

ODREĐIVANJE 1,12-BENZPERILENA,
1,2-BENZPIRENA I KANCEROGENA
3,4-BENZPIRENA U ATMOSFERI METODOM
UGRIJANOG PRSTENA

MIRA CIGULA, MIRKA FUGAŠ i F. VALIĆ

*Škola narodnog zdravlja »Andrija Štampar« Medicinskog fakulteta
i Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU, Zagreb*

(Primljeno 4. XII 1972)

Izrađena je metoda za polukvantitativno određivanje 1,12-benzperilena, 1,2-benzpirena i najvažnijeg atmosferskog kancerogena 3,4-benzpirena uz upotrebu tehnike ugrijanog prstena. Čisti policiklički aromatski ugljikovodici (3,4-benzpiren, 1,2-benzpiren, 1,12-benzperilen, perilen, 1,2-benzantracen, piren, fluoranten), kao i smjesa ugljikovodika iz uzoraka dima vanjske atmosfere, mogu se isprati cikloheksanom u prsten, a dobiveni plavo-zelena fluorescirajući prstenovi vizuelno se uspoređuju sa standardnim prstenovima kininova sulfata koji daju jednaki intenzitet fluorescencije pod primarnim ultraljubičastim zračenjem maksimuma emisije 366 nm. Intenziteti fluorescencije, 3,4-benzpirena, 1,2-benzpirena, 1,12-benzperilena adsorbiranih na papiru toliko su viši od intenziteta ostalih ispitivanih policikličkih aromatskih ugljikovodika uz tipične koncentracije u kojima se pojavljuju u urbanim atmosferama, da se udio potonjih može zanemariti. Iz prethodno utvrdjenog prosječnog odnosa koncentracija 3,4-benzpirena 1,2-benzpirena i 1,12-benzperilena u određenom području može se ocijeniti koncentracija najvažnijeg kancerogena u atmosferi 3,4-benzpirena.

U atmosferi gradova identificiran je čitav niz policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAU) od kojih je za određen broj biološkim testovima ustanovljeno kancerogeno djelovanje.

Glavni PAU prisutni u atmosferi su: 3,4-benzpiren, 1,2-benzpiren, fluoranten, 1,12-benzfluoranten, perilen, 1,12-benzperilen, 1,2-benzantracen, antantren, piren i koronen. Najčešći izvori tih ugljikovodika su nepotpuno izgaranje goriva u kućnim i industrijskim ložištima, te izgaranje goriva u motorima s unutrašnjim sagorijevanjem. Pretežna količina PAU u atmosferi nalazi se u katranskoj frakciji dima.

S obzirom na veliki broj identificiranih policikličkih aromatskih ugljikovodika u atmosferi, vrlo je teško naći zadovoljavajuću metodu analize atmosfere kojom bi se mjerenjem koncentracije određenih policikličkih aromatskih ugljikovodika moglo zaključivati o stupnju kancerogenosti

te atmosfere. Metode koje su dosad u literaturi predložene uglavnom su komplicirane i dugotrajne. One se zasnivaju na sakupljanju atmosferskih čestica iz velikih volumena zraka filtracijom, ekstrakciji policikličkih aromatskih ugljikovodika raznim otapalima, odjeljivanju pojedinih policikličkih aromatskih ugljikovodika kromatografijom na koloni, na papiru ili tankom sloju, i određivanju tih ugljikovodika fluorometrijom, spektrofotometrijom, plinskom kromatografijom ili masenom spektrometrijom (1-13). Te metode su dugotrajne i komplicirane, a zbog potrebne aparature i preskupe za rutinska mjerenja u organiziranoj mreži sakupljačkih stanica, koje u industrijski razvijenim zemljama pokrivaju područja velikih industrijskih gradova. Zato su predložene jednostavnije metode kojima se određuju indeksi koji su u korelaciji s koncentracijom najvažnijeg ili najvažnijih policikličkih aromatskih ugljikovodika.

U Francuskoj se upotrebljava tzv. »antracenski indeks« (14). Uzorci zraka prostrujavaju se kroz plinske ispiralice u kojima se policiklički aromatski ugljikovodici zadržavaju u cikloheksanu. Fluorescencija tog cikloheksanskog ekstrakta uspoređuje se s fluorescencijom standardne otopine antracena u cikloheksanu. *Lindbergh* (15) je predložio metodu »kininova sulfata« u kojoj se katranska frakcija dima ekstrahira etanolom, pa se intenzitet fluorescencije te otopine uspoređuje s intenzitetom fluorescencije standardnih otopina kininova sulfata. Jednostavne metode, kao što su metode antracenskog indeksa i indeksa kininova sulfata, lakše se izvode i tako se u kraće vrijeme može analizirati veliki broj uzoraka atmosferskih čestica.

Kao što je već prethodno naglašeno, metode za kvantitativno određivanje pojedinih policikličkih aromatskih ugljikovodika ne dolaze u obzir za rutinska određivanja zbog dugotrajnih, kompliciranih postupaka i preskupih aparatura. I za određivanje spomenutih indeksa (antracenski i kininova sulfata) laboratorij mora posjedovati fluorometar, što također može predstavljati financijski problem pri planiranju mreže mjernih stanica na širokom području zemlje, što će u neposrednoj budućnosti trebati načiniti u našoj zemlji u skladu s Zakonom o zaštiti zraka od zagađivanja (16).

Da bismo posve pojednostavnili određivanje kancerogenih policikličkih aromatskih ugljikovodika u atmosferi, pokušali smo primijeniti tehniku ugrijanog prstena (17) za njihovo odjeljivanje od ostalih komponenta aerosola u zraku i za polukvantitativno određivanje najvažnijih od tih ugljikovodika na osnovi vizuelne ocjene intenziteta fluorescencije dobivenog prstena. U literaturi dosad još nije opisan pokušaj određivanja PAU tom metodom.

Većina autora koji su opisali metodu za određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika u atmosferi radili su to s uzorcima atmosferskih čestica uzetim filtriranjem velikih volumena zraka (najmanje 2000 m³) kroz filtre od staklenih vlakana. Takvo sakupljanje uzoraka je dugotrajno (uzorci se uzimaju najmanje 24 sata, a u nekim slučajevima i do 14 dana) i zahtijeva glomaznu i relativno skupu aparaturu. Jedino

metode određivanja ukupnih PAU indeksima (antracenski i kininova sulfata) omogućuju određivanje tih ugljikovodika u malim uzorcima atmosfere (oko 1,5–4 m³).

Najčešće mjereni parametri pri rutinskom praćenju stupnja atmosferske onečišćenosti evropskog tipa (koje uglavnom nastaje zbog potrošnje ugljena kao goriva) jesu sumporni dioksid i dim u atmosferi. Svi evropski gradovi koji su uveli kontrolu onečišćenja atmosfere uveli su i mjerenja koncentracije sumpornog dioksida i dima za ocjenjivanje onečišćenosti. I u našoj zemlji se planira razvoj mreža mjernih stanica na kojima će se mjeriti koncentracije sumpornog dioksida i dima u 24-satnim kontinuiranim uzorcima zraka standardiziranim metodama. Kako se koncentracija dima određuje filtriranjem čestica iz zraka na malim filtarskim papirima i kasnijom reflektometrijskom ili denzitometrijskom evaluacijom, smatrali smo da bi vrijedilo iskoristiti isti uzorak dima za određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika ekstrakcijom tih ugljikovodika u ugrijani prsten na prstenastoj peći. Tako otpada potreba uzimanja posebnih uzoraka atmosfere za određivanje policikličkih aromatskih ugljikovodika.

EKSPERIMENTALNI DIO

Pribor i kemikalije

Prstenasta peć, ROFA, Beč

Živina lampa, Solimed BH, Bruno Höpfel, Markkleeberg

Spektrofluorometar MPF-2A s dodatkom za direktno mjerenje tankoslojnog kromatograma, Perkin-Elmer

Filtarski papir Munktell, No 00, ϕ 5,5 cm. Grycksbo Pappersbruk AB, Grycksbo

Kininova baza, p. a. Fluka AG, Chemische Fabrik, Buchs SG

Cikloheksan, p. a., Carlo Erba, Milano

Sumporna kiselina, p. a., Kemika, Zagreb

Policiklički aromatski ugljikovodici (3,4-benzpiren, 1,12-benzperilen, 1,2-benzantracen, piren, fluoranten) dobiveni su od dra Van den Graafa, Department of Air Pollution, Keuringsdienst van Waren, Rotterdam. 1,2-Benzpiren – Heyl & Co., Chem. Pharm. – Fabrik, Oberschöneweide. Perilen sintetiziran u laboratoriju Farmaceutsko-kemijskog fakulteta, Graz.

Izdvajanje policikličkih aromatskih ugljikovodika iz dima

Kako se pri primjeni tehnike ugrijanog prstena komponente koje se žele odrediti nalaze u prstenu adsorbirane na filtarskom papiru, najprije smo kvalitativno ispitali da li policiklički aromatski ugljikovodici flu-

oresciraju u adsorbiranom stanju. Ti su prethodni eksperimenti pokazali da PAU daju plavo-zelenu fluorescenciju pod primarnim ultraljubičastim zračenjem maksimuma emisije 366 nm.

Nanijeli smo otopine PAU na sredinu filtarskog papira stavljenog na Weiszovu prstenastu peći i ispirali PAU raznim otapalima. U prethodnim ispitivanjima pokazalo se da se uz određene uvjete mogu tako koncentrirati policiklički aromatski ugljikovodici u prstenove plavo-zelene fluorescencije.

Kao povoljna otapala pokazali su se etilni alkohol, benzen i cikloheksan. Međutim pokušaj ekstrakcije PAU iz realnih uzoraka atmosferskog dima etanolom i benzenom nije bio uspješan jer su dobiveni žućkasti prstenovi nedovoljno oštro odijeljeni. U pokusima s cikloheksanom dobiveni su oštri prstenovi jake fluorescencije i kvantitativno odjeljivanje PAU iz dima.

Ispitivanjem utjecaja temperature prstenaste peći na kvalitetu prstenova PAU ustanovljeno je da se najbolji prstenovi dobivaju pri temperaturi od 50°C. Intenzitet fluorescencije prstenova PAU treba ocijeniti istog dana budući da intenzitet fluorescencije opada s vremenom.

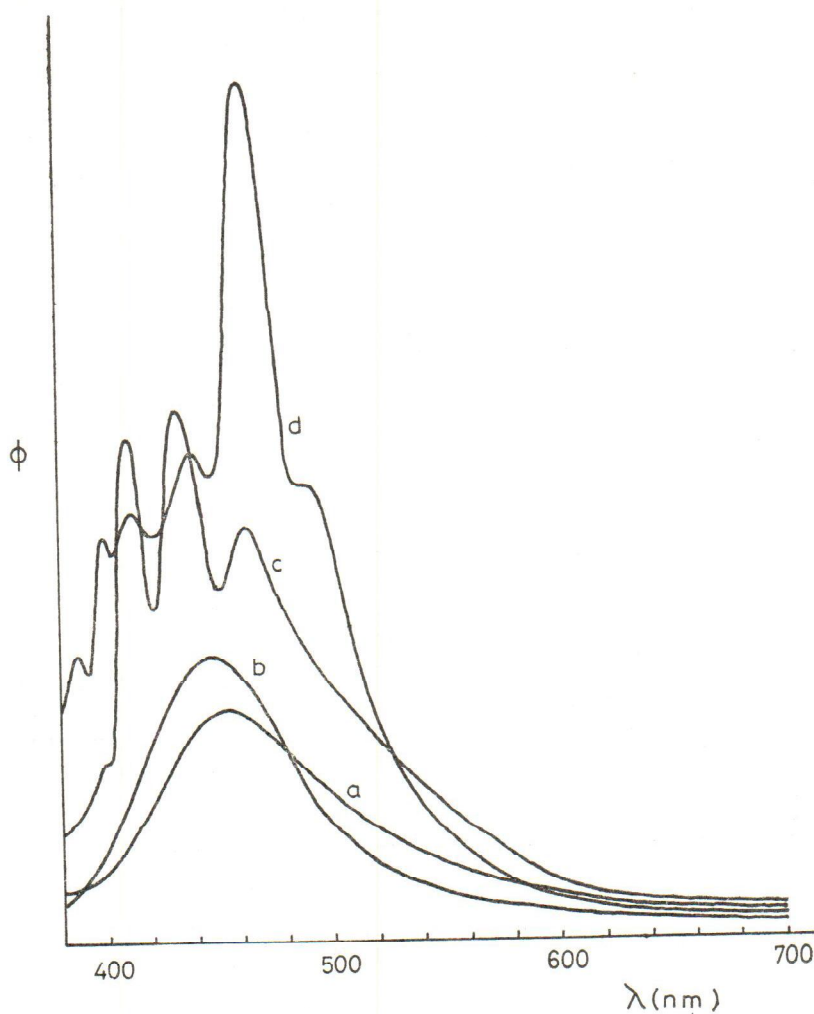
Baždarenje

Kako je vrlo teško doći do čistih PAU, da bi se iz njih pripravili standardni fluorescentni prstenovi, pokušali smo naći supstanciju koja bi nanosena na filtarski papir fluorescirala sličnim spektrom fluorescencije. Utvrdili smo da kininov sulfat u adsorbiranom stanju fluorescira sličnom bojom fluorescencije kao PAU. Adsorbati su bili pripremljeni nanošenjem otopina PAU i kininova sulfata na iste filtre koje upotrebljavamo za odjeljivanje PAU iz uzoraka dima na prstenastoj peći (Munktell No. 00). Nakon sušenja mjereni su spektri fluorescencije adsorbata na spektrofluorometru pomoću dodatka za mjerenje fluorescencije na tankom sloju uz upotrebu emisije od 366 nm visokotlačne ksenonove lampe za pobuđivanje fluorescencije. Analizom dobivenih spektara fluorescencije utvrdili smo da svi ispitani PAU, kao i kininov sulfat, fluoresciraju pretežno u ljubičasto-plavo-zelenom području spektra (420–500 nm). Kao primjer prikazujemo na slici 1 spektre fluorescencije, 1,12-benzperilena, 3,4-benzpirena, fluorantena i kininova sulfata u adsorbiranom stanju na filtarskom papiru.

Iz slike 1 vidi se da su spektri fluorescencije PAU i kininova sulfata u adsorbiranom stanju dovoljno slični.

Zato smo odlučili da standardni niz fluorescentnih prstenova priredimo nanošenjem otopina kininova sulfata na filtarski papir i naknadnim ispiranjem u fluorescentne prstenove. Tako bi se o količini PAU zaključilo na osnovi količine kininova sulfata koja daje jednaki intenzitet fluorescencije.

Standardni prstenovi kininova sulfata priređeni su nanošenjem različitih volumena (1–10 μ l) otopine kininova sulfata u 0,01 N sumpornoj

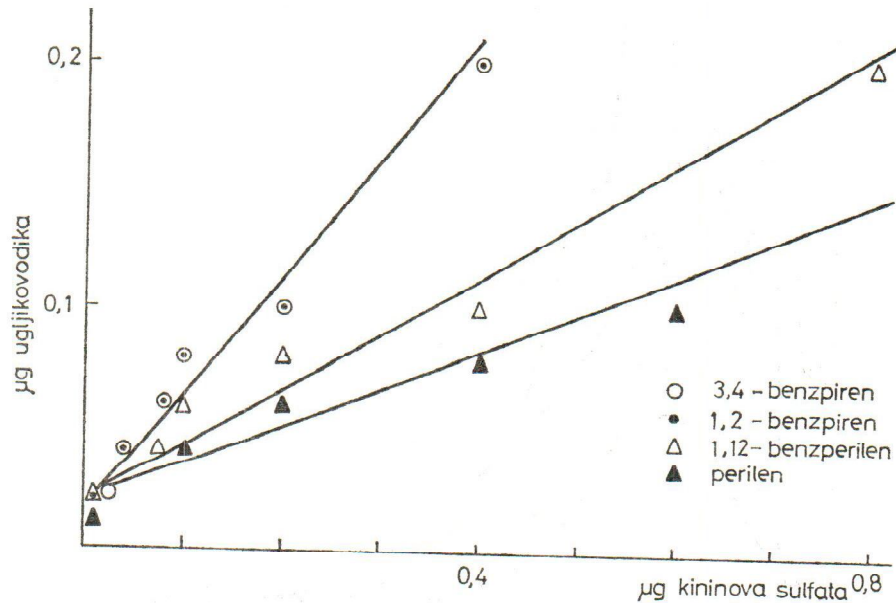


Sl. 1. Spektri fluorescencije (a) kininova sulfata, (b) fluorantena, (c) 3,4-benzpirena, (d) 1,12-benzperilena.

kiselini (0,01 i 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) na sredinu filtarskog papira na prstenastoj peći i ispiranjem kininova sulfata u prsten postepenim dodavanjem 0,01 N sumporne kiseline.

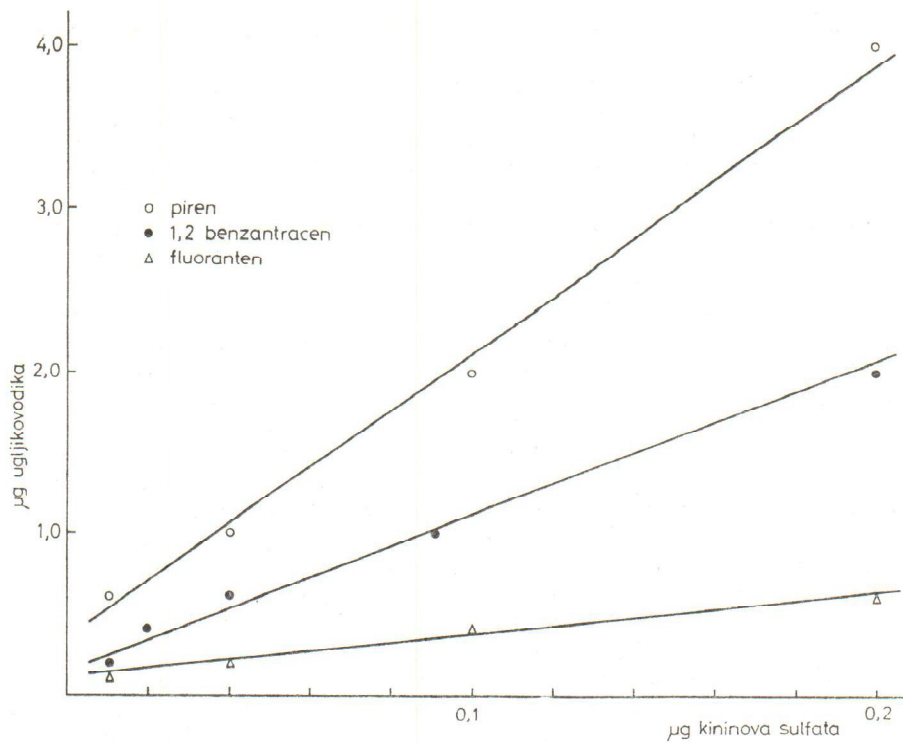
Ispitivanjem utjecaja temperature na kvalitetu prstena kininova sulfata (50–90°C) ustanovljeno je da se najbolji prstenovi dobivaju pri temperaturi od 70–80°C.

Ispitana je stabilnost fluorescencije dobivenih prstenova vizuelnim uspoređivanjem starih sa svježije dobivenim prstenovima jednakih koncentracija kininova sulfata. Praćene su promjene u toku nekoliko sati, dana i tjedana. Iz dobivenih rezultata moglo se zaključiti da unutar razdoblja od dva tjedna ne dolazi do vidljivih promjena intenziteta fluorescencije prstenova s količinom kininova sulfata ispod $1,6 \mu\text{g}$. U periodu od mjesec dana, međutim, intenzitet fluorescencije svih prstenova znatno je pao.



Sl. 2. Pravci ekvivalentnog intenziteta fluorescencije 3,4-benzpirena, 1,2-benzpirena, 1,12-benzperilena, perilena i kininova sulfata.

Na slikama 2 i 3 prikazani su baždarni pravci dobiveni polaganjem kroz točke ekvivalentnog intenziteta fluorescencije prstenova kininova sulfata i PAU. Iz slika se vidi da postoji linearan odnos između količina PAU i količina kininova sulfata koji u prstenu daju jednaki intenzitet fluorescencije. Tako smo pokazali da se o količini PAU u nepoznatom uzorku može zaključiti uspoređivanjem intenziteta fluorescentnog prstena, priređenog difuzijom tog ugljikovodika na prstenastoj peći, s intenzitetom fluorescentnog prstena priređenog s poznatom količinom kininova sulfata.



Sl. 3. Pravci ekvivalentnog intenziteta fluorescencije pirena, 1,2-benzantracena, fluorantena i kininova sulfata.

DISKUSIJA

Analizom baždarnih pravaca može se zaključiti da je u području intenziteta fluorescencije prstenova PAU koji odgovara intenzitetu fluorescencije prstena 0,01 μg kininova sulfata specifični intenzitet fluorescencije 1,12-benzperilena, perilena, 3,4-benzpirena i 1,2-benzpirena jednak, fluorantena 7 puta, 1,2-benzantracena 13 puta, a pirena 25 puta slabiji. U području intenziteta fluorescencije prstenova ekvivalentnih intenzitetu fluorescencije 0,2 μg kininova sulfata, najviši je specifični intenzitet perilena, a fluorescencija 1,12-benzperilena je 1,3 puta, 3,4-benzpirena i 1,2-benzpirena oko 2,3 puta, fluorantena 13, 1,2-benzantracena 41 i pirena 78 puta niža.

Koncentracije pojedinih PAU u atmosferama gradova razlikuju se znatno, a isto tako razlikuju se i međusobni odnosi tih koncentracija, mada u manjoj mjeri. Ipak smo na osnovi ograničenoga broja literaturnih podataka (18–22) mogli zaključiti da se u atmosferama gradova, od PAU uključenih u naš rad, nalazi uglavnom najviša koncentracija

1,2-benzantracna, da koncentracije 3,4-benzpirena, 1,2-benzpirena i 1,12-benzperilena odgovaraju otprilike 50–80% te koncentracije ne razlikujući se međusobno znatno. Koncentracije fluorantena, pirena i perilena uglavnom ne prelaze šestinu koncentracije 3,4-benzpirena.

Na temelju tih odnosa koncentracija, a uzimajući u obzir odnose intenziteta fluorescentnih prstenova pojedinih PAU, došli smo do zaključka da se mjerenjem intenziteta fluorescencije prstenova PAU koje smo ispitali uglavnom mjeri intenzitet fluorescencije 3,4-benzpirena, 1,2-benzpirena i 1,12-benzperilena. Ako bismo naknadnim mjerenjima realnih uzoraka atmosfere pojedinih gradova ili gradskih područja potvrdili da je odnos koncentracija 3,4-benzpirena, 1,2-benzpirena i 1,12-benzperilena u pojedinom području približno konstantan, mogle bi se mjerenjem fluorescencije prstenova policikličkih aromatskih ugljikovodika polukvantitativno odrediti koncentracije 3,4-benzpirena, 1,2-benzpirena i 1,12-benzperilena u atmosferi. Svakako u tom slučaju valja prethodno u zimskoj i ljetnoj sezoni jednom od specifičnih kvantitativnih metoda na reprezentativnom broju uzoraka odrediti približan odnos tih policikličkih aromatskih ugljikovodika u atmosferi toga područja. Iz toga odnosa bi se mogla izračunati koncentracija 3,4-benzpirena, kancerogena koji ima najviši stupanj kancerogenosti od svih policikličkih aromatskih ugljikovodika prisutnih u atmosferi (23).

Za vrijeme naših eksperimenata nismo imali na raspolaganju u čistom stanju ostale policikličke aromatske ugljikovodike koji se pojavljuju u atmosferi kako bismo ustanovili da li njihova prisutnost bitno utječe na rezultate naše metode. To je međutim malo vjerojatno budući da su koncentracije tih ugljikovodika u prosjeku znatno niže od koncentracije 3,4-benzpirena ili su im fluorescencije slabe. Najvjerojatnija interferencija može se očekivati od 11,12-benzfluorantena. U nastavku radova ispitat ćemo utjecaj tih ugljikovodika.

Ako se analizira 24-satni uzorak dima, odijeljen iz 4 m³ zraka, osjetljivost određivanja je 0,002 µg 3,4-benzpirena u m³ zraka, uz pretpostavku da 11,12-benzfluoranten ne interferira. To je dovoljno za određivanje koncentracije 3,4-benzpirena u atmosferi gradova u većini slučajeva. Za izvođenje određivanja 3,4-benzpirena u jednom uzorku dima nije potrebno više od 15 minuta.

Literatura

1. Sawicki, E., et al.: Anal. Chem., 36 (1964) 497.
2. Sawicki, E. et al.: J. Chromat., 20 (1965) 348.
3. De Mayo, L., Corn, M.: Anal. Chem., 38 (1966) 131.
4. Moore, G. E. et al.: J. Chromat., 26 (1967) 456.
5. Zdrojewski, A. et al.: J. Chromat., 28 (1967) 317.
6. Carugno, N., Rossi, S.: J. Gas Chromat., 5 (1967) 103.
7. Bender, D. F.: Environ. Sci. Technol., 2 (1968) 204.
8. Dawis, H. J.: Anal. Chem., 40 (1968) 1583.
9. Lindstedt, G.: Atmos. Environ., 2 (1968) 1.

10. Strömberg, L. E., Widmark, G.: *J. Chromat.*, *47* (1970) 27.
11. Brocco, D. et al.: *J. Chromat.*, *49* (1970) 66.
12. Intersociety Committee, Tentative Method of Analysis for Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Content of Atmospheric Particulate Matter, *Health Lab. Sci.*, *7* (1970) 31, 45, 60, 68.
13. Maly, E.: *Mikrochim. Acta.* *5* (1971) 800.
14. Balgairies, E., Claeys, C.: *Rev. méd. minière*, *10* (1957) broj 34/5, 20.
15. Lindbergh, W.: OECD Document No. DAS/RS/6214, 1962.
16. Službeni list broj 30 od 7. srpnja 1965., 1181.
17. Weisz, H.: *Mikrochim. Acta*, (1954) 140.
18. Sawicki, E. et al.: *Am. Ind. Hyg. Ass. J.*, *23* (1962) 137.
19. Moore, G. E. et al.: *J. Air Poll. Control Assoc.*, *16* (1966) 492.
20. Commins, B. T., Waller, R. E.: *Atmos. Environ.*, *1* (1967) 49.
21. Valori, P. et al.: *N. Ann. Igiene Microbiol.*, *17* (1966) 311.
22. Colucci, J. M., Begeman, C. R.: *Environ. Sci. Technol.*, *5* (1971) 145.
23. Epstein, S. S. et al.: *Cancer Res.*, *24* (1964) 855.

Summary

DETERMINATION OF THE ATMOSPHERIC 1,12-BENZPERYLENE, 1,2-BENZPYRENE AND THE CARCINOGEN 3,4-BENZPYRENE BY THE RING OVEN METHOD

A method for the semiquantitative determination of 1,12-benzperylene, 1,2-benzpyrene and the most important atmospheric carcinogen 3,4-benzpyrene was developed by using the ring oven technique. Pure polycyclic aromatic hydrocarbons (3,4-benzpyrene, 1,2-benzpyrene, 1,12-benzperylene, perylene, 1,2-benzanthracene, pyrene, fluoranthene), as well as the mixtures of these hydrocarbons in outdoor smoke samples can be washed into the ring by cyclohexane. The blue-green fluorescent rings obtained are visually compared with the standard quinine sulphate rings that give the same fluorescence intensity under 366 nm primary ultraviolet radiation. The fluorescence intensity of 3,4-benzpyrene, 1,2-benzpyrene and 1,12-benzperylene adsorbed on paper is so much higher than the intensity of other analysed polycyclic aromatic hydrocarbons in concentrations typical of urban air that the share of the latter can be neglected. Thus a preliminary determination of the average relationship between the concentrations of 3,4-benzpyrene, 1,2-benzpyrene, and 1,12 benzperylene in a certain area may allow the estimation of the concentration of the most important atmospheric carcinogen 3,4-benzpyrene.

*Andrija Štampar School of Public Health,
Medical Faculty, and Institute for Medical
Research and Occupational Health,
Yugoslav Academy of Arts and Sciences,
Zagreb*

*Received for publication
December 4, 1972*