

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Optimalizace SPE pro stanovení perfluorovaných organických
kyselin

SPE optimization for determination of perfluorinated organic acids

Bakalářská práce

studijního programu: Klinická a toxikologická analýza

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857
a byla podporována z projektu GAUK (číslo projektu 40908).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele
RNDr. Radomíra Čabaly PhD., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu
Karlovu v Praze je možné pouze se písemným souhlasem této univerzity.

V Praze dne.....

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval mému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. a Mgr. Veronice Dufkové za trpělivost a rady poskytnuté během řešení a vypracování této práce. Dále pak rodičům za umožnění studia a podporu poskytovanou během studií.

Abstrakt

Práce se zabývá optimalizací úpravy vodných vzorků životního prostředí pro stanovení perzistentních polutantů – perfluorovaných organických kyselin, které jsou potenciálně škodlivé pro živé organismy. Cílem práce je optimalizovat podmínky pro SPE prekoncentraci těchto látek pro jejich stanovení metodou GC-MS. Jako analyty byly zvoleny perfluorované organické kyseliny s uhlíkovým řetězcem od C₆ do C₁₂. Při optimalizaci SPE postupu byly studovány vlivy pH vzorku, typu a objemu elučního činidla, přidavku indiferentní soli a iontově párového činidla. Výsledky ukázaly, že účinnost extrakce je závislá na délce uhlíkového řetězce analytu a dosahuje hodnot od 75 do 110% pro C₆–C₈ a od 55 do 95% pro C₉ - C₁₂. Výsledkem optimalizace bylo zvýšení účinnosti extrakce, které je nejmarkantnější pro kyseliny s krátkým řetězcem (C₆ až 10 x), zatímco u kyselin s delším řetězcem došlo jen k mírnému zvýšení.

Klíčová slova

Optimalizace, extrakce tuhou fází, HLB, perfluorované organické kyseliny,

Abstract

This thesis is focused on optimization of preparation of aqueous environmental samples for determination of persistent pollutants – perfluorinated organic acids, which are potentially dangerous for living organisms. The goal of the thesis is optimization of SPE conditions for preconcentration of these compounds for their determination by GC-MS. Perfluorinated organic acids with carbon chain lengths of C₆–C₁₂ were selected as analytes. Effect of sample pH value, effect of type and elution solvent volume, addition of indifferent salt and ion pair reagent have been studied during the optimization. The results show that the extraction efficiency depends on analyte carbon chain length and reaches values from 75 to 110% for C₆–C₈ and 55 to 95% for C₉–C₁₂ acids. The overall increase in extraction efficiency was more pronounced for acids with shorter chain length (for C₆ up to ten times), whereas for long chain acids the improvement was only moderate.

Keywords

Optimization, solid phase extraction, HLB, perfluorinated organic acids

Obsah:

1. Úvod.....	-7-
2. Teoretická část	-8-
2.1. Optimalizace	-8-
2.2. Extrakce.....	-8-
2.3. Extrakční metody	-9-
2.3.1.Extrakce tuhé látky kapalinou.....	-9-
2.3.2.Extrakce plynem.....	-11-
2.3.3.Extrakce kapaliny kapalinou(LLE)	-12-
2.3.4.SPE(extrakce tuhé fáze).....	-12-
2.4. Perfluorované organické látky	-16-
3. Experimentální část.....	-18-
3.1. Chemikálie	-18-
3.2. Použitý materiál a zařízení.....	-18-
3.3. Postup práce	-18-
3.3.1.Příprava roztoků kyseliny	-18-
3.3.2.Postup SPE.....	-19-
3.3.3.Derivatizace roztoků	-19-
3.3.4.GC-MS analýza.....	-20-
4. Výsledky a diskuze	-21-
4.1. Kalibrační závislosti.....	-22-
4.2. Výběh tuhé fáze	-22-
4.3. Optimalizace pH.....	-23-
4.4. Druha objemu činidla	-24-
4.5. Přídavek NaCl	-24-
4.6. Přídavek tetrabutylamoniumbromidu.....	-25-
4.7. Přídavek NaCl a TBABr	-26-
5. Shrnutí.....	-27-
6. Použitá literatura	-28-

Použitésymboly

ACN	Acetonitril
ASE	Acceleratedsolventextraction,zrychlenáextra kcerozpoušt ědly
FID	Flameionizationdetector,plamenov ěioniza čnídetektor
GC-MS	Plynováchromatografieshmotnostnídetekcí
IBCF	Isobutylchloroformát
LLE	Liquidliquidextraction,extrakcezkapalinyd okapaliny
MASE	Microwave-assistedsolventextraction,extrakc esmikrovlnnýmoh řevem
MeOH	Methanol
PFAS	Perfluorinatedalkylatedsubstances,perfluoro vanéalkylovanélátky
PFCAs	Perfluorinatedcarboxylicacids,perfluorovan ékarboxylovékyseliny
PFDA	Perfluorodecanoicacid,kyselinaperfluordekano vá
PFD _o A	Perfluordodecanoicacid,kyselinaperfluordod ekanová
PFH _p A	Perfluorheptanoicacid,kyselinaperfluorhept anová
PFH _x A	Perfluorhexanoicacid,kyselinaperfluorhexan ová
PFNA	Perfluornonanoicacid,kyselinaperfluornonano vá
PFOA	Perfluorooctanoicacid,kyselinaperfluoroktano vá
PFOS	PerfluorooctaneSulfonate,perfluoroktansulfon át
PFS	Perfluoralkylsulfonates,perfluoroalkylsulfon áty
PFSA	Perfluoralkylsulfonamides,perfluoralkylsulf onamidy
PFUnA	Perfluorundecanoicacid,kyselinaperfluorund ekanová
SAX	Stronganionexchanger,
SCX	Strongcationexchanger,
SFE	Supercriticalfluidextraction,extrakcenadkri tickoutekutinou
SPE	Solidphaseextraction,extrakcetuhoufází
TBABr	Tetrabutylamoniumbromid

1. Úvod

Perfluoralkyl karboxylové kyseliny, patří do značně široké skupiny perfluorovaných sloučenin, využívaných již od padesátých let 20. století, a to nejen v průmyslových, ale i ve spotřebních výrobcích.

Jsou to zároveň i polutanty, které zatím nemají zákonem vymezené limitní koncentrace. Poslední výzkumy prokazují, že se tyto sloučeniny vyskytují ve všech oblastech životního prostředí. Vzhledem k narůstajícímu počtu studií o vlastnostech těchto látek je jasné, že sledování jejich výskytu bude stále věnována značná pozornost.

Jejich koncentrace ve vodách se pohybují v řádu ng/L a proto je jejich monitorování a stanovení standardními metodami značně obtížné nebo finančně náročné (např. HPLC s dvojitou hmotnostní detekcí).

Cílem této práce je proto optimalizovat účinnost SPE prekoncentrace pro stanovení těchto kyselin na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí a umožnit tak jednoduchou, finančně méně náročnou aplikaci metody pro záchyt perfluorovaných kyselých zvodných vzorků.

2. Teoretická část

2.1. Optimalizace

Optimalizace experimentu je proces, při kterém je hlavním cílem upravit jeho podmínky tak, aby bylo dosaženo maxima resp. minima v jeho výsledcích, při zvažování všech vedlejších podmínek. V praxi jsou možné dva postupy. První využívá složitých matematicko-statistických postupů, které umožní najednou modifikovat více proměnných a tím snížit počet nezbytných měření. Při druhém způsobu se postupně mění vždy jen jedna proměnná při konstantnosti ostatních a hledá se jejich optimum. Pro poměrnou složitost prvního způsobu byltéto práci zvolendruhý, jednodušší postup.

2.2. Extrakce

Extrakce je separační proces, probíhající mezi dvěma fázemi, které jsou vzájemně nemísitelné. Fáze mohou být různého skupenství. Separované látky se mezi fázemi rozdělují na základě různých rozdělovacích koeficientů protyto fáze. Se zvyšujícím se rozdílem mezi rozdělovacími koeficienty roste i kvalita vzájemné separace. Využití nachází v selektivním oddělení analytu od ostatních složek nebo v odstranění rušících složek od analytu. Další výhodou je zakoncentrování analytu do menšího objemu extrakčního činidla, ke kterému častodochází.

Látka se rozdělí mezi 2 heterogenní fáze podle Gibbsova zákona fáze:

$$f + v = s + 2$$

kde f je počet fází, s počet složek v systému a v počet stupňů volnosti.

Pokud uvedeme modelový příklad extrakce sedmi fázemi, se zanedbáním plynné fáze a pokud rozdělujeme jednu složku za konstantního tlaku a teploty, systém budeme mít právě jeden stupeň volnosti [1]. Pokud určíme koncentraci analytu v jedné fázi, získáme i hodnotu v druhé fázi.

Rozdělení látky mezi dvě fáze bylo popsáno Nernstovým zákonem. Ten říká, že pokud se látka dělí mezi dvě nemísitelné fáze, pak je při konstantním tlaku a teplotě rovnovážný poměr koncentrací látky v obou fázích konstantní (molekulová hmotnost je stejná v obou fázích).

Tento fakt popisuje distribuční koeficient (koncentrační):

$$K'_{D,X} = \frac{[X]_{org.}}{[X]_{aq.}}$$

kde $K'_{D,X}$ je koncentrační distribuční koeficient, $[X]_{org.}$ relativní koncentrace analytu v organické fázi a $[X]_{aq.}$ je relativní koncentrace ve vodné fázi.

2.3. Extrakční metody

2.3.1. Extrakce tuhé látky kapalinou

Tímto způsobem se vzorek tuhého materiálu vyextrahuje do vhodného rozpouštědla. Vzhledem k nemožnosti upravit přítomné složky tak, aby se potlačila nebo podpořila extrakce, jedinečně selektivní závislé pouze na dvojici rozpouštědlo–vzorek [2]. Provedení může být jednorázové – vsádkové nebo kontinuální – s použitím extraktoru. Extrakce spoužitím Soxhletova extraktoru je relativně jednoduchá a nevyžaduje speciální laboratorní vybavení. Nevýhodou je však velmi dlouhá doba extrakce a velká spotřeba rozpouštědel. Z těchto důvodů se začaly používat automatické extraktory a vyvíjet nové metody využívající vysoké teploty a tlaku, jako je například zrychlená extrakce rozpouštědly (ASE) nebo superkritická fluidní extrakce (SFE). Dalším způsobem, jak podpořit extrakci, je využití mikrovlnného ohřevu rozpouštědla (MASE) nebo ultrazvuku, kdy se vzorek umístí do ultrazvukové lázně, případně se přidá do něj vložka ultrazvuková sonda.

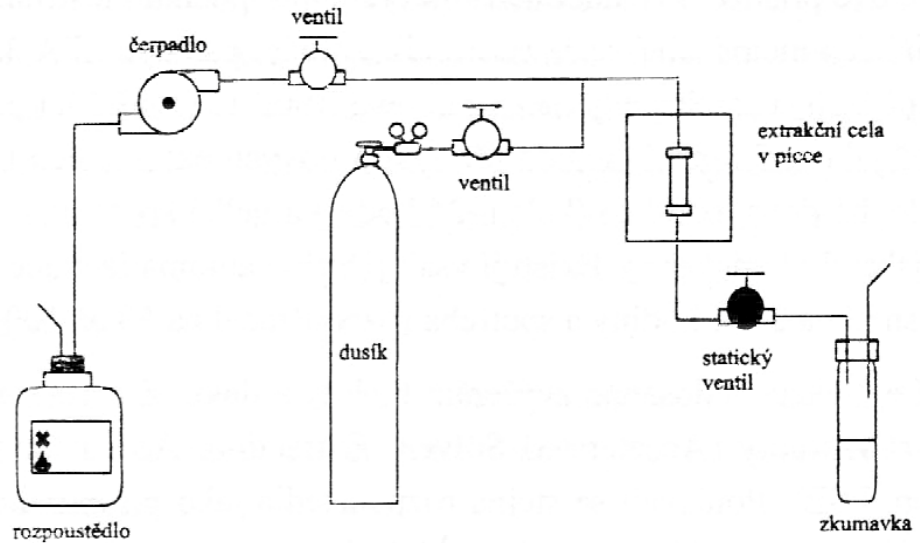
Metoda se využívá pro analýzy vzorků rostlinných materiálů, pŕůd, kalů i anorganických látek (loužení).

Zrychlená extrakce rozpouštědly (ASE)

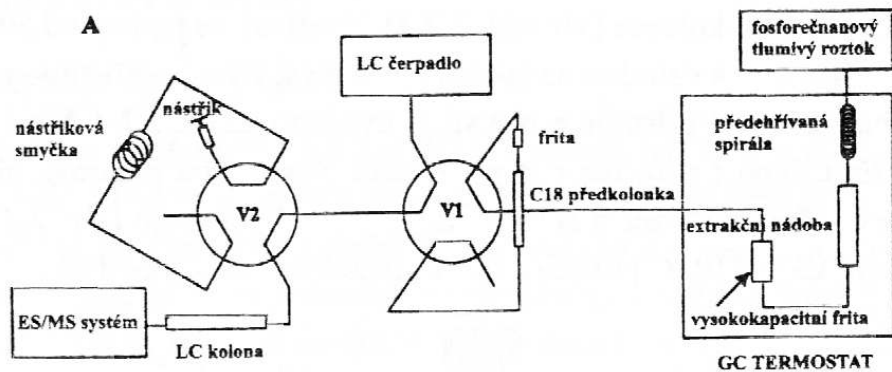
Technika podobná extrakci v Soxhletově extraktoru, ale využívající zvýšené teploty (60–200 °C) a tlaku od 5 do 20 MPa. Touto změnou umožní provést extrakci v krátké době a s malým množstvím stejného rozpouštědla.

Na vzorek umístěný v extrakční cele v termostatu se provádí pod tlakem rozpouštědlo snížkým bodem varu a extrakt je možno jímát například ve zkumavce (obr. 1.) nebo SPE kolonce [2].

Díky vyšší teplotě vzroste rozpustnost analytu v rozpouštědle a zvýšený tlak zabezpečí kapalně skupenství rozpouštědla. Další výhodou mimo výše popsané je také možnost automatizace, kdy je možno ASE spojit například s HPLC (viz obr. 2).



Obrázek1–Příklad aparatury pro zrychlenou extrakci rozpouštědly [2].



Obrázek2–Příklad spojení zrychlené extrakce rozpouštědly kapalinovou chromatografií [2].

Superkritická fluidní extrakce (SFE)

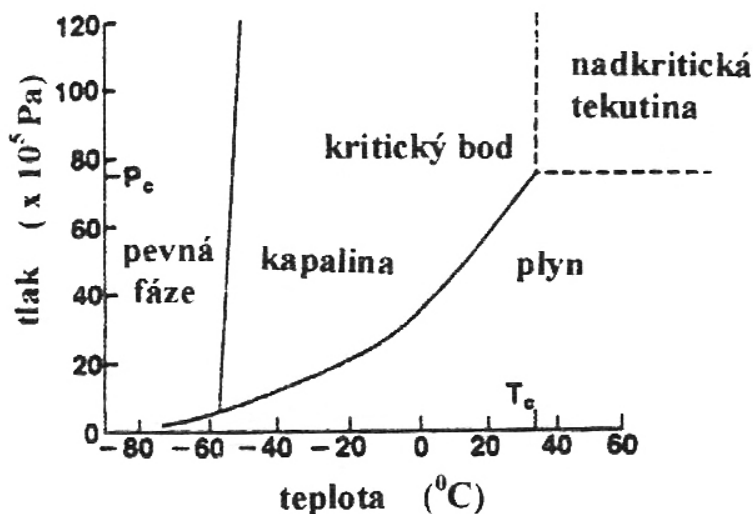
Další z speciálních variant je extrakce tuhých látek kapalinou, která místo kapaliny využívá nadkritickou tekutinu.

Tento zvláštní skupenský stav spojuje vlastnosti kapalin (hustota) a plynů (viskozita) vznikne za určitých tlaků nebo teplot nad jeho kritickou teplotu a zároveň tlakem nad hodnotu jeho kritického tlaku [2].

Tyto vlastnosti se mohou spojit se tlakem a teplotou viz obr. 3. Nejčastěji používaný je CO_2 díky snadno dosažitelným hodnotám kritických veličin ($T_k = 31,3^\circ\text{C}$, $p_k = 738\text{ kPa}$) a jeho vlastnostem: nehořlavý, netoxický, lze snadno oddělit odpařením a je kompatibilní s běžně používanými chromatografickými detektory (FID, UV). CO_2 je nepolární, proto se využívá k extrakci nepolárních látek, jeho polaritu však lze zvýšit pomocí modifikátorů jako je methanol, acetonitril nebo voda.

Hlavními výhodami metody jsou velká extrakční účinnost a krátká doba extrakce.

Nevýhodou je malý výběr modifikátorů KCO_2 , vysoká pořizovací cena a obtížná optimalizace.



Obrázek3–Fázovýdiagramoxiduuhličitého[2].

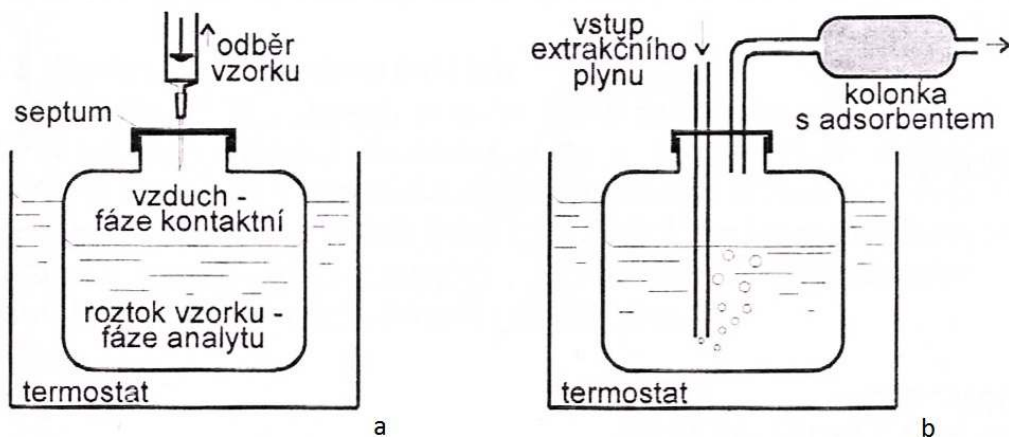
2.3.2. Extrakceplynem

Využívá schopnost tekavých analytů přecházet do plynné fáze nadroztokem, které se po ustavení rovnováhy odebere k dalšímu stanovení. Tato metoda se využívá především pro stanovení tekavých organických látek ve vodách.

V praxi jsou možná dvě provedení: jednoduché statické a účinnější dynamické.

U statického provedení je roztok vzorku zahříván vodní lázní, dokud nedojde k ustavení rozdělovací rovnováhy mezi kapalným vzorkem a plynnou fází nad ním, která je pak jednorázově použita k analýze (headspace analýza).

Při dynamickém způsobu provedení roztokem vzorku probublává plyn a vyextrahované organické látky jsou zachyceny na tuhém sorbentu (silikagel, Al_2O_3 , polymery, atd.) [3]. Analyt, který je zachycen v tomto sorbentu, může být poté uvolněn termickou desorpcí nebo extrakcí rozpouštědlem.



Obrázek 4–Příklad aparatury pro extrakci plynem (a–statická, b–dynamická provedení) [3].

2.3.3. Extrakce kapaliny kapalinou (LLE)

Tento typ extrakce stále patří mezi důležitější separační metody, protože umožňuje rychlé, jednoduché a selektivní dělení různých látek v téměř neomezených koncentracích [2].

Základní pravidlo pro účinnou extrakci je najít 2 kapaliny různé polarity, které spolu nereagují a rozpustnost extrahované látky v kapalině, z níž ji chceme extrahovat, je o hodně menší, než v kapalině, do které ji chceme převést. Ve většině případů se tedy převádí analyt z vodného roztoku do organického rozpouštědla, které se s ním nemísí, takže se vytvoří dvě zřetelně ohraničené vrstvy.

Samotný proces provedeme buď manuálně, vytřepáváním v dělicí nálevce nebo kontinuálně v extraktoru.

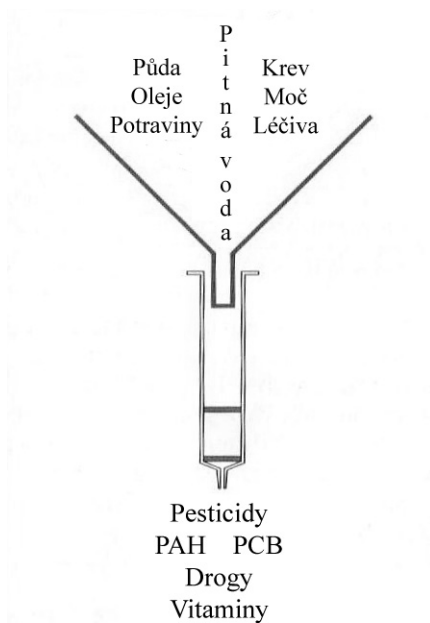
Extrakce analytů z vodných roztoků je důležitou základní operací v organické laboratoři a využití nachází při stanovení netěkavých organických látek a těžkých kovů, ty je však nutné převést na cheláty, jinak by extrakce neproběhla. Intenzivní zbarvení některých komplexů kovů je výhodné pro spektrometrické stanovení.

2.3.4. SPE (extrakce tuhou fází)

Je relativně nová, jednoduchá metoda, při které dojde k rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je tuhá. Do tuhé fáze přechází analyt z plynné nebo kapalné fáze [2]. Ostatní látky ze vzorku se adsorbují velmi málo nebo vůbec. Princip sorpce je obdobný jako u kapalinové chromatografie.

Metoda je často využívána k odběru a úpravě vzorků v spojení s separačními metodami. Umožňuje vzorkovat velké objemy a zároveň selektivně koncentruje vybraný analyt, čímž lze zjednodušit složení vzorku.

Díky stálosti většiny nabídek komerčních produktů (kolonek, disků...) a výhodám, které SPE poskytuje, jako je rychlost, selektivita, reprodukovatelnost, citlivost a možnost automatizace, se ve spojení s plynovou nebo kapalinovou chromatografií využívá v analýze složek životního prostředí, v farmacii, klinické praxi, toxikologii nebo v potravinářství.



Obrázek 5 – Schematická ukázkavýžití extrakce na tuhé fázi [4].

Celý proces SPE může být rozdělen na několik dílčích kroků:

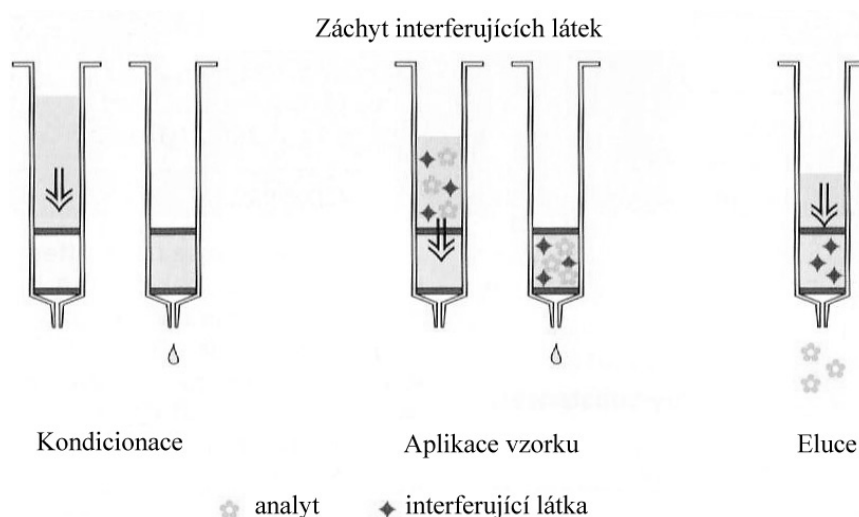
- Prvním a nejdůležitějším krokem je samotná extrakce výtěru vhodného složení tuhé fáze (sorbentu).
- Poté následuje kondicionace – kolonka se propláchne předepsaným roztokem, který jsou určeny složením tuhé fáze a poté roztokem podobným vzorku, tím se umožní samotný zachycení analytu.
- Dalším krokem je samotné nadávkování vzorku, při kterém dojde ke specifickým interakcím mezi tuhou fází kolony a látkami ve vzorku. Hledaný analyt se sorbuje, zatímco matrice projde bez zadržování.
- Následně se kolonka vyčistí zbytků matrice.
- Předposledním krokem je sušení, které se provádí buď inertním plynem (N_2) nebo vzduchem.
- Desorpce je dalším a posledním krokem, při kterém dojde ke uvolnění zachyceného analytu. Aby bylo dosaženo co nejvyššího zkoncentrování, vzorek se desorbuje do co nejmenšího objemu.

Desorpce provedena v několika úsoby:

1. použitím rozpouštědla – rychlý, levný a snadno proveditelný způsob dovolující více analýz jednoho vzorku, protože extrakt může být rozdělen na více menších dílů. Mezi nevýhody patří zatížení životního prostředí rozpouštědly, horší mez detekce vlivem na ředění vzorku, nesnadná automatizace a hlavně nutnost optimalizace výběru rozpouštědla podle vzorku [2].

2. termicky – při tomto postupu je využíváno uvolnění zachyceného analytu do proudu plynné fáze zvýšením teploty, tím odpadá použití rozpouštědla a otvírá se možnost velkého výběru sorbentů, získání nízké hodnoty mez detekce a možnost automatizace. Nevýhodou je vysoká cena zařízení a použití jednoho vzorku pouze na jednu analýzu.

Tepelnou desorpce získáme určitý objem plynu obsahující analyt. Pro řízení nástřiku do GC je ale tento objem příliš velký, proto je tepelná desorpce vždy spojena se zachycením analytu do malého objemu [2].



Obrázek 6 – Ukázka dalšího využití extrakce na tuhé fázi – záchyt interferujících látek v matici vzorku [4].

Typy tuhých fází

Před volbou tuhé fáze je třeba zjistit co nejvíce informací o vzorku a na základě těchto informací potom vybrat vhodný typ fáze a velikost kolonky.

Různé vlastnosti určující mechanismus sorpce na tuhé fázi (adsorpce, rozpouštění, afinita, iontová výměna nebo molekulové rozpoznávání) dovolují různé experimentální uspořádání (terče, kolonky, vlákna), čímž se metoda stává velmi variabilní [2].

Reverzní fáze

Reverzní fáze se vyznačuje nepolární stacionární fází umožňující v polární matici vzorku zachytit středně nepolární analyt. Jako pevné fáze se využívají především alkyl nebo arylkřemičitany. Organické analyty ve vzorcích se v kolonce zachytávají díky přitažlivým silám a funkčním skupinám na povrchu pevné fáze. Tyto nepolární přitažlivé síly jsou nazývány vanderWaalsovy nebo disperzní. K elucisírobovaného analytu se použije nepolární rozpouštědlo, které naruší vzájemné vazby mezi analytem a fází [5].

Zástupci této skupiny jsou například:

- **C18** – oktadecyl vázaný na křemíkový atom silikagelu, viz obr. 7a.
- **HLB** – je hydrofilně modifikovaný polymer styrenu, používaný pro zachytí široké škály látek z vodného prostředí. Díky hydrofilní úpravě fáze umožňuje zachytávat i polární sloučeniny.

V praxi se využívá stovky dalších typů pro zachytí různých látek. Výše uvedené příklady jsou vybrány z tohoto úvodu, že C18 je typický představitel reverzní fáze a HLB kolon bylo používáno pro optimalizaci.

Normální fáze

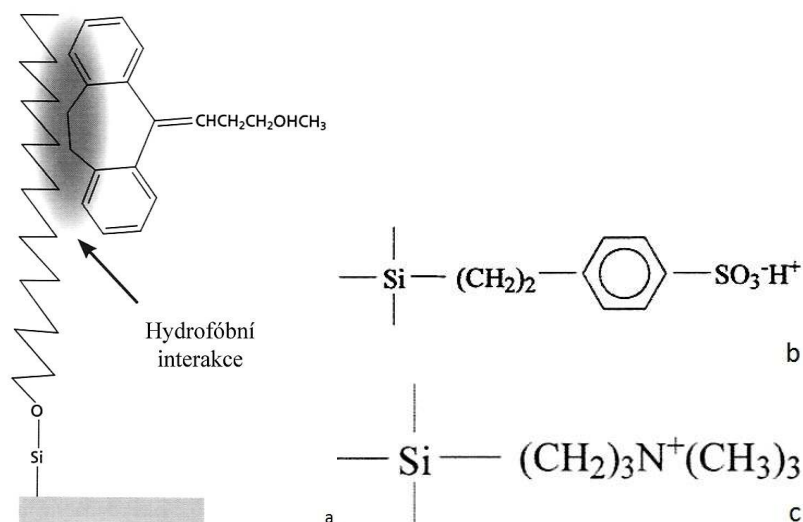
Normální fáze je polární stacionární fáze umožňující zachytí polárního analytu v nepolární matici. Podmínkou adsorpce analytu na pevnou fázi je vzájemná interakce jejich polárních skupin, ta zahrnuje vodíkové vazby, π - π interakce, dipól-dipól interakce a dipól indukovaný dipól. K elucisí analytu dojde pokud je předán rozpouštědlo, které je více polární než původní matrice vzorku [5].

Iontově výměnné fáze

Iontově výměnné tuhé fáze jsou používány pro sloučeniny, jejichž roztoky obsahují nabitě skupiny. Zachytí analytu se uskutečňuje především díky vzájemným elektrostatickým interakcím mezi nabitými funkčními skupinami analytu a tuhé fáze. Podle náboje skupiny se dělí na kationnebo anion-výměnné.

- **SAX** (strong anion exchanger) – polymerně vázaný kvartérní amin (obr. 7c.), běžně používaný k zachytí aniontů, nukleových kyselin, nukleotidů a organických kyselin.
- **SCX** (strong cation exchanger) – na silikagel vázaná benzensulfonová kyselina (obr. 7b.), využití nachází při zachytí kationických antibiotik, herbicidů a dalších organických látek.

Iontově výměnné fáze zahrnují i další typy včetně slabých analogů k SAX a SCX označením W (weak).



Obrázek 7 – Příklad fáze používaných v SPE: a) C-18 reverzní fáze a) příklad její interakce s analytem [5], b) silný kationtovým činičem (SCX), c) silný aniontovým činičem (SAX).

2.4. Perfluorované organické látky

PFAS (polyfluorované alkylované látky) je různorodá skupina chemikálií vyznačující se různě dlouhým hydrofobním polyfluorovaným řetězcem (převážně C₄ až C₁₆), připojeném obvykle k hydrofilní části [6]. Hydrofobní část může být částečně nebo zcela fluorovaná. V druhém případě, při úplné náhradě vodíku za atomy fluoru, jsou sloučeniny také nazývány perfluorované [7].

PFAS lze rozdělit do tří skupin: perfluorované karboxylové kyseliny (PFCAs), perfluoralkyl sulfonáty (PFS) a perfluoralkyl sulfonamidy (PFSA). Nejvíce studovanými zástupci jsou perfluoroktanová kyselina (PFOA) a perfluoroktansulfonát (PFOS) [6].

Díky vysoce pevné kovalentní vazbě mezi uhlíkem a fluorem mají tyto molekuly jedinečné chemické, fyzikální a biologické vlastnosti.

Tyto vlastnosti je činí odolné vůči hydrolyze, fotolýze a mikrobiální degradaci.

Mnoho studií je označuje za PBT (perzistentní, bioakumulativní a toxické) a podle některých existuje statisticky významná souvislost mezi expozicí PFOS a rakovinou močového měchýře [6]. Vzhledem k tomu, že tyto sloučeniny používají, jsou spolu s odpadními produkty nejčastěji vypouštěny do vody a tím dochází k jejich hromadění téměř ve všech povrchových vodách. Díky vysoké rozpustnosti perfluorovaných organických kyselin je voda nejvýznamnějším médiem pro distribuci těchto polutantů do ostatních složek životního prostředí [8].

Perfluorované organické látky jsou již od roku 1950 využívány jako povrchově aktivní látky, kvýrobě polymerů, také se využívají v celé řadě spotřebních a průmyslových produktů pro své jedinečné vlastnosti, jako vynikající tepelnou a chemickou stálost a schopnosti odpuzovat vodu a oleje [9]. Soli kyseliny jsou využívány kvýrobě tetrafluorových nádobí. Dále se využívají jako změkčovač v olejích, v nátěrových hmotách a leštidlech. Ve fotografické průmyslu jsou používány k pokovování a také k výrobě polovodičů.

Již od roku 1960 byly tyto sloučeniny považovány za potenciálně znečišťující látky, ale nebyla jim věnována velká pozornost a byly dále masově používány [9]. V roce 2001 byl prokázán jejich výskyt v lidské krvi a v zorničích zvířat. Další studie prokázaly, že PFOA a PFOS jsou nejčastěji se vyskytujícími zástupci této skupiny látek v životním prostředí, které byly nalezeny v mateřském mléce [10,11,12].

Ke stanovení těchto polutantů ve vodě se nejčastěji využívá HPLC s několika násobnou hmotnostní detekcí. Pro koncentrování se velmi často využívá LLE a SPE.

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie

Použitými chemikáliemi byly: kyselina perfluorheptanová (PFHpA, <95 %), perfluoroktanová (PFOA, 95 %), perfluornonanová (PFNA, 97 %), perfluordekanová (PFDA, 98 %), perfluorundekanová (PFUnA, 95 %), perfluordodekanová (PFDoA, 95 %), tetrabutylamoniumbromid (čistý, >98 %), pyridin (99 %), isobutylchloroformát (98 %), všechny od Aldrich (Steinheim, Německo).

Kyselina perfluorhexanová (PFHxA, <95 %), acetonitril (p.a. >99,5 %), n-hexan (>95 %), byly dodány firmou Fluka (Steinheim, Německo).

Methanol (p.a., Lachema, ČR), NaCl (p.a. Lach-Ner, Neratovice, ČR), isobutylalkohol (p.a.), H₃PO₄ (p.a., Penta, Chrudim, ČR) byly použity tak, jak byly dodány. Deionizovaná voda byla odebrána ze zařízení Milli-Q Plus (Millipore) a její kvalita odpovídá destilované vodě.

3.2. Použitý materiál a zařízení

K koncentraci byly použity SPEHLB a SAX kolony, obě SupelTM-Select (Supelco), vakuová odsávací souprava pro SPE (Visiprep, Supelco), blokový termostat (Start, SBH 130DC), automatické mikropipety, třepačka (Vortexgenie 2, Scientific Industries) a ultrazvuková lázeň (Sonorex RK100).

Roztoky byly analyzovány na plynovém chromatografu GC-17A s použitím GC MS-QP5050A detektoru (Shimadzu) a kolony DB-5 MS (Agilent Technologies), délky 30 m s vnitřním průměrem 0,25 mm a 0,25 μm filmem. Jako nosného plynu bylo využito hélia (99,999%, Linde).

3.3. Postup práce

3.3.1. Příprava roztoků kyseliny

Standardní roztoky

Byly připraveny standardní roztoky sedmi perfluorovaných kyselin: kyseliny perfluorhexanové (PFHxA), kyseliny perfluorheptanové (PFHpA), kyseliny perfluoroktanové (PFOA), kyseliny perfluornonanové (PFNA), kyseliny perfluordekanové (PFDA) a kyseliny perfluorundekanové (PFUnA) o koncentraci 10 000 μg/mL a kyseliny perfluordodekanové (PFDoA) o koncentraci 5000 μg/mL. Byly naváženy přesněmnožství jednotlivých kyselin kvantitativně převedeno do 5 mL polypropylenových odměrných baněk a doplněno porýskem acetonitrilem [13].

Příprava zásobního roztoku směsi kyselin

Byl připraven 1 L zásobního roztoku perfluorovaných kyselin (C_6-C_{12}) o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bylo odměřeno 1000 mL deionizované vody a přelito do zásobní láhve. Poté bylo postupně napipetováno 100 μL standardního roztoku všech kyselin. Vzhledem k velmi malému objemu pipetovaných roztoků (zanedbatelný při řířůstek objemu) nebyl zásobní roztok připravován přímo do černé baňky z důvodu zamezení kontaktu se sklem a špatné manipulace.

Příprava kalibrační řady

Kalibrační řada byla připravena ze zásobních roztoků kyselin (C_6-C_{12}) o koncentracích 1000, 200, 50 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ze zásobních roztoků jednotlivých kyselin bylo připraveno 600 μL roztoku směsi kyselin o jednotné koncentraci 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Z tohoto roztoku bylo dále odebráno 100 μL a přidáno 400 μL deionizované vody pro přípravu výsledné koncentrace 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Obdobně bylo postupováno při přípravě dalších koncentrací kalibrační řady.

3.3.2. Postup SPE

K přípravě byly použity 6 mL HLB kolony 200 mg náplně adsorbentu od firmy Supelco. Kolona byla nejprve kondicionována 6 mL methanolu sprůtokem 1 kapka/s a poté 10 mL deionizované vody se stejným průtokem. Roztok standardů byl na kolonu přiváděn pod tlakem přímo ze zásobní láhve a jeho průtok byl přibližně 5 mL/min. Pro zefektivnění veškerého objemu kolony byla kolona prosávána vzduchem po dobu 30 minut. Následně eluce 4 mL methanolu probíhala sprůtokem 1 kapka/s do plastové 15 mL šroubovací zkumavky. Tento postup je modifikací postupu dle [14]. Následně byl eluát odpařen do sucha a rozpuštěn v 250 μL acetonitrilu, tudíž došlo k koncentrování analytů s faktorem 1000, ale z důvodu nutnosti provedení minimálně tří paralelních derivatizací (viz níže), kdy se používá objem 20 μL je prekoncentrační faktor celého postupu roven 100. Takto připravený roztok byl dále derivatizován a analyzován Mgr. Veronikou Dufkovou.

3.3.3. Derivatizace roztoků

Bylo připraveno reakční medium v polypropylenových vialkách. Postupně bylo pipetováno: 20 μL roztoku směsi kyselin v acetonitrilu (vzorku), 161 μL acetonitrilu, 4 μL pyridinu jako katalyzátoru reakce, 8 μL isobutylalkoholu jako pomocné látky a 10 μL isobutylchloroformátu (IBCF) jako činidla. Takto připravená směs byla po dobu 20 s promíchávána ultrazvukové lázní a poté ponechána cca 8 minut stát a reagovat. Poté bylo přidáno ještě 200 μL hexanu a následovalo protřepání na třepačce po dobu 1 minuty, kdy vznikl isobutylester přechod do hexanové fáze.

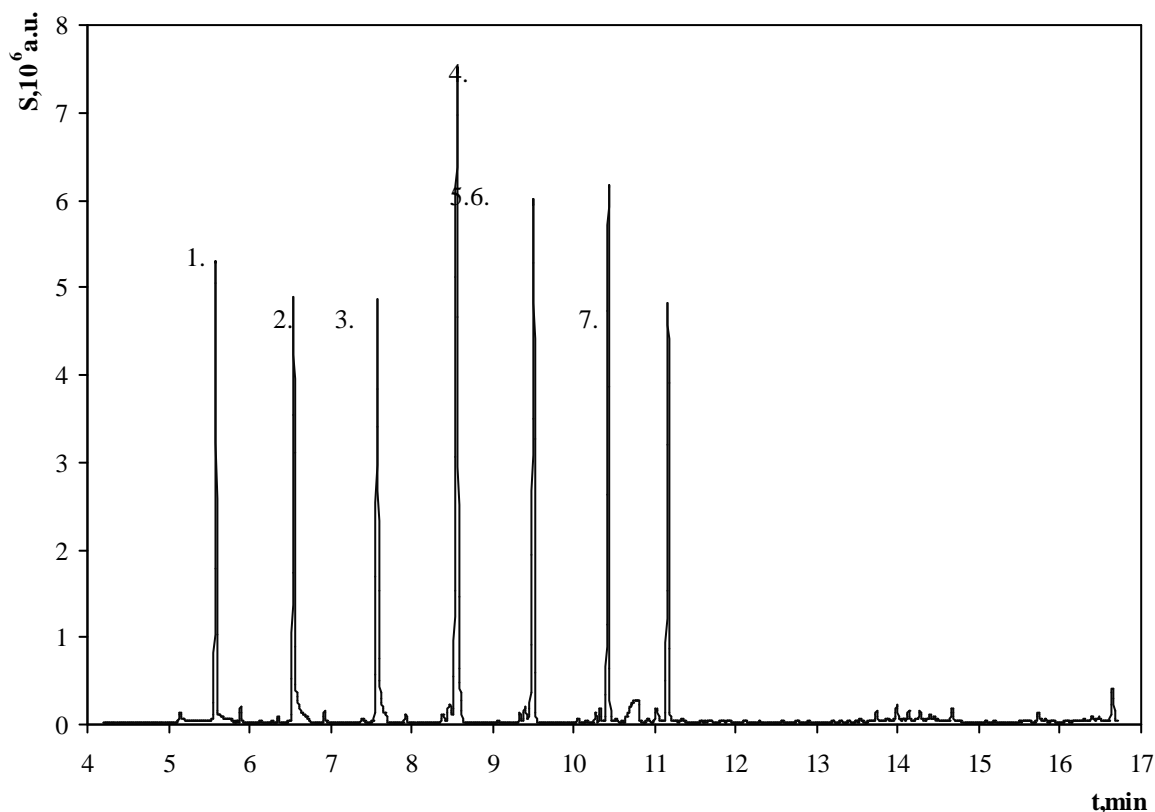
Km ěření byla využita pouze hexanová fáze, která byla od ebírána do ěisté PP vialky o objemu 300 μL smožností pevného uzav ření (crimpovací ví ěka), aby nedocházelo kvypa řováníhexanu[13,15].

3.3.4. GC-MSanalýza

Nástřik hexanové fáze po deprivatizaci roztoku o objemu 1 μL byl proveden ve splitless režimu p ři uzav řeném d ělícím ventilu po dobu 1 min, pak z ůstává po zbytek analýzy ventil otevřený. Teplota kolony byla udržována na po ěátku analýzy p ři 40 $^{\circ}\text{C}$ po dobu t ří minut, poté byla zvyšována teplota po 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na kone ěných 170 $^{\circ}\text{C}$ a na této hodnot ě op ět 3 minuty udržována. Pr ůtok byl 1 mL/min. Teplota injektoru byla nastavena na 250 $^{\circ}\text{C}$, teplota MS interface na 300 $^{\circ}\text{C}$. M ěřeno bylo v SIM módu, sledovány byly jednotlivé ionty o m/z: 69, 131, 169 a 181 odpovídající fragment ům $[\text{CF}_3]^+$, $[\text{C}_3\text{F}_5]^+$, $[\text{C}_3\text{F}_7]^+$, a $[\text{C}_4\text{F}_7]^+$ [15].

4. Výsledky diskuze

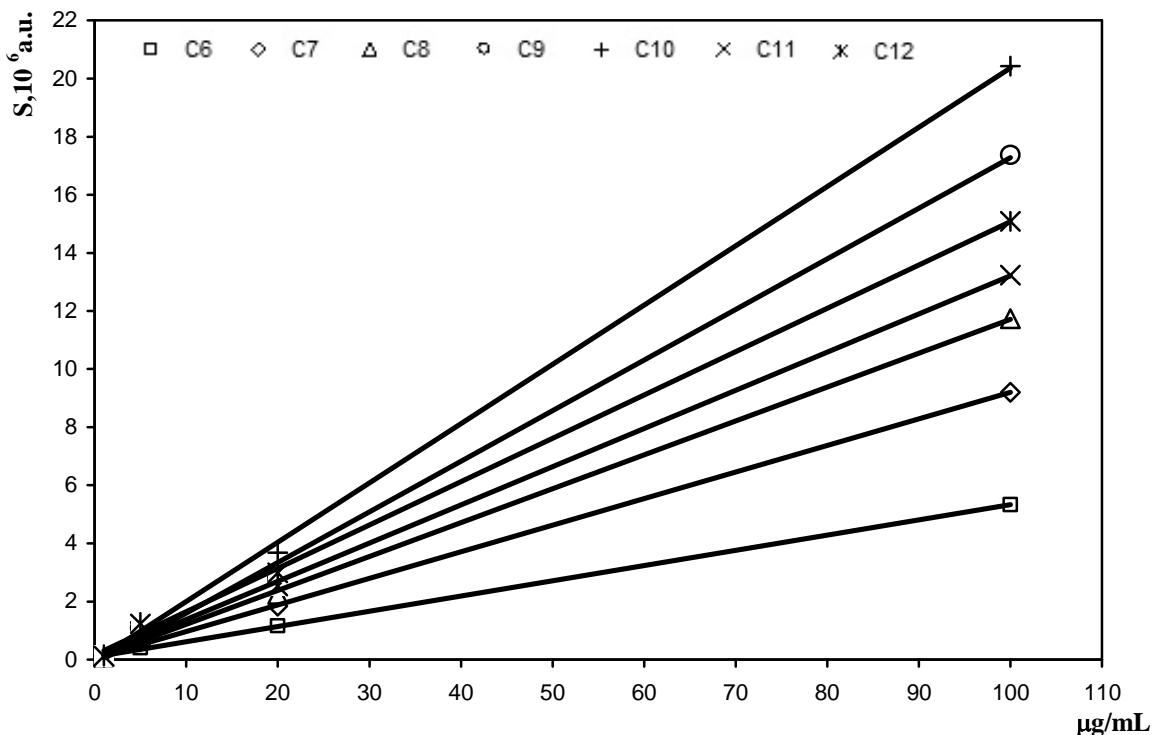
Na obrázku č. 8 je vidět chromatogram isobutylesterů s měšičkem kyseliny po derivatizaci jejich zásobního roztoku o koncentraci 1 µg/mL, ze kterého je patrné, že rozlišení jednotlivých kyselin je dostatečné. Retenční čas poslední kyseliny byl 11,125 min, ale analýza byla provedena až do 17 min z důvodu čištění kolony odnečistoty vyšším bodem varu.



Obrázek 8 – Chromatogram měšičkové kyseliny (1 µg/mL) po koncentraci na SPE, derivatizované na isobutylestery. Nástřik 1 µL, splitless mód (1 min), Teplota kolony 40°C (3 min), 10°C/m do 170°C (3 min). Průtok 1 mL/min. Teplota injektoru 250°C, teplota MS interface 300°C. SIM mód, fragmenty m/z: 69, 131, 169 a 181. Jednotlivé píky odpovídají isobutylesterům kyseliny: 1 – C₆, 2 – C₇, 3 – C₈, 4 – C₉, 5 – C₁₀, 6 – C₁₁, 7 – C₁₂.

4.1. Kalibrační závislosti

Byly provedeny kalibrační závislosti jednotlivých kyselin v rozsahu 1 – 100 $\mu\text{g/mL}$. Výsledné závislosti jsou zobrazeny v grafu č.1 a hodnoty koeficientů rovnic lineární regrese jsou uvedeny v tabulce č.1.



Graf 1 – Kalibrační závislosti jednotlivých kyselin v rozsahu 1–100 $\mu\text{g/mL}$.

	$A \cdot 10^{-3}$	$B \cdot 10^{-3}$	R^2
C ₆	52,45	90,84	0,9994
C ₇	91,50	51,35	0,9997
C ₈	116,58	52,63	0,9994
C ₉	174,17	-139,06	0,9977
C ₁₀	204,02	-35,79	0,9992
C ₁₁	131,52	65,57	0,9993
C ₁₂	149,11	162,56	0,9989

Tabulka 1 – Hodnoty koeficientů rovnic lineární regrese ($y = Ax + B$) a hodnoty korelačních koeficientů u jednotlivých kyselin.

4.2. Výběhová fáze

K optimalizaci byly vybrány dva různé typy kolony, SAX a HLB. Při počátečních analýzách se však ukázalo, že i přes všechny výrobce doporučené kroky při extrakci, docházelo u kolony SAX k tak malému zachytí analytu, že byl pro následnou integraci píků v chromatogramu.

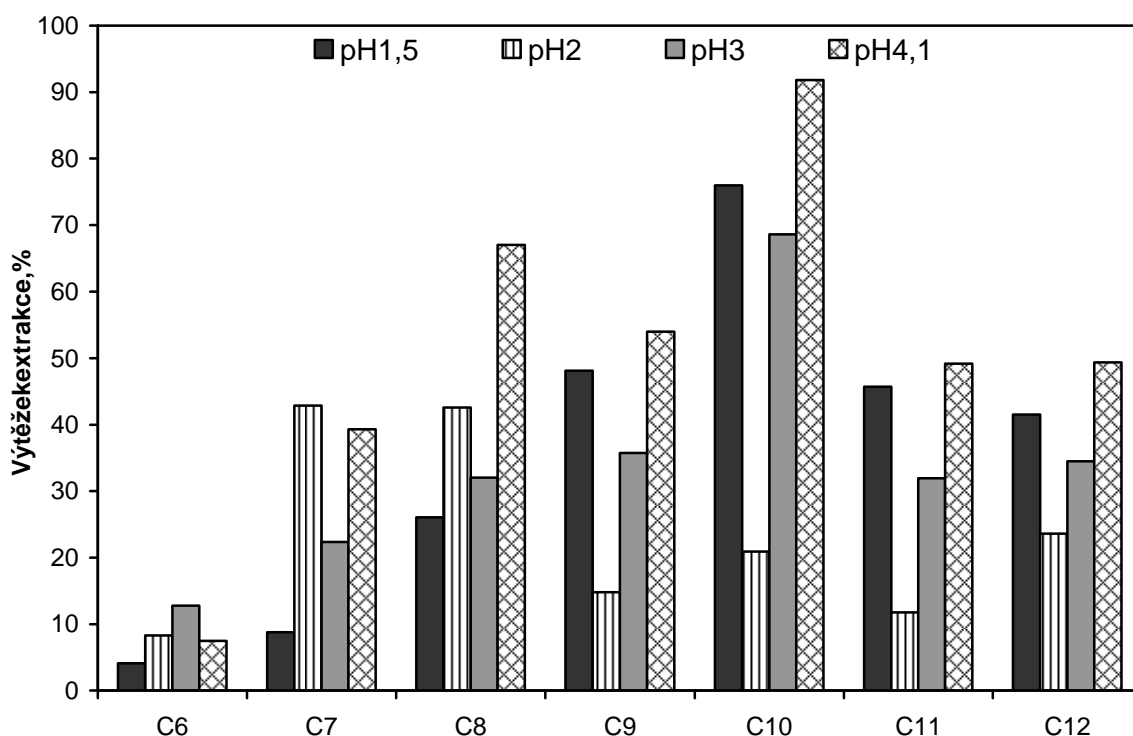
Z časových důvodů proto byly k optimalizaci použity pouze kolony HLB, jejichž počáteční výsledky byly řádově lepší.

4.3. Optimalizace pH

Prvním optimalizovaným parametrem bylo zvoleno pH vzorku. Byla připravena série čtyř roztoků standardů o koncentraci 1 µg/mL s různými hodnotami pH.

Do čtyřech zásobních lahví o objemu 250 mL se standardním roztokem směsi kyselin připraveném dle postupu 3.3.2., byla postupně přidávána H_3PO_4 tak, aby výsledná hodnota pH roztoků byla: 1,5; 2; a 3. Poslední roztok s hodnotou pH = 4,1 odpovídá deionizované vodě bez přidání kyseliny fosforečné.

Připravené roztoky byly zachytávány na HLB kolonkách (6 mL, 200 mg) podle postupu 3.3.4. Po převedení kyselin na jejich isobutylestery (dle 3.3.5.) byla provedena GC-MS analýza (dle 3.3.6.) a výsledek analýzy vyneseno do grafu. Procentuální výtěžek extrakce byl získán jako množství hledaných analytů, určené z plochy píků a kalibrační závislosti, vztažené k roztoku kalibrační řady odpovídající koncentraci (v tomto případě 100 µg/mL, viz koncentrační faktor 100 v bodě 3.3.2.). Tento vypočtený vztah bude použit i v dalších bodech optimalizace.



Graf 2 – Závislost výtěžku SPE extrakce perfluorovaných kyselin na pH vzorku.

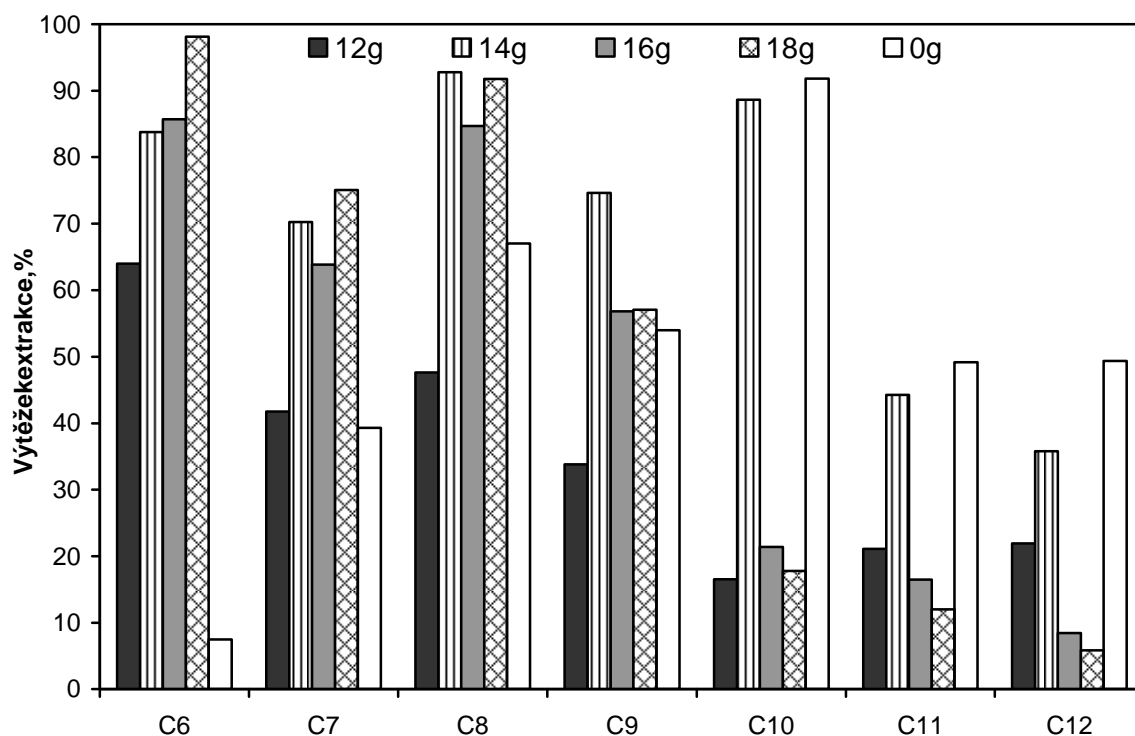
Grafické vyjádření (Graf 1) ukazuje, že výrazné snižování hodnoty pH nemá pozitivní vliv na průběh stanovení další extrakce budou prováděny bez úpravy pH.

4.4. Druha objemu elučního činidla

Dalším optimalizovaným parametrem byl druh elučního činidla. Testovány byly methanol a acetonitril. Výsledky pokusu prokázaly, že změna počátečního elučního činidla – methanolu za acetonitril nepřináší žádné výrazné zvýšení měřených hodnot. Dále byla vyzkoušena eluce s větším objemem ACN (8 mL). Ani tato změna nepřinesla zlepšení, a proto by dále používaný eluční objem byl 4 mL methanolu.

4.5. Přídavek NaCl

Je všeobecně známo, že extrakce lze ovlivnit iontovou silou roztoku vzorku (salting-out, vysolovací efekt). Byla proto připravena série čtyř roztoků standardů s různými přídavky NaCl. Do čtyřech 250 mL zásobních lahví se standardními roztoky směsi kyselin o koncentracích 1 µg/mL jednotlivých kyselin, bylo postupně přidáváno navážky: 12, 14, 16 a 18 g NaCl odpovídající koncentracím 48, 56, 64 a 72 g/L NaCl.



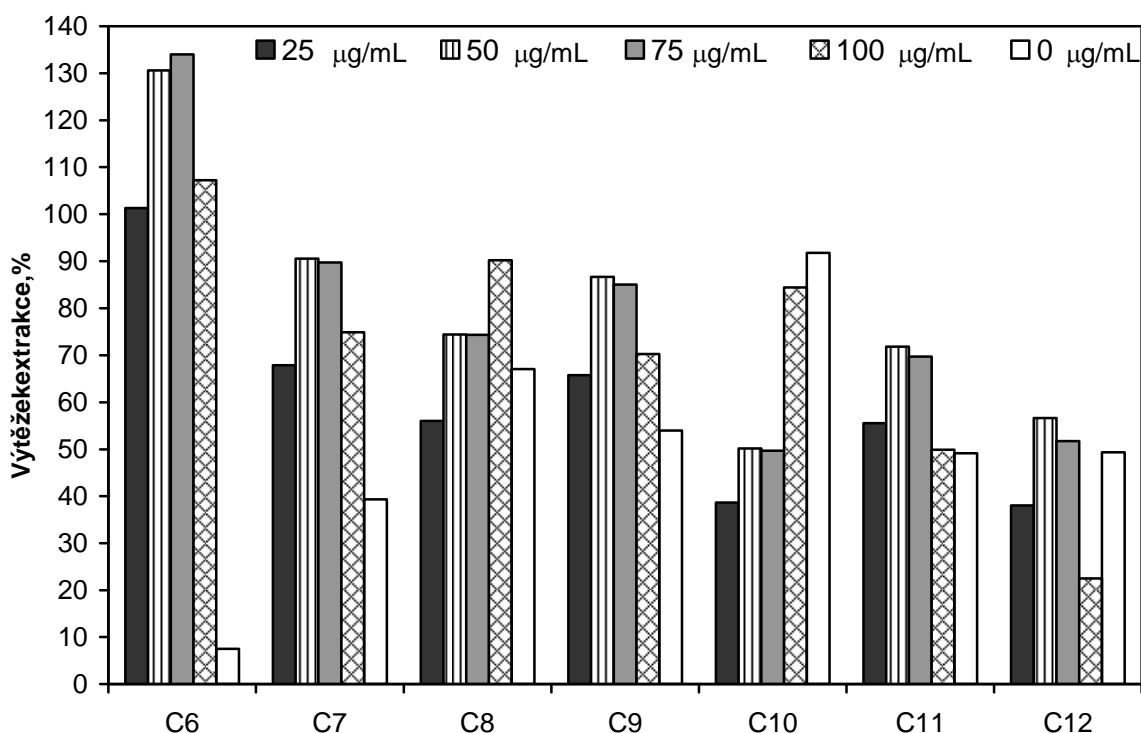
Graf 3 – Závislost výtěžku extrakce na přídavku NaCl ke vzorku, nulová hodnota je uvedena pro srovnání a představuje úvodní neupravený roztok pH=4,1.

Přídavek soli ke vzorku způsobil razantní nárůst výtěžku při extrakci u prvních čtyřech kyselin. U C₁₀–C₁₂ je patrný pokles oproti úvodním hodnotám. Po vyzkoušení různých hmotnostních přídavků bylo zjištěno, že optimální hodnota přídavku je 14 g (viz graf č. 2). Nevýhodou této optimalizace je vzniklý solný odparník, který se téměř nerozpouští v ACN před derivatizačním krokem. Vzniklá emulze soli v ACN pak znesnadňuje pipetaci, ale neovlivňuje samotnou derivatizaci.

4.6. Přídavek tetrabutylamoniumbromidu

Další možností jak ovlivnit extrakci, je přidání látky tvořící analytem iontový pár, v tomto případě by to byla látka TBABr. Přídavkem TBABr dojde ke změně typu extrakce na zachyt neutralně nabitého iontového páru kyselina-TBABr na reverzní fázi.

Byla připravena série čtyřroztoků standardů s různou koncentrací TBABr. Do čtyřech 250 mL zásobních lahví se standardními roztoky směsi kyselin o koncentracích 1 µg/mL jednotlivých kyselin byl postupně přidán tetrabutylamoniumbromid o navážkách: 6,25 mg (25 µg/mL), 12,5 mg (50 µg/mL), 18,75 mg (75 µg/mL) a 25 mg (100 µg/mL).



Graf 4 - Závislost výtěžku SPE extrakce na přidavku tetrabutylamoniumbromidu ke vzorku. Nulový přídavek představuje úvodní neupravený roztok pH=4,1.

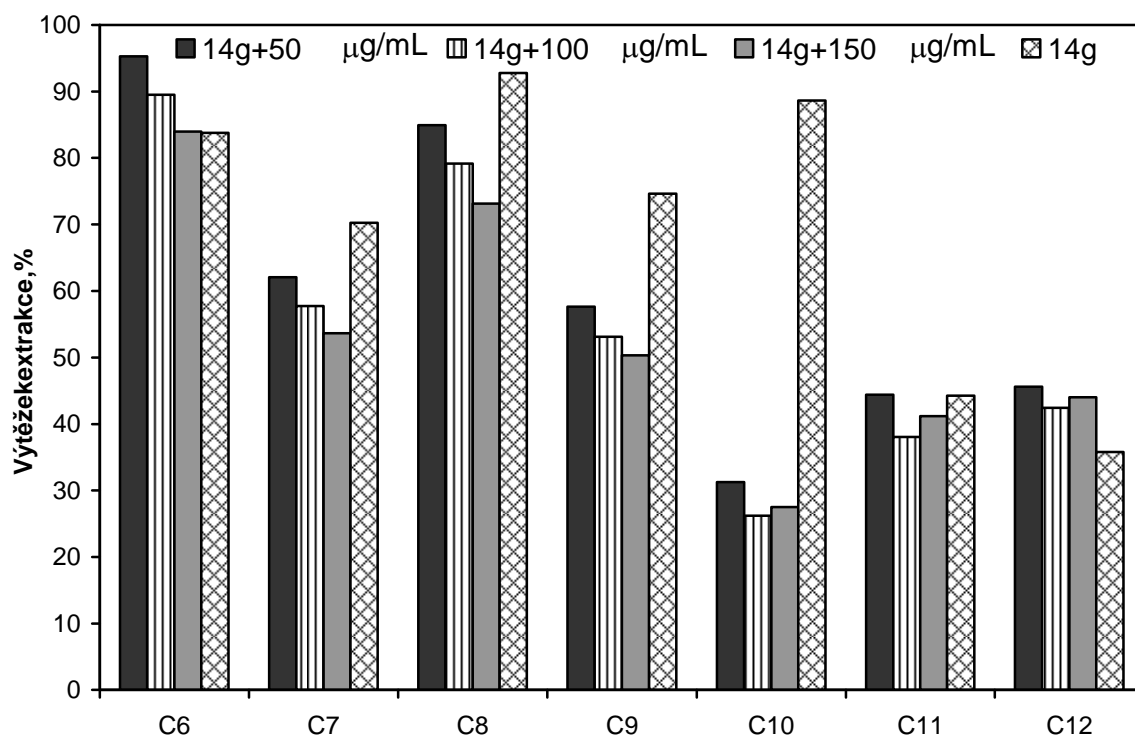
Z grafu č. 3 je patrné, že největší vzrůst signálu se projevil u přidavků 50 a 75 µg/mL, z nichž byla provyrovnanější výsledky v celém souboru vybraných koncentrací 50 µg/mL. Pro případ, že by šlo pouze o detekci perfluoroktanové kyseliny, je lepší zvolit přidavek 25 mg (100 µg/mL) TBABr, nebo v tomto případě výtěžek nad 90%.

Možná příčina řešení 100% výtěžku u PFHxA jako eluce interferentů při analýze. Jelikož jsou analýzy prováděné v SIM módu, tak interferent v chromatogramu není vidět, protože jeho možné množství jsou monitorovány. Může ale způsobit dočasnou změnu ionizační účinnosti iontového zdroje MS a tím pokles citlivosti plochy píku, kterým interferuje, v našem případě nárust plochy píku PFHxA. Při chemické ionizaci není tento efekt pozorován.

4.7. Přídavek NaCl a TBABr

Vzhledem k předchozím velmi dobrým výsledkům po jednotlivých přidávkách NaCl a TBABr byl posledním optimalizačním krokem přidávkou směsi NaCl a TBABr.

Byla připravená série tří roztoků standardů obsahující konstantní přidávek 14 g NaCl (56 g/mL) a různé koncentrace TBABr (50–150 $\mu\text{g/mL}$).



Graf 5 - Závislost výtěžku SPE extrakce na přidávkou směsi tetraabutylamoniumbromidu a NaCl ke vzorku.

Předpokládaný nárůst výtěžku při kombinaci obou látek (NaCl + TBABr) se pokusem nepotvrdil a výtěžky byly naopak nižší. Kvůli výše popsaným nevýhodám spojeným s přidávkou soli horším výsledkům bylo rozhodnuto užít pouze přidávku TBABr, který poskytoval výtěžky přes 70% i u kyselinsdelšími řetězci.

5. Shrnutí

Prvním krokem byla volba tuhé fáze. Na základě výsledků analýz byla vybrána HLB kolona pro řádově lepší výsledky.

Následně byla provedena série optimalizačních kroků u postupu [14] a navíc byly vyzkoušeny přísady NaCl a TBABr, změna pH, druh elučních činidel a jejich objemu.

Sledováním závislosti výtěžku extrakce na pH bylo zjištěno, že změna pH nemá pozitivní vliv na průběh stanovení, proto bylo dále pokračováno bez úpravy pH.

Dalším optimalizovaným parametrem byl druh elučního činidla. Změna průvodního eluentu – methanolu za ACN nepřinesla výrazné zlepšení ani při použití dvojnásobného objemu ACN. Pokračováno bylo proto se 4 mL methanolu.

Vzhledem k možnosti ovlivnit extrakci iontovou silou roztoku, byl vyzkoušen přísadek NaCl ke vzorku. Ztestovaného souboru čtyř přísadků byl vybrán přísadek 14 g, který poskytoval nejvyváženější výsledky (viz graf č. 2.). Tento optimalizační krok se však ukázal jako zcela ideální, díky tvorbě solného roztoku, ztěžujícího práci s roztokem.

Dalším krokem byl přísadek TBABr, který umožňuje zvětšit účinnost extrakce díky tvorbě iontového páru. Z grafu č. 3. je patrné, že nárust účinnosti oproti průvodnímu postupu se pohybuje od 20 do 80% u kyseliny kratším řetězcem a od 10 do 20% u kyseliny delším řetězcem. P přísadek TBABr lze proto volit podle druhů hledaných látek.

Poslední optimalizační krokem byla zvolena kombinace přísadků směsi NaCl a TBABr o různých koncentracích. Předpokládané zlepšení extrakce se nepotvrdilo a proto bylo rozhodnuto zůstat pouze u přísadku TBABr.

Vzhledem k výsledkům optimalizace s přísadkem tetrabutylamoniumbromidu je možné pokládat optimalizaci za úspěšně provedenou.

Předmětem další studie může být testování solí rozpustných v acetonitrilu nebo jiných činidel tvořících iontový pár.

6. Použitá literatura

- [1] Coufal P.,
Extrakce
[http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrachr.html\(extrakce.pdf\)](http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrachr.html(extrakce.pdf))
staženo 3.8.2010
- [2] Štulík K., Ševčík J., Jelínek I., Pacáková V., Coufal P., Bosáková Z.
Analytické separační metody
Karolinum 2004 Praha
- [3] Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.,
Základní analytická chemie
Karolinum 2005 Praha
- [4] Machery-Nagel
SPE application guide
- [5] Supelco
Guide to solid phase extraction
Bulletin 910
- [6] Clara M., Gans O., Weiss S., Sanz-Escribano D., Scharf S., Scheffknecht C.,
Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: An Austrian case study
Water research 43(2009), 4760–4768
- [7] de Voogt P., Sáez M.,
Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances
Trends in Analytical Chemistry, Vol. 25, No. 4, 2006
- [8] Loos R., Locoro G., Huber T., Wollgast J., Christoph H.E., de Jager A., Gawlik B.M.,
Hanke G., Umlauf G., Zaldívar J.-M.,
Analysis of perfluorooctanoate (PFOA) and other perfluorinated compounds (PFCs) in
the River Po watershed in N-Italy
Chemosphere 71(2008), 306–313

- [9] Teng J., Tang S., Ou S.,
 Determination of perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate in water samples by SPE-HPLC/electrospray ion trap mass spectrometry
 Microchemical Journal 93(2009), 55–59
- [10] Chiao-Li Tseng, Li-Lian Liu, Chien-Min Chen, Wang-Hsien Ding,
 Analysis of perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in water and biological tissue samples by liquid chromatography–ion trap mass spectrometry
 Journal of Chromatography A, 1105(2006), 119–126
- [11] Llorca M., Farré M., Picó Y., Lopez Teijón M., Álvarez G.J., Barceló D.,
 Infant exposure of perfluorinated compounds: Levels in breast milk and commercial baby food
 Environment International 36(2010), 584–592
- [12] González-Barreiro C., Martínez-Carballo E., Šitka A., Scharf S., Gans O.,
 Method optimization for determination of selected perfluorinated alkylated substances in water samples
 Anal Bioanal Chem (2006) 386:2123–2132
- [13] Dufková V.,
 Stanovení perfluorovaných polutantů metodou GC a GC-MS
 Diplomová práce
 Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, katedra analytické chemie, 2007,
 str. 27–28.
- [14] Weremiuk A.M., Gerstmann S., Frank H.,
 Quantitative determination of perfluorinated surfactants in water by LC-ESI-MS/MS
 J. Sep. Sci. 2006, 29, 2251–2255
- [15] Dufková V., Čabala R., Maradová D., Štícha M.
 A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids
 Journal of Chromatography A, 1216(2009), 8659–8664