

Chloralkany (C₁₀-C₁₃, SCCP)

Chloralkany jsou chlorované parafíny s krátkým řetězcem. Vyráběny jsou od roku 1930 chlorací n-alkanů za vysokých teplot v přítomnosti UV-záření. Používaly se jako náhrada za PCB, neboť mají podobné vlastnosti. Používaly se jako plastifikátory, zpomalovače hoření, rubrikanty, aditiva při výrobě barviv, tmelů a adhezi. Hlavním zdrojem chloralkanů je průmysl výroby obuvi (použití při výrobě pryží, podešví), průmysl nátěrových hmot (chemicky odolné smáčedlo proti vodě, kyselinám). Chloralkany mají vysoký bioakumulační potenciál, podílejí se na vzniku respiračních onemocnění, způsobují dermatidy. C₁₂ s obsahem 60 % chloru je hodnocen jako karcinogen podle IARC. Nejznámějším zástupcem je 1-chlordekan a 1-chlordodekan. Výzkumem chloralkanů (SCCP) se v České republice zabývá pracoviště RECETOX, které používá metodu GC-ECNI-MS (Příbylová et al. 2005). V rámci výzkumu výskytu SCCP zjistili, že se v ČR v sedimentech vyskytují obsahy až do 181 ng/kg, což dokumentuje používání těchto látek.

Standardizované metody stanovení

ISO 14507:2005 Soil quality - Pretreatment of samples for determination of organic contaminants

Mezinárodní norma specifikuje 3 metody předúpravy vzorků půd v laboratoři před vlastním stanovením organických polutantů. Jsou zde uvedeny postupy s ohledem na chemický charakter stanovovaných látek: těkavé organické látky, polotěkavé organické látky – matrice obsahuje částice větší než 2 mm pa má heterogenní distribuci kontaminantu v matrici, stanovení stabilních organických látek, velikost půdních částic je < 2 mm a polutanty jsou homogenně rozšířeny v matrici. Organické látky, které jsou stabilní, mohou být připraveny pro analýzu podle ISO 11464.

ISO/CD 12010 Water quality – Determination of short chain polychlorinated alkanes (SCCP) in water. Method using gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) and negative ion chemical ionisation (NCI). *Je v přípravě.*

U.S. EPA 8270:2007 Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)

Metoda je vhodná pro stanovení ftalátů a chloralkanů C₁₀-C₁₃. Metoda se používá pro stanovení polotěkavých organických sloučenin v extraktu připraveném z tuhé matrice (odpady, půdy), ale i pro vzorky ovzduší a vod. Pro použití EPA metody 8270 se doporučují následující metody separační techniky: EPA 3540/41 extrakce Soxhletem, 3545 – akcelerované extrakce rozpouštědlem pro polotěkavé látky, 3550 – extrakce ultrazvukem, 3560 – superkritická fluidní extrakce TRP. U těchto metod je deklarována výtěžnost > 70 %. Extrakty jsou v případě potřeby přečištěny vhodným čistícím postupem a přečištěné extrakty jsou analyzovány metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Hmotnostní detektor musí být schopen provést scan v rozmezí 35 – 500 amu za 1 sekundu nebo rychleji, ionizační technikou je elektronová ionizace. Hmotnostním analyzátozem může být iontová past nebo kvadrupólový analyzátor. Pro vyhodnocování se používají izotopicky značené vnitřní standardy. Podmínky GC/MS analýzy musí splňovat určitá kritéria, která jsou detailně popsána v metodě.

Nestandardizované metody stanovení

Data o obsahu chloralkanů (Polychlor-n-alkane PCA) v environmentálních vzorcích jsou vzhledem ke složitosti analýzy vzácná, ve srovnání např. s daty o výskytu PCB. Chloralkany jsou v environmentálních maticích obsaženy obvykle v nízkých koncentracích, jejich analýza vyžaduje extrakci analytu z matrice a následné zkoncentrování. Pro odstranění interferujících substancí je vyžadována čistící procedura. Obecně, chloralkany jsou izolovány z environmentálních vzorků podobně jako organohalonové sloučeniny. Nejobvyklejším postupem je Soxhletova extrakce, k modernějším a rychlejším technikám patří PLE (kapalná tlaková extrakce) nebo mikrovlnná extrakce (MAE). Využití moderních extrakčních metod je limitováno především jejich cenou. MAE a PLE jsou ve srovnání se Soxhletovou extrakcí rychlejší (čas extrakce cca 30 min.) a spotřebovávají méně rozpouštědel.

Pro extrakci chloralkanů z pevných vzorků (půdy, sedimenty, kaly apod.) se používají nepolární organická rozpouštědla jako jsou dichlormethan (Tomy et al., 1999), n-hexan (Kemmlin et al., 2002), toluen (Maulshagen et al., 2003) nebo směs hexan:dichlormethan (Tomy et al., 1997).

Při extrakci polychlorovaných látek ze vzorků půd pomocí PLE při teplotách okolo 100 °C a tlacích 2000 psi je účinnost extrakce velmi podobná Soxhletově extrakci. PLE je časově rychlejší než Soxhletova extrakce. Vzorky extrahované pomocí PLE se nemusí čistit, neboť je již zahrnut čistící krok. Nilsson et al. (2001) doporučuje PLE jako extrakční a čistící techniku s přídavkem XAD-4 nebo XAD-16 (do extrakční cely). Účinnost extrakce chlorovaných alkanů z pevných vzorků (Santos et al., 2006) se pohybuje mezi 50 až 100 % se standardní odchylkou 6 – 10 % a limitem detekce 1 – 92 ng/g, v závislosti na typu vzorku, extrakce a metody stanovení. Některé sedimenty a kaly obsahují poměrně velká množství síry, která narušuje GC analýzu, proto je síra odstraňována během extrakce přídavkem mědi (Muir et al., 2003). V extraktech je obecně možné stanovit chlorované alkyly s krátkým řetězcem (C₁₀-C₁₃, sPCA), se středním řetězcem (C₁₄-C₁₇, mPCA) a s dlouhým řetězcem (C₂₀ – C₃₀, IPCA).

MAE (Santos et al., 2006) poskytuje vysokou extrakční účinnost - až 90 % pro vzorky říčních sedimentů extrahované 30 ml směsí n-hexan:aceton (1:1, v/v) při teplotě 115 °C a síle 1200 W s časem extrakce 15 min. MAE ve srovnání s PLE umožňuje zpracovávat více vzorků najednou. Extrakce vzorků pomocí MAE, vyžaduje čistící proceduru. Volba čistící procedury závisí na typu matrice a na metodě determinace. Z nedestruktivních čistících metod se nabízí gelová permeační chromatografie (GPC) s polystyrenovými-divinylbenzenovými kopolymery (BioBeds SX-3), jako eluent (Coellhan, 1999) se používá směs n-hexan:dichlormethan (1:1, v/v). Často ve vzorcích interferují lipidy, pro jejich destruktivní odstranění se používá kyselina sírová (Nicholls et al., 2001). Po odstranění lipidů jsou aplikovány dodatečné čistící procedury, které se používají pro odstranění interferujících komponent např. polychlorovaných bifenylů (PCB) a ostatních organochlorovaných látek (např. pesticidy), které ovlivňují stanovení chloralkanů pomocí GC. Pro separaci PCA od jiných kontaminantů v sedimentech (Tomy et al., 1997) se využívá silikagel, Florisil nebo oxid hlinitý. Florisil se může používat buď plně aktivovaný nebo částečně deaktivovaný 1,2% vodou, první frakce (hexan) obsahuje PCB, chlorované benzeny, DDT a jeho metabolity, toxafen a aromatické komponenty, teprve v druhé frakci jsou obsaženy PCA (eluovány jsou směsí hexan:dichlormethan (85:15, v/v) a hexan:dichlormethan (1:1, v/v)). Více polární organochlorované komponenty takové jako epoxid heptachloru a dieldrin jsou eluovány společně s PCA. Deaktivovaný florisil (1,5 % voda) je užíván pro frakcionaci PCA

v sedimentech a ve vzorcích bioty, v tomto případě PCB a toxafen je eluován v první frakci hexanem a několika mililitry dichlorethanu, zatímco PCA jsou získány v sekundární fázi po eluci dichlormethanem. Pro izolaci PCA (Nicholls et al., 2001) jsou dále využívány kolony se silikagelem deaktivovaným vodou (3 a 5 %). PCA (Coellham, 1999) jsou při separaci na silikagel eluovány v druhé fázi směsí hexan:dichlormethan (1:1, v/v) po eluci PCB, hexachlorbenzenu, 2,4'- a 4,4'-DDT, 2,4'-a 4,4'-DDE oktachlorostyrolu, cis- a trans-chlordanu, heptachloru, trans-nonachloru, mirexu a části toxafenu pomocí hexanu.

Chromatografická separace PCA je velmi obtížná v důsledku komplexnosti PCA směsí (>10000 kongenerů). Kapilární GC je nedostatečná pro separaci všech píků PCA kongenerů a chromatogramy jsou charakterizovány širokými shluky. Proto se užívají především semi-polární stacionární fáze takové jako je (35%-fenyl)methylpolysiloxan (DB-35 ms). Obvykle kolony pro separaci mají tloušťku filmu 0,25 μm , s vnitřním průměrem 0,25 mm a 30 m délkou, někteří autoři (Kemmler et al., 2002) doporučují kratší kolony (od 65 cm do 15 m) pro zlepšení citlivosti a snížení času analýzy. Ovšem použití těchto kratších kolon zvyšuje nebezpečí eluce interferujících substancí. Použití krátkých křemenných kapilár (Štejnarová et al., 2005) bez stacionární fáze je doporučováno pro analýzu PCA pomocí MS.

PCA analýza se provádí pomocí plynové chromatografie spojené s nízko- nebo vysoce-rezoluční hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Kromě GC-MS jsou pro analýzu PCA aplikovány GC-ECD (plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu, Parera et al., 2002) a GC-FID (plynová chromatografie s plamenově-ionizační detekcí, Nilsson et al., 2001). Dobrá citlivost je získána při použití GC-EDC (Santos et al., 2006) pouze v případě, že koncentrace PCA je vyjádřena jako suma krátkých, středních a dlouhých polychlorovaných alkanů, neboť ECD není schopna rozlišit PCA ve směsi. Často ve výsledku PCA jsou zahrnuty i jiné interferující halogenované látky. GC-ECD vyžaduje vysoce selektivní vyčištění vzorku a účinnou frakcionaci. Cooley et al., (2001) proto navrhuje použití gelové permeační chromatografie s frakcionací na Florisilové koloně. Stanovení pomocí GC-FID je založeno na analýze uhlíkového skeletu po katalytické dechlorinaci PCA v injekčním portu plynového chromatografu s Pd katalyzátorem. Při použití této metody je více než 90 % PCA směsi přeměněno na korespondující n-alkany, které jsou pak analyzovány GC-FID. Informace o stupni chlorace se ztrácí, metoda poskytuje informace o distribuci homologových skupin PCA. Podobný přístup aplikoval Kemmler et al. (2002) při použití GC-EI-MS pro analýzu PCA v mořských sedimentech a biotě. Alternativní metodou analýzy PCA (Zencak et al., 2004) v technických směsích, domovních odpadech a barvivech je kapalná chromatografie kombinovaná s atmosférickou tlakovou chemickou ionizací (chloridů) – LC-Cl-APCI. PCA separace se v této metodě provádí na kolonách Nucleosil s náplní silikagel (5 μm) a CH_3Cl je používán jako mobilní fáze. Díky nízké polaritě není možná klasická ionizace pomocí ESI (elektrosprejová ionizace) nebo atmosférická tlaková ionizace (APCI). Ionizační proces APCI je podobný klasické chemické ionizaci, tvoří se adukty $[\text{M}+\text{Cl}]^+$ v negativním chemickém ionizačním módu hmotnostního spektrometru (NCI-MS) za pomoci $\text{CH}_4/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ jako reakčního plynu. PCA jsou eluovány jako jednoduché píky. LC-Cl-APCI v kombinaci s iontovou pastí MS umožňuje rychlé a přesné stanovení středně dlouhých PCA. Dvou-dimenzionální plynová chromatografie byla studována pro zlepšení separace PCA. Korytář et al., (2005) studoval aplikovatelnost GC dvou-dimenzionální techniky s ECD detektorem ve spojení s hmotnostní spektrometrií s negativní ionizací průletovým analyzátozem (GC x GC-ECNI-TOF-MS) pro charakterizaci krátkých, středně dlouhých a dlouhých PCA směsí. Nejvhodnější kolonou je DB-1 a 65% fenylmethylpolysiloxan (007-65HT), separace PCA se stejně dlouhým řetězcem je založena na počtu atomů chloru. Z výše uvedených technik je GC-MS nejlepší technikou pro analýzu PCA. Nejvíce používaným typem GC-MS (Zencak et

al., 2006; Tomy et al., 1997) pro analýzu PCA je plynová chromatografie s detektorem elektronového záchyty v kombinaci s hmotnostním spektrometrem s ionizací v negativním módu (GC-ECNI-MS). Jako moderující plyny se používají methan a argon. ECNI (Zencak et al., 2005) preferuje elektronovou ionizaci, neboť poskytuje vyšší selektivitu a citlivost pro detekci PCA. ECNI (Tomy et al., 1998) vede k formaci iontů zahrnujících $[M-Cl]^-$, $[M-HCl]^-$, $[M+Cl]^-$, $[Cl_2]^-$ a $[HCl_2]^-$ s rozdílným výskytem, který závisí na stupni chlorace, teplotě iontového zdroje a množství injektovaného vzorku. ***ECNI ionizace poskytuje nejmenší stupeň fragmentace, a proto nejvyšší citlivost, z tohoto důvodu je nejvíce aplikována.*** Pro maximální separaci PCA od ostatních interferujících chlorovaných látek vysoce rezoluční hmotnostní spektrometrie využívá elektronový záchytný negativní iontový ionizační mód (ECNI-HRMS). Spojení tohoto módu (Santos et al., 2006) s plynovou chromatografií je považováno za standardní nástroj pro analýzu PCA. Metoda je založena na kvantifikaci PCA směsí selektováním iontů $[M-Cl]^-$ v každé skupině v SIM módu. GC-ENCI-LRMS (GC-ENCI – nízko rozlišující hmotnostní spektrometrie) je alternativou k HRMS. Renth et al. (2004) zjistil, že LRMS může být využita pro kvantifikaci většiny kongenerových skupin bez interních interferencí. Nicméně stanovení $C_{10}H_{14}Cl_{18}$ a $C_{15}H_{26}Cl_6$ je obtížné, pokud ve vzorku jsou přítomné krátké a střední PCA. GC-ECNI-LRMS je využívána pro stanovení PCA v čistírenských kalech (Nicholls et al., 2001) a v sedimentech (Štejnarová et al., 2005). Někteří autoři předpokládají využití $[Cl_2]^-$ a $[HCl_2]^-$ iontů ECNI spektra jako alternativu ke stanovení PCA při monitorování $[M-Cl]^-$ iontů. Tento přístup byl použit v kombinaci s iontovou pastí MS Nichollsem et al. (2001) a Castellsem et al., (2004). Nicméně tato technika neposkytuje rozdíly mezi krátkými PCA a středně dlouhými PCA a výsledky jsou vyjadřovány jako celková koncentrace PCA. Navíc mohou interferovat pesticidy – chlordan a sloučeniny hexachlorcyklohexanů, proto je nutná čistící procedura.

Pro PCA analýzu byly aplikovány i další ionizační techniky, Zencak et al. (2005) jako plyn pro negativní iontovou chemickou ionizaci v kombinaci s GC-LRMS použil směs methanu a dichlormethanu (80:20). Přidání CH_2Cl_2 k reakčnímu plynu vytváří přednostně ionty $[M+Cl]^-$ a redukuje hmotnostní interference mezi PCA kongenery. Použití EI pro PCA analýzu bylo testováno s LRMS. Aplikace byla limitována silnou fragmentací PCA za podmínek EI, vzniklá spektra byla bez strukturně-specifické informace o délce řetězce nebo o množství chlorových atomů. Zencak et al., (2004) testoval možnost využití tandemové hmotnostní spektrometrie s EI (EI-MS/MS) s iontovou pastí a trojitým kvadrupólem, nicméně vzniklé fragmenty iontů jsou tvořeny nezávisle na délce řetězce. Hlavní výhodou EI-MS/MS je nízký detekční limit, vysoká selektivita a nezávislost na stupni chlorace. Další technika pro analýzu PCA využívá metastabilní atomové bombardování (MAB) ve spojení s HRMS (Moore et al., 2004). Spektra získána při použití této techniky jsou charakterizována ionty $[M-HCl]^+$.

Lepom P., Brown B., Loos R., Quevauviller P., Wollgast J. (2009): Needs for reliable analytical method for monitoring chemical pollutants in surface water under the European Water Framework Directive. *Journal of Chromatography A*, 1216, 302-315.

Autoři uvádí nutnost standardizace postupů pro stanovení SCCPs (short-chain chlorinated paraffins) v rámci Water Framework Directive. Pouze pro 75 % z 41 nebezpečných látek existují standardizované postupy. Podobná situace je u PBDE, některých pesticidů a u polyaromatických uhlovodíků s 6 konjugovanými benzenovými jádry.

Štejnárová P., Coelham M., Kostrhounová R., Parlar H., Holoubek I.(2005): Analysis of short chain chlorinated paraffins in sediment samples from the Czech Republic by short-column GC/ECNI-MS, Chemosphere 58,253-262.

Metodika byla aplikována na vzorky sedimentů – 20 g na vzduchu usušeného sedimentu se extrahuje se 120 ml dichlorethanu v Soxtecově aparatuře po dobu 40 min. Poté se extrakt odpaří do sucha, přidá se 5 ml n-hexanu. Lipidy ze vzorku se odstraní přidávkem kyseliny sírové (3 ml) a roztok se umístí do pece o teplotě 60 °C na 1 hod., poté se provede centrifugace (3000 rpm, 5 min.). Hexan se odpaří na objem 500 µl proudem dusíku. Komponenty obsahující síru jsou ze vzorku odstraněny aktivovanou mědí. Poté se extrakt čistí od interferujících substancí pomocí kolon se silikagelem deaktivovaným 3 % deionizovanou vodou. První frakce je eluována 40 ml n-hexanu – obsahuje PCB, toxafen, DDD, DDE apod. Druhá frakce je eluována 25 ml směsí dichlormethan:n-hexan (1:1) – společně s PCA se eluují i interferující látky, proto je nutná čistící procedura. Interferující látky jsou odstraněny GPC (gelová permační chromatografie). GPC systém obsahuje L-6000 A HPLC pumpu, kovové kolony (300 mm x 7,8 mm, Phenomenex) s náplní fenogel (5 µm), jako mobilní fáze se používá tetrahydrofuran (rychlost toku 2,5 ml/min.). Injektuje se 200 µl vzorku (detekce se uskutečňuje pomocí UV-VIS detektoru, λ=280 nm). Po vyčištění se extrakt odpaří do sucha a odparek se rozpustí v 50 µl n-hexanu (metoda Coelham, 1999). Determinace PCA se provede na plynovém chromatografu (SCGC/LRMS/ENCI) s krátkými křemennými kolonami (1,3 m x 0,15 mm) bez stacionární fáze. GC je spojen s MS Finigan Mat 8200. GC/MS podmínky: nosný plyn – hélium (rychlost toku 1,38 ml/min.), teplota injektoru 280 °C. Teplotní program – isotermicky 270 °C, ENCI mód s methanem jako reakčním plynem, teplota rozhraní 270 °C, teplota iontového zdroje 250 °C, energie elektronů 120 eV, napětí 3 kV, plně-skenovací mód. Identifikace PCA – pomocí srovnání hmotnostních spekter standardů a vzorků. Kvantifikace se vykonává integrováním iontů 313/349/383/417 (C₁₀), 329/361/395/431/465 (C₁₁), 341/375/409/445/477 (C₁₂) a 355/389/423/457/491 (C₁₃).

Literatura

- Castells P., Santos F.J., Galceran M.T., 2004. Rapid Commun. Mass Spectrom 18, 529-536.
- Coelham M., 199. Anal.Chem.71, 4498-4505.
- Colley H.M., Fisk A.T., Siena S.C., Tomy G.T., Evans R.E., Muir D.C.G., 2001. Aquat Toxicol.54, 81-99.
- Kemmler S., Hermeneut A., Rotard W., 2002. Organohalogen Comp. 59, 279-282.
- Maulshagen A., Hamm S., Petersern M., Elsholz O., Fengler S., Seel P., 2003. Organohalogen Compounds 62, 371-374.
- Muir D., Braekevelt E., Tomy T., Whittle M., 2003. Organohalogen Compounds 61, 295-298.
- Nicholls C.R., Allchin C.R., Law R.J., 2001. Environ.Pollut.114, 415-430.
- Nilsson M.L., Waldeback M., Liljegren G., Kylin H., Markides K.E., 2001. Fresenius J.Anal.Chem. 370, 913-918.
- Příbylová P. Klánová J., Holoubek I. (2005): Survey of short and medium chain chlorinated paraffin levels in the environmental samples from the Central and Southern Europe. In *ECOTOX 2005. Advantages and Trends in Ecotoxicology*. Masarykova univerzita, CZ : Masarykova univerzita, CZ, 2005. ISBN 80-210-3799-7, s. 87-87. 5.9.2005, Brno, Česká republika.
- Renth M., Oehme M., 2004. Anal.Bional.Chem.378, 1741-1747.
- Santos F.J., Parera J., Galceran M.T., 2006. Analysis of polychlorinated n-alkanes in environmental samples, Anal.Bioanal. Chem. 386, 837-85.
- Štejnárová P., Coelham M., Kostrhounová R., Parlar H., Holoubek I., 2005. Analysis of short chain chlorinated paraffins in sediment samples from the Czech Republic by short-column GC/ECNI-MS, Chemosphere 58, 253-262.
- Tomy G.T., Tittlemeier S.A., Stern G.A., Muir D.C.G., Westmore J.B., 1998. Chemosphere 37, 1395-1410.
- Zencak Z., Borgen A., Renth M., Oehme M., 2005. J.Chromatogr.A, 1067, 295-301.
- Zencak Z., Oehme M., 2004. Rapid Commun.Mass Spectrom.18, 2235-2240.
- Zencak Z., Oehme M., 2006. Trends Anal.Chem. 25,310-317.
- Zencak Z., Renth M., Oehme M., 2004. Anal.Chem.76, 1957-1962.