

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Anežka Skrottová

**STANOVENÍ ROZDĚLOVACÍHO KOEFICIENTU
PERFLUOROVANÝCH LÁTEK V SYSTÉMU
OKTAN-1-OL/ VODA**

Determination of distribution coefficients of perfluorinated
compounds in 1-octanole/water system

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Praha 2011

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 2. 6. 2011

Podpis

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. M. Ruckému, Ph.D. za cenné rady, vstřícný přístup a pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Dále děkuji RNDr. R. Čabalovi za vedení mé práce. Velký dík patří celé mé rodině za veškerou poskytnutou podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Cílem bakalářské práce bylo určit rozdělovací koeficienty 1H,1H,2H,2H-perfluorooktan-1-olu a 1H,1H,2H,2H-perfluorodekan-1-olu v systému oktan-1-ol/voda. K měření bylo použito metody třepací lahve, kde se měřená látka po intenzivním třepání rozdělila mezi zmíněné nemísitelné kapaliny. Po ustavení rovnováhy byla změřena koncentrace v obou fázích. K tomuto stanovení byla použita metoda plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Znalost rozdělovacího koeficientu látky napomáhá k odhadu velikosti jejího toxického účinku. Výsledné hodnoty log P měřených látek se pohybovaly kolem 3,5. Z toho vyplývá, že látky jsou lipofilní. S tím souvisí i vysoká bioakumulační schopnost PFL obecně. Hromadí se v organismu a jejich vyloučení je velmi obtížné. Tyto látky se hromadí také v abiotické složce přírody. Mají tedy negativní vliv na životní prostředí a jejich výroba je značně omezena.

Klíčová slova

Fluorované telomerní alkoholy, rozdělovací koeficient, GC-MS.

Abstract

The aim of the bachelor thesis was to determinate distribution coefficients of 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-octanol and 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-decanol in 1-octanol/water system. Method used for measurement was the shake flask method. Measured substance distributed between two immiscible liquids after intensive shaking. Concentration in both phases was measured after equilibration with Gas Chromatography – Mass Spectrometry.

Knowledge of distribution coefficients helps to estimate toxic potential of substance. Logarithm of distribution coefficient of measured substances was about 3,5. It means, that measured substances are lipophilic. It is associated with their high bioaccumulation potential. They accumulate in organism and their excretion is very difficult. They also accumulate in abiotic environment. So they have negative effects on it and their production is reduced.

Key words

Fluorotelomer alcohols, distribution coefficient, GC-MS.

OBSAH

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	9
1 ÚVOD.....	11
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	12
2.1 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT.....	12
2.1.1 DEFINICE.....	12
2.1.2 HISTORIE.....	13
2.1.3 STANOVENÍ.....	14
2.2 PERFLUOROVANÉ LÁTKY.....	14
2.2.1 VÝROBA.....	14
2.2.2 VYUŽITÍ.....	15
2.2.3 VLSTNOSTI.....	16
2.2.4 EXPOZICE.....	17
2.2.4.1 Vzduch.....	18
2.2.4.2 Potraviny.....	18
2.2.4.3 Pitná voda.....	19
2.2.4.4 Ostatní.....	20
2.2.5 NÁSLEDKY EXPOZICE.....	20
2.2.5.1 Následky expozice zvířat.....	21

2.2.5.2 Hypothyroxinémie.....	22
2.2.5.3 Imunotoxicita.....	23
2.2.6 EXKRECE.....	24
2.2.7 ARKTICKÉ OBLASTI.....	27
2.2.7.1 Antarktida.....	27
2.2.7.2 Arktida.....	29
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
3.1 INFORMACE O ANALYZOVANÝCH LÁTKÁCH--.....	31
3.1.1 1H,1H,2H,2H-PERFLUOROOKTAN-1-OL.....	31
3.1.1.1 Akutní toxicita.....	31
3.1.1.2 Chronická toxicita.....	31
3.1.2 1H,1H,2H,2H-PERFLUORODEKAN-1-OL.....	31
3.1.2.1 Akutní toxicita.....	32
3.1.2.2 Chronická toxicita.....	32
3.1.3 1H,1H,2H,2H-PERFLUOROHEXAN-1-OL.....	32
3.2 CHEMIKÁLIE.....	33
3.3 PŘÍSTROJE.....	33
3.4 PŘÍPRAVA LÁTEK.....	34
3.4.1 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ 6:2 FTOH...34	
3.4.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ 6:2 FTOH.....34	
3.4.3 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ 8:2 FTOH...34	

3.4.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ 8:2 FTOH.....	35
3.4.5 STANOVENÍ POMOCÍ GC-MS.....	35
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
4.1 6:2 FTOH.....	38
4.2 8:2 FTOH.....	45
4.3 4:2 FTOH.....	51
5 ZÁVĚR.....	52
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53

Seznam použitých zkratek

ACP - schopnost znečišťovat arktické oblasti (arctic contamination potential)

BAS - žlučová kyselina napomáhající vylučovat látky (bile acid sequestrant)

CAS - registrační číslo látky podle časopisu Chemical Abstracts (Chemical Abstracts Service)

c_m - hmotnostní koncentrace [g/l]

CNS - centrální nervový systém

$c_{oktanol}$ - koncentrace v oktanolové fázi [mg/ml]

c_{voda} - koncentrace ve vodné fázi [mg/ml]

ECF - elektrochemická fluorace

FTOH - fluorované telomerní alkoholy

GC-MS - plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (gas chromatography - mass spectrometry)

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

LD₅₀ - dávka způsobující smrt v 50% případů

log P - logaritmus rozdělovacího koeficientu

log S - logaritmus součinu rozpustnosti

LRET - schopnost látky přesouvat se životním prostředím na dlouhé vzdálenosti (Long Range Environmental Transport)

Mr – relativní molární hmotnost

m/z – poměr hmotnosti a náboje částice

P – rozdělovací koeficient

PFBA – perfluorobutanová kyselina (perfluorobutyric acid)

PFBS – perfluorobutansulfonát

PFHxS – perfluorohexansulfonát

PFL – perfluorované látky

PFOA – perfluorooktanová kyselina (perfluorooctanoic acid)

PFOS – perfluorooktansulfonát

POP – perzistentní organický polutant (persistent organic pollutant)

PPAR – receptory aktivované proliferátory peroxizomů (peroxisome proliferators – activated receptors)

PTFE – polytetrafluorethylen

QSAR – kvantitativní vztah mezi strukturou látky a jejím biologickým účinkem (Quantitative Structure – Activity Relationship)

RPM – otáčky za minutu (revolutions per minute)

TTR – transthyretin (transports thyroxin and retinol)

TDLo – nejnižší toxická dávka (toxic dose low)

URL – jednotný lokátor zdrojů (uniform resource locator)

USA – Spojené státy americké (United States of America)

ρ – hustota [g/ml]

1 ÚVOD

Skupina organických látek, jejichž každý atom vodíku na uhlíkatém řetězci je nahrazen atomem fluoru, se nazývá perfluorované organické sloučeniny. Funkční skupina obsažená ve sloučenině může být různá, většinou jde o skupinu sulfonovou, karboxylovou nebo jde o alkohol. Tato skupina představuje část hydrofilní, fluorovaný uhlíkatý řetězec část hydrofobní.

Díky pevnosti vazby uhlík-fluor jsou tyto látky neobyčejně stabilní, i při vysokých teplotách nehořlavé a velmi špatně rozložitelné [1].

Jde o skupinu perzistentních látek, které mají bioakumulační potenciál a stejně jako jiné halogenované organické látky (např. polychlorované a polybromované) jsou skupinou negativně působící na životní prostředí [2].

PFL se začali používat až ve druhé polovině 20. století. Produkce PFOS na konci osmdesátých let je odhadována na 3500 t za rok. Do nedávna byly tyto látky považovány za biologicky inaktivní [1].

Poté co byly PFL detekovány i ve vzdálených oblastech, a to jak ve složce abiotické, tak biotické, největší producent těchto látek, americká společnost 3M, v roce 2002 dobrovolně ukončila jejich výrobu [2].

Ze znalosti hodnoty rozdělovacího koeficientu látky mezi oktan-1-ol a vodu lze usuzovat na jeho toxicitu. Cílem mé práce bylo změřit tyto rozdělovací koeficienty u dvou fluorovaných telomerních alkoholů; 1H,1H,2H,2H-perfluorooktan-1-olu (6:2 FTOH) a 1H,1H,2H,2H-perfluorodekan-1-olu (8:2 FTOH). Ke stanovení bylo použito metody třepací lahve. K měření koncentrace v jednotlivých fázích pak metody plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT

2.1.1 DEFINICE

Rozdělovací koeficient mezi oktano-1-ol a vodu je definován jako poměr rovnovážných koncentrací rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému dvou omezeně mísitelných rozpouštědel – oktano-1-ol a voda:

$$P = C_{\text{oktanol}} / C_{\text{voda}} \quad (\text{rov. 1})$$

kde C_{oktanol} je koncentrace látky v oktanolové fázi [mg/ml] a C_{voda} je koncentrace látky ve vodné fázi [mg/ml]. Z definice je zřejmé, že rozdělovací koeficient nezávisí na objemu použitých rozpouštědel. [3]

Rozdělovací koeficient je podíl dvou koncentrací, je tudíž bezrozměrný a obvykle je vyjádřen v logaritmickém tvaru $\log P$.

Rozdělovací koeficient v systému oktano-1-ol/voda souvisí s distribucí chemikálie mezi organickou a vodnou fází. Při hodnotách P menších než 10 lze považovat látky za hydrofilní – mají tedy tendenci rozpouštět se ve vodě. Naopak látky s P vyšším než 10^4 jsou považovány za velmi hydrofobní [3].

Biologické systémy jsou rozděleny na vodné a nevodné kompartmenty. Molekula chemikálie může působit buď v jednom z těchto kompartmentů nebo v obou. Nepochopitelné fáze představují především membrány tvořené makromolekulami s lipofilními i hydrofilními konci. Při transportu chemikálie na místo účinku tedy dochází k neustálému rozdělování molekul chemikálie mezi polární a nepochopitelné fázi. Pokud má chemikálie toxické vlastnosti, velikost jejího toxického účinku koreluje právě s rozdělovacím koeficientem této chemikálie mezi oktano-1-ol a vodu, případně mezi jiné fáze [4].

Poměr rozpustností chemikálie v oktano-1-olu a vodě není totožný s rozdělovacím koeficientem oktanol/voda. Žádná z fází totiž není čistě

rozpouštědlo. Organická fáze obsahuje v rovnováze 2,3 mol/l vody a vodná fáze 0,0045 mol/l oktanolu [3].

2.1.2 HISTORIE

Berthelot a Jungfleisch provedli v roce 1872 první systematickou studii o rozdělení látky mezi dvě nemísitelné kapaliny. Konkrétně se jednalo o měření množství I_2 a Br_2 v systému CS_2 /voda v rovnovážném stavu. Dále se zabývali stanovením organických kyselin, kyseliny sírové, chlorovodíkové a amoniaku v systému ethylether/voda. Výsledkem studií bylo zjištění, že poměr koncentrací rozpuštěné látky rozdělené mezi dvě nemísitelné fáze je konstantní a že nezávisí na relativním objemu použitých rozpouštědel [3].

Walther Nernst v roce 1891 zjistil, že rozdělovací koeficient látky bude konstantní pouze v případě, že je při rozdělení mezi fáze uvažována jediná molekulová forma této látky. Je-li toto splněno, může být rovnovážný stav popsán pomocí klasické termodynamiky. Tedy jako tendence molekuly rozpuštěné látky opustit rozpouštědlo a přejít do jiného. Tato tendence může být měřena aktivitou rozpuštěné látky v rozpouštědle. Aktivita je funkcí jiných obecně měřených veličin jako je chemický potenciál, parciální a osmotický tlak [3].

Zájem farmakologů o studium rozdělovacích koeficientů byl na přelomu 19. a 20. století vyvolán na sobě nezávislými pracemi Meyera a Overtona, které popisují, že narkotické působení léčiv koreluje s jejich rozdělovacím koeficientem v systému olej/voda. Tento zájem však brzy klesl a objevil se až v 60. letech 20. století, kdy Hansch et al. publikovali, že rozdělovací koeficient mezi oktanol a vodu koreluje s biologickou aktivitou fenoxycetových kyselin. Tím jsou položeny základy pro QSAR (quantitative structure - activity relationship), tedy kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou látek a jejich biologickou účinností [3].

2.1.3 STANOVENÍ

Rozdělovací koeficient lze určit několika způsoby. Prvním je metoda třepací láhve, při níž se používají velmi nízké koncentrace stanovované látky (menší než setina mol/l). Tato látka i rozpouštědla musí být velmi čistá. Do systému oktanol/voda je přidána stanovovaná látka a poté se směsí intenzivně třepe po dobu asi 15 minut. Následuje centrifugace, nutná k odstranění případné emulze a poté stanovení koncentrace v obou fázích vhodnou analytickou metodou [3].

Další metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), jejíž výhodou oproti metodě třepací láhve je, že vzorek stanovované látky nemusí být nejvyšší možné čistoty. Lze použít i směs látek, pokud jsme schopni identifikovat pík stanovované látky. Při této metodě jsou nejprve měřeny retenční časy standardů o známých rozdělovacích koeficientech. Pokud měřená látka leží mezi retenčními časy standardů, můžeme určit její rozdělovací koeficient. Pro měření silných kyselin, zásad, komplexních sloučenin kovů, povrchově aktivních látek a látek, které reagují s eluentem nelze této metody využít. Rozdělovací koeficienty je možné určit také různými početními metodami [3].

2.2 PERFLUOROVANÉ LÁTKY

2.2.1 VÝROBA

Existují dva komerčně používané způsoby syntézy PFL. Prvním z nich je elektrochemická fluorace (ECF), při které jsou výchozí organické látky ponořeny do bezvodé kyseliny fluorovodíkové. Průchodem elektrického proudu dochází ke kompletní náhradě vodíkových atomů atomy fluoru. Hlavním produktem je ta perfluorovaná organická látka, která byla použita jako výchozí látka. Nevýhodou této reakce je však její nízká selektivita. Důsledkem je vznik větvených, cyklických produktů a produktů

o různé délce uhlíkatého řetězce. Obsah nežádoucích produktů může dosahovat až 30% [2].

Dalším způsobem je telomerizace tetrafluorethylenu a jodopentafluorethanu. Při tomto procesu nevznikají větvené produkty. Tento postup je ale velmi drahý [2].

Perzistentní PFL jako PFOS a PFOA mohou vznikat také transformací komerčně vyráběných prekurzorů [5].

2.2.2 VYUŽITÍ

Perfluorované sloučeniny mají široké využití v průmyslu již více než 50 let, díky jejich unikátním fyzikálně - chemickým vlastnostem jako je chemická a teplotní stabilita, povrchová aktivita. PFOS, a s ním související sloučeniny, se používaly jako impregnační prostředky proti špíně, vodě a oleji na koberce, textilie, kůži, papír, lepenku a potravinové sáčky [5].

Dále se PFOS používá pro elektronická zařízení, jako součást mnoha čistících prostředků, hasicích pěn (především k hašení hořlavých tekutin), jako pesticid a v kosmetice. Amonná sůl kyseliny perfluorooktanové je využívána jako nezbytná součást při výrobě některých fluoropolymerů jako je polytetrafluorethylen, či jako antistatické činidlo [5].

PFOS a jemu podobné látky jsou používány ve fotografickém průmyslu. Aplikují se na fotografický film, papír a tiskařské desky. Díky jejich povrchové aktivitě zlepšují ostrost snímku při použití malého množství těchto látek [2].

PFL mají využití při pokovování předmětů, především při pochromování. Karcinogenní šestimocný chrom, obsažený v pokovovacím roztoku, díky PFL, které snižují povrchové napětí roztoku, neuniká do vzduchu [2].

2.2.3 VLASTNOSTI

Vazba C-F je velmi silná a odolná vůči mnoha degradačním vlivům, jako jsou reakce s kyselinami a bázemi, oxidační a redukční reakce. Tato odolnost přispívá k neobyčejné stabilitě perfluorovaných sloučenin. Nejčastěji studovanými perfluorovanými sloučeninami jsou perfluorované sulfonáty (zejména perfluorooktansulfonát = PFOS) a perfluorované kyseliny (zejména perfluorooktanová kyselina = PFOA). Obě sloučeniny jsou velmi persistentní v lidském těle i v životním prostředí [5].

Tyto perzistentní látky jsou v nezanedbatelném množství patrné i ve vzdálených oblastech. Tím je demonstrována jejich schopnost přesunu životním prostředím na dlouhé vzdálenosti, tzv. LRET = Long Range Environmental Transport. Vlastnosti, díky kterým jsou PFL tolik akumulovány v povrchové vodě jsou: malá tenze páry, rozpustnost ve vodě a špatná sorpce na pevné látky [6].

Perfluorované karboxylové a sulfonové kyseliny jsou rozložitelné působením elementárního železa v subkritické vodě o teplotě 350 °C a při dostatečném tlaku k udržení kapalné fáze nebo působením záření a použití peroxosíranu [1].

Při analýzách tkání a krve provedených v okamžiku smrti lidí ve věku 12 – 83 let byla pozorována koncentrace PFOA obdobná v krvi (3,0 ng/g) i v jaterní tkáni (3,1 ng/g), na druhou stranu koncentrace PFOS byla v krvi 5,1 ng/g, přičemž v jaterní tkáni byla koncentrace nejvyšší (13,6 ng/g), druhá nejvyšší byla v tkáni plicní, kde byla pozorována nejvyšší koncentrace PFOA (3,8 ng/g). Nejnižší koncentrace jak PFOA (0,5 ng/g), tak PFOS (1,3 ng/g) byla naměřena v nervové tkáni. Velmi nízké hodnoty byly naměřeny také při analýzách cerebrospinální tekutiny. Z toho vyplývá fakt, že PFL prochází hematoencefalickou bariérou jen ve velmi malé míře [5].

Z pokusů na zvířatech víme, že PFL prochází placentou a mohou proniknout až do plodu. Po podání perfluorooktanoátu amonného gravidní kryse, koncentrace PFOA v krvi plodu dosáhla 42% koncentrace v krvi matky [5].

Na základě americké studie nebyla zjištěna žádná spojitost mezi hladinou PFOA v séru z pupečnickové krve a věkem, vzděláním matky nebo pohlavím dítěte. Japonská studie prokázala, že neexistuje spojitost mezi body mass indexem, věkem matky nebo pohlavím dítěte a hladinou PFOS v krvi. V Japonsku byly hladiny koncentrací PFOS v pupečnickové i mateřské krvi velmi nízké. Mnohem vyšší hodnoty byly naměřeny např. u Inuitů žijících v arktických částech Kanady. Při analýzách v Německu bylo zjištěno, že hladina PFOS v pupečnickové krvi odpovídá v průměru 60% koncentrace v krvi mateřské. Koncentrace PFOA byla v pupečnickové krvi dokonce vyšší než v mateřské. Vysvětlením by mohla být skutečnost, že v pupečnicku je obsah albuminu, na nějž se PFOA váže s vysokou afinitou, vyšší než v krvi matky [5].

Schopnost PFOS přecházet do mateřského mléka potvrdila maďarská studie. Bylo testováno 61 zdravých, 3 – 7 týdnů starých novorozenců, kteří byli krmeni buď výhradně mateřským mlékem nebo výhradně dětskou výživou. Medián koncentrací PFOS byl 7,3 µg/l a PFOA 3,6 µg/l. Testy jasně ukázaly, že děti kojené mateřským mlékem měly vyšší hladiny PFOS než ty krmené dětskou výživou. Pro PFOA nebylo totéž prokázáno [5].

2.2.4 EXPOZICE

Perfluorované látky se dostávají do těla buď cestou přímou – inhalací, z prachu v místnostech, z pitné vody a z potravy, případně konzumací prachu a špíny dětmi; nebo nepřímou: z obalů potravin, úpravou potravin, bioakumulací v potravním řetězci. Některé prekurzory, které jsou obsaženy v některých potravinách, ve venkovním vzduchu i ve vzduchu

v místnostech, jsou metabolizovány na perzistentní PFL jako je PFOS. Odhaduje se, že asi 5% fluorotelomerních alkoholů (FTOH) a 20% fluorooktylsulfonamidů je v lidském těle přeměněno na PFOA a PFOS. Nejvíce PFL přijme člověk v potravě, asi stokrát méně v pitné vodě a z prachu v místnostech a zhruba tisíckrát méně ze vzduchu [5].

2.2.4.1 Vzduch

Tělavé perfluorované sloučeniny (fluorotelomerní alkoholy, perfluorooktansulfonamidoethanol, perfluorooktan sulfonamid) byly měřeny ve venkovním ovzduší v různých lokalitách. Výsledky ukazují nejen na rozdíl mezi jednotlivými státy, ale především na rozdíl mezi ovzduším ve městě, na venkově a ve vzdálených oblastech. Rozdíly jsou též patrné v různých ročních obdobích odběru vzorku, dnu odběru (víkend nebo všední den) a na momentálních klimatických podmínkách. V prachu z domácností, který byl získán z vakuových čističů, byl nejčastěji detekován PFOS. Podle norských měření bylo zjištěno větší zamoření domácností než kanceláří. Důvodem je nejspíše absence koberců a různých čalounění v kancelářích. Koncentrace PFL je ve vzduchu v místnostech vyšší než ve venkovním ovzduší [5].

2.2.4.2 Potraviny

Konzumace mořských ryb a měkkýšů je hlavní potravní zdroj perfluorovaných sloučenin. Koncentrace perfluorovaných sloučenin v séru byla zřetelně spjata s konzumací lína, rybích jater a krevet, ale také s věkem, kojením v minulosti a lokalitou pobytu [7].

PFOS a PFOA jsou bioakumulovány v rybách, přičemž PFOS ve větší míře. Významné koncentrace těchto látek jsou detekovány především v místech zvýšeného výskytu těchto látek v důsledku továren produkujících fluoropolymery (nebo sloučeniny obsahující fluor) a v blízkém okolí. Z ryb chycených v zamořených oblastech byla naměřena nejvyšší koncentrace

PFOS v pstruhovi, PFOA v úhořovi a okounovi [5]. Krevní testy skupiny Poláků žijících u Baltského moře prokázaly souvislost mezi koncentrací deseti perfluorovaných sloučenin v krvi a konzumací ryb z Baltského moře [9]. Podobná souvislost byla prokázána v Severním Porýní-Vestfálsku u lidí konzumujících ryby z místních řek [5].

Při testech potravin v Severní Americe nazvaných „Multi-City-Study“ byly získány pozitivní vzorky především z mletého hovězího masa, dále pak z mléka, zelených fazolek, jablek a chleba. Ve Velké Británii, při testech „Total Diet Study“ , byly nalezeny hodnoty koncentrace PFL vyšší než 10 ng/g především u potravin obsahujících brambory (např. bramborové lupínky, hranolky aj.) [5].

2.2.4.3 Pitná voda

Kontaminace pitné vody je většinou pod limitem detekce. V japonské vodárně, kde je voda získávána z řeky Tama, do které je vypouštěna odpadní voda z továrny zpracovávající PFOS, byla zjištěna koncentrace kolem 50 ng/l. Ve velké většině testů v Evropě byly hodnoty menší než limit detekce. Hodnoty byly z neznámých důvodů vyšší, a to 8,1 ng/l PFOS a 2,4 ng/l PFOA, pouze ve vodě, která pocházela z jezera Lago Maggiore v Itálii. V okolí letišť je koncentrace PFOS mezi 5,4 a 40 ng/l a 1,6 ng/l PFOA, zatímco v místech, kde není znám žádný zdroj znečištění je koncentrace PFOS menší než 0,1 ng/l a PFOA 0,1 až 0,7 ng/l [5].

V Little Hocking v Ohiu, kde je zdroj PFOA, se její koncentrace ve zdrojích pitné vody v letech 2004 a 2005 pohybovaly mezi 1900 a 18600 ng/l. Nejvyšší koncentrace PFOA v séru (medián = 374 ng/l) byly naměřeny u lidí používajících výhradně vodu z centrálního zdroje pitné vody Little Hockingu. Zřetelně nižší hladina v krvi byla zjištěna u lidí používajících karbonový filtr na vodu [5].

Součet koncentrací 7 perfluorovaných sloučenin v pitné vodě v Sauerlandu v Německu byl v roce 2006 mezi 26 a 598 ng/l. Nejvíce zastoupena byla PFOA. Zde jsou zvýšené koncentrace způsobeny tím, že průmyslový odpad bohatý na PFL byl recyklující společností zapracován do půdních přípravků. Použitím těchto půdních přípravků byly PFL rozptýleny na zemědělskou půdu, což způsobilo značné znečištění životního prostředí ve venkovských částech Sauerlandu. Z kontaminovaných míst byly PFL smyty do povrchové vody a do malých potoků, ze kterých však vznikají řeky Rúr a Möhne a také jezero Möhne. To jsou významné zdroje pitné vody pro několik milionů obyvatel Porúří. V nejvíce zasažené vodárně v Möhnebogenu byly použity filtry z aktivního uhlí, které PFOA z pitné vody efektivně odstraňují. Počáteční koncentrace PFOA vyšší než 500 ng/l klesla použitím filtrů na méně než 100 ng/l. Bylo zjištěno, že zemědělská zvířata, která žerou trávu na kontaminovaných místech nebo žerou krmivo vypěstované na kontaminované půdě, nemají zvýšené hodnoty koncentrací PFL [9].

2.2.4.4 Ostatní

Zbytková množství PFOA jsou detekovatelná v polytetrafluorethylenových (PTFE) neboli teflonových pánvích, dentálních nitech potažených PTFE a v PTFE fóliích. FTOH a PFOA se z nových pánví uvolňují především při prvním použití, FTOH při opakovaném použití úplně vymizí, výsledky měření koncentrací PFOA byly proměnlivé - někdy po opakovaném použití vymizela, někdy se množství nezměnilo. PFOA je těkavá látka, tudíž je přítomna ve větších množstvích v produktech vyráběných za nižších teplot [5].

2.2.5 NÁSLEDKY EXPOZICE

Poprvé byly perfluorované látky vyrobeny před více než padesáti lety a mnohé jsou stále produkovány. Výzkum, díky němuž byla zjištěna přítomnost perfluorovaných látek v divoké přírodě i v lidech, byl proveden

v roce 2001. První výzkumy byly zaměřeny především na vysoce exponované pracovníky. Tyto výzkumy poukázaly na několik účinků na malý počet pracovníků, především mužů. Další výzkumy byly zaměřeny především na vliv na reprodukci a vývoj plodu [10].

Studie na zvířatech ukázaly, že nepříznivé vlivy perfluorovaných látek mohou záviset na délce perfluorovaného uhlíkového řetězce a na funkční skupině. Nejrozšířenějšími PFL sloučeninami jsou PFOS a PFOA, tudíž byly studie zaměřeny především na ně. Byly prokázány fyziologické následky expozice PFOS, jako rozvrat homeostázy thyroidních hormonů, proliferace jaterního peroxisomu, nespecifická hepatotoxicita, snížení celkového cholesterolu v séru [10], zvětšení jater, pozměněná steroidogeneze, úbytek na váze spojený s tzv. wasting syndromem. Amonná sůl PFOA způsobuje zvýšenou aktivitu aromatázy a hladinu estradiolu v plazmě, což může způsobit adenom Leydigových buněk [11].

Studie in vitro, při kterých byly použity lidské buňky ukazují, že některé PFL mohou být genotoxické, některé mají vliv na intracelulární orgány a některé mají vliv na estrogeny. Rozvrácením hormonální rovnováhy mohou mít PFL vliv na lidskou plodnost [12].

2.2.5.1 *Následky expozice zvířat*

Kvůli nedostatku a nekompletnosti toxikologických dat nelze určit vztah mezi strukturou a biologickým účinkem a vliv na životní prostředí. Jsou uváděny informace o vývojové toxicitě u hlodavců a ptáků jako jsou například úmrtnost novorozenců, snížení tělesné hmotnosti plodu, rozštěp patra, zpomalení vývinu plic, edém a abnormality srdce. Kratší PFL byly testovány na savcích a výsledkem působení byl malý vliv na tělesnou váhu, pohlavní zralost a otevírání očí. Testování různě dlouhých sloučenin a sloučenin s různými funkčními skupinami dává možnost určit vztah mezi strukturou a jejich biologickým účinkem. Při testech na malých tropických

říčních rybách pocházejících z Indie a jižní Asie - dánío pruhované (*Danio rerio*), bylo zjištěno, že sloučeniny s delším uhlíkatým řetězcem (C8) jsou více toxické než sloučeniny kratší (C4). Porovnáním stejně dlouhých sloučenin s různými funkčními skupinami bylo zjištěno, že ty, obsahující sulfonovou funkční skupinu, mají větší toxický potenciál než ty, obsahující karboxylovou funkční skupinu. Bylo tedy učeno pořadí podle toxicity: PFOS > PFOA > PFBS > PFBA [13]. Vysvětlením proč sloučeniny se stejným počtem uhlíků, ale odlišnou funkční skupinou, jsou různě toxické může být fakt, že sloučeniny obsahující sulfonovou funkční skupinu obsahují o jeden fluorovaný uhlík více než sloučeniny s karboxylovou funkční skupinou [14].

Výsledky ukazují, že největší toxický účinek má PFOS před PFOA. PFBS a PFBA mají malý toxický účinek, který se objevuje až při velkých koncentracích. PFOS je pro embrya dánía teratogenní, PFOA je potenciální slabý teratogen při delší expozici. Při expozici osmiuhlíkatým sloučeninám byly malformace zjevné již na počátku líhnutí, zatímco u čtyřuhlíkatých se objevily později. Delší PFL způsobovaly u embryí otok perikardu. Otok žloutkového vaku se vyskytoval pouze po expozici PFOA. Sulfonované sloučeniny způsobovaly malformace hlavy. Malformace ocasu a nenafouknutý plynový měchýř způsobovaly všechny PFL. Tyto malformace znemožňují jedinci získávat potravu a únik před predátorem. Všechny testované PFL mají vliv na tepovou frekvenci. Snížení celkové velikosti se objevilo při expozici PFOS a PFOA, přičemž k vyvolání účinku stačilo stokrát méně PFOS než PFOA. Expozicí PFOA bylo zjevně opožděno líhnutí a snížena jeho úspěšnost [13].

2.2.5.2 Hypothyroxinémie

Při testech na zvířatech byl nalezen důkaz, který nasvědčuje vlivu perfluorovaných sloučenin na rozvrat homeostázy thyroidních hormonů. Výsledkem je hypothyroxinémie. V séru je nízká hladina thyroxinu, přestože hladina thyreotropinu je normální [10].

Dlouhou dobu se soudilo, že hypothyroxinémie nemá žádný vliv na matku ani plod. Nyní je znám negativní vliv na vývoj centrální nervové soustavy dítěte, vliv na růst plodu a váhu novorozence. Tyto následky byly měřeny u potomků hypothyroxinemických matek tři týdny po porodu a v 1 - 3 letech dítěte. Nejhorší následky nastávají, pokud rozvrat homeostázy nastane v raném období gravidity (do 12 týdnů). Vzhledem k důležitosti thyroïdních hormonů pro vývoj CNS je v prenatálním a krátce i v postnatálním období zvířat zvýšená koncentrace transthyretinu (TTR) - proteinu, na který se váže thyroxin. Perfluorované látky jsou schopny se vázat na TTR a blokovat tak vazebné místo pro thyroxin. Afinita PFL je 12,5 - 50 krát nižší než vazebný potenciál přirozeného ligandu - thyroxinu [10].

Bylo zjištěno, že riziko mateřské hypothyroxinémie vlivem expozice perfluorovaným látkám je v dnešní době v Severní Americe zanedbatelné. Koncentrace perfluorovaných látek v lidech klesla, když firma 3M zastavila svou produkci PFOS v roce 2002 [10] a nahradila ji produkcí PFBS (perfluorobutansulfonátu), u kterého se předpokládá nižší bioakumulace [13]. Vliv může mít také legislativa. PFOS byl označen jako toxická látka a byly upraveny podmínky pro import a zpracování. V roce 2009 byl na Stockholm Convention PFOS zařazen mezi tzv. persistentní organické polutanty (POP = Persistent Organic Pollutant) [10].

Emise PFOA byla snížena o 95% a nahrazena PFL s kratšími řetězci [13]. Existují však obavy, že tyto kratší PFL budou v budoucnu nejvíce přispívat k celkovým hladinám PFL v pitné vodě, a to především proto, že jsou těžko odstranitelné běžnými úpravami pitné vody a filtrace přes aktivní uhlí [14].

2.2.5.3 *Imunotoxicita*

Některé studie ukazují, že PFOA způsobuje zakrnění brzlíku a sleziny, čímž potlačuje tvorbu protilátek a pozměňuje populaci T - lymfocytů

[11]. Tento vliv je plně reversibilní. Hmotnost těchto orgánů se vrátí do normálu po 5 až 10 dnech od poslední dávky [1].

Perfluorované látky jsou imunotoxické jak z pohledu buněčné, tak látkové imunity. Jaderné receptory, zvané receptory aktivované proliferátory peroxizomů (PPAR = peroxisome proliferators - activated receptors), jsou tří druhů: α , β a γ . Procesy regulované těmito receptory jsou např. homeostáza lipidů, adipogeneze, reprodukce, hojení ran a karcinogeneze. PFOA aktivují PPAR α . Jisté studie proto soudí, že některé biologické účinky, které PFL mají, jsou zprostředkovány právě přes tyto receptory. Přesto je role PPAR v otázce imunotoxicity PFL předmětem debat. Bylo prokázáno, že při expozici kultur lidských leukocytů PFOA i PFOS in vitro je přímo inhibována produkce cytokinů. Dále také, že účinky pozorované při expozici PFOA byly závislé na aktivaci PPAR α , kdežto při expozici PFOS byly tyto účinky na PPAR α nezávislé. To bylo pozorováno i při testech na myších in vitro [11].

2.2.6 EXKRECE

PFL jsou z lidského těla velmi pomalu eliminovány, z části také kvůli enterohepatálnímu cyklu. Jen některé látky, jako perfluorobutyryát, jsou snadno vylučovány a mají nízkou bioakumulační schopnost. Právě stálost a bioakumulace v organismu zvyšuje zájem o to, jaké má PFL schopnosti ovlivnit fyziologické procesy v těle [12].

PFL jsou primárně vylučovány játry a nejspíš i ledvinami. Dostávají se do střev jako součást žluče a většina je resorbována a vrácena zpět do jater enterohepatálním cyklem. Špatná exkrece některých PFL ledvinami, způsobená tubulární resorpcí zprostředkovanou transportními organickými anionty, přispívá k perzistenci těchto látek. Medián poločasů PFL v lidském séru je např. pro PFHxS roven 8,8 roku, PFOS 5,4 roku a PFOA 3,8 roku. Tyto poločasy jsou však velmi individuální, závislé na biochemii a fyziologii.

Rozdíly jsou dány genetickou a metabolickou odlišností jedince. Nebyly pozorovány rozdíly v exkreci u mužů a žen [12].

Vzhledem k tomu, že PFL jako PFOS a PFOA patří k velmi perzistentním látkám, které nepodléhají metabolickým přeměnám, dalo by se očekávat, že jejich koncentrace v těle bude s věkem vzrůstat. Většina studií však nepotvrdila souvislost mezi koncentrací perzistentních PFL a věkem [5].

Health Ethics and Research Board při Univerzitě v Albertě prováděl testy dobrovolníků k zjištění bioakumulace toxinů a jejich vylučování u chronicky nemocných pacientů. Pro získání kontrolních vzorků se přihlásil i 51 roků starý, asymptomatický muž. Nečekaně u něj však byly nalezeny vysoké hladiny PFL v séru. Ostatní měřené toxiny nebyly detekovány. Po obdržení výsledků tento muž požádal výše zmíněný výbor o provedení testů u všech členů rodiny, bydlících ve stejné domácnosti. Všichni, včetně jednoho dítěte, měli zvýšené hodnoty koncentrací PFL. Bylo tedy shromážděno několik vzorků z jejich domácnosti, aby byl zjištěn zdroj zamoření. Rodina neměla žádné zvláštní stravovací návyky ani žádný z členů nikdy nebyl zaměstnán ve firmě, kde by byl PFL exponován. Rodina žila v kanadské Albertě, kde jsou dlouhé a studené zimy, tudíž topná sezóna je od září do května. V tomto období byl dům vytápěn podlahovým topením. Ve většině pokojů byl od roku 1989 koberec občasně impregnován proti špíně. V domě byla zjištěna špatná ventilace. Vzorky prachu a koberců z tohoto domu obsahovaly velké množství PFL, především PFHxS. Zvýšená expozice je pravděpodobně způsobena zahříváním koberce, který byl ošetřen impregnačním prostředkem následně vypařovaným a inhalovaným členy domácnosti. Zvýšené hodnoty byly opakovaně nalezeny u lidí žijících v domech s podlahovým topením a s koberci, ne však u lidí, kteří měli doma koberce, ale ne podlahové topení, a to přesto, že používali stejné impregnační prostředky jako výše zmíněná rodina [12].

Byla zjišťována zdravotní historie rodiny. Manželka prodělala dva po sobě následující samovolné potraty krátce po nastěhování do zmíněného domu, přestože její porodní i zdravotní minulost byla v pořádku. Z důvodu předcházení zdravotním problémům rodiny, spojeným se zvýšeným množstvím PFL v těle, začal původně testovaný muž hledat ve vědecké literatuře možnosti, jak snížit hladiny PFL v těle s minimálním zdravotním rizikem. Několik měsíců hledal radu u mnoha vědců i u výrobců PFL, všichni mu však řekli, že neexistuje žádné riziko související se zvýšenou hladinou PFL v lidském těle, jídle, textilu ani životním prostředí a že není znám žádný postup, který by vedl k urychlení exkrece PFL z těla. Tento muž shromáždil informace o možných terapiích. K exkreci sloučenin, které se akumulují v těle se používá metod jako: použití BAS (bile acid sequestrant), inhibitorů pankreatické lipázy, nevstřebatelných tuků, očišťování pomocí sauny či série flebotomií. Dále také alternativní metody jako použití zeolitů a saponinů ze sóje a juky, které mají údajně stejný mechanismus působení jako BAS [12].

Pouze PFOA byla nalezena v moči. Jen velmi malé množství PFHxS v potu, v němž nebyla nalezena žádná jiná PFL, tudíž navštěvování sauny se zdá být pro vylučování PFL neúčinné. Po užití saponinů bylo detekováno ve stolici jen nepatrné množství PFOA, nepatrné množství PFOS bylo detekováno ve stolici po užití zeolitu. V obou případech nebyly detekovány žádné jiné PFL. Ani jedna z metod tedy není pro urychlení vylučování PFL vhodná [12].

Po užití BAS - cholestyraminu byla zaznamenána exkrece především PFHxS a PFOS, ale také PFOA do stolice. Cholestyramin působí proti cirkulaci PFL, čímž umožní jejich vyloučení. S užitím cholestyraminu je tedy spojen i pokles PFL v séru. Výhodou jeho použití je snadnost užití bez invazivní intravenózní aplikace, dostupnost, bezpečnost, nízká toxicita a

přijatelné vedlejší účinky. Není absorbován do těla – pouze se pevně váže na nežádoucí látku a je společně s ní vyloučen [12].

2.2.7 ARKTICKÉ OBLASTI

Perfluorované sloučeniny se sulfonovými nebo karboxylovými funkčními skupinami mají schopnost dostávat se do vzdálených oblastí, například arktických oblastí. Toxicita a sklon k akumulaci v těle jsou charakteristiky perzistentních organických polutantů. Na rozdíl od většiny POP, které se hromadí v tukových tkáních, PFL se sulfonovou nebo karboxylovou funkční skupinou se vážou na bílkoviny v krvi a hromadí se především v játrech, ledvinách a žluči [15].

Jsou možné dva mechanismy přesunu PFL. První (přímý) je spjat s ionty PFL samotnými. Následné rozšíření je zajištěno hydrodynamickými jevy, především celkovou cirkulací oceánů. Druhý (nepřímý) předpokládá rozšíření neutrálních, těkavých prekurzorů (např. fluorotelomerních alkoholů a perfluorovaných sulfonamido alkoholů), jemuž následuje oxidace v atmosféře na karboxyláty nebo sulfonáty [6]. FTOH, fluorotelomerní olefiny, jodidy a akryláty jsou přeměňovány na karboxyláty, sulfonamido alkoholy na karboxyláty i sulfonáty [15].

2.2.7.1 *Antarktida*

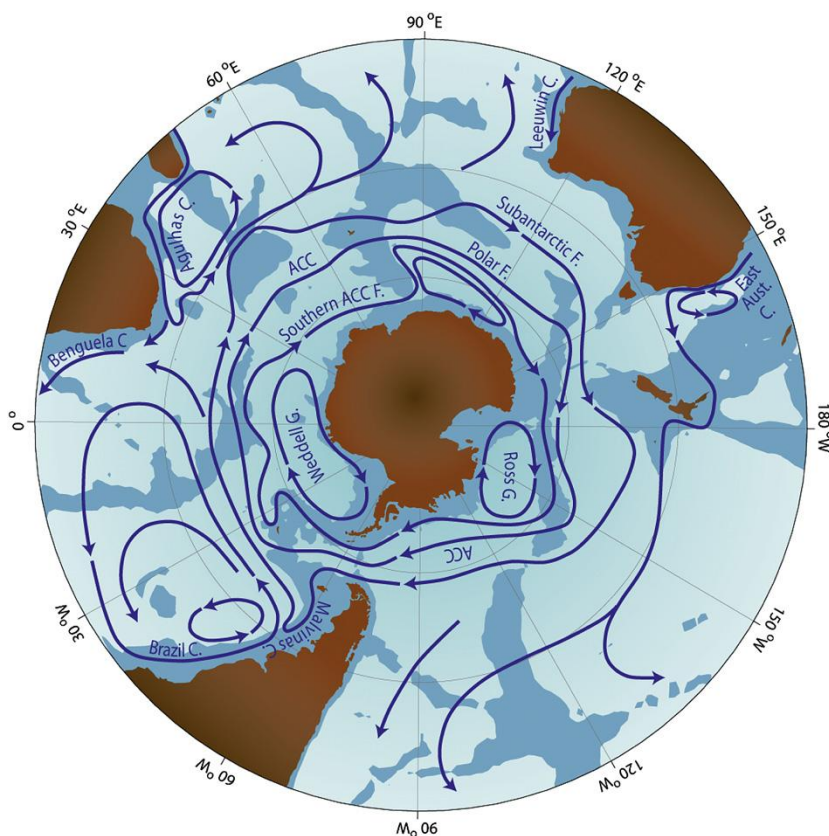
Vzhledem k absenci velkých měst a izolaci od ostatních kontinentů představuje Antarktida unikátní prostředí pro zjišťování LRET (Long Range Environmental Transport) perfluorovaných látek. Jediná společnost vyrábějící nebo dovážející PFL na jižní polokouli je v Brazílii, asi 4700 km vzdálené od Antarktidy [6].

FTOH mají, i přes jejich těkavost, nízkou schopnost znečišťovat arktické oblasti (ACP = Arctic Contamination Potential), vlivem jejich nízké stability v atmosféře (jen asi 10 – 20 dnů). Ve srovnání například s

hexachlorbenzenem (2 - 6 let), který se jeví být nejvíce akumulovaným organohalogenem v biotě Antarktidy [6].

PFL se primárně shromažďují v krevním séru a v orgánech detoxikace jako jsou játra. Výsledky analýz jiných tkání proto mohou být nepřesné. Dalším problémem při těchto analýzách jsou stěhovaví ptáci (např. buřňák bělobradý a chaluha antarktická), kteří na zimu odlétají do teplejších oblastí. Jejich vzorky tedy nemohou být považovány za přesně odrážející potravní síť Jižního oceánu obklopujícího Antarktidu. PFOS byl detekován jen u predátorů patřících k obratlovcům stravujícím se v západní části Antarktického poloostrova. Příkladem může být rypouš sloní (*Mirounga leonina*), chaluha antarktická (*Stercorarius maccormicki*), lachtan antarktický (*Arctocephalus gazella*), tučňák oslí (*Pygoscelis papua*), tučňák kroužkový (*Pygoscelis adeliae*). Naměřené hodnoty byly nízké a nepřekročily 10 ng/g [6].

Skutečnost, že PFL jsou detekovány pouze v některých predátorech (a to v nízkých koncentracích) a jinak v biotě Antarktidy nedetekovatelné, je nejspíš způsobena neustálou cirkulací Jižního oceánu (od západu k východu) kolem Antarktidy. Nedochozí k významnějšímu proudění ze severu. Tato hypotéza však není zcela potvrzena [6].



Obr. 1 Oceánské proudy kolem Antarktidy. Zkratky: ACC = Anctarctic Circumpolar Current (antarktický cirkumpolární proud), F = Front (frontální proud), G = Gyre (krouživý proud), C = Current (proud) [6].

2.2.7.2 Arktida

Při studii [16] byla testována jaterní tkáň ledních medvědů ze sedmi různých míst Arktidy. Koncentrace PFOS byly mnohem vyšší než koncentrace ostatních PFL. Vzorke tkání pocházejících z jedinců žijících v okolí Hudsonského zálivu a v Grónsku obsahovaly značně vyšší koncentrace PFOS než ty, pocházející z jedinců ze Severozápadních teritorií Kanady a ze Špicberků. Zvýšené koncentrace jsou způsobeny blízkostí zdrojů PFOS (Evropa a východ Severní Ameriky). Vůbec nejnižší koncentrace PFOS byly naměřeny u jedinců žijících v okolí Čukotského moře. Podobné geografické rozdělení vykazovaly i perfluorované karboxylové kyseliny s více než 11 uhlíky, zatímco kratší kyseliny,

perfluorooktansulfonamid a perfluorohexansulfonát byly detekovány ve zvýšené míře na západě Severní Ameriky [15].

V práci [17] byla testována potravní síť v arktických oblastech západní Kanady. Nejvýznamnější byly opět koncentrace PFOS. V zooplanktonu byly na hranici detekovatelnosti, u tresky ledové (*Arctogadus glacialis*) se hodnoty pohybovaly v desetinách ng/g. Hodnoty v různých tkáních tuleně kroužkovaného (*Pusa hispida*) se lišily. V tukové tkáni se jednalo o desetiny ng/g, v krvi šlo již o jednotky (2,5 - 8,6 ng/g) a v jaterní tkáni se hodnoty pohybovaly od 18 do 34 ng/g. Naměřené hodnoty u tuleně vousatého (*Erignathus barbatus*) byly několikanásobně nižší. Tento rozdíl nejspíš pramení z odlišného stravování těchto druhů [15].

Při analýze svrchní vrstvy sněhu v arktických oblastech Kanady byly PFL zaznamenány v nízkých koncentracích (řádově pg/l). Vyšší hodnoty byly naměřeny v oblastech více na jihu. Přítomnost PFL ve sněhu potvrzuje možnost transportu PFL nepřímou cestou, tedy v atmosféře jako prekurzory. Hloubkové testy sněhu ukázaly, že zatímco koncentrace perfluorovaných karboxylových kyselin byly mezi léty 1996 a 2005 konstantní, koncentrace PFOS od roku 1996 do roku 1998 rostly, následně klesaly a dále byly koncentrace konstantní. Pokles souvisí se změnami v jeho průmyslové výrobě. Hodnoty naměřené ve sněhu jsou nižší než ty naměřené v mořské vodě. Detekcí PFL v mořské vodě je potvrzen i přímý transport, tedy oceánem. Je však třeba dalších měření, abychom byli schopni posoudit, který z transportů má větší vliv [15].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 INFORMACE O ANALYZOVANÝCH LÁTKÁCH

3.1.1 1H,1H,2H,2H-PERFLUOROKTAN-1-OL

Synonymum: 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridekafluorooktan-1-ol

Sumární vzorec: C₈H₅F₁₃O

CAS číslo: 647-42-7

Mr = 364, 11; ρ = 1,68 g/ml; bod varu při 28 mmHg = 88 - 95 °C [18]

3.1.1.1 Akutní toxicita [19]

LD₅₀ = 1750 mg/kg (potkan, orálně)

LD₅₀ = >5000 mg/kg (potkan, dermálně)

3.1.1.2 Chronická toxicita [19]

TDLo = 2625 mg/kg/3 týdny, přetržitě (potkan, orálně)

Následky intoxikace: změny na játrech, ledvinách, močovodu, močovém měchýři, smrt

3.1.2 1H,1H,2H,2H-PERFLUORODEKAN-1-OL

Synonymum: 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadekafluorodekan-1-ol

Sumární vzorec: C₁₀H₅F₁₇O

CAS číslo: 678-39-7

Mr = 464,12 [18]

3.1.2.1 Akutní toxicita [19]

TDLo = 30 mg/kg (myš, orálně)

Následky: změna hmotnosti jater, úbytek na váze

3.1.2.2 Chronická toxicita [19]

TDLo = 30 mg/kg (myš, orálně) samicím po dobu 8 dnů gravidity

Následky: vliv na centrální nervovou soustavu, abnormální vývoj nosu a jazyka

TDLo = 2500 mg/kg/5 dní přetržitě (potkan, orálně)

Následky: somnolence, hypermotilita, průjem, změny na játrech, ledvinách, plicích, srsti, smrt

TDLo = 3000 mg/kg (potkan, orálně) samicím po dobu 6-20 dnů gravidity

Následky: muskuloskeletární abnormality

3.1.3 1H, 1H, 2H, 2H-PERFLUOROHEXAN-1-OL

Synonymum: 3,3,4,4,5,5,6,6,6-Nonafluorohexan-1-ol

Sumární vzorec: C₆H₅F₉O

CAS číslo: 2043-47-2

Mr = 264,09; ρ = 1,59 g/ml; bod varu při 760 mmHg = 140 - 143 °C [18]

3.2 CHEMIKÁLI E

1H,1H,2H,2H-perfluorooktan-1-ol, 97 %, Sigma Aldrich

1H,1H,2H,2H-perfluorodekan-1-ol, 97 %, Sigma Aldrich

1H,1H,2H,2H-perfluorohexan-1-ol, 97 %, Sigma Aldrich

Oktan-1-ol, $\geq 99,0$ %, Merck

Heptan, $\geq 99,5$ %, Fluka Analytical

Deionizovaná voda, ČL 1997 ČSN ISO 3696 typ 2, odběr s mikrofiltrem
0,2 μm , vodivost = 0,1 $\mu\text{S/cm}$, GORO

3.3 PŘÍSTROJE

Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí -
GCQ Finnigan MAT, USA

Kolona DB-5MS Agilent Technologies, USA; délka 30 m o vnitřním průměru
0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm (durabond)

Centrifuga EBA 21 Hettich, Německo

Vortex TK3S Kartell, Austrálie

Mikrostříkačka Hamilton 701 N, PST 2 Microliter, Švýcarsko

Pipety: Nichipet EX (5000 - 1000 μl) Nichiryo, Japonsko

Model 5000 (1000 - 100 μl) Nichiryo, Japonsko

Model 5000 (200 - 40 μl) Nichiryo, Japonsko

Pipetman (100 - 10 μl) Gilson, Francie

Nichipet EX (20 - 2 μl) Nichiryo, Japonsko

3.4 PŘÍPRAVA LÁTEK

3.4.1 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ 6:2 FTOH

Byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 800, 400, 160, 80, 40, 16 a 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zředěním příslušných množství čistého 6:2 FTOH heptanem.

3.4.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ 6:2 FTOH

Tab. 1 Přípravu vzorků 6:2 FTOH shrnuje následující tabulka

Koncentrace v oktanolu [mg/ml]	Hmotnost 6:2 FTOH [mg]	Objem 6:2 FTOH [μl]	Objem oktan-1-olu [μl]	Objem vody [μl]
160	128	76	800	800
80	64	38	800	800
40	80	48	2000	2000
10	20	12	2000	2000

Takto připravenými vzorky bylo několik minut intenzivně třepáno pomocí Vortexu. Poté byly vzorky odstředěny pomocí centrifugy (5 minut při 4000 RPM). Z každého vzorku byl odebrán do čistých vialek 1 ml vodné fáze a ke každé bylo přidáno 100 μl heptanu. Poté opět následovalo třepání a odstředění stejným způsobem. Část okatnolové fáze byla odebrána a zředěna 200 krát heptanem.

3.4.3 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ 8:2 FTOH

Byl připraven zásobní roztok 8:2 FTOH o koncentraci 40 mg/ml . Kalibrační roztoky o koncentracích 220, 110, 44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 8:2 FTOH byly připraveny ze zásobního roztoku zředěním příslušných objemů heptanem.

3.4.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ 8:2 FTOH

Tab. 2 Přípravu vzorků 8:2 FTOH shrnuje následující tabulka

Koncentrace v oktanolu [mg/ml]	Objem zásobního roztoku [ml]	Objem oktan-1-olu [ml]	Objem vody [ml]
40	2,0	0,0	2,0
20	1,0	1,0	2,0
10	0,5	1,5	2,0

Další postup byl shodný s přípravou vzorků 6:2 FTOH. Rozdílný byl pouze objem pipetovaného heptanu. U 8:2 FTOH činil 50 μ l.

3.4.5 STANOVENÍ POMOCÍ GC-MS

Pro stanovení perfluorovaných sloučenin ve fázi oktanolové a vodné bylo použito plynové chromatografie. Mobilní fází byl při této metodě plyn, konkrétně helium. Plyn byl uchováván v tlakové lahvi, ze které byl veden přes redukční ventil do dávkovače. Vnitřní prostor dávkovače byl od vnějšího oddělen septem. Při dávkování bylo septum propíchnuto mikrostříkačkou a byl proveden nástřik kapalného vzorku. Objem dávkovaného vzorku činil 1 μ l. Dále byl vzorek veden do chromatografické kolony a následně do detektoru. Teplotu dávkovače, kolony a detektoru bylo možné nastavit, jelikož tyto části byly umístěny v termostatovaném prostoru. [20].

Pro detekci bylo použito hmotnostní spektrometrie. Při této metodě docházelo k ionizaci a fragmentaci molekul látky. Bylo užito ionizace nárazem elektronů. Vzniklé fragmenty se lišily poměrem své hmotnosti a náboje (m/z). Látka byla identifikována po vyhodnocení hmotnostního

spektra, v němž byla vynesena závislost zastoupení fragmentu v souboru fragmentů na jejich m/z [20]. Celé zařízení pracovalo za velmi nízkých tlaků. Jako hmotnostního analyzátoru bylo užito iontové pasti, ve které byly ionty uzavírány do ohraničeného prostoru s pomocí elektrického pole. S rostoucí amplitudou napětí vkládaného na jednu z elektrod ionty s rostoucím m/z postupně opouštěly vnitřní prostor iontové pasti směrem do detektoru [21]. Elektrický proud tekoucí detektorem vzrostl po dopadu iontů a byl zaznamenán jako pík. Ten byl tím vyšší, čím více iontů na detektor dopadlo [20].

Součástí vybavení přístroje byl počítač s programem Xcalibur schopným převést signál z detektoru do formy hmotnostních spekter. Tímto počítačem byl také proces analýzy řízen, kontrolován a optimalizován.

Koncentrace obou alkoholů byla měřena v každé oktanolové i heptanové fázi pomocí GC-MS nejméně třikrát. K vyhodnocení výsledků byl použit program Microsoft Excel.

Tab. 3 Parametry nastavení GC-MS shodně pro oba alkoholy

Parametr	Nastavená hodnota
Lineární průtoková rychlost [cm/s]	30
Teplota injektoru [°C]	250
Teplota zdroje iontů [°C]	180
Teplota transfer line [°C]	275
Rozsah měřených hodnot m/z	50 – 400
Potenciálový rozdíl při EI ionizaci [eV]	70

Měření probíhalo ve scan módu. Jeden scan trval 0,42 s.

Tab. 4 Parametry nastavení GC-MS pro jednotlivé alkoholy

Parametr	6:2 FTOH	8:2 FTOH
Délka analýzy [min]	13,50	6,00
Čas. interval detekce iontů [min]	3,80 - 6,50	3,00 - 4,50
Počáteční teplota [°C]	45	70
Růst teploty [°C/min]	6	10
Konečná teplota [°C] (po dobu 1 minuty)	120	120

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

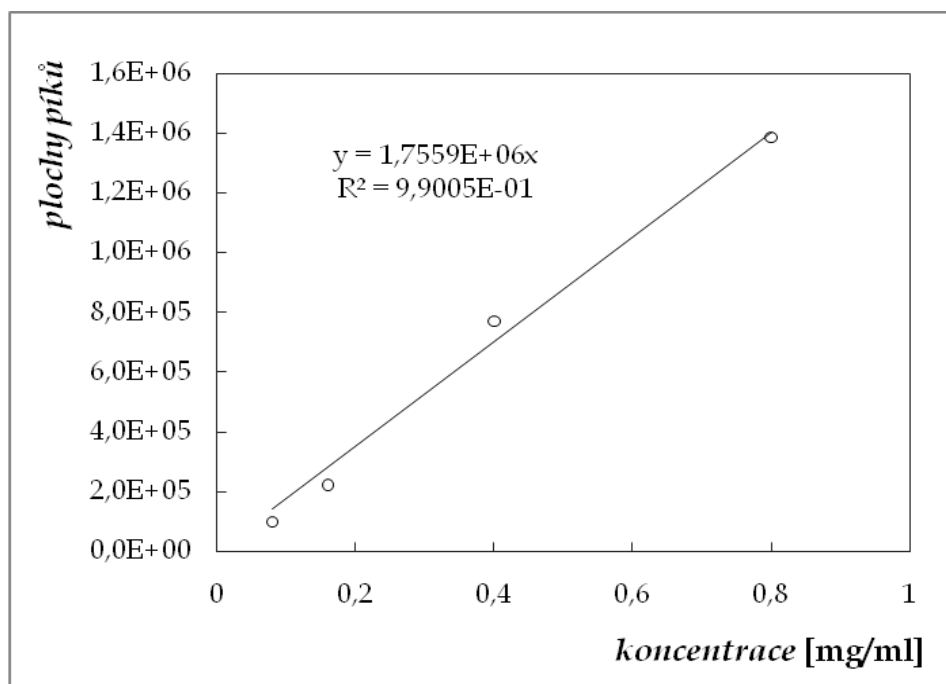
4.1 6:2 FTOH

Po dokončení analýzy byl zobrazen příslušný chromatogram. Nalezený pík byl následně integrován. Plochy těchto píků shrnují následující tabulky.

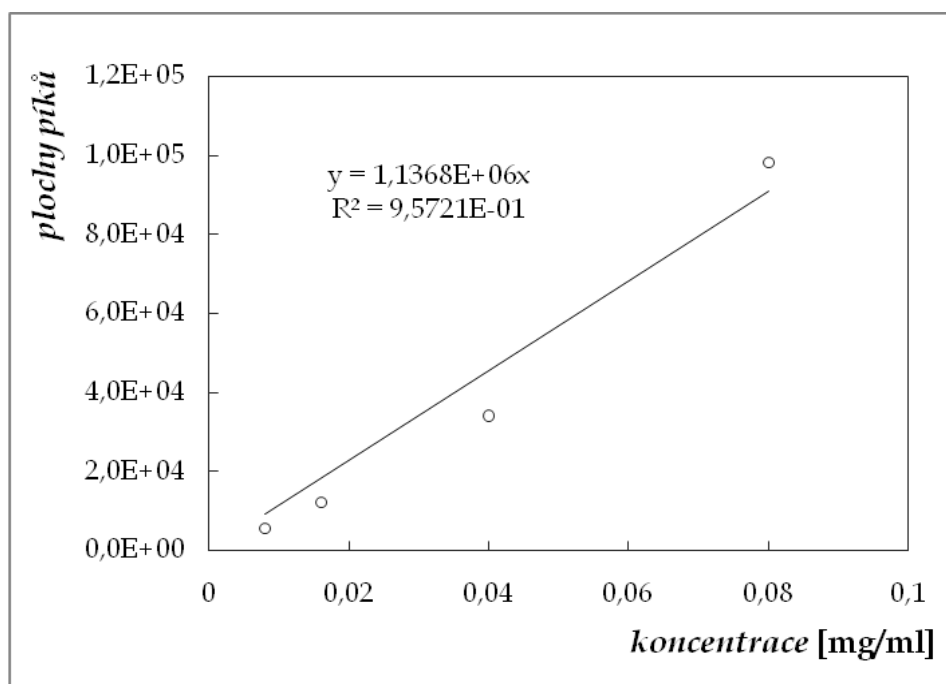
Tab. 5 Naměřené plochy píků kalibračních roztoků 6:2 FTOH

Koncentrace [µg/ml]	Plocha 1	Plocha 2	Plocha 3
800	1178871	1474266	1504561
400	782636	802800	729844
160	210395	233349	224601
80	103110	99446	91924
40	34092	30041	38258
16	11309	11156	14039
8	5839	4560	6580

Ze získaných dat byly sestrojeny kalibrační přímky.



Obr. 2 (a)



Obr. 2 (b)

Obr. 2 Kalibrační přímka vyjadřující závislost průměrů ploch píkú kalibračních roztoků 6:2 FTOH na jejich koncentraci (a) pro plochy >98160 a (b) pro plochy <98160.

Vzhledem k širokému rozsahu koncentrací kalibračních roztoků bylo nutné vytvořit dvě kalibrační přímky. V opačném případě by se roztoky o nízkých koncentracích řídili kalibrační závislostí roztoků koncentrovanějších, což by výsledek zkreslovalo.

Tab.6 Naměřené plochy píků vzorků 6:2 FTOH v oktanolové fázi zředěné 200 krát heptanem.

Koncentrace v okt. [mg/ml]	Plocha 1	Plocha 2	Plocha 3
160	857636	734559	941068
80	478684	472731	499626
40	123238	108402	95564
10	38364	38044	44172

Tab. 7 Naměřené plochy píků vzorků 6:2 FTOH v heptanové fázi - 10 krát koncentrovanější (vyextrahováno z vodné fáze)

Koncentrace v okt. [mg/ml]	Plocha 1	Plocha 2	Plocha 3
160	165729	180298	177317
80	164275	161618	165729
40	84298	98931	101600
10	17863	18838	24890

Tab. 8 Průměrné hodnoty ploch píků pro jednotlivé koncentrace u vzorků oktanolové fáze, koncentrace odpovídající průměrům ploch podle kalibrační přímky a skutečné koncentrace v nezředěném vzorku

Koncentrace v okt. [mg/ml]	Průměr ploch	Konc. podle kal. přímky [mg/ml]	Konc. ve vzorku [mg/ml]
160	844421	0,48091	96,182
80	483680	0,27546	55,092
40	109068	0,06212	12,423
10	40193	0,03536	7,071

Tab. 9 Stejně údaje jako v tab. 8 pro vodnou fázi

Koncentrace v okt. [mg/ml]	Průměr ploch	Konc. podle kal. přímky [mg/ml]	Konc. ve vzorku [mg/ml]
160	174448	0,09935	0,009935
80	163874	0,09333	0,009333
40	94943	0,08352	0,008352
10	20530	0,01806	0,001806

V tab. 9 je patrna značná nelinearita v množství 6:2 FTOH ve vodné fázi u vzorků 160 a 80 mg/ml v okt. Tato nelinearita je pravděpodobně způsobena nízkou rozpustností 6:2 FTOH ve vodné fázi, která byla u vzorku 160 mg/ml v okt. zřejmě překročena.

Nárůst množství analytu ve vzorku 160 mg/ml v okt. oproti 80 mg/ml v okt. značí, že ve vzorku 80 mg/ml v okt. ještě rozpustnost překročena nebyla.

Nelinearita mezi vzorky 80 a 40 mg/ml je způsobena použitím odlišných kalibračních křivek.

Tab. 10 Shrnutí koncentrací 6:2 FTOH ve vzorku - v oktanolové a vodné fázi, rozdělovací koeficienty a rozdělovací koeficienty v logaritmické formě

Konc. v okt. [mg/ml]	Konc. v okt. fázi [mg/ml]	Konc. ve vod. fázi [mg/ml]	P	Log P
160	96,181	0,009935	9681	3,99
80	55,092	0,009333	5903	3,77
40	12,423	0,008352	1487	3,17
10	7,071	0,001806	3916	3,59

$$P = 5247 \pm 5900 (s_r = 75,85\%), n = 4$$

$$\log P_{\text{průměr}} = 3,63$$

Je tedy zřejmé, že naměřené výsledky jsou velmi nepřesné.

Tab. 11 Vypočtené rozdělovací koeficienty 6:2 FTOH [18]

PROGRAM	HODNOTA log P
Experimentálně	–
ALOGPs	3,00
AClogP	4,48
ALOGP	3,36
MLOGP	4,13
KOWWIN	5,60
XLOGP2	4,59
XLOGP3	4,37
Průměr	4,22

Průměr naměřených log P činí 3,63, což přibližně odpovídá hodnotám vypočteným některými programy.

Tab. 12 Vypočtené součiny rozpustnosti 6:2 FTOH [18]

PROGRAM	HODNOTA log S	c_m [mg/l]
Experimentálně	-	-
ALOGpS	-3,56	99,16
AClogS	-5,08	3,05
Průměr	-4,32	51,11

Z tab. 11 a 12 je zřejmé, že rozdíly mezi vypočtenými rozdělovacími koeficienty i součiny rozpustnosti jsou značné. Poskytnou však alespoň řádový odhad vhodných koncentrací roztoků vzorků. Pokud zvolíme rozpustnost ve vodě 50 mg/l, log P zvolíme 3,5, pak koncentrace v oktanolu bude:

$$C_{\text{oktanol}} = P \cdot C_{\text{voda}}, \text{ jak vyplývá z (rov. 1)}$$

$$C_{\text{oktanol}} = 3162 \cdot 50 = 158114$$

$$C_{\text{oktanol}} \doteq 160 \text{ mg/ml}$$

Tato a nižší koncentrace byly použity pro přípravu vzorků. Při vyšších koncentracích dochází k překročení rozpustnosti ve vodě, což zkresluje výsledky.

Jak je však zmíněno výše, byla rozpustnost překročena. Rozpustnost vypočtená programy není přesná, tudíž ani použitá průměrná hodnota nebyla optimální.

Je předpokládáno, že do vodné fáze přejde jen malá část látky, tudíž jsou vzorky pojmenovány podle koncentrace v samotném oktanolu.

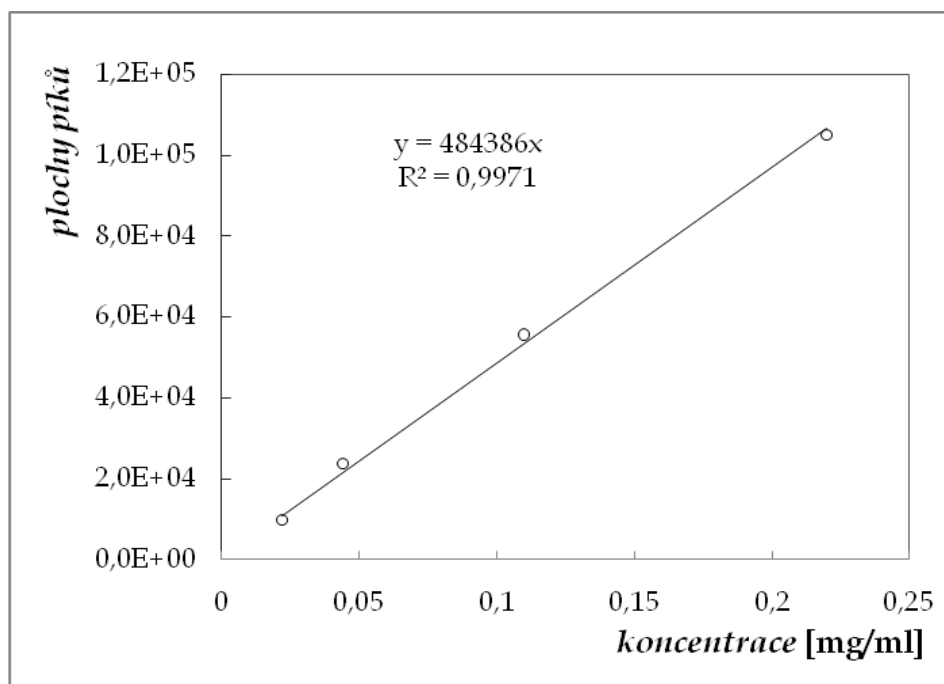
4.2 8:2 FTOH

I u této látky byl po dokončení analýzy zobrazen příslušný chromatogram a nalezený pík byl zintegrován. Plochy těchto píků shrnují následující tabulky.

Tab. 13 Naměřené plochy píků kalibračních roztoků 8:2 FTOH

Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Plocha 1	Plocha 2	Plocha 3
220	104659	106588	103596
110	54696	59620	52751
44	25257	25696	20484
22	8452	10445	10495

Ze získaných dat byla sestrojena kalibrační přímka.



Obr. 3 Kalibrační přímka vyjadřující závislost průměrů ploch píků kalibračních roztoků 8:2 FTOH na jejich koncentraci.

Tab. 14 Naměřené plochy píků vzorků 8:2 FTOH v oktanolové fázi zředěné 200 krát heptanem

Koncentrace v okt. [mg/ml]	Plocha 1	Plocha 2	Plocha 3
40	79171	71197	83949
20	56059	54870	52937
10	20391	22316	23097

Tab. 15 Naměřené plochy píků vzorků 8:2 FTOH v heptanové fázi – 20 krát koncentrovanější (vyextrahováno z vodné fáze)

Koncentrace v okt. [mg/ml]	Plocha 1	Plocha 2	Plocha 3
40	115574	121579	115614
20	87564	75792	78059
10	18197	18146	17707

Tab. 16 Průměrné hodnoty ploch píků pro jednotlivé koncentrace 8:2 FTOH u vzorků oktanolové fáze, koncentrace odpovídající průměrům ploch podle kalibrační přímký a skutečné koncentrace v nezředěném vzorku

Koncentrace v okt. [mg/ml]	Průměr ploch	Konc. podle kal. přímký [mg/ml]	Konc. ve vzorku [mg/ml]
40	78106	0,161247	32,249
20	54622	0,112765	22,553
10	21935	0,045283	9,057

Tab. 17 Stejné údaje jako v tab. 16 pro vodnou fázi

Koncentrace v okt. [mg/ml]	Průměr ploch	Konc. podle kal. přímky [mg/ml]	Konc. ve vzorku [mg/ml]
40	117589	0,242759	0,012138
20	80472	0,166131	0,008307
10	18017	0,037195	0,001860

Tab. 18 Shrnutí skutečných koncentrací 8:2 FTOH ve vzorku – v oktanolové a vodné fázi, rozdělovací koeficienty a rozdělovací koeficienty v logaritmicke formě

Konc. v okt. [mg/ml]	Konc. v okt. fázi [mg/ml]	Konc. ve vod. fázi [mg/ml]	P	Log P
40	32,249	0,012138	2657	3,42
20	22,553	0,008307	2715	3,43
10	9,057	0,00186	4869	3,69

Při testu na odlehlost výsledků, byl vzorek 10 mg/ml vyhodnocen jako odlehlý, tudíž pro statistické zpracování byly použity pouze hodnoty dvou koncentrovanějších vzorků.

$$P = 2686 \pm 371 (s_r = 1,91\%), n = 2$$

$$\log P_{\text{průměr}} = 3,43$$

Tab. 19 Vypočtené rozdělovací koeficienty 8:2 FTOH: [18]

PROGRAM	HODNOTA log P
Experimentálně	-
ALOGPs	3,68
AClogP	5,72
ALOGP	4,35
MLOGP	5,11
KOWWIN	7,53
XLOGP2	6,08
XLOGP3	5,71
Průměr	5,45

Naměřená průměrná hodnota log P činí 3,43. Tato hodnota tedy příliš nekorresponduje s hodnotami vypočtenými programy (tab. 19). Velké rozdíly v hodnotách vypočtených různými programy však ukazují na značnou nevěrohodnost těchto hodnot. Rozdíly jsou částečně způsobeny odlišnostmi v databázích, ze kterých tyto programy čerpají informace pro výpočet rozdělovacích koeficientů.

Tab. 20 Vypočtené součiny rozpustnosti 8:2 FTOH: [18]

PROGRAM	HODNOTA log S	c _m [mg/l]
Experimentálně	-	-
ALOGpS	-3,84	66,34
AClogS	-6,51	0,14
Průměr	-5,18	33,24

U 8:2 FTOH byla situace s odhadem vhodných koncentrací vzorků ještě komplikovanější. Rozdíl ve vypočtených rozpustnostech je v řádech stovek. Je tedy raději uvažována nižší rozpustnost než u 6:2 FTOH, tudíž nejvyšší koncentrace v oktanolu byla zvolena 40 mg/ml.

Výsledné hodnoty ukazují, že měřené látky jsou lipofilní. Z toho vyplývá, že se v těle hromadí a jejich exkrece je velmi pomalá. Aby mohly být tyto látky vyloučeny močí, musí dojít k reakci s tzv. konjugátem. I poté však může být látka resorbována zpět do krve [4].

Lipofilní látky přecházejí z jater žlučí do tenkého střeva. Odtud mohou pokračovat do tlustého střeva a být vyloučeny stolicí [4]. FTOH ale podléhají enterohepatálnímu cyklu, tudíž jsou z tenkého střeva resorbovány zpátky do krve.

Je tedy zřejmé, že FTOH jsou velmi bioakumulativní a jejich vyloučení přirozenými mechanismy, bez užití farmak, je velmi obtížné.

Vzhledem k neznalosti experimentálních hodnot rozdělovacích koeficientů je těžké posoudit, jsou-li naměřené výsledky správné. Jistě došlo k chybám při ručním dávkování vzorku, při přípravě kalibračních roztoků a vzorků. Jisté chyby mohou být způsobeny plynovým chromatografem či

hmotnostním spektrometrem. Další chyby vznikají při vyhodnocení chromatogramů. Především při nízkých koncentracích analytu není integrace píků přesná. Vzhledem k vysokému šumu je totiž obtížné určit základní linii. Naopak u vzorků vyšších koncentrací je výsledek zkreslen při překročení rozpustnosti analytu v rozpouštědle. Konkrétně u fluorovaných telomerních alkoholů problém nastává při překročení rozpustnosti ve vodné fázi.

4.3 4:2 FTOH

Další měřenou látkou byl 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorohexan-1-ol. Avšak ani po opakovaných měřeních roztoků různých koncentrací, při různých teplotních podmínkách analýzy nebyla látka detekována. Jednou z možných příčin může být fakt, že látka byla fragmentována na částice menší než je hodnota 50 m/z, což je mimo rozsah detekce. Z tohoto důvodu by bylo patrně vhodnější užití měkké ionizační techniky (chemické ionizace), namísto ionizace nárazem elektronů.

5 ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo experimentálně určit hodnotu rozdělovacího koeficientu mezi oktan-1-ol a vodu některých fluorovaných telomerních alkoholů. Podařilo se mi naměřit rozdělovací koeficient 1H,1H,2H,2H-perfluorooktan-1-olu a 1H,1H,2H,2H-perfluorodekan-1-olu. V prvním případě je průměrná hodnota logaritmu rozdělovacího koeficientu v systému oktan-1-ol/voda rovna 3,63; ve druhém případě 3,43. Především v prvním případě je výsledek zatížen velkou chybou. Hodnotu rozdělovacího koeficientu 1H,1H,2H,2H-perfluorohexan-1-olu nebylo možné změřit, jelikož nebyly nalezeny optimální podmínky analýzy.

6:2 FTOH i 8:2 FTOH jsou tedy lipofilní látky. Tyto látky se kumulují v organismu a jejich vyloučení je velmi obtížné.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kovářová, J.; Svobodová, Z.: Perfluorinated compounds: occurrence and risk profile. *Neuroendocrinology Letters* **29**:5, 599-608 (2008).
- [2] Hájková, K.: Perfluorované perzistentní kontaminanty v potravních řetězcích. Dostupné z URL: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-10-04.pdf> [cit. 23.3.2011].
- [3] Rucki, M.; Tichý, M.: Význam, historie a užití rozdělovacího koeficientu látek mezi vodu a oktan-1-ol. In: *Alternativní metody testování toxicity chemických látek a jejich směsí 2*. Tichý, M.; Halousková, O. (ed.). Chrudim – Píšťovy, Vodní zdroje EKOMONITOR 2006, p. 56-59.
- [4] Tichý, M.: *Toxikologie pro chemiky*. 2. vyd. Praha, Karolinum 2003.
- [5] Fromme, H.; Tittlemier, S.A.; Volkel, W.: Perfluorinated compounds – Exposure assessment for the general population in western countries. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **212**:3, 239-270 (2009).
- [6] Nash, S. B.; Rintoul, R.; Kawaguchi, S.; Staniland, I.; van den Hoff, J.; Tierney, M.; Bossi, R.: Perfluorinated compounds in the Antarctic region: Ocean circulation provides prolonged protection from distant sources. *Environmental Pollution* **158**:9, 2985-2991 (2010).
- [7] Haug, L. S.; Thomsen, C.; Brantseter, A. L.; Kvalem, H. E.; Haugen, M.; Becher, G.; Alexander, J.; Meltzer H. M.; Knutsen: Diet and particularly seafood are major sources of perfluorinated compounds in humans. *Environment International* **36**:7, 772-778 (2010).
- [8] Falandysz, J.; Taniyasu, S.; Gulkowska, A.: Is fish a major source of fluorinated surfactants and repellents in humans living on the Baltic coast? *Environmental Science and Technology* **40**:3, 748-751 (2006).

- [9] Wilhelm, M.; Kraft, M.; Rauchfuss, K.; Hölzer, J.: Assessment and management of the first German case of a contamination with perfluorinated compounds (PFC) in the region Sauerland, North Rhine-Westphalia. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues* **71**:11-12, 725-733 (2008).
- [10] Chan, E.; Burstyn, I.; Cherry, N.; Bamforth, F.; Martin, J.W.: Perfluorinated acids and hypothyroxinemia in pregnant women. *Environmental Research* **111**:4, 559-564 (2011).
- [11] Corsini, E.; Avogadro, A.; Galbiati, V.; Dell'Agli, M.; Marinovich, M.; Galli, C. L.; Germolec, D. R.: In vitro evaluation of the immunotoxic potential of perfluorinated compounds (PFCs). *Toxicology and Applied Pharmacology* **250**:2, 108-116 (2011).
- [12] Genuis, S. J.; Birkholz, D.; Ralitsch, M.; Thibault, N.: Human detoxification of perfluorinated compounds. *Public Health* **124**:7, 367-375 (2010).
- [13] Hagenaaars, A.; Vergauwen, L.; De Coen, W.; Knapen, D.: Structure-activity relationship assessment of four perfluorinated chemicals using a prolonged zebrafish early life stage test. *Chemosphere* **82**:5, 764-772 (2011).
- [14] Wilhelm, M.; Bergmann, S.; Dieter, H. H.: Occurrence of perfluorinated compounds (PFCs) in drinking water of North Rhine-Westphalia, Germany and new approach to assess drinking water contamination by shorter-chained C4-C7 PFCs. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **213**:3, 224-232 (2010).
- [15] Butt, C. M.; Berger, U.; Bossi, R.; Tommy, G. T: Levels and trends of poly- and perfluorinated compounds in the arctic environment. *Science of The Total Environment* **408**:15, 2936-2965 (2010).

- [16] Smithwick, M.; Mabury, S.A.; Solomon, K. R.; Sonne, C.; Martin, J. W.; Born, E. W.; Dietz, R.; Derocher, A. E.; Letcher, R. J.; Evans, T. J.; Gabrielsen, G. W.; Nagy, J.; Stirling, I.; Taylor, M. K.; Muir, D. C. G.: Circumpolar study of perfluoroalkyl contaminants in polar bears (*Ursus maritimus*). *Environmental Science and Technology* **39**:15, 5517-5523 (2005).
- [17] Powley, C. R.; George, S. W.; Russell, M. H.; Hoke, R. A.; Buck, R. C.: Polyfluorinated chemicals in a spatially and temporally integrated food web in the Western Arctic. *Chemosphere* **70**:4, 664-672 (2008).
- [18] VCCLAB: *Virtual Computational Chemistry Laboratory*. Dostupné z URL: <http://www.vcclab.org> [cit. 20.4.2011].
- [19] Thomson Reuters: *TOMES ®System* [elektronická verze], Volume 87, USA. Dostupné z URL: <http://csi.micromedex.com> [cit. 20.4.2011].
- [20] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha, Karolinum 2007.
- [21] Němcová, I.; Engst P.; Jelínek, I.: *Spektrometrické analytické metody II*. Praha, Karolinum 1998.