

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků metodou
plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Bc. Ondřej Kačerovský

Diplomová práce

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ondřej Kačerovský**
Osobní číslo: **C20474**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí**
Téma práce anglicky: **Determination Of Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons By Gas Chromatography With Mass Detection**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Možnosti stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích, zaměření se na metody GC-MS.
Příprava vzorku před vlastní analýzou.

Experimentální část:

Příprava vzorků pro analýzu polycyklických aromatických uhlovodíků metodou GC-MS.
Validace metody GC-MS pro stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků v různých vzorcích.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Michal Kopčil**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č.121/2000Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60odst.1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s §47 b zákona č.111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019. Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 5.5. 2022

Bc. Ondřej Kačerovský v. r.

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce panu prof. Mgr. Romanovi Kand'árovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Michalovi Kopčilovi za jejich odborné rady, vstřícnost, ochotu a čas, který mi věnovali při zpracování této práce.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá zavedením metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků v receptorové tekutině, procházející přes kůži transdermální absorpcí. Teoretická část této práce se zaměřuje na základní popis polycyklických aromatických uhlovodíků, jako jsou jejich fyzikální vlastnosti, zdroje šíření do okolí a metabolismus, až po jejich toxikologické vlastnosti a účinek na lidský organismus. V praktické části jsou testovány validační parametry metody jako je linearita, přesnost a výtěžnost.

KLÍČOVÁ SLOVA

polycyklické aromatické uhlovodíky, plynová chromatografie s hmotností detekcí, kůže, transdermální absorpce, receptorová tekutina

TITLE

Determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by gas chromatography with mass detection

ANNOTATION

This thesis deals with the evaluation and validation of the gas chromatography method with mass detection for the determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in the receptor fluid, passing through the skin by transdermal absorption. The theoretical part of this thesis focuses on the basic description of polycyclic aromatic hydrocarbons, such as their physical properties, sources of spread to the environment and metabolism, to their toxicological properties and effect on the human body. In the practical part, validation parameters such as linearity, precision and recovery are tested.

KEYWORDS

polycyclic aromatic hydrocarbons, gas chromatography with mass detection, skin, transdermal absorption, receptor fluid

OBSAH

ÚVOD	15
1. TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky	16
1.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti polycyklických aromatických uhlovodíků.....	19
1.2 Zdroj polycyklických aromatických uhlovodíků v životním prostředí 21	
1.2.1 Přírodní zdroje	21
1.2.2 Antropogenní zdroje.....	21
1.3 Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků	23
1.3.1 Cytochrom P450 a epoxidhydrólázová dráha	24
1.3.2 Cytochrom P450 peroxidázová dráha	26
1.3.3 Aldo-ketoreduktázová dráha	26
1.3.4 Detoxikace polycyklických aromatických uhlovodíků	27
1.4 Toxikologické vlastnosti polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich dopad na lidské zdraví.....	27
1.4.1 Akutní nebo krátkodobé účinky polycyklických aromatických uhlovodíků na zdraví člověka.....	28
1.4.2 Chronické nebo dlouhodobé účinky polycyklických aromatických uhlovodíků na zdraví člověka.....	29
1.4.3 Karcinogenita polycyklických aromatických uhlovodíků.....	30
1.4.4 Oxidativní stres způsobený polycyklickými aromatickými uhlovodíky.....	31
1.4.5 Teratogenita a abnormality v lidské reprodukci způsobené polycyklickými aromatickými uhlovodíky	32
1.4.6 Vliv polycyklických aromatických uhlovodíků na imunitní systém.....	32
1.4.7 Biomarkery polycyklických aromatických uhlovodíků	33

1.5	Metody stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v biologických vzorcích	34
1.5.1	Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích lidské krve	35
1.5.2	Stanovení metabolitů polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích moči	37
1.6	Dermální absorpce polycyklických aromatických uhlovodíků.....	39
1.6.1	<i>Stratum corneum</i>	40
1.6.2	Transdermální absorpce	41
1.6.3	Metody stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků po absorpci kůží.....	42
1.6.4	Polycyklické aromatické uhlovodíky obsažené v kamenouhelném dehtu	44
2.	CÍL PRÁCE	45
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
3.1	Materiál	46
3.1.1	Seznam chemikálií	46
3.1.2	Seznam přístrojů a pomůcek	46
3.1.3	Pracovní roztoky.....	47
3.2	Příprava směsných standardů polycyklických aromatických uhlovodíků pro jednotlivé kalibrační křivky	50
3.2.1	Příprava směsných standardů polycyklických aromatických uhlovodíků pro sestavení kalibrační křivky I	50
3.2.2	Příprava směsných standardů polycyklických aromatických uhlovodíků pro sestavení kalibrační křivky II.....	51
3.2.3	Příprava směsných standardů deuterovaných polycyklických aromatických uhlovodíků pro sestavení kalibrační křivky III.....	52

3.3	Postup přípravy vzorků pro stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků v receptorové tekutině metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	53
3.3.1	Příprava kalibračních standardů pro sestavení kalibrační křivky ...	53
3.3.2	Příprava vzorků pro určení přesnosti metody.....	54
3.3.3	Příprava vzorků pro určení výtěžnosti metody.....	54
3.4	Podmínky pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	54
3.5	Analytické parametry metody	55
3.5.1	Linearita metody.....	55
3.5.2	Přesnost metody	56
3.5.3	Správnost metody	56
3.6	Zpracování výsledků	57
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	58
4.1	Optimalizace metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků v receptorové tekutině	60
4.1.1	MS podmínky	60
4.1.2	Odpařování hexanu z extraktu.....	61
4.1.3	Receptorová tekutina.....	62
4.1.4	Příprava vzorků pro analýzu a možnost detekce.....	62
4.2	Validace metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	63
4.3	Analytické parametry metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků v receptorové tekutině.....	63
4.3.1	Linearita.....	63
4.3.2	Přesnost metody	66
4.3.3	Výtěžnost metody.....	66
5.	ZÁVĚR	69

6.	SEZNAM LITERATURY	70
7.	PŘÍLOHY	80

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Chemické struktury 16 prioritních PAH.....	17
Obrázek 2: Antropogenní zdroje PAH a jejich šíření do životního prostředí ..	22
Obrázek 3: Tři biotransformační dráhy benzo[a]pyrenu .	25
Obrázek 4: Vývojový diagram znázorňující krátkodobé a dlouhodobé účinky PAH na lidské zdraví.	29
Obrázek 5: Rozdíl mezi oblastmi bay a fjordu ve dvou konformacích PAH....	30
Obrázek 6: Strukturní vzorec 1-hydroxypyrenu	37
Obrázek 7: Stavba pokožky.....	40
Obrázek 8: Cesty perkutánní absorpce látek	41
Obrázek 9: Franzova komůrka	43
Obrázek 10: Graf kalibračních křivek I vybraných PAH.....	64
Obrázek 11: Graf kalibračních křivek II vybraných PAH.....	65
Obrázek 12: Graf kalibračních křivek III vybraných deuterovaných PAH.....	65
Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti 16 prioritních PAH	20
Tabulka 2: Hlavní enzymy podílející se na biotransformaci PAH.....	23
Tabulka 3: Typ matrice vzorku, koncentrace PAH, metoda extrakce a činidla, metoda purifikace vzorku, analytická metoda a citlivost metody.....	36
Tabulka 4: Příprava pracovních roztoků směsi PAH pro kalibrační řadu I	50
Tabulka 5: Příprava kalibračních standardů pro sestavení kalibrační křivky I. 51	
Tabulka 6: Příprava pracovních roztoků směsi PAH pro kalibrační řadu II	51
Tabulka 7: Příprava kalibračních standardů pro sestavení kalibrační křivky II 52	
Tabulka 8: Příprava pracovních roztoků směsi deuterovaných PAH pro kalibrační řadu III.....	52
Tabulka 9: Příprava kalibračních standardů pro sestavení kalibrační křivky III 53	
Tabulka 10: Retenční časy a poměry hmotnosti k náboji (m/z) PAH určených metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	55
Tabulka 11: Porovnání zvolených hodnot m/z iontů s prací Cheng a kol.....	61
Tabulka 12: Parametry kalibračních křivek I	64
Tabulka 13: Parametry kalibračních křivek II.....	64
Tabulka 14: Parametry kalibračních křivek III (deuterované PAH)	65

Tabulka 15: Přesnost metody pro stanovení vybraných PAH.....	66
Tabulka 16: Parametry výtěžnosti metody pro naftalen.....	67
Tabulka 17: Parametry výtěžnosti metody pro fenanthren.....	67
Tabulka 18: Parametry výtěžnosti metody pro pyren.....	67
Tabulka 19: Parametry výtěžnosti metody pro benzo[a]pyren.....	68

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

1-OHP	1-hydroxypyren
ACN	acetonitril
AHR	arylový uhlovodíkový receptor, (z angl. <i>aryl hydrocarbon receptor</i>)
AKR	aldo-keto-reduktáza
BaP	benzo[a]pyren
BC	černý uhlík, (z angl. <i>black carbon</i>)
BSA	bovinní sérový albumin
CYP	cytochrom P450
DLLME	disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (z angl. <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
EH	epoxidhydroláza
FID	plamenově ionizační detektor, (z angl. <i>flame ionization detector</i>)
FSH	folikulostimulační hormon, folitropin
GnRH	gonadoliberin
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (z angl. <i>gas chromatography–mass spectrometry</i>)
GST	gluthation-S-transferáza
GSH	gluthation
HMW PAH	vysokomolekulární polycyklické aromatické uhlovodíky, (z angl. <i>high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons</i>)
HPLC-FLD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (z angl. <i>high-performance liquid chromatography with fluorescence detection</i>)
CHRY-D ₁₂	chrysen- d ₁₂
IARC	mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (z angl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IS	vnitřní standard, (z angl. <i>internal standard</i>)

LH	luteinizační hormon, lutropin
LLE	extrakce kapalina-kapalina (z angl. <i>liquid-liquid extraction</i>)
LMW PAH	nízkomolekulární polycyklické aromatické uhlovodíky, (z angl. <i>low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons</i>)
MAE	mikrovlnná extrakce (z angl. <i>microwave assisted extraction</i>)
NAP	naftalen, (z angl. <i>naphthalene</i>)
NAP-d ₈	naftalen d ₈
OH-PAH	monohydroxylované PAH
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky, (z angl. <i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i>)
PBS	fosfátový pufr
PER-d ₁₂	perylen d ₁₂
PHE	fenanthren, (z angl. <i>phenanthrene</i>)
PHE- d ₁₀	fenanthren d ₁₀
PLE	extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (z angl. <i>pressurized liquid extraction</i>)
PYR	pyren
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku, (z angl. <i>reactive oxygen species</i>)
RT	receptorová tekutina
SC	<i>stratum corneum</i>
SFE	superkritická fluidní extrakce (z angl. <i>supercritical fluid extraction</i>)
SULT	sulfotransferáza
SPE	extrakce tuhou fází (z angl. <i>solid-phase extraction</i>)
SPME	mikroextrakce na pevné fázi (z angl. <i>solid-phase microextraction</i>)
TOC	celkový organický uhlík, (z angl. <i>total organic carbon</i>)
UGT	UDP-glukoronosyltransferáza
USE	extrakce podpořená ultrazvukem (z angl. <i>ultrasound extraction</i>)

ÚVOD

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou většinou bezbarvé, bílé nebo světle žluté pevné látky. Jedná se o skupinu několika stovek chemicky příbuzných sloučenin, perzistentních vůči životnímu prostředí s různými strukturami a různou toxicitou. PAH jsou tedy všudypřítomné látky znečišťující životní prostředí vznikající především při nedokonalém spalování organických materiálů (např. uhlí, ropy, benzínu a dřeva).

Za mechanismus toxicity je považována interference s buněčnou membránou a také s enzymatickými systémy, které jsou s membránou spojeny. Bylo prokázáno, že PAH mohou mít karcinogenní a mutagenní účinky, jsou taktéž považovány za silná imunosupresiva. PAH do těla pronikají několika cestami, a to cestou inhalační, perorální a dermální. Vzhledem k rozšířené přítomnosti PAH v životním prostředí a jejich toxikologickým vlastnostem, je posouzení expozice PAH velice důležité, a to jak pro pracovníky (např. podílející se na výrobě metalurgického koksu a hliníku), tak pro obecnou populaci. Za tímto účelem se obvykle provádí biologické monitorování, které umožňuje kvantifikovat celkový příjem PAH do těla respirační, dermální a gastrointestinální cestou. Metabolit pyrenu 1-hydroxypyren v moči je považován za jeden z nejdůležitějších biomarkerů expozice PAH.

Některé studie prokazují, že v pracovním prostředí by se mělo možné dermální expozici PAH připisovat stejná váha, jako expoziční inhalační cestě. Kůže je považována z toxikologického hlediska za jednu z významných cest škodlivých látek do organismu.

1. TEORETICKÁ ČÁST

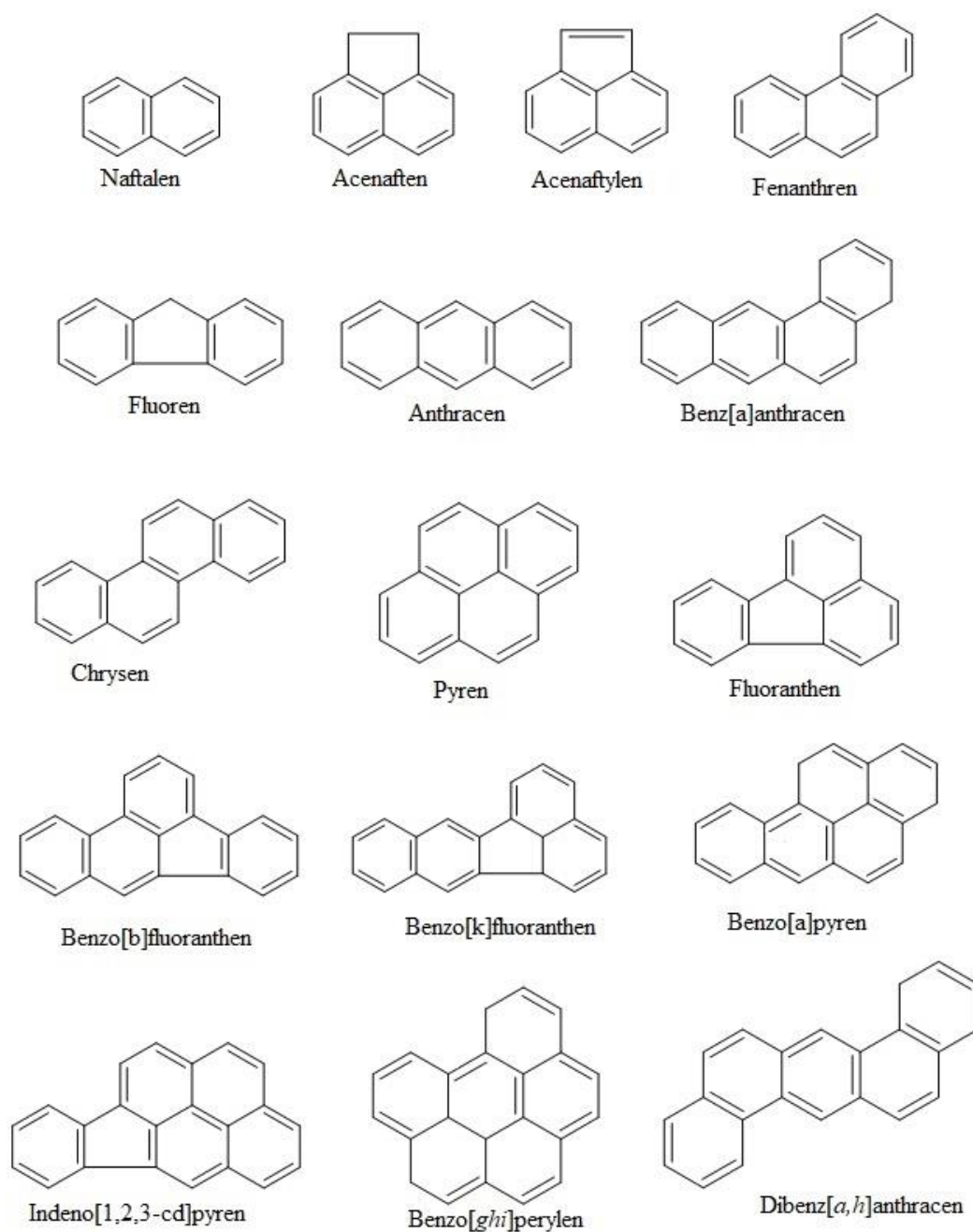
1.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky

PAH jsou chemické sloučeniny obsahující pouze atomy uhlíku a vodíku, skládající se ze dvou nebo více kondenzovaných aromatických kruhů, které mohou být substituovány, typicky od naftalenu ($C_{10}H_8$, dva aromatické kruhy) až po korunen ($C_{24}H_{12}$, sedm aromatických kruhů) s molekulovou hmotností v rozmezí od 128 do 278 Da. PAH jsou v zásadě rozděleny do dvou skupin: nízkomolekulární PAH (LMW PAH) a vysokomolekulární PAH (HMW PAH). LMW PAH (např. naftalen, acenaften, acenaftylen, fluoren, anthracen, fenanthren) mají základní strukturu dvou až tří benzenoidních kruhů (šestistranné aromatické kruhy uhlíku), zatímco HMW PAH mají molekulární strukturu čtyř nebo více benzenoidních kruhů (např. fluoranthen, pyren, benzo[a]pyren a benzofluorantheny). Hydrofobicita, tendence k akumulaci v organismu, odolnost vůči biodegradaci a celková perzistence v životním prostředí se obecně zvyšují s rostoucí molekulovou hmotností. Alkylované PAH, které vznikají diagenetickými procesy, jsou toxičtější než mateřské sloučeniny. Obvykle koexistují se svými mateřskými sloučeninami v matricích životního prostředí (*Brazkova a kol., 2013*).

PAH vznikají spalováním organické hmoty a z tohoto důvodu jsou přítomny v různých koncentracích jako běžné znečišťující látky v domácnosti a pracovním prostředí. Jsou hlavními organickými látkami znečišťující životní prostředí, pro člověka jsou pro své karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky nebezpečné. PAH obecně mohou mít dráždivé účinky a způsobit respirační onemocnění, některé z nich jsou Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny klasifikovány jako možné nebo pravděpodobné karcinogeny pro člověka. Více než 80 % z celkového množství PAH, které působí škodlivě na životní prostředí a lidské zdraví, lze připsat 16 prioritním PAH (*Obrázek 1*) (*Kumar a kol., 2014*).

Vzhledem k významnému rozšíření PAH v životním prostředí a jejich toxickým vlastnostem je hodnocení expozice PAH důležité jak pro pracovníky (např. zabývající se výrobou hutního koksu, hliníku, uhlíkových elektrod, asfaltáře), tak pro běžnou populaci. Proto se obvykle provádí monitoring, který umožňuje kvantifikovat celkový příjem PAH do těla dýchacími, dermálními a gastrointestinálními cestami. Po expozici jsou PAH v organismu nejprve oxidovány, poté redukovány nebo podléhají hydrolyze (fáze I biotransformace xenobiotik), hydroxylované metabolity mohou být dále konjugovány

nebo sulfatovány (fáze II biotransformace xenobiotik) a vyloučeny močí nebo stolicí (Campa a kol., 2008).



Obrázek 1: Chemické struktury 16 prioritních PAH

Obecnou charakteristikou PAH je vysoký bod tání a varu, nízká tenze par a velmi nízká rozpustnost ve vodě. Poslední dvě vlastnosti mají tendenci klesat s rostoucí molekulovou hmotností, naopak roste odolnost proti oxidaci a redukci. Rozpustnost PAH ve vodě klesá s každým dalším aromatickým kruhem. PAH jsou velmi dobře rozpustné v organických rozpouštědlech, protože jsou vysoce lipofilní. PAH také vykazují další vlastnosti, jako je citlivost na světlo, tepelná odolnost a odolnost proti jejich přeměně v organismu. PAH vykazují charakteristická UV absorpční spektra. Každá kruhová struktura má jedinečné UV spektrum, takže každý izomer má v UV oblasti jiné spektrum. To je užitečné zejména při identifikaci PAH. Většina PAH také fluoreskuje (*Kaminski a kol., 2008*).

Hlavním zdrojem PAH je nedokonalé spalování organických materiálů, jako je uhlí, ropa a dřevo. PAH nejsou chemicky syntetizované pro průmyslové účely. Nicméně existuje několik komerčních využití některých PAH. Většinou se používají ve farmaceutickém, zemědělském, fotografickém a chemickém průmyslu, termosetových plastech a lubrikačních materiálech. Obecné použití některých PAH je následující:

- *Acenaften*: výroba pigmentů, barviv, plastů, pesticidů a léčiv
- *Anthracen*: ředidlo pro ochranné prostředky na dřevo, výrobu barviv a pigmentů
- *Fluoranthen*: výroba agrochemikálií, barviv a léčiv
- *Fluoren*: výroba léčiv, pigmentů a barviv
- *Fenanthren*: výroba pryskyřic a pesticidů
- *Pyren*: výroba pigmentů

Jiné PAH mohou být obsaženy v asfaltu používaném pro výstavbu silnic. Dále se používají specifické rafinované produkty z konkrétních PAH také v oblasti elektroniky (*Hussein a kol., 2016*).

1.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti polycyklických aromatických uhlovodíků

Rozpustnost PAH ve vodě obecně klesá s rostoucí molekulovou hmotností, zatímco jejich bod varu a tání se zvyšuje. Aromatické uhlovodíky se čtyřmi a pěti jádry, jako je chrysen a benzo[a]pyren, jsou prakticky nerozpustné ve vodě. Rozpustnost se také snižuje s rostoucí strukturou jader, se zvyšujícím se stupněm substituce, poklesem tenze par a zvyšováním molekulové hmotnosti. Molekuly s lineárním uspořádáním jsou méně rozpustné ve vodě. Například anthracen je ve vodě méně rozpustný v porovnání s fenantrenem. Nahrazení aromatického kruhu alkylem rovněž vede k celkovému snížení rozpustnosti PAH, i když existují určité výjimky, např. benz[a]anthracen je méně rozpustný než methyl- nebo ethylbenz[a]anthracen. Rozpustnost PAH ve vodě je trojnásobně až čtyřnásobně zvýšena zvýšením teploty z 5 na 30 °C (*Kafilzadeh a kol., 2011*).

PAH ve vodním prostředí mají tendenci rychle se vázat na částice nebo organické látky. V sedimentech jsou PAH mnohem stabilnější než v čistém stavu a jsou odolnější vůči oxidačním a nitračním reakcím. Většina PAH je málo těkavá. Některé procesy, jako je fotooxidace, hydrolyza, biotransformace, biodegradace a mineralizace, vedou k transformaci PAH na jiné látky. Podobně další činnosti, jako je akumulace v organismu, adsorpce a desorpce jsou zodpovědné za cyklování PAH. PAH s vysokou molekulovou hmotností jsou ve vodě většinou degradovány působením světla (*Kumar a kol., 2014*).

Celkový organický uhlík (TOC) a černý uhlík (BC) hrají důležitou úlohu při sekvestraci PAH v půdě a sedimentech, a to navzdory jejich relativně nízké hladině v životním prostředí. Sorpce PAH do půdy a sedimentů se zvyšuje se zvyšujícím se obsahem organického uhlíku a se zvětšující se povrchovou plochou částic. Koncentrace PAH se proto v konkrétních částech sedimentu liší. Jedna ze studií uvádí, že nejvyšší celková koncentrace PAH byla zjištěna ve frakci o velikosti 250–500 µm, zatímco maximální hladina jednotlivých PAH byla zjištěna ve frakci o velikosti 250–500 µm nebo 500–2000 µm (*Li a kol., 2010*).

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti 16 prioritních PAH

PAH	Vzorec	Molekulová hmotnost [g/mol]	Rozpustnost ve vodě [mg/l]	Bod tání [°C]	Bod varu [°C]	Tenze par [mmHg]	*Toxicita podle IARC
Naftalen	C ₁₀ H ₈	128,17	31	80,26	218	0,087	2B
Acenaften	C ₁₂ H ₁₀	154,21	44776	95	96	4,47 10 ⁻³	3
Acenaftylen	C ₁₂ H ₈	152,20	44577	92–93	265–275	0,029	3
Anthracen	C ₁₀ H ₁₀	178,23	0,045	218	340–342	1,75 × 10 ⁻⁶	3
Fenanthren	C ₁₄ H ₁₀	178,23	44562	100	340	6,8 × 10 ⁻⁴	3
Fluoren	C ₁₃ H ₁₀	166,22	44805	116–117	295	3,2 × 10 ⁻⁴	3
Fluoranthen	C ₁₆ H ₁₀	202,26	0,26	110,8	375	5,0 × 10 ⁻⁶	3
Benzo[a]anthracen	C ₂₀ H ₁₂	228,29	0,011	158	438	2,5 × 10 ⁻⁶	2B
Chrysen	C ₁₈ H ₁₂	228,29	0,0015	65	448	6,4 × 10 ⁻⁹	2B
Pyren	C ₁₆ H ₁₀	202,26	0,132	156	393–404	2,5 × 10 ⁻⁶	3
Benzo[a]pyren	C ₂₀ H ₁₂	252,32	0,0038	179–179,3	495	5,6 × 10 ⁻⁹	1
Benzo[b]fluoranthen	C ₂₀ H ₁₂	252,32	0,0015	168,3	–	5,0 × 10 ⁻⁷	2B
Benzo[k]fluoranthen	C ₂₀ H ₁₂	252,32	0,0008	215,7	480	9,59 × 10 ⁻¹¹	2B
Dibenz[a,h]anthracen	C ₂₂ H ₁₄	278,35	0,0005	262	–	1 × 10 ⁻¹⁰	2A
Benzo[g,h,i]perylene	C ₂₂ H ₁₂	276,34	0,00026	273	550	1,03 10 ⁻¹⁰	3
Indeno[1,2,3-cd] pyren	C ₂₂ H ₁₂	276,34	0,062	163,6	530	10–10–10– 16	2B

*Toxicita podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC): karcinogen skupiny 1 u lidí, pravděpodobný karcinogen skupiny 2A u lidí, možný karcinogen skupiny 2B u lidí a skupina 3 neklasifikovatelný jako karcinogen u lidí.

Obsah organického uhlíku závisí na zeměpisné poloze, znečišťujících látkách vstupujících do řek, hodnotě pH a hloubce vrstev testovaných sedimentů. Vzorky sedimentů s nejnižší hodnotou pH zaznamenaly nejmenší množství organického obsahu. Asociace PAH s pevnou fází závisí na jejich molekulové hmotnosti a rozdělovacím koeficientu oktanol-voda. Mezi 16 prioritními PAH EPA jsou nejdůležitějšími kontaminanty v půdě fenanthren, fluoranthen, benzo[a]anthracen, chrysen, benzo[b&k]fluoranthen, benzo[a]pyren a indeno[1,2,3-cd]pyren. (*Niemirycz a kol., 2006*).

1.2 Zdroj polycyklických aromatických uhlovodíků v životním prostředí

PAH vstupují do ústí řek, jezer a říčního prostředí z ropných skvrn, vypouštěním průmyslových a komunálních odpadních vod, odtoku městské a příměstské dešťové vody, chemických rafinérií, rekreačních a komerčních lodí, sopek a atmosférického spadu výfukových plynů vozidel. Jejich původ je tedy z přírodních i antropogenních zdrojů (*Tornero a kol., 2014*).

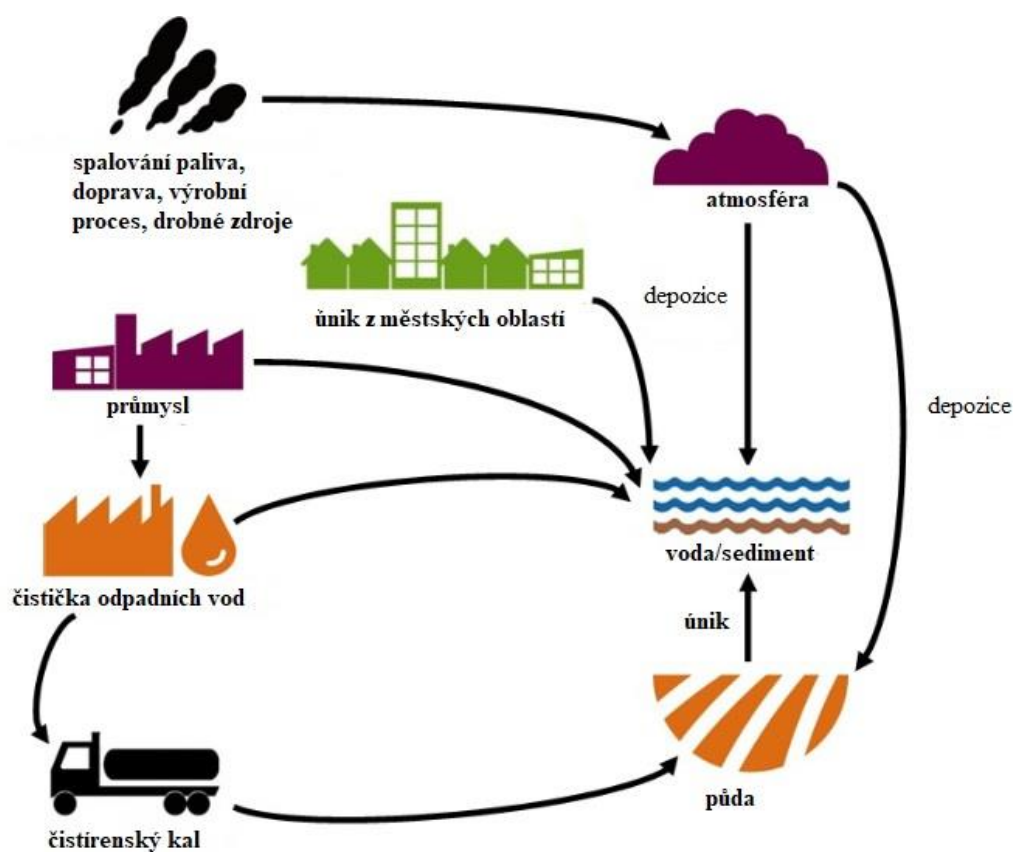
1.2.1 Přírodní zdroje

Mezi přírodní zdroje patří ropné průsaky, lesní požáry, préríjní požáry, zemědělské spalování a transformace biogenních prekurzorů. Skutečné množství PAH z těchto zdrojů se liší podle typu spáleného organického materiálu, typu, povahy a intenzity požáru. PAH z požárů mají tendenci saturovat suspendované částice, a nakonec vstupovat do suchozemského a vodního prostředí jako atmosférický spad. Ošetřené dřevo bylo také uznáno jako zdroj PAH ve vodě a sedimentech. Mezi další přírodní zdroje patří sopky, rostliny, houby a bakterie (*Brazkova a kol., 2013*).

1.2.2 Antropogenní zdroje

Antropogenní zdroje jsou v podstatě děleny do dvou skupin, a to na pyrolytické a petrogenní. Pyrolytické zdroje zahrnují spalovací procesy (např. spalování fosilních paliv, výroba elektrické energie, spalování odpadů, vytápění domácností a průmyslové emise), zatímco petrogenní zdroje úzce souvisí s úniky ropných produktů (např. úniky ropy, materiálů pro stavbu silnic, výroba koksu, sazí, uhelného dehtu a asfaltu) (*Obrázek 2*).

Některé zdroje PAH mají dominanci jak pyrogenních, tak petrogenních typů v důsledku složitých procesů zapojených do vzniku typu zdroje PAH. Kliková hřídel a s ní spjaté mazací oleje používané například ve spalovacích motorech obsahují různé petrogenní PAH. Složení PAH se však mění s použitím oleje, protože se zvýšeným používáním se hromadí různé PAH v důsledku spalování. Zbytky uhelného dehtu z bývalých zařízení na výrobu plynu (MGP) mají tendenci mít velmi složité a vysoce variabilní složení PAH, protože uhelný dehet se dříve vyráběl spalováním uhlí nebo koksů obsahujících PAH za vzniku uhelného plynu jako zdroje tepla a světla. Jak už bylo řečeno, PAH tedy ve vodě podléhají distribuci a akumulaci mezi vodním sloupcem, suspendovanými částicemi, sedimenty na dně a biotou (Oluseyi a kol., 2011).



Obrázek 2: Antropogenní zdroje PAH a jejich šíření do životního prostředí (Neff a kol., 2005)

1.3 Metabolismus polycyklických aromatických uhlovodíků

Po vstupu do těla PAH snadno procházejí buněčnými membránami prostřednictvím pasivní difúze v důsledku jejich lipofilních vlastností. Rodičovské molekuly PAH, které vstupují do buněk, přímo nevyvolávají poškození DNA. Jsou to elektrofilně reaktivní meziproducty, které vznikají enzymatickou konverzí PAH, ty jsou toxické, mutagenní a karcinogenní. Biologická aktivita různých PAH souvisí s jejich strukturou. Obecně mezi nejúčinnější karcinogenní a mutagenní PAH patří ty, které obsahují 4 až 6 aromatických jader (Moorthy a kol., 2015).

PAH jdou dále detoxikovány a následně eliminovány vylučovacími cestami, a to jak močí, tak stolicí. Přeměna chemicky inertních PAH na hydrofilní deriváty vyžaduje aktivaci a spolupráci několika enzymů. V tabulce 2 jsou uvedeny hlavní enzymy zapojené do biotransformace PAH (Alexandrov a kol., 2010).

Tabulka 2: Hlavní enzymy podílející se na biotransformaci PAH

Enzym	cíl	funkce	funkční mechanismus
cytochrom P450 (CYP, zejména CYP1A1, CYP1A2, a CYP1B1)	PAH	aktivace	oxidace aromatické C-C dvojně vazby na odpovídající arenoxid (epoxid)
epoxidhydroláza (EH)	PAH	aktivace	hydrolýza epoxidů PAH na <i>trans</i> -dihydrodioly
peroxidázy	PAH	aktivace	jednoelektronová oxidace PAH
aldo-ketoreduktázy (AKR)	PAH	aktivace	přeměna <i>trans</i> -dihydrodiolů PAH na reaktivní <i>o</i> -chinony PAH, vytvářejí adukty s DNA
NAD(P)H-chinonoxidoreduktáza 1 (NQO1)	PAH	aktivace	dvouelektronová redukce různých substrátů, např. přeměna <i>o</i> -chinonu PAH na hydrochinony PAH
glutathion-S-transferázy (GST)	diolepoxidy PAH	detoxikace	konjugace s glutathionem (GSH)
UDP-glukuronosyltransferázy (UGT)	monohydroxylované metabolity PAH	detoxikace	glukuronidace
sulfotransferázy (SULTS)	katecholy PAH	detoxikace	sulfátová konjugace

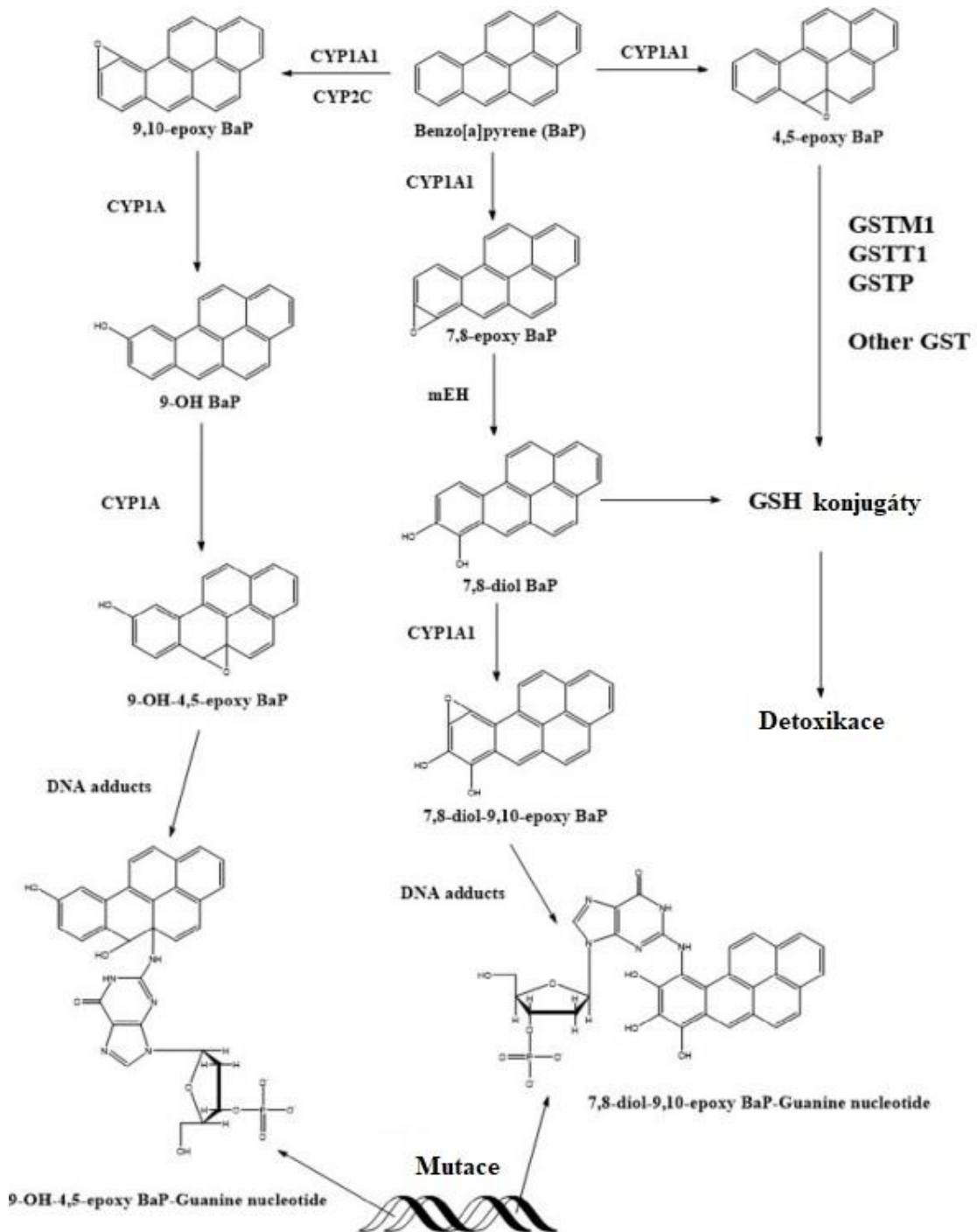
První fáze biotransformace PAH zahrnuje oxidační (epoxidační) reakce, které jsou primárně katalyzovány cytochromem P450 (CYP). Vzniklé deriváty PAH pak mohou vstoupit do fáze II biotransformace, což jsou konjugační reakce s polárními endogenními molekulami, jako je glutathion (GSH), kyselina glukuronová, sulfát a kyselina octová. Pro PAH jsou popsány tři hlavní metabolické dráhy: 1. CYP1A1/1B1 a epoxidhydrolázová (CYP/EH); 2. CYP peroxidázová; a 3. aldo-ketoreduktázová (AKR) (Gao a kol., 2018).

1.3.1 Cytochrom P450 a epoxidhydrolázová dráha

CYP tvoří přibližně 75 % veškerých enzymů, které metabolizují různá xenobiotika, kterým jsou lidé vystaveny v každodenním životě. CYP jsou tedy hlavními metabolickými enzymy, které katalyzují oxidaci organických látek, jako jsou PAH. Rodiny CYP1, 2 a 3 jsou zodpovědné za biotransformaci většiny xenobiotik, konkrétně CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 hrají zásadní úlohu v aktivaci PAH. Studie založené na modelu *Salmonella typhimurium* kmene NM2009 uvádí, že CYP1A1 a CYP1B1 katalyzují oxidaci několik PAH mnohem rychleji než ostatní enzymy P450, jako jsou CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 a CYP2C19. Cesta CYP/EH je nejběžnější biotransformační cestou pro homocyklické a heterocyklické PAH. V této dráze zvyšují PAH expresi CYP prostřednictvím vazby na arylový uhlovodíkový receptor (AHR). AHR je ligandem aktivovaný transkripční faktor, na který se vážou různá xenobiotika z životního prostředí a potravin, včetně dioxinů a PAH (Shimada a kol., 2001).

Obecně cesta CYP/EH probíhá ve třech enzymaticky katalyzovaných krocích. Nejprve je aromatická dvojná vazba C-C oxidována za katalýzy CYP na odpovídající arenoxid (epoxid). Dále je epoxid hydrolyzován za katalýzy EH za vzniku *trans*-dihydrodiolu. V závěrečném kroku dochází k další epoxidaci na sousední dvojně vazbě, výsledkem je vznik vicinálních diolepoxidů, což jsou karcinogenní metabolity PAH. Reakční produkty mohou mít různé prostorové tvary v závislosti na druhu PAH a zúčastněných enzymů CYP. Benzo[a]pyren (BaP) použijeme jako názorný příklad. BaP je transformován na BaP-7,8-epoxid prostřednictvím CYP1A1 nebo CYP1B1 a dále je oxidován EH za vzniku BaP-7,8-dihydrodiolu, následuje poslední krok reakce

katalyzovaný CYP (např. CYP1A1, CYP1B1 a CYP3A4), vzniká BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BaPDE) (Obrázek 3) (Benigni a kol., 2011).



Obrázek 3: Tři biotransformační dráhy benzo[a]pyrenu (Ewa a kol., 2016)

1.3.2 Cytochrom P450 peroxidázová dráha

Peroxidázy patří mezi hlavní antioxidační enzymy, které se hojně vyskytují v rostlinách, živočiších a mikroorganismech. Peroxidázy katalyzují oxidaci celého spektra substrátů a zároveň katalyzují dismutaci H_2O_2 . Peroxidázová aktivita CYP je v jednoelektronové oxidaci PAH, peroxidáza závislá na H_2O_2 nebo prostaglandin-H-syntáza jsou také schopné generovat vysoce reaktivní radikálové kationty (*Bilal a kol., 2018*).

Pouze PAH s nízkým ionizačním potenciálem ($<7,35$ eV) mohou být aktivovány CYP peroxidázovou dráhou. Kovalentní interakce mezi nukleofilem a určitými PAH probíhají v centrech uhlovodíku s velmi vysokou elektronovou hustotou, například v poloze 6 v BaP nebo v benzyly v methylovaných PAH, jako je 6-methyl-BaP. Radikálové kationty PAH mohou reagovat s DNA a vést ke vzniku rakoviny (*Sen a kol., 2013*).

1.3.3 Aldo-ketoreduktázová dráha

AKR jsou cytosolové monomerní oxidoreduktázy, které zahrnují více než 190 proteinů. Jako biotransformační enzymy fáze I, katalyzují AKR redukci různých xenobiotik, která obsahují aldehydickou a ketoskupinu za vzniku alkoholu. V případě PAH to jsou AKR1C a AKR1A, které jsou zapojené do jejich biotransformace. Kromě sekundární epoxidační reakce mohou být *trans*-dihydrodioly také enzymaticky přeměněny na redox aktivní chininy PAH-chinonoxidoreduktázou (NAD(P)H)-dependentní AKR. AKR mohou také redukovat *o*-chinony PAH za vzniku katecholů PAH (*Zhang a kol., 2012*).

V AKR dráze jsou případné karcinogeny PAH, *trans*-dihydrodioly (např. BaP- 7,8-*trans*-dihydrodiol), oxidovány AKR za vzniku ketolů, které se pak spontánně přeměňují na katecholy (např. BaP-7,8-katechol). Další oxidací katecholů vznikají *o*-chinony. Například BaP-7,8-katechol není stabilní a podléhá autooxidaci za vzniku BaP-7,8-dionu. *o*-Chinony PAH mohou reagovat s DNA za vzniku jak stabilních, tak „depurinačních“ aduktů, což může vést k mutagenезi. Redoxní cyklus chinonů může navíc vytvářet reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS), které mohou vést k oxidativnímu poškození DNA. Nicméně *o*-chinony PAH mohou snadno tvořit s thioley konjugáty, které jsou pak následně eliminovány a vyloučeny z těla (*Abedin a kol., 2012*).

1.3.4 Detoxikace polycyklických aromatických uhlovodíků

Nukleofilní metabolity PAH mohou být konjugovány s kyselinou glukuronovou, sulfáty a glutathionem za katalýzy UDP-glukuronosyltransferáz (UGT), sulfotransferáz (SULT) a glutathion-S-transferáz (GST). Většina konjugátů PAH je eliminována z organismu stolicí nebo močí. Zvýšená exprese enzymů CYP hraje klíčovou úlohu při detoxikaci xenobiotik, včetně PAH, a to navzdory skutečnosti, že CYP po expozici PAH katalyzují vznik nestabilních meziproduktů, které mohou vést k poškození DNA (*Manikandan a kol., 2018*).

UGT1 a UGT2 je rodinou enzymů s jedinečnou, ale překrývající se substrátovou specifitou. Podrodiny UGT1A a 2B jsou klíčové pro eliminaci a detoxikaci PAH. Dále bylo zjištěno, že UGT 2A1 a 2A2 mají výrazný vliv na detoxikaci prokarcinogenních monohydroxylovaných metabolitů PAH. Glukuronidové konjugáty jsou tedy dominantními metabolity PAH v moči mnoha savců (*Bushey a kol., 2013*).

GST zahrnují rodinu enzymů, které se uplatňují při detoxikaci mnoha endogenních a xenobiotických elektrofilů. GST a GSH mohou chránit buňky před hydrofobními elektrofilny, které vznikají při biotransformaci PAH. Studie na buněčných kulturách ukázaly, že GSTA1 a GSTA2 jsou účinné při detoxikaci diolepoxydů vznikajících při biotransformaci dibenzo[*a,l*]pyrenu, čímž chrání DNA před poškozením a mutací PAH (*Sundberg a kol., 2002*).

Cytosolické SULT jsou další třídou enzymů uplatňující se při detoxikaci PAH. Tyto enzymy katalyzují sulfátovou konjugaci různých karcinogenů, včetně PAH. Sulfatační reakce může inaktivovat sloučeniny substrátu, produkty jsou více rozpustné ve vodě a jsou odstraněny z těla. Ve srovnání s jinými enzymy, které se uplatňují při detoxikaci PAH, a které jsou exprimovány převážně až v dospělosti, jsou SULT exprimovány již během fetálního období (*Suiko a kol., 2017*).

1.4 Toxikologické vlastnosti polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich dopad na lidské zdraví

Světová zdravotnická organizace uvádí, že 19 % všech nádorových onemocnění lze celosvětově připisat faktorům životního prostředí, tj. chemickým znečišťujícím látkám ve vzduchu, vodě, půdě a biologickým činitelům, včetně jejich expozice na pracovišti. Hlavním zdrojem PAH u běžné populace je vdechování okolního (a vnitřního) vzduchu,

konzumace potravin obsahujících PAH, kouření cigaret nebo dýchání kouře z otevřených krbů. PAH z tabákového kouře jsou považovány za hlavní zdroj karcinogenů u kuřáků. Pro nekuřáky jsou hlavním zdrojem PAH potraviny, např. sušené nebo uzené maso, dále potraviny, které jsou při přípravě vystaveny vysokým teplotám (grilování, opékání a smažení). Některé plodiny (jako je pšenice, žito a čočka) mohou syntetizovat PAH nebo je absorbovat z okolí. K expozici PAH na pracovišti může dojít u pracovníků, kteří dýchají výfukové plyny (jako jsou mechanici, řidiči motorových vozidel nebo hlídači parkovišť) a v neposlední řadě ti, kteří se podílejí na těžbě a zpracování kovů nebo rafinaci ropy (Wang a kol., 2012).

PAH do lidského organismu mohou tedy vstupovat orální cestou (dýchání, příjem potravy), další možností je dermální cesta (kontakt kůže s materiálem obsahujícím PAH). V některých případech se PAH do organismu dostávají více cestami, jako je dermální a inhalační expozice z kontaminovaného vzduchu, což poté ovlivňuje celkovou dávku absorpce PAH. Je tedy prakticky nemožné, aby se člověk v běžném životě vyhnul vystavení stopovým množstvím PAH (Ravindra a kol., 2008).

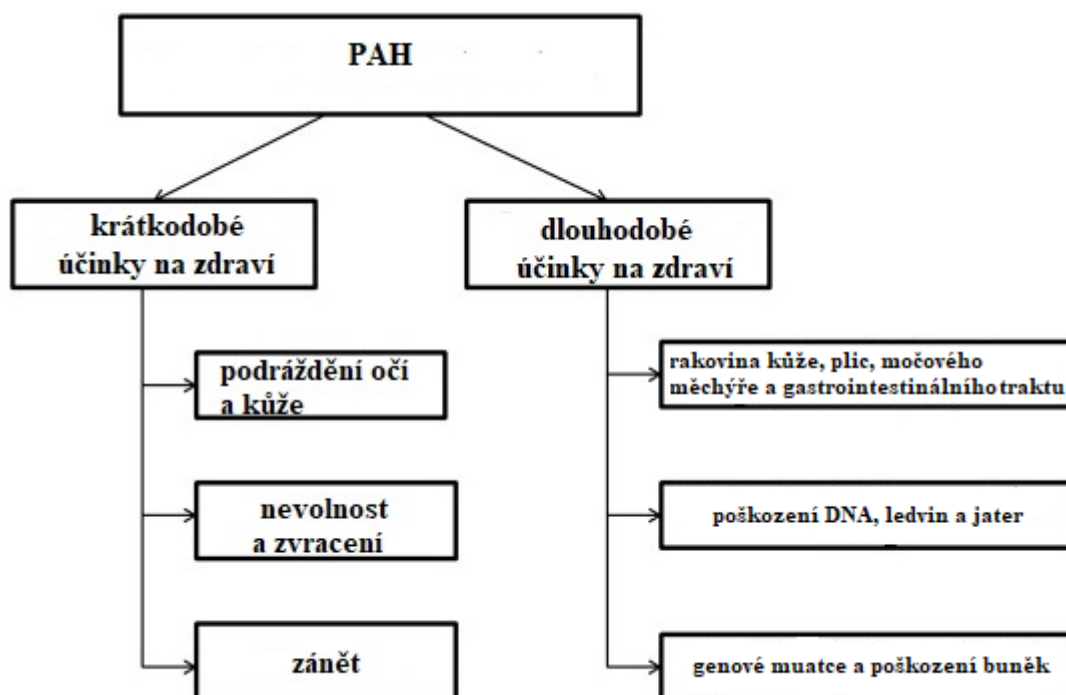
1.4.1 Akutní nebo krátkodobé účinky polycyklických aromatických uhlovodíků na zdraví člověka

Akutní účinky PAH na lidské zdraví závisí především na délce působení PAH na organismus, cestě vstupu do organismu, koncentraci nebo množství a v neposlední řadě na toxicitě konkrétních PAH, kterým byl člověk vystaven. Zároveň je potřeba brát v potaz zejména subjektivní faktory, jako je aktuální zdravotní stav a věk daného člověka. Je známo, že krátkodobá expozice PAH způsobuje poruchu funkce plic u astmatiků a trombotické stavy u lidí postižených ischemickou chorobou srdeční. Není však zcela známo, které konkrétní PAH jsou zodpovědné za tyto účinky (Unwin a kol., 2006).

Je prokázáno, že vystavení vysokým dávkám PAH v pracovním prostředí má za následek zdravotní problémy, jako je podráždění očí, nevolnost, zvracení a průjem. Některé PAH také mohou způsobovat podráždění a záněty pokožky. Zejména anthracen, BaP a naftalen jsou přímé dráždivé látky pro kůži a jsou hlášeny jako senzibilizátory kůže, tj. příčiny alergické kožní reakce u zvířat a lidí (Aguilera a kol., 2010).

1.4.2 Chronické nebo dlouhodobé účinky polycyklických aromatických uhlovodíků na zdraví člověka

U lidí, kteří byli v rámci pracovního procesu každodenně vystavováni působením PAH, byla hlášena řada zdravotních problémů (zvýšené riziko rakoviny kůže, plic, močového měchýře a gastrointestinálního traktu). Dlouhodobá expozice nízkými hladinami některých PAH (např. pyrenu a BaP), byla identifikována jako příčina rakoviny u laboratorních zvířat. Opakovaný kontakt kůže s naftalenem může vést k zarudnutí a zánětu kůže. Taktéž vdechování většího množství naftalenu po delší dobu, může způsobit rozpad červených krvinek a následný rozvoj anémie. PAH mohou interferovat s hormony, taktéž mohou mít škodlivé účinky na reprodukci a imunitní systém a jejich správnou funkci. Mnohými autory bylo také prokázáno poškození DNA vyvolané expozicí PAH. Na obrázku 4 je znázorněno, jaký dopad na lidské zdraví má krátkodobé a dlouhodobé působení PAH (Diggs a kol., 2011).

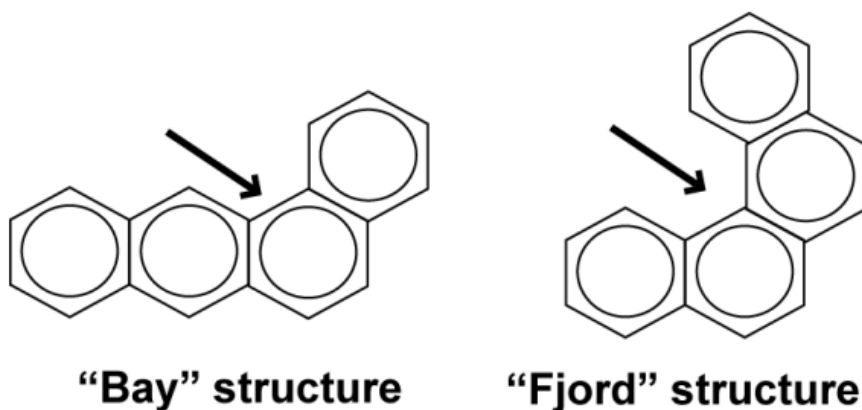


Obrázek 4: Vývojový diagram znázorňující krátkodobé a dlouhodobé účinky PAH na lidské zdraví (Kim a kol., 2013)

1.4.3 Karcinogenita polycyklických aromatických uhlovodíků

Jak již bylo uvedeno, PAH se stávají karcinogenními až poté, co jsou aktivovány enzymy metabolizující xenobiotika na reaktivní produkty, které mohou reagovat s DNA. Změna sekvence DNA v genech regulujících replikaci zvyšuje možnost vzniku rakoviny a dalších onemocnění (*Abdel a kol., 2015*).

Biologická aktivita PAH úzce souvisí s jejich strukturou, která se tvoří mezi kondenzovanými aromatickými kruhy v důsledku regionálních distorzí, označovaných jako oblasti „fjord“ a „bay“ (*Obrázek 5*). Přestože reaktivita PAH závisí na hustotě elektronových nábojů, geometrické deformace v molekulách také značně ovlivňují rozložení náboje a nepřímo reaktivitu konkrétního PAH. PAH s „fjordskými“ oblastmi (např. dibenzo[a,l]pyren) jsou neplanární, v důsledku toho se vážou přednostně na adeninové nukleotidy, tyto oblasti jsou považovány za původce tumorigenicity. Na druhé straně PAH s „bay“ oblastmi (např. BaP) jsou planární, vážou se na guaninové nukleotidy a celkově jsou považovány za méně reaktivní. Zvýšením planarity PAH se snižuje jejich schopnost biotransformace na reaktivní formy, které poté mohou produkovat adukty poškozující DNA. Mezi mutagenní produkty biotransformace PAH patří diolepoxydy, chinony a radikálové kationty PAH, které se mohou vázat na DNA za vzniku objemných komplexů nazývaných adukty DNA. Stabilní DNA adukty zapříčiňují chyby při replikaci DNA, oproti tomu nestabilní adukty DNA reagují s řetězcem DNA odstraněním purinových bází, a to adeninu nebo guaninu (*Ewa a kol., 2016*).



Obrázek 5: Rozdíl mezi oblastmi bay a fjordu ve dvou konformacích PAH

1.4.4 Oxidativní stres způsobený polycyklickými aromatickými uhlovodíky

Jako příklad si opět uvedeme BaP. Deriváty BaP mají schopnost vstupovat do redoxních cyklů a indukovat produkci ROS, čímž způsobují oxidační stres. Radikálové kationty BaP jsou prekurzory pro 6-OH-BaP. Autooxidace tohoto derivátu může vést k tvorbě chinonů BaP, jako je 6-, 12-, 1,6- a 3,6-BaP-dion. Tyto metabolity mohou podléhat redoxnímu cyklování na odpovídající dioly BaP, které jsou zdrojem ROS. Volné radikály reagují s guaninem a způsobují poškození DNA, včetně produkce 7-hydro-8-oxo-20-deoxyguanosinu (8-oxodG) (*Bonner a kol., 2005*).

Rovnováha mezi tvorbou ROS a jejich vychytáváním je zásadní při opravě poškozené DNA. Pokud je rychlost tvorby ROS větší než jejich odstranění, je pravděpodobné, že dojde k většímu poškození DNA. PAH významně absorbují světlo v UV oblasti (280-400 nm), což může vyvolat produkci ROS. Například chrysen navozuje apoptózu a poškození DNA v lidských keratinocytech generováním ROS v reakci na UVB záření (*Ali a kol., 2011*).

1.4.4.1 Mutagenese způsobená polycyklickými aromatickými uhlovodíky

Selhání opravných mechanismů a neustálá expozice PAH indukují v buňkách mutagenese. Tyto mutace jsou přítomny v mnoha genech, včetně těch, které se podílejí na přežití buněk. Zejména mutace genu p53 jsou spojeny s rizikem karcinogeneze u jedinců vystavených PAH. Hlavním důvodem, proč tomu tak je, je to, že protein p53 je transkripční faktor, který reguluje dělení buněk, diferenciaci, apoptózu a opravu DNA, mutace genu pro tento důležitý protein vede k vážnému poškození buněk. Dalším běžným cílem mutagenese způsobené PAH je gen *ras* (*Mordukhovich a kol., 2010*).

1.4.5 Teratogenita a abnormality v lidské reprodukci způsobené polycyklickými aromatickými uhlovodíky

U pokusných zvířat byla hlášena embryotoxicita v důsledku expozice naftalenu, benzo[a]anthracenu a BaP (*Wassenberg a kol., 2004*). Tyto sloučeniny mohou působit jako antiestrogeny nebo antiandrogeny přímou vazbou na estrogenové a androgenní receptory. Bylo zaznamenáno mnoho případů nerakovinných onemocnění reprodukčního systému jak u mužů, tak u žen v důsledku expozice PAH. Změny se týkaly zejména kvality spermií, funkce varlat, životaschopnosti vajíčka, též docházelo k poškození DNA v oocytech a vaječnících (*Bolden a kol., 2017*).

Důležité regulátory reprodukce, jako je lutropin (LH), folitropin (FSH), gonadotropin (GnRH) a enzym aromatáza, mohou být ovlivňovány PAH. Bylo také prokázáno, že BaP způsobuje neplodnost u mužů. Působení PAH u žen během těhotenství může mít v konečném důsledku negativní vliv na samotného novorozence. Děti se rodí s nízkou porodní hmotností, srdeční malformací a též může docházet k předčasným porodům. Vysoká expozice PAH v prenatálním období může být také spojena s nízkým IQ a zvýšenými problémy chování dítěte v raném věku, v některých případech může u dětí docházet k rozvoji astmatu (*Rengarajan a kol., 2015*).

1.4.6 Vliv polycyklických aromatických uhlovodíků na imunitní systém

PAH mají také negativní vliv na imunitní systém, nežádoucí účinky souvisejí s inhibicí prekurzorových B, T a myeloidních buněk, dochází zároveň k potlačení produkce zralých B a T buněk, apoptóze lymfatických tkání, narušení myelopoézy, změnám produkce cytokinů, makrofágů a monocytů. V nejhorších případech může dojít k rozvoji nádorového onemocnění, autoimunitnímu onemocnění i hypersenzitivitě (alergii) (*Abdel a kol., 2016*).

PAH se váží na specifické AHR, které se nacházejí na lymfocytech a pomocných buňkách imunitního systému a zvyšují expresi CYP produkující toxické metabolity. PAH svým účinkem mohou také zapříčinit strukturální a funkční změny v kostní dřeni, čímž způsobují vážné zdravotní problémy, protože kostní dřeň je ústředním orgánem krvetvorby a životně důležité místo pro produkci buněk imunitního systému. Celkově lze tedy říct, že imunosuprese je nejčastěji uváděným následkem expozice PAH v rámci imunitního systému (*Burchiel a kol., 2001*).

1.4.7 Biomarkery polycyklických aromatických uhlovodíků

Biomarkery PAH lze využít pro určení dávky, které byl organismus vystaven působením konkrétního PAH. Biomarkery jsou běžně stanovovány v biologických materiálech jako je krev a moč. Byla vyvinuta řada metod pro hodnocení hladin PAH po expozici v prostředí, na pracovišti nebo v potravě (*Gao a kol., 2018*).

1-Hydroxypyren (1-OHP) je hlavním produktem biotransformace pyrenu a tvoří 90 % jeho metabolitů. 1-OHP je široce používán jako spolehlivý biomarker po expozici PAH. HPLC-FLD a GC-MS jsou dvě hlavní analytické metody používané k detekci hladin 1-OHP v moči. 1-OHP však nelze vždy považovat za směrodatný biomarker po expozici BaP nebo jiných PAH. 1-OHP nemůže tedy vždy odrážet celkovou expozici PAH. 1-OHP může poukazovat na absorpci PAH dermální cestou, zatímco 1-OH-naftalen a 1-OH-fenantren jsou biomarkery pro inhalační cestu PAH do lidského organismu. Pro přesnější posouzení expozice PAH u lidí je tedy třeba měřit více metabolitů a biotransformačních produktů PAH. Kromě 1-OHP byly jako biomarkery ve studiích expozice PAH použity různé hydroxylované PAH včetně mono-, poly- a multi-hydroxy-PAH, jako je 2-OH-naftalen, 2-OH-fluoren, 9-OH-fenanthren a 2-OH-bifenylyl. Kromě metabolitů byly jako biomarkery použity také mateřské PAH pro odhad jejich expozice. Tedy jak hydroxylované produkty, tak nativní PAH v moči jsou užitečné biomarkery pro průkaz expozice PAH. Koncentrace mateřských PAH nebo jejich metabolitů a biotransformačních produktů v organismu závisí nejen na expozici, ale také na jejich vstřebávání, biotransformaci, detoxikaci a v neposlední řadě také na schopnosti vylučování těchto látek z organismu. Většina vysokomolekulárních a lipofilních PAH, jako je BaP, je náchylná k bioakumulaci v tukové tkáni, a proto se přednostně vylučují stolicí a nikoliv močí (*Zhang a kol., 2021*).

Aduky BaP a DNA v periferních lymfocytech se také užívají k odhadu množství biotransformačních produktů PAH v lidském organismu, můžeme tedy různé DNA adukty jednotlivých PAH používat také jako biomarkery (*Herbstman a kol., 2012*).

1.5 Metody stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v biologických vzorcích

PAH jsou převážně detekovány ze vzduchu, kdy se hodnotí kvalita ovzduší, v biologických tkáních v důsledku monitorování jejich účinků na lidské zdraví, vodě a sedimentech z důvodu monitorování životního prostředí a v neposlední řadě v potravinách. Analýza PAH v těchto komplexních matricích se provádí metodou plynové chromatografie (GC) a metodou kapalinové chromatografie (LC). GC je často preferovaná pro výbornou separaci, identifikaci a kvantifikaci PAH, GC se obecně považuje za více selektivní v porovnání s LC (*Poster a kol., 2006*).

Dříve se pro stanovení PAH využívala především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s fluorescenční (FLD), UV a v ojedinělých případech hmotnostní (MS) detekcí. K separaci jednotlivých analytů jsou používány kolony s reverzní fází či polymerní fází speciálně navrženou pro separaci PAH. Vzhledem k úpravě seznamu sledovaných PAH, kde jsou zahrnuty i analyty, které nefluoreskují (např. cyklopenta[c,d]pyren), byla HPLC postupně nahrazována GC. Dříve se GC obvykle používala ve spojení s plamenově ionizační detekcí (FID). Vzhledem k malé selektivitě a nízké citlivosti FID, je v současné době téměř nezbytné využití MS detektoru (MSD) a často v tandemovém uspořádání (GC-MS/MS), což umožňuje za vhodně zvolených podmínek (kolona, teplotní program) stanovení i PAH vyskytujících se ve stopovém množství. V současné době je GC-MS široce používanou chromatografickou technikou pro stanovení PAH. PAH jsou separovány na kapilárních kolonách s vnitřními průměry v rozmezí 0,2-0,32 mm, s délkou mezi 25 až 60 m a tloušťkou filmu stacionární fáze (obvykle na bázi fenylmethylpolysiloxanu s 5 a 35% obsahem fenylu nebo se 100% obsahem dimethylpolysiloxanu) 0,1-0,25 μm (*Dost a kol., 2012*).

Kompletní analytický postup zahrnuje zpravidla tyto kroky: vzorkování, extrakci PAH ze vzorku, přečištění, separaci, identifikaci, kvantifikaci a interpretaci výsledků. Účinnost celého procesu lze ovlivnit zejména v technikách extrakce, přečištění a separace. Příprava vzorků a jeho následné přečištění jsou nezbytné kroky pro získání správných výsledků v analýze PAH. Některé druhy vzorků (voda) vyžadují jen minimální zpracování, avšak jiné vzorky, jako např. potraviny, vyžadují před samotnou analýzou vhodnou izolaci PAH z matrice (*Guillen a kol., 2011*).

V matricích tvoří PAH většinou jen nepatrný podíl a jejich kvantitativní převedení do extrakčního činidla proto není vždy jednoduché a je provázeno společnou extrakcí řady dalších, interferujících sloučenin. Při výběru vhodné extrakční techniky je nutné vzít v úvahu několik faktorů, jako je např. rychlost a účinnost extrakce, provozní náklady spojené s danou technikou a v neposlední řadě také potenciální vliv použité metody, resp. extrakčního činidla, na životní prostředí. Použití účinné a relativně rychlé extrakční techniky dosahující vysoké výtěžnosti je jedním z hlavních předpokladů pro dobrou kvantifikaci analytů. Mezi často používané izolační techniky při stanovení PAH patří extrakce podle Soxhleta, která se používá zejména pro izolaci PAH z potravin s vysokým podílem lipidů (maso, ryby, sýr aj.), extrakce podpořená ultrazvukem (USE, ultrasound extraction), extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE, pressurized liquid extraction), mikrovlnná extrakce (MAE, microwave assisted extraction) a superkritická fluidní extrakce (SFE, supercritical fluid extraction) (Ramalhosa a kol., 2012). Podrobněji se zaměříme na možnosti stanovení PAH v biologických vzorcích.

1.5.1 Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích lidské krve

Většina mateřských PAH v lidském organismu může být detekována ve vzorcích krve, zatímco jejich metabolity jsou nalézány především ve vzorcích moči. Existují různé druhy postupů pro extrakci PAH z biologických vzorků, nejpoužívanější jsou extrakce kapalina-kapalina (LLE) a extrakce tuhou fází (SPE) (Campo a kol., 2011).

SPE nabízí mnoho výhod při přípravě vzorků oproti jiným tradičním technikám (např. LLE). Týká se to zejména vysokých výtěžků, relativně čistých extraktů, snadné automatizace, kompatibility s instrumentální analýzou a v neposlední řadě snížení spotřeby organických rozpouštědel. Výběr rozpouštědla pro SPE je založen na typu kolony SPE, kolony pro extrakci PHA jsou dvojího typu, a to s reverzní fází a normální fází. Prvně je stacionární fáze v kolonce aktivována rozpouštědlem kompatibilním s rozpouštědlem pro ekvibraci stacionární fáze. Rozpouštědlo pro eluci PAH by se mělo snadno odpařit (Guo a kol., 2012).

V tabulce 3 je uveden přehled používaných metod pro stanovení hladin PAH ve vzorcích krve, publikovaných v letech 2009 až 2019.

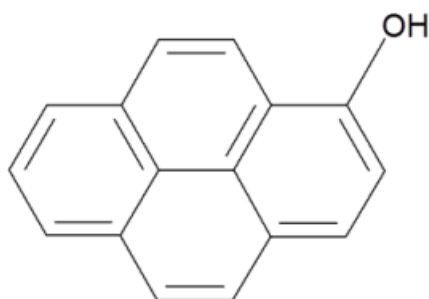
Tabulka 3: Typ matrice vzorku, koncentrace PAH, metoda extrakce a činidla, metoda purifikace vzorku, analytická metoda a citlivost metody

matrice	objem vzorku	koncentrace PAH	extrakce vzorku a reagensie	přečištění vzorku	analytická metoda	LOD a výtěžnost	zdroj
sérum	1-2 ml	1461 ng/g (sérum matky) - 1158 ng/g (sérum z pupečnickové krve)	SPE DCM methanol Milli-Q water n-hexan	SPE kolona fáze C18 fáze mikrofolisil	GC-MS	NA 71-126 %	<i>Guo a kol., 2012</i>
sérum	2 ml	5839 ng/g	SPE acetonitril siran sodný n-hexan	silikagel	GC-MS	0,05-0,10 ng/ml 67,4-106 %	<i>Tsang a kol., 2011</i>
sérum	2 ml	0,3-19 ng/ml	SPE methanol fosfátový pufr n-butylchlorid ethylacetát	SPE kolona	GC-MS	20-5000 ng/ml NA	<i>Pleil a kol., 2009</i>
sérum	2 ml	206 ng/g	SPE kyselina mravenčí ethanol n-hexan DCM	kolona naplněná předem aktivovaným silikagelem	GC-MS	0,013-0,912 ng/ml 70,2-103,4 %	<i>Wang a kol., 2015</i>
pupečnicková krev	5 ml	2560 ng/g	SPE acetonitril siran sodný n-hexan	silikagel	GC-MS	0,012-0,025 ng/g 71 %	<i>Yin a kol., 2017</i>
pupečnicková krev	NA	108,05 ng/ml	SPE n-hexane ethanol hydroxid sodný Mill-Q ultračistý DCM	SPE RP-18	GC-MS	0,03-0,09 ng/ml 78,2-105,6 %	<i>Campo a kol., 2010</i>

1.5.2 Stanovení metabolitů polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích moči

Jak už bylo uvedeno výše, po inhalační, orální nebo dermální resorpci se PAH biotransformují na odpovídající epoxidy a hydroxyderiváty za katalýzy různých CYP. Monohydroxylované PAH (OH-PAH), metabolity PAH v moči, se používají jako biomarkery po expozici PAH. V moči je možné stanovit až 20 různých OH-PAH, ale vzhledem k vysokým nákladům na analýzu takového množství metabolitů PAH se v moči nejčastěji stanovují především tyto čtyři OH-PAH: 1-hydroxypyren (1-OHP), 1-hydroxynaftalen (1-OHNAP), 2-hydroxynaftalen (2-OHNAP), 3-hydroxybenzo[a]pyren (3-OHBaP) (Díaz a kol., 2021).

1-OHP v moči (Obrázek 6) je uznávaný biomarker pro stanovení PAH po jejich expozici. U vybrané skupiny pracovníků se jeho hladina v moči stanovuje vždy na konci směny a na konci pracovního týdne. Pro 1-OHP je biologická mezní hodnota (BMH) legislativou upravena na hodnotu 5,66 $\mu\text{g/l}$, resp. 3,77 $\mu\text{g/g}$ kreatininu. Metabolity naftalenu, 1- a 2-OHNAP, jsou nejhojnějšími metabolity PAH v lidské moči, a také spolehlivé a specifické biomarkery po expozici PAH ze vzduchu. Hlavní metabolit BaP v moči, 3-OHBaP, je považován za potenciální biomarker expozice karcinogenním PAH, a proto je jeho stanovení také významné. Zjištěné koncentrace 3-OHBaP v moči u rizikových pracovníků byly kolem 0,5 nmol/mol kreatininu, zatímco v běžné populaci jsou hodnoty přibližně menší než 0,1 nmol/mol kreatininu (Bajusová a kol., 2015).



Obrázek 6: Strukturální vzorec 1-hydroxypyrenu (Bajusová a kol., 2015)

Jak už tedy bylo uvedeno, tak koncentrace 1-OHP v moči je sledována jako vhodný biomarker expozice PAH především u profesní expozice. V posledních letech se zařazuje i do expozičních studií zaměřených na běžnou populaci s vyšší expozicí znečištěnému ovzduší. Z dosud publikovaných prací vyplývá, že koncentrace 1-OHP v moči se pohybuje od 1-5 nmol/l (0,2–1,1 µg/l) u neexponovaných osob. Biomarker 1-OHP v moči je možné stanovit metodou LC/MS, HPLC-FLD a metodou GC-MS. Před vlastní analýzou 1-OHP je nutno jeho konjugáty hydrolyzovat. Biologický poločas vylučování PAH z organismu je 6–35 hodin. Individuálně rozdílné výsledky jsou dány genetickým polymorfismem enzymů účastnících se biotransformace (*Abid a kol., 2015*).

Analytické metody pro stanovení OH-PAH jsou tedy obvykle založeny na enzymatické hydrolýze sulfátových a glukuronidových derivátů PAH. Poté následuje extrakce hydroxylovaných PAH z moči např. metodou SPE nebo LLE, nakonec jsou OH-PAH separovány a detegovány metodami HPLC-FLD nebo HPLC-MS, případně GC-MS. Použití GC-MS je méně běžné, i když tato technika zaručuje dostatečnou specifitu a lepší chromatografické rozlišení izomerních sloučenin než při použití metody HPLC. Nicméně, i když se častěji pro stanovení OH-PAH používá metoda HPLC, tak GC-MS stále zůstává metodou volby pro výzkumníky, díky své vysoké selektivitě, dobré citlivosti, vysoké separační účinnosti a schopnosti jednoznačné identifikace metabolitů. Metody založené na GC-MS pro stanovení polárních metabolitů PAH vyžadují derivatizaci k jejich převedení na nepolární a těkavé deriváty. Silylace je nejběžněji používanou derivatizační technikou pro převedení polárních metabolitů PAH na nepolární deriváty. Hlavní nevýhodou silylace jsou přísné bezvodé podmínky při derivatizaci, protože jak reakční činidlo, tak i deriváty jsou náchylné k hydrolýze, dále doba reakce je dlouhá, a to v rozmezí od 30 do 60 minut (*Gupta a kol., 2015*).

V roce 1976 navrhl Rasmussen online derivatizační techniku, tj. silylaci injektorovým portem (IPS), která překonává omezení tradiční silylace ve zkumavce. Proces IPS zahrnuje reakci v plynné fázi mezi silylačním činidlem a polární analytem, který se vyskytuje uvnitř injektoru GC. Jedná se o téměř okamžitou reakci během několika sekund uvnitř vyhřívaného injektoru GC, což také snižuje možnost degradace derivátů, protože jejich expozice prostředí je zanedbatelná. Kromě toho je značně sníženo požadované množství derivatizačního činidla a vzorku. On-line derivatizace vedla k zvýšení citlivosti a přesnosti kvantifikace (*Rasmussen, 1976*).

V některých publikacích byly při stanovení OH-PAH metodou GC-MS použity velké objemy vzorků (150 ml moči) a organických rozpouštědel jako benzen, tak také

derivatizačních činidel, např. diazomethanu. V některých publikacích byly používány menší objemy vzorků, ale stanovení se omezilo pouze na metabolity naftalenu a fenanthrenu (*Carmella a kol., 2004*).

Mikroextrakce na pevné fázi (SPME) následovaná derivatizací na vlákne byla v minulosti navržena společností Gmeiner. Tato metoda byla dostatečně citlivá a jednoduchá, ale vyžadovala specifický automatický dávkovač vzorků. Krátkodobá životnost vlákna SPME byla navíc významným omezením pro její rutinní aplikaci (*Luan a kol., 2007*).

Metoda umožňující současné stanovení dvaceti OH-PAH metabolitů v moči byla dostatečně citlivá (mez detekce v rozmezí ng/l) díky použití hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (GC/HRMS). Toto zařízení je však velmi drahé a pro běžné laboratoře nedostupné (*Li a kol., 2006*).

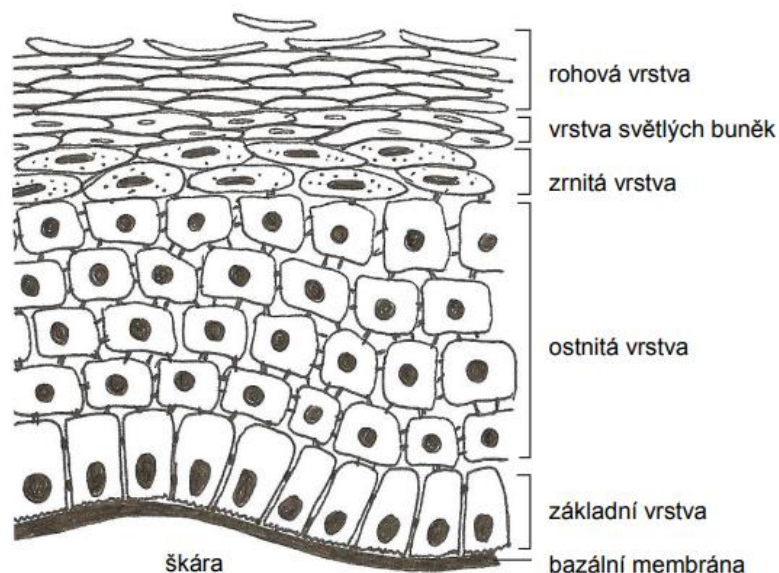
Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME) je extrakční technika, která je rychlá, šetrná k životnímu prostředí, relativně levná a jednoduchá. Od svého objevu byla DLLME široce používána pro extrakci různých organických látek z komplexních matric. DLLME a IPS se v současné době používají pro extrakci, zkoncentrování a derivatizaci OH-PAH v moči s následnou GC-MS analýzou (*Gupta a kol., 2015*).

1.6 Dermální absorpce polycyklických aromatických uhlovodíků

Jak už bylo uvedeno, jednou z cest průniku PAH do lidského organismu je kůže. Kůže je největší orgán. U dospělého člověka činí kůže přibližně 5 % celkové tělesné hmotnosti a pokrývá plochu přibližně 1,8 m². Mezi hlavní funkce kůže patří fyzická a chemická ochranná bariéra, smyslové vnímání (tlak, teplota a bolest) a regulace teploty (*Pannatier a kol., 1975*).

Kůže se skládá ze tří hlavních vrstev: pokožky (epidermis), škáry (dermis) a podkoží (hypodermis). Vnitřní a nejtlustší vrstva kůže je hypodermis. Buňky podkoží se specializují na akumulaci a ukládání tuků a jsou seskupeny do laloků oddělených pojivovými tkáněmi. Další vnitřní vrstvou je dermis, 0,2-0,3 cm silná a obsahující kolagen a elastin. V dermis se dále nachází krevní cévy a sensorické nervy. Dermis poskytuje nutriční podporu pro vnější vrstvu epidermis. Epidermis je tvořena dalšími 5 vrstvami (*stratum basale*, bazální vrstva, *stratum spinosum*, vrstva ostnitých buněk, *stratum granulosum*, vrstva zrnitých buněk, *stratum lucidum* a *stratum corneum*, rohová vrstva) (*Obrázek 7*). *Stratum corneum* epidermální membrány je tvořena až z 50 %

ceramidy a je tedy bohatá na lipidy. Protože PAH jsou látky lipofilní, lze předpokládat, že budou snadno prostupovat právě epidermální membránou, vrstvou *stratum corneum*. V ostatních vrstvách epidermální membrány, které jsou tvořeny vodným prostředím, dochází k biotransformaci PAH (Beriro a kol., 2016).



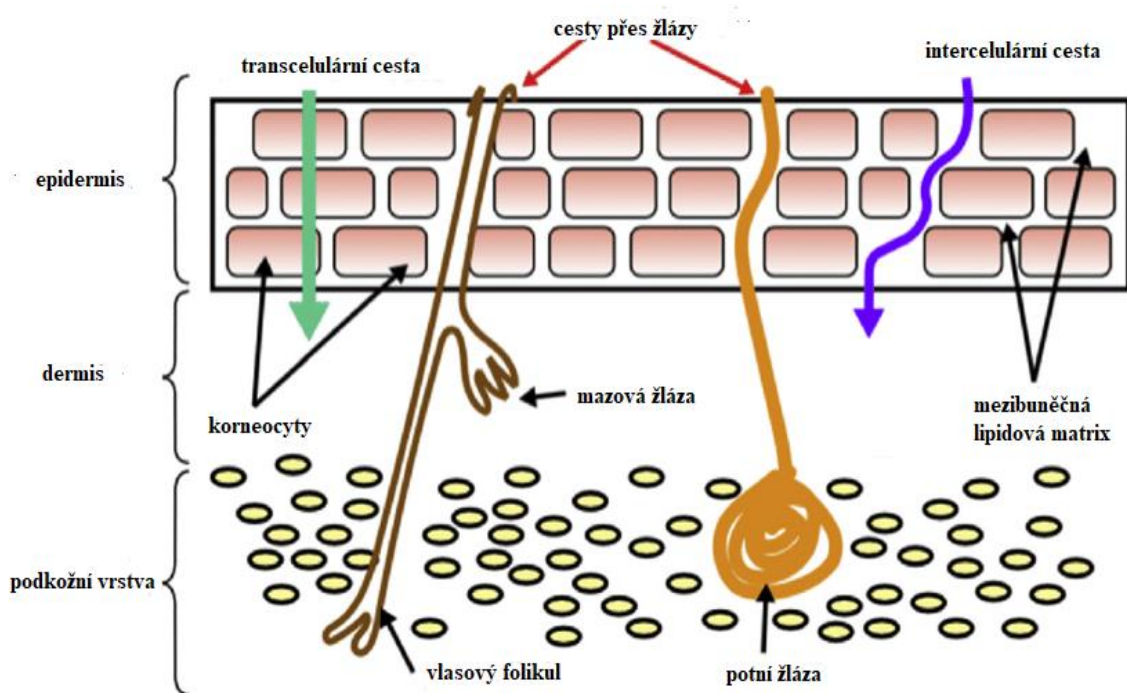
Obrázek 7: Stavba pokožky (Kotingová a kol., 2009)

1.6.1 *Stratum corneum*

Stratum corneum (SC) se skládá až z 20 vrstev zploštělých buněk (korneocytů) obsahujících keratin. Tyto buňky postrádají jádra a organely, ale jsou naplněny tonofibrilovým komplexem na bázi keratinu. Vnitřně vyztužená buněčná membrána je označována jako zrohovatělá buněčná vrstva. Kombinace lipidového pláště a zrohovatělé buněčné vrstvy dohromady tvoří velmi silnou nepropustnou membránu. Lipidy představují téměř 20 % objemu SC. Pro vstup látek do organismu je důležitý rozdíl mezi charakterem hydrofobní rohové vrstvy a charakterem ostatních hydrofilních vrstev pokožky. Pro bariérovou funkci SC má největší význam složení mezibuněčné matrix, jež je rovnoměrně přítomna v celém SC a prostupující látky musí touto hmotou projít (Bouwstra a kol., 2006).

1.6.2 Transdermální absorpce

Transdermální absorpce je proces, kdy látky pronikají přes kůži do systémového oběhu. Skládá se z těchto kroků: penetrace, vstup látek do konkrétní vrstvy, permeace, látka prochází z jedné vrstvy do druhé a resorpce, látka vstupuje do lymfy a odtud do systémového oběhu. Proces percutánní absorpce může probíhat dvěma různými cestami: transepidermálně (mezibuněčná a intracelulární) a transappendageálně (přes vlasové folikuly, potní kanálky a mazové žlázy) (Obrázek 8) (Erdo a kol., 2016).



Obrázek 8: Cesty percutánní absorpce látek (Erdo a kol., 2016)

Transepidermální dráha se skládá z mezibuněčných a intracelulárních drah. Mezibuněčná dráha zahrnuje difúzi rozpuštěné látky přes mezibuněčné lipidové domény cestou přes zrohovatělé buňky SC, epidermis a dermis. Některé studie poskytly důkazy, že intercelulární lipidy jsou hlavní bariérou epidermální permeability. Pro lipofilní látky jako jsou PAH je typická intracelulární cesta přenosu. Látky hydrofilní povahy pak prochází transcelulární cestou, která je pro tyto látky značně ztížena vzhledem k nutnosti procházet jak přes hydrofilní vnitřní prostředí buněk, tak i přes hydrofobní intercelulární prostor (Otberg a kol., 2008).

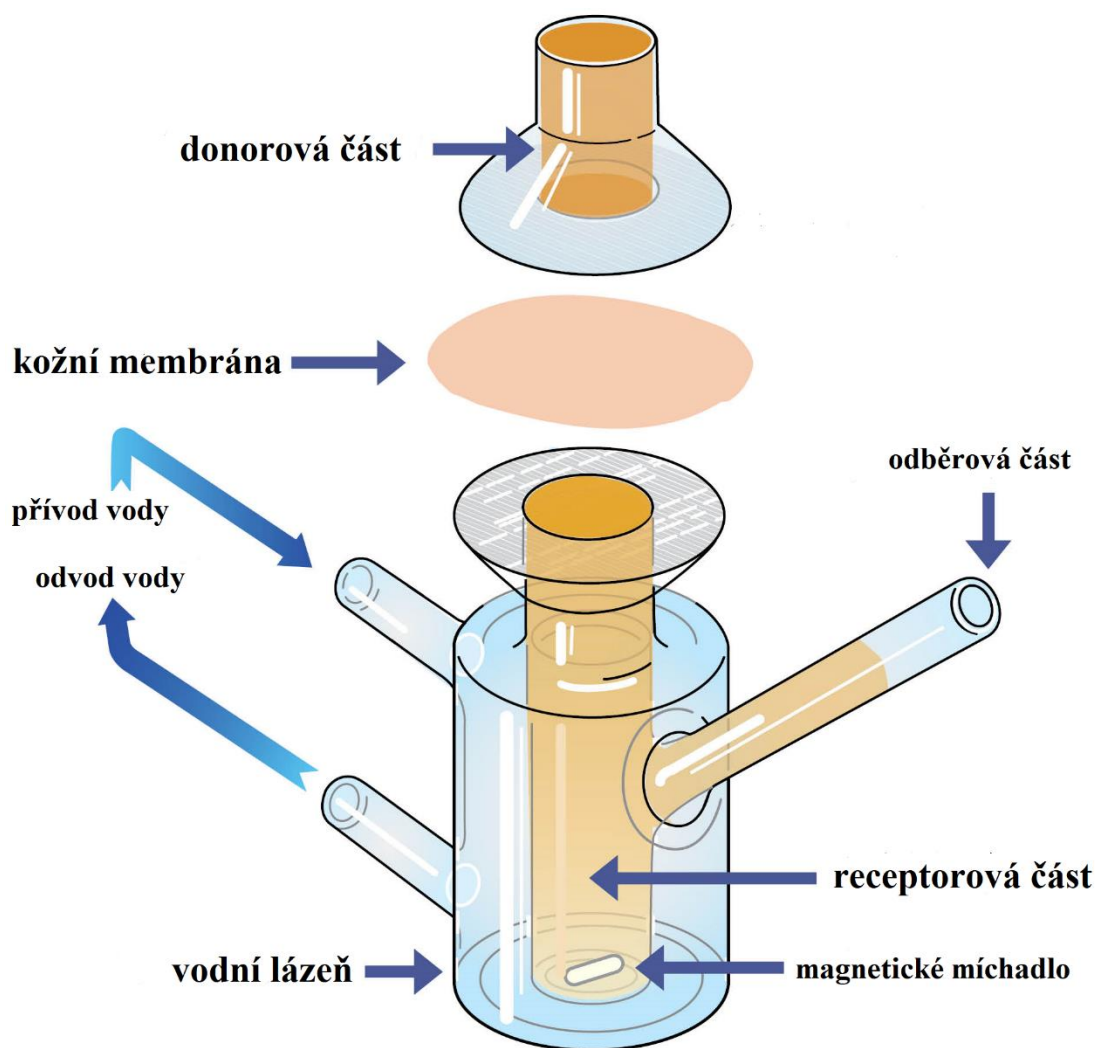
1.6.3 Metody stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků po absorpci kůží

Pro testování průniku PAH přes kůži lze užít metody *in vivo* na člověku nebo zvířeti a *in vitro* na lidské nebo zvířecí kůži. Metody *in vitro* se užívají k testování průniku látek do kůže a jejich následnému průniku do krevního řečiště. K měření průniku může být užívána neživá kůže nebo čerstvá kůže metabolicky aktivní, u níž lze stanovit jak průnik látek, tak jejich biotransformaci. Výhodou testování *in vitro* oproti testování *in vivo* je zkrácení doby analýzy, lepší reprodukovatelnost výsledků a snížení kolísání parametrů testování (Bartošová a kol., 2012).

1.6.3.1 Difuzní komůrky

Mezi základní laboratorní zařízení pro testování transdermální absorpce PAH *in vitro* patří difuzní komůrky. Komůrky se skládají ze dvou částí, horní části (donorová část) a spodní části (receptorová část), která je naplněna receptorovou tekutinou. Difuzní komůrky jsou vyráběny z inertních materiálů jako je teflon a sklo. Kůže se vkládá mezi obě části komůrky.

Rozeznáváme dva typy difuzních komůrek. Prvním typem je tzv. Franzova komůrka (statická vertikální difuzní komůrka), v které musí být receptorová tekutina neustále míchána, poté je receptorová tekutina odebírána pro výslednou analýzu (Obrázek 9). Druhým typem je průtoková vertikální difuzní komůrka, v které se musí receptorová tekutina kontinuálně odstraňovat peristaltickou pumpou (Kotíngová a kol., 2009).



Obrázek 9: Franzova komůrka (*Patel a kol., 2016*)

1.6.3.2 Receptorová tekutina

Jak již bylo uvedeno, receptorová část komůrky je naplněna receptorovou tekutinou (RT). Složení RT je voleno tak, aby neomezovalo rozsah difúze zkoumané látky, tj. musí být zaručena rozpustnost a stálost dané chemické látky v RT. Pro hydrofilní sloučeniny se volí fyziologické roztoky nebo pufované fyziologické roztoky. Pro lipofilní látky jako jsou PAH, se používá sérový albumin nebo vhodné emulgátory, které se přidávají v množstvích, která nesmí narušovat integritu membrány. Podle obecného pravidla by RT měla mít fyziologické pH, což lze dosáhnout přidáním PBS pufru (*Bronaugh a kol., 2006*).

1.6.4 Polycyklické aromatické uhlovodíky obsažené v kamenouhelném dehtu

Jedním ze zdrojů PAH, které pronikají do organismu dermální absorpcí, je dehet užívaný Goeckermanovou metodou při léčbě lupénky. Hlavní indikací pro léčbu dehtem Goeckermanovou metodou je tedy chronická stacionární lupénka. Dehty obsahují mnoho chemických látek, jejich zastoupení je ovlivněno teplotou karbonizace a výchozí surovinou, jenž jsou nejčastěji břidlice, listnaté a jehličnaté dřeviny, uhlí, petrolej a jiné látky. V dehtu jsou obsaženy především PAH, sirné sloučeniny, dusíkaté látky a alifatické uhlovodíky. Za jeden z nejúčinnějších dehtů je považován kamenouhelný dehet (*Chalupová a kol., 2007*).

Kamenouhelný dehet (*pix lithanthracis*) obsahuje nejčastěji naftalen, pyren, fenol a anthracen. Vzniká suchou destilací černého uhlí. V případě zbarvení se jedná o hnědočervenou viskózní tekutinu. Zápach má typický po naftalenu. Účinky má především adstringentní, antiprurigiózní, antiflogistické, antimykotické a antimikrobiální. V současné době se používají masti obsahující cca 3-5 % farmaceutického dehtu, který obsahuje cca 30 % PAH (*Ditrichová, 2014*). Léčba mastmi s přídavkem dehtu kromě výše zmíněných pozitivních účinků má i negativní účinky, a to v podobě již zmíněných vlastností PAH, jakými jsou karcinogenita, mutagenita a genotoxicita. Z toho důvodu se v lékárnách od prodeje mastí s přídavkem dehtu postupně opouští.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je zavést metodu GC-MS pro stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků v receptorové tekutině procházející přes kůži transdermální absorpcí. Tato metoda by měla být po řádné validaci náhradou za metodu HPLC-FLD používanou Ústavem hygieny a preventivního lékařství LF HK v Hradci Králové pro monitorování vybraných PAH v receptorové tekutině.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Seznam chemikálií

- Acetonitril (C_2H_3N); Mr 41,05; (Merck, Darmstadt, Německo)
- Benzo[a]pyren ($C_{20}H_{12}$); Mr 252,31; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Deionizovaná voda, H_2O , Mr 18,00
- Dichlormethan (CH_2Cl_2); Mr 84,93 (Merck, Darmstadt, Německo)
- Fenanthren; ($C_{14}H_{10}$); Mr 178,23; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Fenanthren- d_{10} ; ($C_{14}D_{10}$); Mr 188,29; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Fosfátový pufr, pH = 7,4 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Chrysen- d_{12} ; ($C_{18}D_{12}$); Mr 240,36; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Methanol (CH_4O); Mr 32,04; (Merck, Darmstadt, Německo)
- n-Hexan (C_6H_{12}); Mr 86,18; (Merck, Darmstadt, Německo)
- Naftalen ($C_{10}H_8$); Mr 84,93; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Naftalen- d_8 ($C_{10}D_8$); Mr 136,22; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- PAH Mix 3 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Perylen- d_{12} ($C_{20}D_{12}$); Mr 264,38; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Pyren ($C_{16}H_{10}$); Mr 202,25; (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

3.1.2 Seznam přístrojů a pomůcek

- Analytické váhy AdventureTM Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Automatické mikropipety Eppendorf Research[®] plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Kombinovaná chladnička s mrazničkou (AEG, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
- Kádinky, odměrné válce, odměrné baňky, zkumavky
- Kapilární kolona SLB[®]-PAHms, 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm

- Odpařovací zařízení Thermo Scientific, model TS-18825 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Odstředivka Sorvall TC6 (Sorvall Instruments, Wilmington, DE, USA)
- Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Polypropylenové (PP) zkumavky s víčkem typu eppendorf; 1,5 ml (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Skleněné inserty 200 μ l, (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Skleněné vialky s krimpovacími víčky (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Koncentrátor Termovap (Ecom, Chrášťany, ČR)
- Třepačka Reax top (Heidolph, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
- Ultrazvuková čistička Sonorex Digitec (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlín, Německo)
- Vortex Relax top (Heidolph, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
- Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo).

3.1.3 Pracovní roztoky

Příprava deionizované vody

Deionizovaná voda ($G = 0,055 \mu\text{S}$) byla vyráběna zařízením na úpravu vody Smart2pure.

Příprava fosfátového pufru (pH = 7,4)

Obsah lahvičky s fosfátovým pufrem byl dle pokynu výrobce rozpuštěn v 3,8 l destilované vody k získání fosfátového pufru o koncentraci 8,3 mmol/l a pH 7,4 (při 25 °C).

Příprava receptorové tekutiny

Navážka 4 g bovinního sérového albuminu (BSA) byla rozpuštěna ve 100 ml fosfátového pufru. Receptorová tekutina (RT) byla uchovávána v chladničce při 4 °C minimálně po dobu 1 týdne.

Zásobní roztok naftalenu (3,59 mmol/l)

Navážka 0,0023 g naftalenu (NAP) byla rozpuštěna v 5 ml acetonitrilu (ACN). Roztok byl uchováván při -20 °C.

Zásobní roztok fenanthrenu (3,14 mmol/l)

Navážka 0,0028 g fenanthrenu (PHE) byla rozpuštěna v 5 ml ACN. Roztok byl uchováván při -20 °C.

Zásobní roztok pyrenu (1,88 mmol/l)

Navážka 0,0019 g pyrenu (PYR) byla rozpuštěna v 5 ml ACN. Roztok byl uchováván při -20 °C.

Zásobní roztok benzo[a]pyrenu (2,06 mmol/l)

Navážka 0,0019 g BaP byla rozpuštěna v 5 ml ACN. Roztok byl uchováván při -20 °C v 1ml alikvotách.

Směs methanolu a dichlormethanu (1:1, v/v)

Směs byla připravena smícháním 50 ml methanolu (CH₃OH) s 50 ml dichlormethanu (CH₂Cl₂).

Zásobní roztok vnitřního standardu naftalenu-d₈ (7,63 mmol/l)

Navážka 0,0052 g naftalenu-d₈ (NAP-d₈) byla rozpuštěna v 5 ml směsi CH₃OH a CH₂Cl₂ (1:1, v/v). Roztok byl uchováván při -80 °C.

Zásobní roztok vnitřního standardu fenanthrenu-d₁₀ (5,31 mmol/l)

Navážka 0,0050 g fenanthrenu-d₁₀ (PHE-d₁₀) byla rozpuštěna v 5 ml směsi CH₃OH a CH₂Cl₂ (1:1, v/v). Roztok byl uchováván při -80 °C.

Zásobní roztok vnitřního standardu chrysenu-d₁₂ (4,66 mmol/l)

Navážka 0,0056 g chrysenu-d₁₂ (CHRY-d₁₂) byla rozpuštěna v 5 ml směsi CH₃OH a CH₂Cl₂ (1:1, v/v). Roztok byl uchováván při -80 °C.

Zásobní roztok vnitřního standardu perylenu-d₁₂ (4 mmol/l)

Navážka 0,0054 g perylenu-d₁₂ (PER-d₁₂) byla rozpuštěna v 5 ml směsi CH₃OH a CH₂Cl₂ (1:1, v/v). Roztok byl uchováván při -80 °C.

Pracovní roztok směsi PAH pro kalibraci I (asi 25 µmol/l)

Pracovní roztok směsi PAH pro kalibraci I (PR1) byl připraven naředěním zásobních roztoků jednotlivých PAH ACN následujícím způsobem. Do odměrné baňky bylo pipetováno 35 µl NAP, 40 µl PHE, 67 µl PYR, 61 µl BaP a objem doplněn po rysku ACN.

Pracovní roztok směsi vnitřních standardů pro kalibraci I (asi 50 µmol/l)

Pracovní roztok směsi vnitřních standardů pro kalibraci I (PRIS1) byl připraven naředěním zásobních roztoků jednotlivých vnitřních standardů ACN následujícím způsobem. Do zkumavky bylo pipetováno 10 µl NAP-d₈, 14 µl PHE-d₁₀, 16 µl CHRY-d₁₂ a 1460 µl ACN.

Pracovní roztok směsi vnitřních standardů pro kalibraci I (asi 8 µmol/l)

Pracovní roztok směsi vnitřních standardů pro kalibraci I byl připraven naředěním PRIS1 ACN následujícím způsobem. Do zkumavky bylo pipetováno 240 µl PRIS1 a 1260 µl ACN.

Pracovní roztok směsi PAH pro kalibraci II (asi 500 µmol/l)

Pracovní roztok směsi PAH pro kalibraci II (PR2) byl připraven naředěním zásobních roztoků jednotlivých PAH ACN následujícím způsobem. Do zkumavky bylo pipetováno 696 µl NAP, 796 µl PHE, 1330 µl PYR, 1213 µl BaP a 965 µl ACN.

Pracovní roztok směsi vnitřních standardů pro kalibraci II (asi 800 µmol/l)

Pracovní roztok směsi vnitřních standardů pro kalibraci II byl připraven naředěním zásobních roztoků jednotlivých vnitřních standardů ACN následujícím způsobem. Do zkumavky bylo pipetováno 157 µl NAP-d₈, 226 µl PHE-d₁₀, 258 µl CHRY-d₁₂ a 861 µl ACN.

Pracovní roztok směsi deuterovaných PAH pro kalibraci III (asi 25 µmol/l)

Pracovní roztok směsi deuterovaných PAH pro kalibraci III (PR3) byl připraven naředěním zásobních roztoků jednotlivých deuterovaných PAH ACN následujícím způsobem. Do odměrné baňky bylo pipetováno 16 µl NAP-d₈, 24 µl PHE-d₁₀, 27 µl CHRY-d₁₂ a objem doplněn po rysku ACN.

Pracovní roztok perylenu-d₁₂ pro kalibraci III (asi 50 µmol/l)

Pracovní roztok vnitřního standardu PER-d₁₂ pro kalibraci III (PRIS3) byl připraven naředěním zásobního roztoku PER-d₁₂ ACN následujícím způsobem. Do zkumavky bylo pipetováno 19 µl PER-d₁₂ a 1481 µl ACN.

Pracovní roztok perylenu-d₁₂ pro kalibraci III (asi 8 µmol/l)

Pracovní roztok vnitřního standardu PER-d₁₂ pro kalibraci III byl připraven naředěním PRIS3 ACN následujícím způsobem. Do zkumavky bylo pipetováno 240 µl PRIS3 a 1260 µl ACN.

3.2 Příprava směsných standardů polycyklických aromatických uhlovodíků pro jednotlivé kalibrační křivky

Byly připraveny kalibrační standardy pro tři jedenáctibodové kalibrační křivky směsi PAH s různým rozmezím koncentrací, 10-1000 nmol/l a 1-100 µmol/l pro NAP, PHE, PYR a BaP a 10-1000 nmol/l pro NAP-d₈, PHE-d₁₀ a CHRY-d₁₂.

3.2.1 Příprava směsných standardů polycyklických aromatických uhlovodíků pro sestavení kalibrační křivky I

Prvně byly připraveny kalibrační standardy o různých koncentracích PAH ředěním PR1 ACN (*Tabulka 4*). Takto připravené standardy byly naředěny RT na požadovanou koncentraci (*Tabulka 5*). Nulový standard byl připraven smícháním 480 µl RT s 20 µl ACN.

Tabulka 4: Příprava pracovních roztoků směsi PAH pro kalibrační řadu I

	c NAP [nmol/l]	c PHE [nmol/l]	c PYR [nmol/l]	c BaP [nmol/l]	PR1 [µl]	ACN [µl]
S1	251,21	251,36	251,76	251,43	10	990
S2	2512,09	2513,60	2517,56	2514,27	100	900
S3	5024,18	5027,21	5035,10	5028,54	200	800
S4	7536,28	7540,82	7552,66	7542,80	300	700
S5	10048,37	10054,42	10070,21	10057,07	400	600
S6	12560,46	12568,03	12587,76	12571,34	500	500
S7	15072,55	15081,64	15105,31	15085,61	600	400
S8	17584,65	17595,24	17622,86	17599,87	700	300
S9	21352,79	21365,65	21399,19	21371,27	850	150
S10	25120,92	25136,06	25175,52	25142,68	1000	0

Tabulka 5: Příprava kalibračních standardů pro sestrojení kalibrační křivky I

KALIBRACE I			NAP	PHE	PYR	BaP
	RT (μ l)	pracovní roztoky (μ l)	[nmol/l]	[nmol/l]	[nmol/l]	[nmol/l]
S0	480	20*	0	0	0	0
S1	480	20	10,05	10,05	10,07	10,06
S2	480	20	100,48	100,54	100,70	100,57
S3	480	20	200,97	201,09	201,40	201,14
S4	480	20	301,45	301,63	302,11	301,71
S5	480	20	401,93	402,18	402,81	402,28
S6	480	20	502,42	502,72	503,51	502,85
S7	480	20	602,90	603,27	604,21	603,42
S8	480	20	703,39	703,81	704,91	703,99
S9	480	20	854,11	854,63	855,97	854,85
S10	480	20	1004,84	1005,44	1007,02	1005,71

*acetonitril

3.2.2 Příprava směsných standardů polycyklických aromatických uhlovodíků pro sestrojení kalibrační křivky II

Příprava kalibračních standardů o různých koncentracích PAH pro sestrojení kalibrační křivky byla provedena stejně jako v případě kalibrační křivky I (*Tabulka 6 a 7*).

Tabulka 6: Příprava pracovních roztoků směsi PAH pro kalibrační řadu II

	c NAP [μ mol/l]	c PHE [μ mol/l]	c PYR [μ mol/l]	c BaP [μ mol/l]	PR2 [μ l]	ACN [μ l]
S1	5,00	5,00	5,00	5,00	10	990
S2	50,03	50,02	50,01	50,00	100	900
S3	100,05	100,04	100,03	99,99	200	800
S4	150,08	150,06	150,04	149,99	300	700
S5	200,11	200,08	200,05	199,99	400	600
S6	250,13	250,10	250,06	249,98	500	500
S7	300,16	300,12	300,08	299,98	600	400
S8	350,19	350,15	350,09	349,98	700	300
S9	425,23	425,18	425,11	424,97	850	150
S10	500,27	500,21	500,13	499,97	1000	0

Tabulka 7: Příprava kalibračních standardů pro sestavení kalibrační křivky II

KALIBRACE II			NAP	PHE	PYR	BaP
	RT [μ l]	pracovní roztoky [μ l]	[μ mol/l]	[μ mol/l]	[μ mol/l]	[μ mol/l]
S0	400	100*	0	0	0	0
S1	400	100	1,00	1,00	1,00	1,00
S2	400	100	10,01	10,00	10,00	10,00
S3	400	100	20,01	20,01	20,01	20,00
S4	400	100	30,02	30,01	30,01	30,00
S5	400	100	40,02	40,02	40,01	40,00
S6	400	100	50,03	50,02	50,01	50,00
S7	400	100	60,03	60,02	60,02	60,00
S8	400	100	70,04	70,03	70,02	70,00
S9	400	100	85,05	85,04	85,02	84,99
S10	400	100	100,05	100,04	100,03	99,99

*acetonitril

3.2.3 Příprava směsných standardů deuterovaných polycyklických aromatických uhlovodíků pro sestavení kalibrační křivky III

Příprava kalibračních standardů o různých koncentracích deuterovaných PAH pro sestavení kalibrační křivky byla provedena stejně jako v případě kalibrační křivky I (Tabulka 8 a 9).

Tabulka 8: Příprava pracovních roztoků směsi deuterovaných PAH pro kalibrační řadu III

	c NAP-d ₈ [nmol/l]	c PHE-d ₁₀ [nmol/l]	c CHRY-d ₁₂ [nmol/l]	PR3 [μ l]	ACN [μ l]
S1	244,31	254,93	251,62	10	990
S2	2443,11	2549,26	2516,23	100	900
S3	4886,21	5098,52	5032,45	200	800
S4	7329,32	7647,78	7548,68	300	700
S5	9772,43	10197,04	10064,90	400	600
S6	12215,53	12746,30	12581,13	500	500
S7	14658,64	15295,55	15097,35	600	400
S8	17101,75	17844,81	17613,58	700	300
S9	20766,41	21668,70	21387,92	850	150
S10	24431,07	25136,06	25162,26	1000	0

Tabulka 9: Příprava kalibračních standardů pro sestrojení kalibrační křivky III

KALIBRACE III			NAP-d ₈	PHE-d ₁₀	CHRY-d ₁₂
	RT [μl]	pracovní roztoky [μl]	[nmol/l]	[nmol/l]	[nmol/l]
S0	480	20*	0	0	0
S1	480	20	9,77	10,20	10,06
S2	480	20	97,72	101,97	100,65
S3	480	20	195,45	203,94	201,30
S4	480	20	293,17	305,91	301,95
S5	480	20	390,90	407,88	402,60
S6	480	20	488,62	509,85	503,25
S7	480	20	586,35	611,82	603,89
S8	480	20	684,07	713,79	704,54
S9	480	20	830,66	866,75	855,52
S10	480	20	977,24	1005,44	1006,49

*acetonitril

3.3 Postup přípravy vzorků pro stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků v receptorové tekutině metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

3.3.1 Příprava kalibračních standardů pro sestrojení kalibrační křivky

Jako modelová matrice byla použita RT, která byla připravena postupem popsáním v kapitole 3.1.3. Pracovní roztoky směsi PAH pro kalibrační řadu I a II a pracovní roztoky směsi deuterovaných PAH pro kalibrační řadu III byly ředěny RT na požadovanou koncentraci vždy do objemu 500 μl. K takto připraveným vzorkům bylo přidáno 20 μl IS o známé koncentraci. V případě kalibrace I se jednalo o směs IS PAH (NAP-d₈, PHE-d₁₀ a CHRY-d₁₂) o koncentraci asi 308 nmol/l a v případě kalibrace II o koncentraci 30,7 μmol/l. V případě kalibrace III deuterovaných PAH byl použit jako IS PER-d₁₂ o koncentraci 308 nmol/l. K takto připraveným vzorkům bylo přidáno 500 μl vychlazeného ACN (-20 °C) pro precipitaci proteinů. Směs byla promíchána a inkubována při -20 °C po dobu 5 minut. PAH byly extrahovány hexanem. K směsi byl přidán 1 ml hexanu, směs intenzivně třepána 5 minut při 1400 rpm a následně odstředěna (3000 x g, 5 minut, laboratorní teplota). Celkem 800 μl horní hexanové vrstvy bylo přeneseno do čisté zkumavky. Ke zbytku byl přidán 1 ml hexanu a další proces byl stejný, jen do zkumavky byl přenesen 1 ml hexanové vrstvy. Ke spojeným extraktům (1800 μl) bylo přidáno 100 μl ACN a hexan opatrně odpařen v atmosféře dusíku při laboratorní teplotě tak, aby ve zkumavce zbyl objem asi 100 μl (odpovídá ACN). ACN se k spojeným hexanovým

vrstvám přidává k zabránění ztrát dvou a tří jaderných PAH, což se dělo v případě odpaření do sucha u jiných testovaných vzorků. Po odpaření bylo asi 100 μl ACN obsahující PAH přeneseno do insertu vialky se šroubovacím uzávěrem. Vzorky byly připraveny v duplikátu.

3.3.2 Příprava vzorků pro určení přesnosti metody

Z kalibračních standardů pro sestrojení kalibrační křivky I a II byly vybrány kalibrační standardy S2 a S8. Od každého bodu bylo připraveno 10 identických vzorků podle postupu uvedeném v kapitole 3.3.1.

3.3.3 Příprava vzorků pro určení výtěžnosti metody

Výtěžnost metody byla určena metodou standardního přídávku. K 450 μl RT bylo pipetováno 50 μl směsi PAH o dané koncentraci (v případě nulového přídávku bylo přidáno 50 μl ACN). Takto připravené vzorky byly zpracovány postupem uvedeným v kapitole 3.3.1. Vzorky byly připraveny v duplikátu.

3.4 Podmínky pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

PAH byly stanoveny metodou GC-MS. Byla použita kapilární kolona (SLB-PAHms s délkou 30 m, vnitřní průměrem 0,25 mm a tloušťkou filmu 0,25 μm).

- Průtok nosného plynu (He): 2,19 ml/min
- Teplota nástřiku: 270 °C
- Mód nástřiku: split v poměru 10:1 pro kalibraci II a 2:1 pro Kalibraci I a III
- Teplota iontového zdroje: 230 °C
- Teplota interface: 280 °C
- Ionizační energie: 70 eV
- Objem dávkovaného vzorku: 1 μl
- Teplotní gradient:
 - počáteční teplota 100 °C, udržována 13 min
 - rychlostí 25 °C/min nárůst do 220 °C
 - rychlostí 10 °C/min nárůst do 350 °C, udržovaná 8 min

- Doba analýzy: 39 min
- Typ snímání: SIM

Identifikace jednotlivých PAH byla provedena proměřením standardu PAH Mix 3, který obsahoval 18 PAH, metodou SCAN. Jednotlivé PAH byly identifikovány knihovnou spekter. Finální metodu používanou pro měření PAH v simulované matrici RT jsme vytvořili takto. Z vytvořené SIM tabulky, získané na základě proměření standardu PAH mix 3, jsme vybrali 4 PAH našeho zájmu s odpovídajícími retenčními časy a hodnoty m/z iontů (cílový ion a dva referenční). Stejně jsme postupovali v případě čtyř IS, které jsme v této práci používali. Finální SIM metoda tedy obsahovala rozsah retenčních časů a m/z ionty pro námi vybrané 4 PAH a 3 IS (tabulka 10).

Tabulka 10: Retenční časy a poměry hmotnosti k náboji (m/z) PAH určených metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

PAH	retenční čas [min]	cílový ion [m/z]	referenční ionty [m/z]
NAP-d8	9,71	136	135; 108
NAP	9,90	128	127; 102
PHE-d10	20,02	188	94; 80
PHE	20,06	178	176; 152
PYR	23,02	202	201; 101
CHRY-d12	25,90	240	236; 120
BaP	29,37	252	253; 126
PER-d12	29,50	264	265; 132

3.5 Analytické parametry metody

3.5.1 Linearita metody

Linearitu můžeme chápat jako posuzování závislosti mezi dvěma proměnnými, a to odezvou analyzátoru (analytický signál) a koncentrací analytu, tj. ověřuje schopnost metody poskytovat v určitém rozmezí koncentrací stanovované látky měřený signál, který je přímo úměrný měřené koncentraci. Za lineární rozsah odezvy je považován interval mezi nejnižší a nejvyšší hladinou stanovovaného analytu, v němž je analyt stanovován s určitou správností, přesností a linearitou.

Linearitu analytické metody dokládáme výsledky regresní analýzy, kdy uvádíme korelační koeficient R^2 (míra linearity), směrnici k (míra citlivosti) a úsek y (míra vedlejších vlivů).

3.5.2 Přesnost metody

Přesnost metody definujeme jako míru shody mezi nezávislými výsledky opakovaného měření jednoho homogenního vzorku za přesně daných podmínek. Pro možnost statistického vyhodnocení musí být počet opakování měření dostatečně velký. Dle podmínek opakování rozlišujeme opakovatelnost a reprodukovatelnost. Definicí opakovatelnosti je těsnost shody mezi výsledky po sobě následujících měření stejné měřené veličiny. Výsledky zkoušek se získají stejnou metodou, v téže laboratoři, stejnou osobou, za použití téhož vybavení během krátkého časového intervalu. Reprodukovatelnost definujeme jako míru shody mezi výsledky, které získáme měřením stejného analytu v totožném vzorku, totožnou metodou, ale za odlišných podmínek, jako je osoba provádějící měření, analyzátor, místo i čas.

Míru přesnosti vyjadřujeme variačním koeficientem (CV %).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - AVG)^2}{n - 1}} \quad CV (\%) = \frac{SD}{AVG} \times 100$$

kde SD je směrodatná odchylka, AVG je průměr, n je počet měření.

3.5.3 Správnost metody

Správnost metody definujeme jako míru shody mezi průměrnou hodnotou získanou z většího počtu měření a skutečnou hodnotou.

Správnost metody v praxi ověřujeme tzv. metodou standardních přídavek a zjišťujeme tzv. výtěžnost metody (R). Výtěžnost metody vypočítáme vynásobením poměru mezi nalezeným a přidaným množstvím stanovovaného analytu stem.

$$R (\%) = \frac{xp - xe}{P} \times 100$$

kde x_p je koncentrace analytu s přídatkem stanovované látky, x_e je endogenní koncentrace analytu a P je množství přídatku stanovované látky.

3.6 Zpracování výsledků

Pro vyhodnocení naměřených dat a zpracování výsledků byly použity programy GCSolution (Shimadzu, Kjóto, Japonsko) a MS Excel.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

PAH jsou látky karcinogenní a mutagenní povahy. Grimmer a kol. (1984) ve své práci studovali účinek PAH na myších, kdy nanášeli kondenzát z uhelných pecí na jejich kůži a pozorovali jejich možný karcinogenní účinek. Frakce kondenzátu PAH obsahující dva a tři aromatické kruhy (dohromady asi 77 % hm) neměly žádný karcinogenní účinek. Zatímco u BaP (0,702 mg/g kondenzátu) byl karcinogenní účinek potvrzen. PAH mohou být příčinou mnoha závažných zdravotních problémů, jako je např. rakovina plic. Touto problematikou se ve své práci zabývali Kim a kol. (2013), kteří BaP určili za potenciální karcinogen způsobující rakovinu plic. Patel a kol. (2020) se ve své studii zabývali účinky PAH na lidské zdraví. Studovali mechanismy účinků LMW a HMW PAH a dospěli k závěru, že HMW PAH představují pro lidský organismus vyšší riziko než LMW. Bylo provedeno mnoho studií zabývajících se expozicí PAH jak v prenatálním, tak postnatálním období (Freek a kol., 1994). Expozice PAH u dospělých v mnoha případech vyvolávala vznik astmatu nebo dokonce i zvýšenou úmrtnost na chronickou obstrukční plicní nemoc. Za mechanismus účinku byla považována vazba PAH na AHR, čímž docházelo ke zvýšené genové expresi a metabolické aktivaci CYP podílejících se na biotransformaci PAH. To má za následek vznik protizánětlivých mediátorů a oxidační stres. Protizánětlivé mediátory a oxidační stres mohly být potencionálně také signalizací zprostředkovanou Ca^{2+} ionty a depolarizací buněčné membrány (Lag a kol., 2020).

Stanovení hladin metabolitů PAH v lidské moči je nejčastější metodou jak zjistit, že jedinec byl vystaven v nedávné době expozici PAH. Metabolit BaP 1-OHP byl určen jako hlavní biomarker pro určení expozice PAH (Campo a kol., 2008). Vzhledem k tomu, že biologické monitorování metabolitů PYR i PHE neodráží vnitřní expozici karcinogenních PAH, tak první zmiňovaný PAH může být taktéž považován za biomarker. Jacob a kol. (2002) ve své studii prokázali, že rozšířené monitorování metabolitu PHE v moči skládajícího se z pěti izomerních fenolů a tří izomerních dihydrodiolů by mohlo být přínosné. Hladiny metabolitů PHE v moči závisely na stupni expozice PAH a poskytovaly informace o individuální rovnováze enzymů metabolizujících PAH, jako je CYP a epoxidhydroláza. Keimig a Morgan (1983) vyvinuli metodu stanovení 1-OHP v moči po kyselé hydrolýze jeho konjugátu β -glukuronidázou/arylsulfatázou.

Jednou z expozičních cest PAH do organismu je cesta dermální. Dosud nebylo publikováno mnoho studií zabývajících se transepidermální absorpcí PAH v porovnání s velkým počtem studií zabývajících se inhalační cestou expozice PAH. Kotingová a kol. (2009) ve své práci uvádějí, že zlatým standardem pro testování *in vitro* transdermální absorpce chemických látek je lidská nebo zvířecí kůže. Málková a kol. (2018) ve své práci při testování transepidermální absorpce PAH použili epidermální membránu z dorzální strany ušního boltce prasete domácího, kterou lze považovat za vhodnou náhradu lidské epidermální membrány. Množství PAH, které pronikne do systémové cirkulace, může být v případě použití plné kůže (2 mm silná, obsahující dermis i epidermis) podhodnocováno. Jako řešení se jeví alternativa použití transdermálních a transepidermálních hodnot, což by mohlo v konečném důsledku snižovat nejistoty v odhadech souvisejících zdravotních rizik.

Ditrichová (2015) uvádí za jeden z možných zdrojů transdermální absorpce PAH užívání mastí s přídavkem kamenouhelného dehtu pro léčbu chronické stacionární psoriázy Goeckermanovou metodou, zahrnující aplikaci surového kamenouhelného dehtu s následným ozářením ultrafialovým světlem. U ekzému a psoriázy stále tato metoda dosahuje dobrých léčebných výsledků. Kotingová (2015) provedla rozbor farmaceutického dehtu používaného k přípravě dehtové masti. Pro PAH, kterými se zabýváme v této práci, byly v dehtu stanoveny tyto hodnoty (NAP 10,8 % hm; PHE 5,6 % hm; PYR 1,9 % hm; BaP 0,9 % hm). Genotoxickým účinkem Goeckermanovy metody pro léčbu psoriázy se zabýval ve své práci Fiala a kol. (2006). Sledovali 23 pacientů s psoriázou, kteří podstoupili léčbu Goeckermanovou metodou. Obsah dehtu v terapeutické masti byl 5 %. U pacientů byly stanoveny vysoké hladiny metabolitů PHE a PYR, což svědčilo pro vysokou úroveň dermální penetrace. Dále bylo pozorováno významné zvýšení chromosomálních aberací v periferních lymfocytech ve vzorcích krve odebraných na konci léčby. Goeckermanovou metodou a jejím potenciálním karcinogenním účinkem se také zabývali Borská a kol. (2006).

Výběr PAH, které stanovujeme v naší práci, je úzce spjat se zaměřením Ústavu hygieny a preventivního lékařství LF HK v Hradci Králové, který se dlouhodobě zabývá problematikou dermální expozice PAH (Borská a kol., 2007; Kotingová, 2015; Fiala, 2006). Hladiny těchto PAH stanovovali metodou HPLC-FLD a požádali naše pracoviště o vyvinutí metody GC-MS, která by měla být stejně citlivá, ale více selektivní s možností rozšíření o stanovení dalších PAH.

4.1 Optimalizace metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků v receptorové tekutině

Pro stanovení vybraných PAH byla zavedena metoda GC-MS. Metoda byla optimalizovaná pro separaci PAH ve standardu PAH Mix 3 (viz kapitola 3.4.). Zvolené podmínky chromatografické separace byly použity pro stanovení vybraných PAH v RT.

Doba analýzy v naší práci je 39 min. Doba analýzy metody HPLC-FLD v práci Kotingové (2015) je 35 min. Na tomto místě je třeba podotknout, že naší metodou dokážeme separovat celkem 18 PAH a jejich derivátů. Retenční časy (tR) jednotlivých PAH v její práci byly následovné (NAP 5,8 min; PHE 10,3 min; PYR 13,9 min a BaP 21,2 min) v porovnání s našimi tR (NAP 9,77 min; PHE 20,02 min; PYR 22,99 min a BaP 29,30 min). Chromatogramy jsou součástí Příloh 1-4. V závislosti na tom, kolik a jaké PAH budou stanovovány, lze úpravou teplotního gradientu dobu analýzy zkrátit.

4.1.1 MS podmínky

Byly optimalizovány podmínky MS (tabulka 10). Givechev a kol. (2020) ve své práci, kdy stanovovali metodu GC-MS PAH ve vepřovém mase, volili pro námi stanovované PAH tyto cílové a referenční m/z ionty, na prvním místě je uváděn m/z cílového iontu, další dva jsou m/z referenčních iontů: (NAP 128, 127, 129; PHE 178, 176, 89; PYR 202, 101, 202; BaP 252, 126, 250). Cheng a kol. (2012), kteří stanovovali PAH v sedimentu průmyslové oblasti metodou GC-MS, používali ve své práci stejné IS jako my. V tabulce 11 je uvedeno srovnání cílových a referenčních m/z iontů.

Tabulka 11: Porovnání zvolených hodnot m/z iontů s prací Cheng a kol. (2012)

PAH	m/z iontu			m/z iontu (<i>Cheng a kol., 2012</i>)		
	cílový	referenční	referenční	cílový	referenční	referenční
NAP-d ₈	136	135	108	136	–	–
NAP	128	127	102	128	129	127
PHE-d ₁₀	188	94	80	188	–	–
PHE	178	176	152	178	179	176
PYR	202	201	101	202	200	203
CHRY-d ₁₂	240	236	120	240	–	–
BaP	252	253	126	252	253	125
PER-d ₁₂	264	132	118	264	–	–

Jak je z tabulky patrné, Cheng a kol. volili pro IS jen cílový iont. V případě ostatních PAH jsme se lišili tím, že jsme jako druhý referenční iont volili takový, který vykazoval rozdílnou hodnotu od cílového iontu a zároveň poskytoval dostatečnou intenzitu. Hmotnostní spektra stanovovaných PAH jsou uvedena v Příloze 5-8.

4.1.2 Odpařování hexanu z extraktu

Byl optimalizován proces odpařování hexanu z extraktu v atmosféře dusíku. Odpařením organického rozpouštědla, do kterého se extrahují PAH dosáhneme zkoncentrování vzorku, a tak zvýšení citlivosti metody. Běžně se organické rozpouštědlo odpařuje do sucha a odparek je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle pro GC, případně je provedena derivatizace. I my jsme prvně opatrně odpařili hexan do sucha a odparek rozpouštěli v ACN, případně ve směsi methanolu a dichlormethanu (1:1, v/v). Tímto způsobem jsme významně ztráceli naftalen a deuterovaný naftalen. Proto jsme přistoupili k tomu, že ke spojeným hexanovým vrstvám jsme před odpařením hexanu přidali ACN. Opatrným a velmi mírným čeráním hladiny proudem dusíku jsme při laboratorní teplotě odpařili hexan, a ACN, který je méně těkavý se za těchto podmínek prakticky neodpařil. ACN obsahující PAH jsme poté převedli do insertu vialky, vialku uzavřeli a vložili do autosampleru přístroje GC-MS. Za těchto podmínek byly plochy píků naftalenu a deuterovaného naftalenu nesrovnatelně větší než v případě, kdy k hexanu nebyl přidán ACN a extrakt odpařen do sucha.

Touto problematikou se podrobněji zabýval ve své práci Dabrowski. K extraktu před odpařením organického rozpouštědla se přidával tzv. „keeper“, rozpouštědlo s

vysokým bodem varu, jako jsou např. isooktan, toluen, nonan, oktanol a dodekan. Při odpařování volil laboratorní teplotu, což samozřejmě vedlo k delší době odpařování, a tak byla vyšší spotřeba dusíku. Jako nejvíce problematické se ukázaly těkavější PAH s nižší molekulovou hmotností, jako je NAP. Pravidelně tyto PAH dosahují nižších hodnot výtěžnosti. Dabrowski v případě NAP jako stabilizátor použil isooktan a nonan. Výtěžnost NAP bez isooktanu a nonanu byla 53,9 %. Oproti tomu s přídavkem isooktanu výtěžnost NAP dosáhla 96,2 %, v případě použití nonanu 77,7 % (*Dabrowski, 2016, Dobrowski 2020*).

4.1.3 Receptorová tekutina

RT se běžně používá pro testování transdermální absorpce PAH, jak je uvedeno v kapitolách 1.6.3.1 a 1.6.3.2. Kotingová (2015) jako základ pro RT zvolila Hanksovův roztok (vodný roztok obsahující glukózu a soli). Jako nevýhodu v případě použití Hanksova roztoku uváděla tvorbu CO₂. Příčina tvorby CO₂ bylo velké množství NaHCO₃ v Hanksově roztoku, výsledkem pak byla tvorba bublinek. Další nevýhodou Hanksova roztoku je možná změna pH RT v průběhu analýzy. Vzhledem k lipofilitě PAH byla jako další základ RT volena látka, která by zvyšovala rozpustnost PAH v RT, a tím je BSA o koncentraci 3–5 %. Selzer a kol. (2013) ve své práci, která se zabývala průchodem xenobiotik přes kůži, uvádějí jako základní médium RT fosfátový pufr o pH 7,4. Dále pro zvýšení rozpustnosti xenobiotik v RT doporučují přidání těchto látek (50 % ethanolu, polyethylenglykol 20, 6 % oleyletheru, 5 % BSA). Nejběžnějším médiem používaným pro lepší rozpustnost xenobiotik v RT je BSA (*Krüse a kol., 2007*). Další možností, jak zvýšit rozpustnost xenobiotik v RT je změna pH RT. Změna pH RT daleko od fyziologických hodnot pH kůže může vést k dramatickým změnám v rozpustnosti ionizovaných léčiv v důsledku různého stupně ionizace (*Hadgraft a kol., 2000*). Málková a kol. (2018) ve své práci jako základ RT zvolili fosfátový pufr o pH 7,4 a 4% BSA. V naší práci jsme zvolili stejné složení RT, jako Málková a kol.

4.1.4 Příprava vzorků pro analýzu a možnost detekce

Postup přípravy vzorku v naší práci je popsán v kapitole 3.3.1. K 500 µl vzorku PAH v RT bylo přidáno 20 µl IS, poté následovala precipitace proteinů přidáním 500 µl ACN. Dávkovaný objem vzorku byl 1 µl. V případě dávkování kalibračních standardů kalibrací I a III (asi 10-1000 nmol/l) byl zvolen split mód 2:1, v případě kalibrace II (asi 1-1000

μmol/l) 10:1. Postup přípravy kalibrátorů je popsán v kapitole 3.2. Příprava byla volena tak, aby co nejvíce odpovídala přípravě kalibrátorů jako v práci Kotingové (2015).

V práci Kotingové (2015) byly jednotlivé kalibrační standardy PAH (NAP, PHE, PYR a BaP) připraveny v RT. Zásobní a pracovní roztoky PAH byly připraveny v ACN. Do zkumavky obsahující 300 μl deproteinačního činidla s IS (acenaften v ACN) bylo přidáno 200 μl vzorku. Na HPLC kolonu bylo dávkováno 50 μl supernatantu. Nejnižší bod kalibrace měl hodnotu 2,4 nmol/l, v případě naší metody asi 10 nmol/l. V přepočtu množství dávkovaného vzorku na kolonu je však naše metoda o něco citlivější (17 fmol oproti 48 fmol). To však nemění nic na tom, že metodou HPLC-FLD můžeme ve vzorku detegovat nižší hladiny PAH než metodou GC-MS. Je to dáno tím, že v případě HPLC lze na analytickou kolonu dávkovat až 50 μl vzorku, metodou GC s kapilární kolonou lze ve většině případů dávkovat maximálně 1 μl vzorku.

4.2 Validace metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Pro základní validaci byly testovány pouze linearita, přesnost a výtěžnost metody. Cílem této práce bylo zjistit, zda metoda GC-MS může nahradit současnou metodu HPLC-FLD. Proto byla provedena pouze základní validace metody. V případě zájmu o využití této metody pro stanovení vybraných PAH v RT budou validační parametry rozšířeny. Řádná validace metody je totiž časově, ale především finančně velmi náročné.

4.3 Analytické parametry metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků v receptorové tekutině

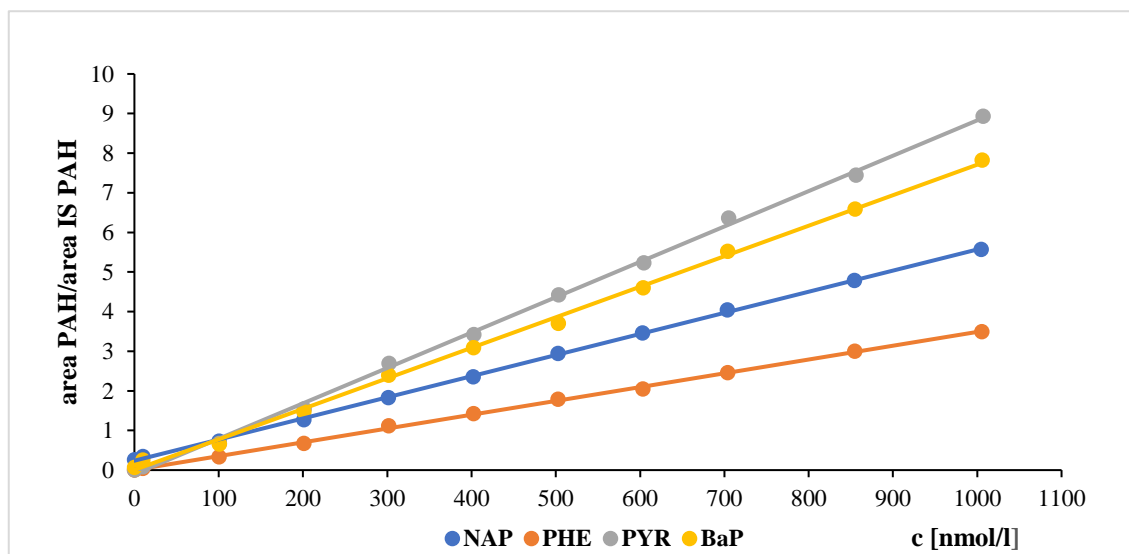
4.3.1 Linearita

Linearitu metody jsme určovali metodou kalibrační křivky. Pro každou kalibrační křivku bylo připraveno v duplikátu 11 kalibračních standardů včetně nulového. Kalibrační křivky byly sestaveny jako závislost poměru plochy píku PAH k ploše píku daného IS na koncentraci konkrétního PAH.

Parametry kalibračních křivek jsou shrnuty v tabulkách 12-14. Grafy kalibračních křivek jsou uvedeny na obrázcích 10-12.

Tabulka 12: Parametry kalibračních křivek I

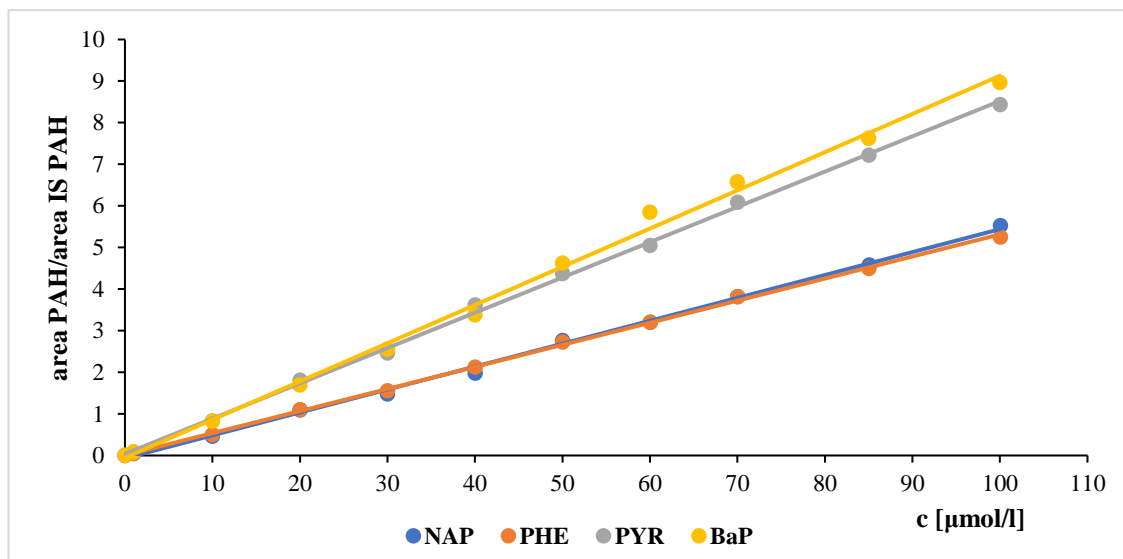
PAH	směrnice (k)	intercept (q)	korelační koeficient (R ²)
NAP	0,0053	0,2538	0,9997
PHE	0,0035	0,0037	0,9993
PYR	0,009	-0,1096	0,9986
BaP	0,0077	0,0056	0,9981



Obrázek 10: Graf kalibračních křivek I vybraných PAH

Tabulka 13: Parametry kalibračních křivek II

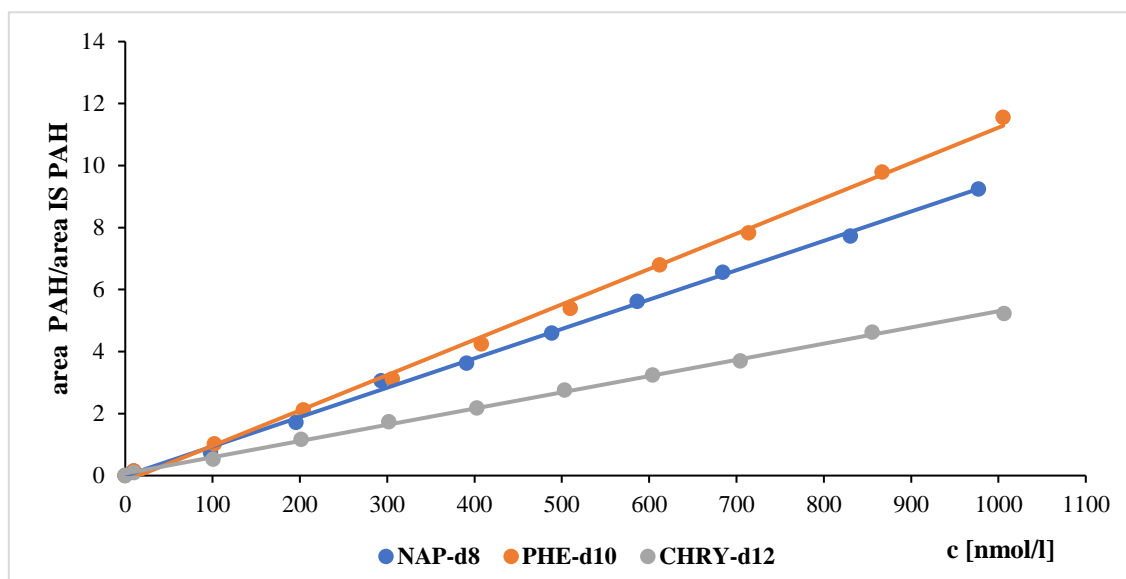
PAH	směrnice (k)	intercept (q)	korelační koeficient (R ²)
NAP	0,0544	-0,0491	0,9966
PHE	0,0532	0,0124	0,9993
PYR	0,0855	0,0165	0,9986
BaP	0,0918	-0,0627	0,9966



Obrázek 11: Graf kalibračních křivek II vybraných PAH

Tabulka 14: Parametry kalibračních křivek III (deuterované PAH)

deuterované PAH	směrnice (k)	intercept (q)	korelační koeficient (R ²)
NAP-d ₈	0,0093	-0,0167	0,9980
PHE-d ₁₀	0,0116	-0,1791	0,9980
CHRY-d ₁₂	0,0052	0,0718	0,9984



Obrázek 12: Graf kalibračních křivek III vybraných deuterovaných PAH

4.3.2 Přesnost metody

Přesnost jako míra shody výsledků z většího počtu měření byla vyjádřena variačním koeficientem (CV %). Přesnost metody byla testována na čtyřech koncentračních hladinách. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 15.

Tabulka 15: Přesnost metody pro stanovení vybraných PAH

PAH	průměrná koncentrace [nmol/l]	SD [nmol/l]	CV [%]
NAP	84,25	8,01	9,51
	653,13	23,18	3,55
	8978,09	260,02	2,90
	55429,69	2007,08	3,62
PHE	90,06	4,64	5,16
	661,71	22,24	3,36
	8110,06	261,76	3,23
	57736,57	2092,18	3,62
PYR	99,97	6,29	6,29
	669,04	46,18	6,90
	8540,79	721,53	8,45
	64094,49	5026,22	7,84
BaP	87,71	4,14	4,72
	666,95	37,96	5,69
	9012,27	747,93	8,30
	61508,00	4368,97	7,10

4.3.3 Výtěžnost metody

Výtěžnost metody pro NAP se pohybovala od 72 % až po 121 %, průměrná hodnota výtěžnosti byla 88,19 %, pro PHE v rozmezí od 88,4 % po 99,8 % s průměrnou hodnotou 93,19 %, pro PYR v rozmezí od 84,47 % až po 93,3 %, s průměrnou hodnotou 90,09 % a pro BaP v rozmezí od 91,15 % po 103,56 %, s průměrnou hodnotou 96,99 %. Nejnižší výtěžnosti bylo dosaženo s NAP, což může být důsledkem ztráty při odpařování extrakčního činidla (hexanu). V tabulce 16-19 jsou shrnuty hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé PAH.

Tabulka 16: Parametry výtěžnosti metody pro naftalen

přídavek NAP [nmol/l]	nalezený přídavek [nmol/l]	výtěžnost [%]
20,10	24,44	121,61
50,24	40,9	81,41
100,48	77,86	77,49
502,42	362,95	72,24
průměrná výtěžnost [%]		88,19
SD [nmol/l]		22,60
CV [%]		25,63

Tabulka 17: Parametry výtěžnosti metody pro fenanthren

přídavek PHE [nmol/l]	nalezený přídavek [nmol/l]	výtěžnost [%]
20,11	20,06	99,76
50,27	44,43	88,38
100,54	92,87	92,37
502,72	463,86	92,27
průměrná výtěžnost [%]		93,19
SD [nmol/l]		4,75
CV [%]		5,10

Tabulka 18: Parametry výtěžnosti metody pro pyren

přídavek PYR [nmol/l]	nalezený přídavek [nmol/l]	výtěžnost [%]
20,14	18,28	90,76
50,35	42,53	84,47
100,70	93,96	93,30
503,51	462,43	91,84
průměrná výtěžnost [%]		90,09
SD [nmol/l]		3,89
CV [%]		4,32

Tabulka 19: Parametry výtěžnosti metody pro benzo[a]pyren

přídavek BaP [nmol/l]	nalezený přídavek [nmol/l]	výtěžnost [%]
20,11	20,83	103,56
50,29	50,7	100,82
100,57	91,67	91,15
502,85	464,86	92,44
průměrná výtěžnost [%]		96,99
SD [nmol/l]		6,13
CV [%]		6,32

5. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zavést metodu plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení PAH v receptorové tekutině jako náhradu metody kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Presentovaná metoda plynové chromatografie umožňuje separovat a detegovat další PAH, což bylo prokázáno analýzou standardní směsi 18 PAH. Velkým problémem při stanovení PAH je kontaminace ze životního prostředí. Ve vzorcích nulového standardu bylo detegováno stopové množství celé řady PAH. To je také jeden z důvodů, proč nahradit kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí. U některých nulových standardů se objevovaly velké píky buď stanovovaného PAH nebo kontaminující látky. V případě hmotnostní detekce lze ve skenovacím módu určit, zda se jedná a stanovovaný analyt nebo kontaminující látku. Zjistili jsme, že u většiny námi stanovovaných PAH se v nulovém standardu objevovaly PAH, nejvíce viditelné to bylo v případě pyrenu. Jednou z možností, jak tento problém obejít, je používat při pokusech *in vitro* deuterované PAH. Metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí lze přirozené a deuterované PAH od sebe odlišit, dokonce i separovat. V tom spatřujeme velkou výhodu plynové chromatografie s hmotnostní detekcí oproti kapalinové chromatografii s fluorescenční detekcí. Vybrané analytické parametry, linearita a přesnost, byly uspokojivé, horší výsledky byly v případě výtěžnosti metody. V případě zájmu o námi zavedenou metodu bude validace podrobnější a rozšířená o takové parametry, jako je určení meze detekce a stanovitelnosti z kalibračních křivek, účinky matrice na ionizaci analytů, a především porovnání se stávající metodou kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Jedná se o časově, ale především finančně náročné postupy.

6. SEZNAM LITERATURY

1. ABDEL-SHAFY, H. I., MANSOUR, M. S.: A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. **2016** (25), 107-123.
2. ABEDIN, Z., SEN, S., FIELD, J.: Aldo-keto reductases protect lung adenocarcinoma cells from the acute toxicity of B[a]P-7,8- trans-dihydrodiol. *Chemical Research in Toxicology*. **2012** (25), 113-121.
3. ABID, Z., ROY, A., HERBSTMAN, J. B. et al.: Urinary Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites and Attention/Deficit Hyperactivity Disorder, Learning Disability, and Special Education in U.S. Children Aged 6 to 15. *Journal of Environmental and Public Health*. **2014** (6), 28-33.
4. AGUILERA, F., MÉNDEZ, J., PÁSARO, E. et al.: Review on the effects of exposure to spilled oils on human health. *Journal of Applied Toxicology*. **2010** (30), 291-301.
5. ALEXANDROV, K., ROJAS, M., SATARUG, S.: The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation. *Toxicology Letters*. **2010** (1), 63-68.
6. ALI, D., VERMA, A., MUJTABA, F. et al.: UVB-induced apoptosis and DNA damaging potential of chrysene via reactive oxygen species in human keratinocytes. *Toxicology Letters*. **2011** (204), 199-207.
7. ARMSTRONG, B., HUTCHINSON, E., UNWIN, J. et al.: Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: an overview and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*. **2004** (9), 970-978.
8. BAJUSOVÁ, I., LEGÁTH, L.: Validácia stanovenia 1-hydroxypyrenu v moči metódou HPLC. *Chemické listy*. **2015** (109), 55-60.
9. BARTOŠOVÁ, L., BAJGAR, J.: Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. *Current Medicinal Chemistry*. **2012** (27), 4671-4677.
10. BATTAWI, S., HO, Y. B., LATIF, M. B. et al.: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Blood Samples Using Solid Phase Extraction

and Gas Chromatography Mass Spectrometry. *A Review Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. **2019** (204), 165-169.

11. BENIGNI, R., BOSSA, C.: Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: A review with implications for predictive toxicology. *Chemical Reviews*. **2011** (4), 2507-2536.
12. BERIRO, D.J., CAVE, M.R., WRAGG, J.: A review of the current state of the art of physiologically-based tests for measuring human dermal in vitro bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil. *Journal of Hazardous Materials*. **2016** (305), 240-259.
13. BILAL, M., RASHEED, T., IQBAL, H. et al.: Peroxidases-assisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction mechanisms of industrial dyes. *Science of the Total Environment*. **2018** (644), 1- 13.
14. BOLDEN, A. L., ROCHESTER, J. R., SCHULTZ, K. et al.: Polycyclic aromatic hydrocarbons and female reproductive health: a scoping review. *Reproductive Toxicology*. **2017** (73), 61-74.
15. BONNER, M. R., ROTHMAN, N., MUMFORD, J. L. et al.: Green tea consumption, genetic susceptibility, PAH-rich smoky coal, and the risk of lung cancer. *Mutation Research*. **2005** (582), 53-60.
16. BORSKA, L., ANDRYS, C., KREJSEK, J. et al.: Genotoxic hazard and cellular stress in pediatric patients treated for psoriasis with the Goeckerman regimen. *Pediatric Dermatology*. **2009** (26), 23-27.
17. BORSKÁ, L., FIALA Z., KREJSEK, J. et al.: Cytogenetic and immunological changes after dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UV radiation. *Physiological Research*. **2006** (5), 317-323.
18. BOUWSTRA, J., PONEC, M. et al.: The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2006** (12), 2080-2095.
19. BRAZKOVA, M., KRASTANOV, A.: Polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, effects and biodegradation. In: *Proceedings of the International Scientific Conference of University of Ruse, Razgrad, Bulgaria*. **2013** (52), 1-5.

20. BRONAUGH, ROBERT L.: In Vitro Diffusion Cell Studies. In: RIVIERE, J. Edmond. *Dermal Absorption Models in Toxicology and Pharmacology. Boca Raton: Taylor & Francis. 2006*, 21-26.
21. BURCHIEL, S. W., LUSTER, M. I.: Signaling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes. *Clinical Immunology. 2001* (98), 2-10.
22. BUSHEY, R. T., DLUZEN, D. F., LAZARUS, P.: Importance of UDP-glucuronosyltransferases 2A2 and 2A3 in tobacco carcinogen metabolism. *Drug Metabolism and Disposition. 2013* (41), 170-179.
23. CAMPO, L., ROSSELLA, F., FUSTINONI, S.: Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2008* (875), 531-540.
24. CARMELLA, S. G., CHEN, M., YAGI, H. et al.: Analysis of phenanthrols in human urine by gas chromatography-mass spectrometry: potential use in carcinogen metabolite phenotyping. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2004* (13), 21-67.
25. DABROWSKI, L.: Evaluation of Solvents Used as Keepers in the Determination of Organic Pollutants by GC/MS. *Molecules. 2020* (25), 2-11.
26. DABROWSKI, L.: Review of use of keepers in solvent evaporation procedure during the environmental sample analysis of some organic pollutants. *Trends in Analytical Chemistry. 2016* (80), 507-516.
27. DÍAZ M. R., RODRIGUEZ, M. et al.: Analysis of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in precarious workers of highly exposed occupational scenarios in Mexico. *Environmental Science and Pollution Research. 2021* (28), 23087-23098.
28. DIGGS, D. L., HUDERSON, A. C., HARRIS, K., L. et al.: Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a perspective. *Journal of environmental science and health. 2011* (4), 57-324.

29. DITRICOVÁ, D.: Návrat k dehtovým externům. *Dermatologie pro praxi*. **2014** (4), 138–139.
30. DONG, C. D., CHEN, C. F., CHEN, C. W.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial harbor sediments by GC-MS. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **2012** (6), 2175-2188.
31. DOST, K., IDELI, C.: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV–Vis detection. *Food Chemistry*. **2012** (1), 193-199.
32. ERDO, F., HASHIMOTO, N., KARVALY, G. et al.: Critical evaluation and methodological positioning of the transdermal microdialysis technique. A review. *Journal of Controlled Release*. **2016** (233), 147-161.
33. FIALA, Z., BORSKA, L., PASTORKOVA, A. et al.: Genotoxický účinek Goeckermanova režimu psoriázy. *Archives of Dermatological Research*. **2006** (5), 243-251.
34. FREEK, A., MARIEKE, V., GERARD, P. et al.: Analysis of 3-Hydroxy Benzo[a]pyrene in Urine for the Biomonitoring of Human Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Analytical Toxicology*. **1994** (18), 195–204.
35. GAO, P., SILVA, E., HOU, L. et al.: Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective. *Environment International*. **2018** (119), 466– 477.
36. GIVECHEV, I., TANEV, D., DANALEV, D.: Development and validation of GC/MS method for simultaneous determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pork meat matrix. *Acta Chromatographica*. **2020** (33), 57-63.
37. GRIMMER, G., BRUNE, H., DEUTSCH-WENZEL, R. et al.: The contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons to the carcinogenic impact of emission condensate from coal-fired residential furnaces evaluated by topical application to the skin of mice. *Cancer Letters*. **1984** (2), 167-176.
38. GUILLEN, M. D., SOPELANA, P., PARTEARROYO, M. A.: Reviews on Environmental Health. *Toxicology Reports*. **2011** (12) 133-137.

39. GUO, Y., HUO, X., WU, K. et al.: Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in umbilical cord blood of human neonates from Guiyu, China. *The Science of the total environment*. **2012** (420), 40-45.
40. GUPTA, M. K., JAIN, R., SINGH, P. et al.: Determination of Urinary PAH Metabolites Using DLLME Hyphenated to Injector Port Silylation and GC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. **2015** (5), 365-373.
41. HADGRAFT, J., VALENTA, C.: pH, pKa and dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. **2000** (2), 243-247.
42. HERBSTMAN, J. B., TANG, D., ZHU, D. et al.: Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo[a]pyrene-DNA adducts, and genomic DNA methylation in cord blood. *Environmental Health Perspectives*. **2012** (5), 733- 738.
43. CHALUPOVÁ, Z., MASTEIKOVÁ, R., RABIŠKOVÁ, M. et al.: Použití dispergační látky při zpracování dehtu do topických hydrofobních a hydrofilních přípravků. *Praktické lékařství*. **2007** (3) 123-125.
44. JACOB, J., SEIDEL, A.: Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. **2002** (778), 31-47.
45. KAFILZADEH, F., SHIVA, A. H., MALEKPOUR, R.,: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water and sediments of the Kor River. *Middle-East Journal of Scientific Research*. **2011** (10), 1-7.
46. KAMINSKI, N. E., FAUBERT, B. L., HOLSAPPLE, M. P. et al: Casarett and Doull's Toxicology, the basic science of poisons. **2008** (526), 265- 290.
47. KEIMIG, S.D, KIRBY, K. W., MORGAN, D. P. et al.: Identification of 1- hydroxypyrene as a major metabolite of pyrene in pig urine. *Xenobiotica*. **1983** (7) 415- 420.
48. KIM, K. H, JAHAN, S. A, KABIR, E. et al.: A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*. **2013** (60), 71-80.

49. KOTINGOVÁ, L., ROSSELLA, F., PAVANELLO, S. et al.: Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coke-oven workers. *Toxicology Letters*. **2010** (192), 72-78.
50. KOTINGOVÁ, L. Kinetika vybraných látek při dermální expozici (Polycyklické aromatické uhlovodíky) [disertační práce]. Hradec Králové: Univerzita Karlova; **2015**.
51. KOTINGOVÁ, L., et al.: Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. *Chemické listy*. **2009** (7), 533-539.
52. KRÜSE, J., GOLDEN, D., WILKINSON, S. et al.: Analysis, interpretation, and extrapolation of dermal permeation data using diffusion-based mathematical models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2007** (96), 682-703.
53. KUMAR, B., TYAGI, J., VERMA, L. et al.: Concentrations, source identification and health risk of selected priority polycyclic aromatic hydrocarbons in residential street soils. *Advances in Applied. Science Research*. **2014** (3), 130-139.
54. LAG E, B., DANUTA, M., Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *Journal of Applied Genetics*. **2016** (58), 321–330.
55. LÅG, M., ØVREVIK, J., REFSNES, M. et al.: Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons in air pollution-induced non-malignant respiratory diseases. *Respiratory Research*. **2020** (21), 299-308.
56. LI, H., CHEN, J., WU, W. et al.: Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in different size fractions of oil from a coke oven plant and its relationship to organic carbon content. *Journal of Hazardous Materials*. **2010** (729), 176-234.
57. LI, Z., ROMANOFF, L. C., TRINIDAD, D. A. et al.: Measurement of urinary monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons using automated liquid-liquid extraction and gas chromatography/isotope dilution high-resolution mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. **2006** (16), 5744-5751.
58. LUAN, T., FANG, S., ZHONG, Y. et al.: Determination of hydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by fully automated solid-phase microextraction derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2007** (2),37-43.

59. MÁLKOVÁ, A., KOTINGOVÁ, L., KANĎÁR, R. et al.: Ttrans-epidermal absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Hygiene*. **2018** (3), 76-83.
60. MANIKANDAN, P., NAGINI, S.: Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: A review. *Current Drug Targets*. **2018** (19), 38-54.
61. MOORTHY, B., CHU, C., CARLIN, D. J.: Polycyclic aromatic hydrocarbons: From metabolism to lung cancer. *Toxicological Sciences*. **2015** (145), 5–15.
62. MORDUKHOVICH, I., ROSSNER, P., TERRY, J., R.: Associations between polycyclic aromatic hydrocarbon-related exposures and p53 mutations in breast tumors. *Environmental Health Perspectives*. **2010** (118), 511-518.
63. NIEMIRYCZ, E., GOZDEK, J., MARON, D.: Variability of organic carbon in water and sediments of Odra River and its tributaries. *Polish Journal of Environmental Studies*. **2006** (15), 557-553.
64. OLUSEYI, T., OLAYINKA, K., ALO, B. et al.: Comparison of extraction and clean-up techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil samples. *African Journal of Environmental Science and Technology*. **2011** (7), 482-493.
65. OTBERG, N., PATZELT, A., RASULEV, U. et al.: The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **2008** (4), 488-492.
66. PANNATIER, A., JENNER, P., TESTA, B. et al.: The skin as a drug-metabolizing organ. *Drug Metabolism Reviews*. **1978** (8), 319-343.
67. PATEL, S., AUNDHIA, CH., SETH, A. et al.: EMULGEL: A novel approach for topical drug delivery system. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical sciences*. **2016** (3), 501-506.
68. PATEL, A. B., SHAIKH, S., JAIN, K. R. et al.: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Frontiers in Microbiology*. **2020** (11), 562-813.
69. PLEIL J. D, STIEGEL, M. A, SOBUS, J. R.: exposure assessment for trace-level polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using human blood and plasma analysis. *Journal of chromatography B*. **2010** (21), 53-60.

70. POSTER, D. L., SCHANTZ, M. M., SANDER, L. C. et al.: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2006** (4), 859- 881.
71. RAMALHOSA, M. J., PAÍGAA, P., MORAISA, S. et al.: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: Optimisation and validation of microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*. **2012** (135), 235-241.
72. RASMUSSEN, K.E., Quantitative morphine assay by means of gas-liquid chromatography on-column silylation. *Journal of Chromatography A*. **1976** (120), 491– 495.
73. RAVINDRA, K., SOKH, I. R., GRIEKEN R. V.: Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*. **2008** (42), 895-921.
74. RENGARAJAN, T., RAJENDRAN, P., NANDAKUMAR, N. et al.: Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **2015** (5), 182-189.
75. SELZER, D., ABDEL-MOTTALEB, M. M., HAHN, T.: Finite and infinite dosing: difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2013** (65), 278-294.
76. SEN, S., FIELD, J.: Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites: Radical cations and ketones. *Advances in Molecular Toxicology*. **2013** (7), 83-127.
77. SHIMADA, T., ODA, Y., GILLAM, E. M. et al.: Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug Metabolism and Disposition*. **2001** (29), 1176-1182.
78. SUIKO, M., KUROGI, K., HASHIGUCHI, T. et al.: Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **2017** (81), 63-72.

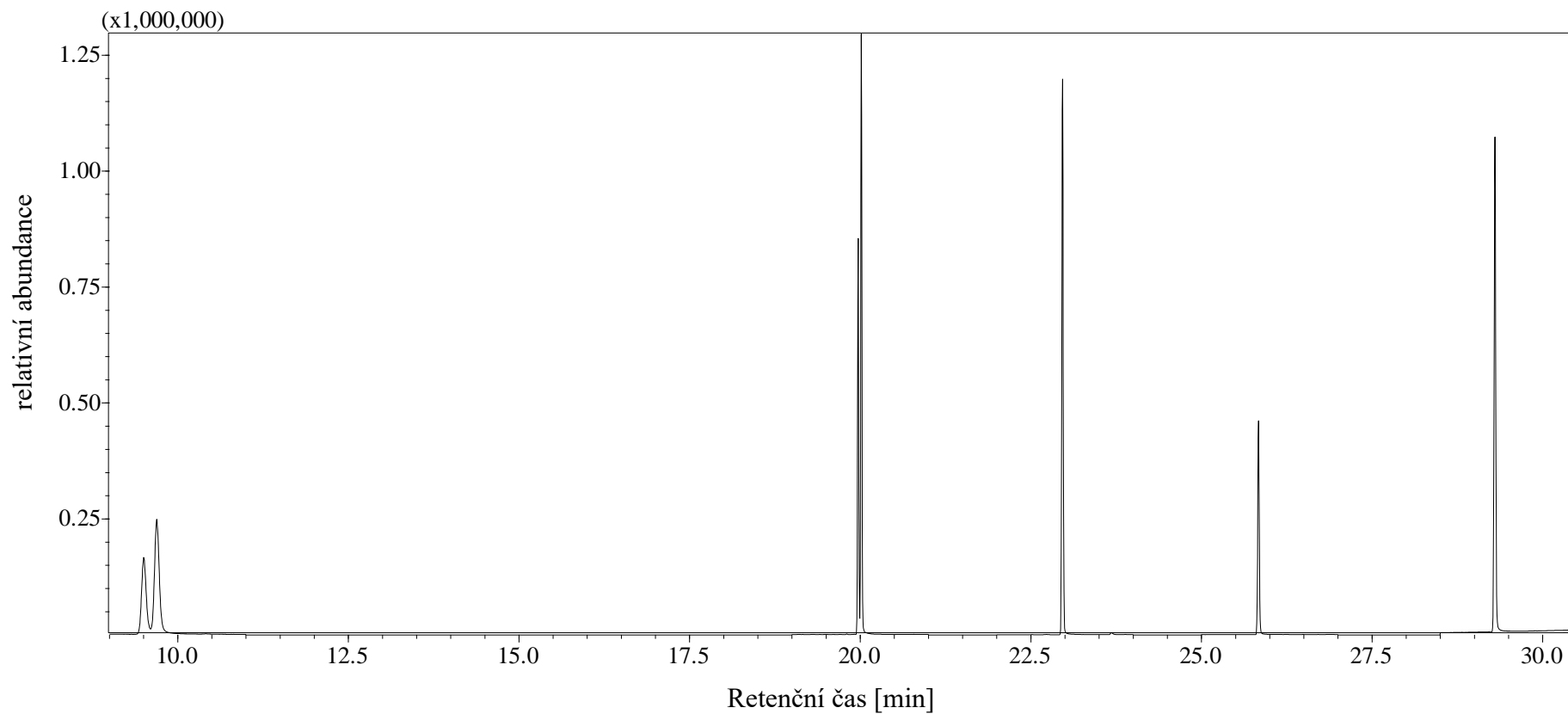
79. SUNDBERG, K., DREIJ, K., SEIDEL, A. et al.: Glutathione conjugation and DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene diol epoxides in V79 cells stably expressing different human glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*. **2002** (2), 170-179.
80. TORNERO, V., D'ALCALÀ, M. R.: Contamination by hazardous substances in the gulf of Naples and nearby coastal areas: A review of sources, environmental levels and potential impacts in the MSFD perspective. *Science of the Total Environment*. **2014** (28), 466-467.
81. TSANG, H. L., WU, S., LEUNG, C. K. M.: Body burden of POPs of Hong Kong residents, based on human milk, maternal and cord serum. *Environment International*. **2011** (37), 51-142.
82. UNWIN, J., COCKER, J., SCOBBIIE, E. et al.: An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. *Annals of Occupational Hygiene*. **2006** (4), 395-403.
83. WANG, Y., TIAN, Z., ZHU, H. et al.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils and vegetation near an e-waste recycling site in South China: concentration, distribution, source, and risk assessment. *Science of the Total Environment*. **2012** (15), 93-187.
84. WANG, B., JIN, L., REN, A. et al.: Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Maternal Serum and Risk of Neural Tube Defects in Offspring. *Environmental science & technology*. **2015** (49), 96-588.
85. WASSENBERG, D. M., DI GIULIO, R. T.: Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environmental Health Perspectives*. **2004** (17), 1658-1664.
86. YIN, S., TANG, M. S., CHEN., F. et al.: Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): The correlation with and impact on reproductive hormones in umbilical cord serum. *Environmental Pollution*. **2017** (220), 29-37.
87. ZHANG, L., JIN, Y., HUANG, M. et al.: The role of human aldo-keto reductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclic aromatic hydrocarbons:

Interconversion of PAH catechols and PAH o-quinones. *Frontiers in Pharmacology*. **2012** (3), 193-199.

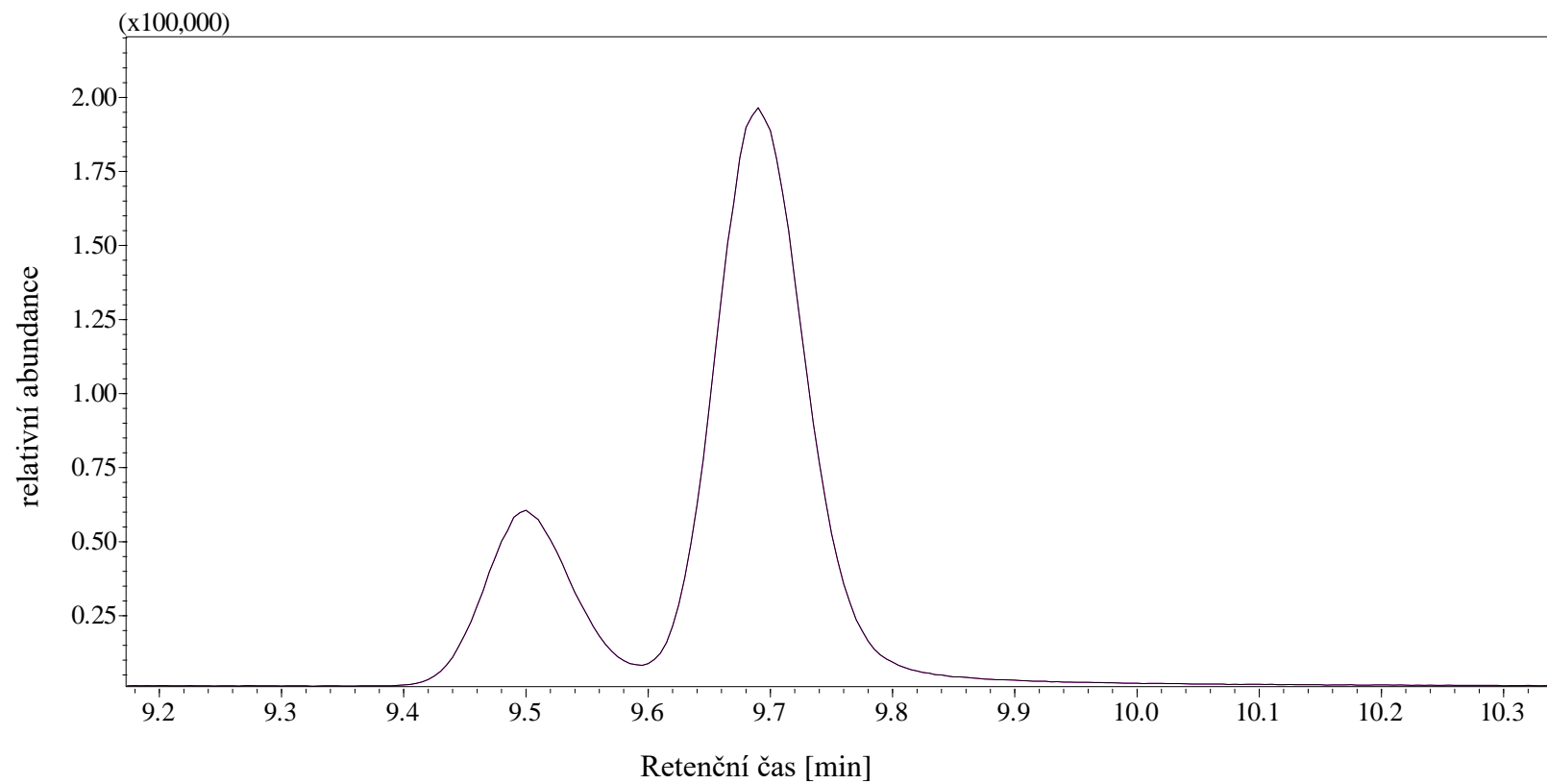
88. ZHANG, Y., CHEN, X., ZHANG, Y.: Analytical chemistry, formation, mitigation, and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons: From food processing to in vivo metabolic transformation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2021** (2), 1422-1456.

7. PŘÍLOHY

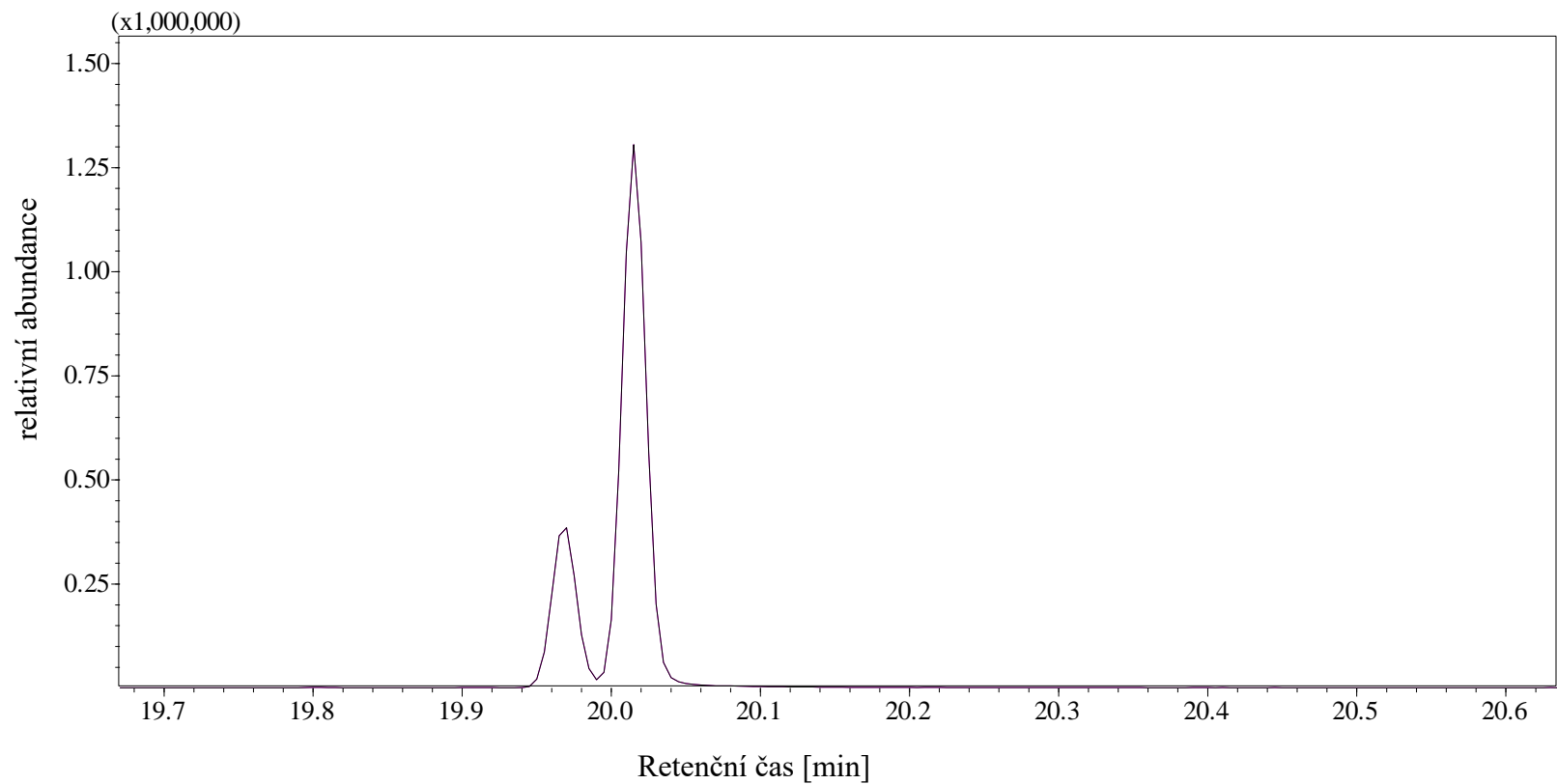
Příloha 1: Chromatografický záznam stanovení směsi PAH	81
Příloha 2: Chromatografický záznam stanovení NAP-d ₈ a NAP.....	82
Příloha 3: Chromatografický záznam stanovení PHE-d ₁₀ a PHE	83
Příloha 4: Chromatografický záznam stanovení směsi deuterovaných PAH	84
Příloha 5: Hmotnostní spektrum naftalenu	85
Příloha 6: Hmotnostní spektrum fenanthrenu.....	85
Příloha 7: Hmotnostní spektrum pyrenu.....	86
Příloha 8: Hmotnostní spektrum benzo[a]pyrenu.....	86



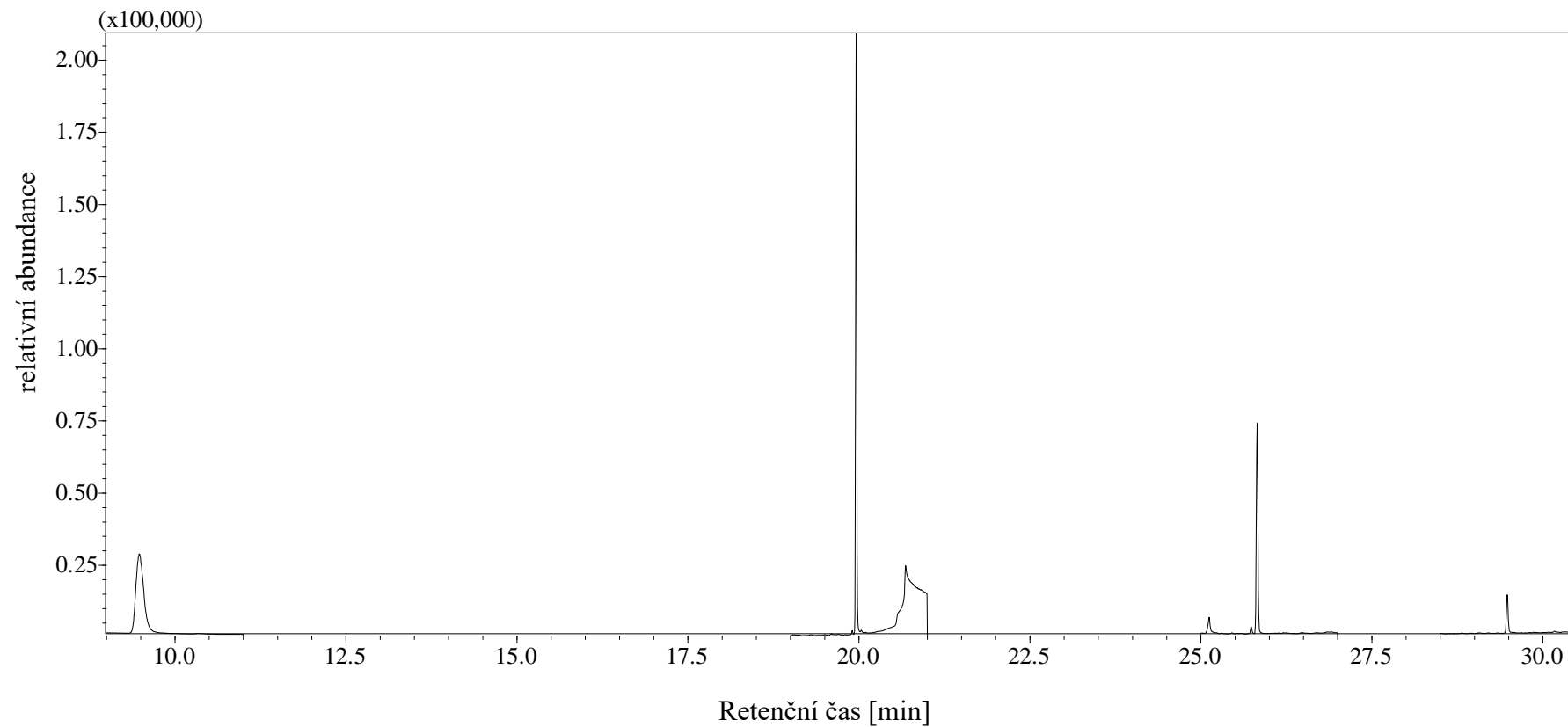
Příloha 1: Chromatografický záznam stanovení PAH v receptorové tekutině (asi 100 $\mu\text{mol/l}$) a IS PAH (asi 30 $\mu\text{mol/l}$) metodou GC- MS. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4. NAP-d₈ (9,58 min), NAP (9,77 min), PHE-d₁₀ (19,97 min), PHE (20,02 min), PYR (22,97 min), CHRY-d₁₂ (25,84 min) a BaP (29,3 min)



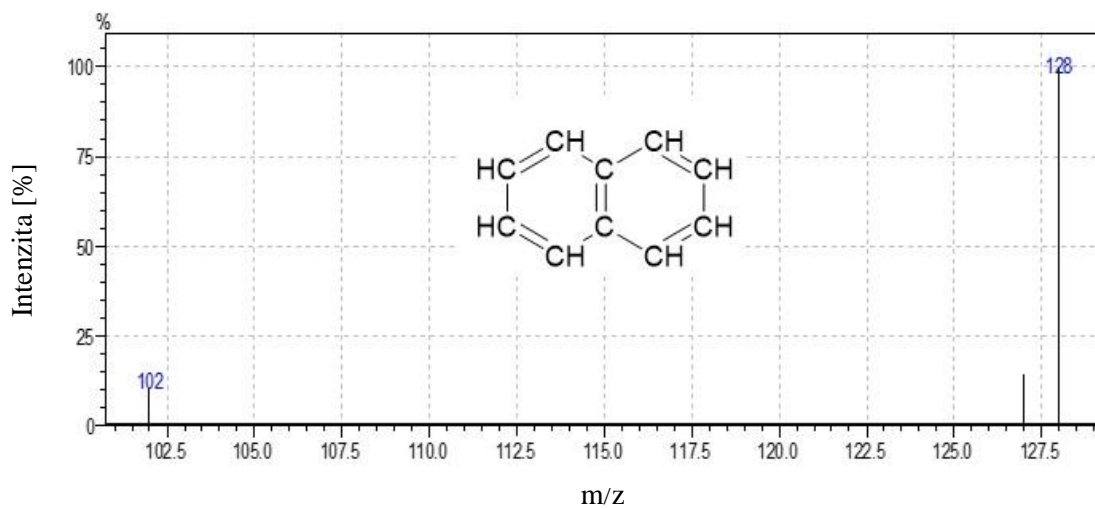
Příloha 2: Chromatografický záznam stanovení NAP-d₈ (asi 30 μmol/l) a NAP (asi 80 μmol/l) v receptorové tekutině metodou GC- MS. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4. NAP-d₈ (9,58 min), NAP (9,77 min)



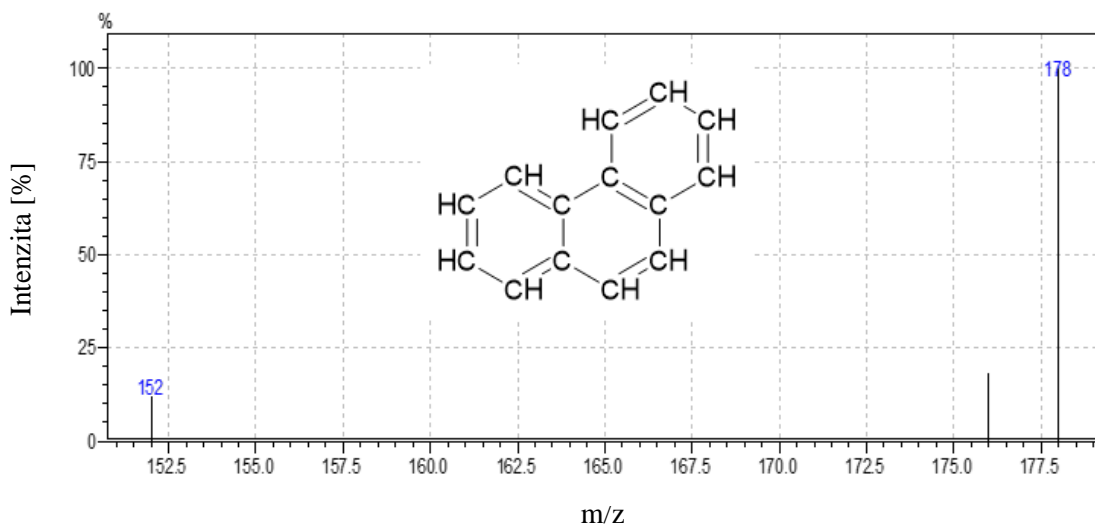
Příloha 3: Chromatografický záznam stanovení PHE-d₁₀ (asi 30 μmol/l) a PHE (asi 80 μmol/l) v receptorové tekutině metodou GC-MS. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4. PHE-d₁₀ (19,97 min), PHE (20,02 min)



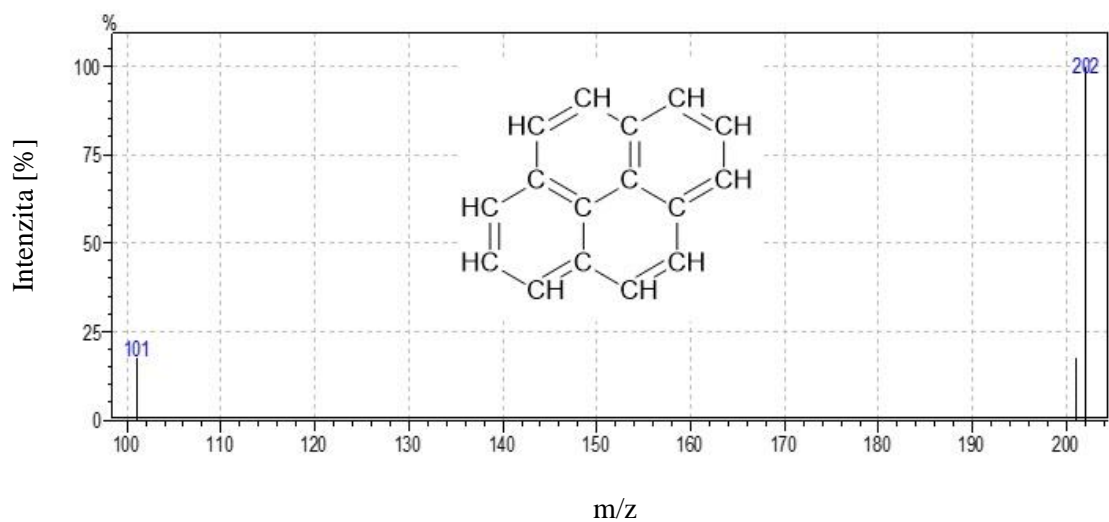
Příloha 4: Chromatografický záznam stanovení směsi deuterovaných PAH v receptorové tekutině (asi 60 nmol/l) a IS PER-d₁₂ (asi 30 nmol/l) metodou GC- MS. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4. NAP-d₈ (9,58 min), PHE-d₁₀ (19,97 min), CHRY- d₁₂ (25,84 min) a PER-d₁₂ (29,57 min)



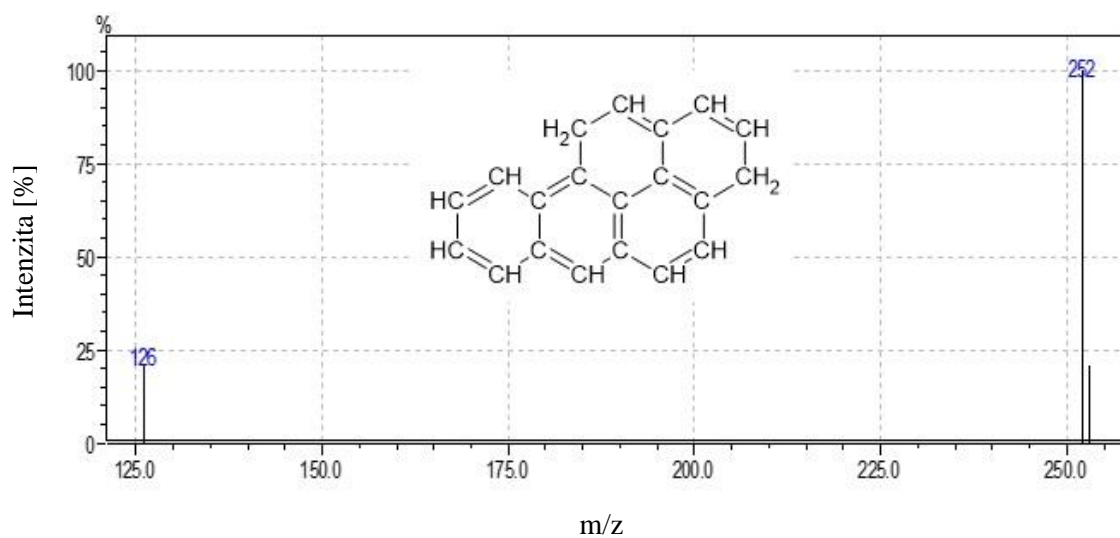
Příloha 5: Hmotnostní spektrum naftalenu. MS podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4.



Příloha 6: Hmotnostní spektrum fenanthrenu. MS podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4.



Příloha 7: Hmotnostní spektrum pyrenu. MS podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4.



Příloha 8: Hmotnostní spektrum benzo[a]pyrenu. MS podmínky jsou uvedeny v kapitole 3.4.