

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

URČENÍ TOXICITY SOLÍ PERFLUOROVANÝCH  
ORGANICKÝCH KYSELIN

Toxicity Determination of Salts of Perfluorinated Organic  
Acids

Bakalářská práce  
studijního oboru Chemie životního prostředí

Praha 2008

Radka Valigurová

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

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením svého školitele Doc. RNDr. M. Tichého, DrSc., a školitele RNDr. R. Čabaly, PhD., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Státní zdravotní ústav je možné pouze po písemném souhlasu.

V Praze dne.....

.....  
Podpis

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli Doc. RNDr. M. Tichému, DrSc. za trpělivost a rady poskytnuté během měření, RNDr. R. Čabalovi, Ph.D. za jeho pomoc při vypracovávání této práce a Ing. Z. Rothovi CsC. za pomoc při statistickém vyhodnocování. Velký dík také patří celé mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

## OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	7
2.1 Pokusný objekt <i>Tubifex tubifex</i> (Nitěnka větší).....	7
2.2 Testované látky.....	9
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	13
3.1 Použité chemikálie a pomůcky.....	13
3.2 Postup při stanovování EC <sub>50</sub> .....	14
3.2.1 Příprava roztoků referenční látky.....	14
3.2.2 Příprava roztoků PFA.....	15
3.2.3 Postup měření.....	16
3.2.4 Výpočty log EC <sub>50</sub> .....	16
3.3 Postup při stanovování ET <sub>50</sub> .....	17
3.3.1 Postup měření.....	17
3.3.2 Výpočty log ET <sub>50</sub> .....	17
4. VÝSLEDKY.....	18
4.1 Stanovení EC <sub>50</sub> v roztocích PFA s neupraveným pH.....	18
4.2 Stanovení EC <sub>50</sub> v roztocích PFA s upraveným pH.....	19
4.3 Stanovení ET <sub>50</sub> na <i>Tubifex tubifex</i> .....	19
5. ZÁVĚR.....	23
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	24

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

- EC<sub>50</sub> - efektivní koncentrace, při které reaguje 50 % jedinců
- ET<sub>50</sub> - efektivní čas, při kterém reaguje 50 % jedinců
- LC<sub>50</sub> - letální koncentrace způsobující úhyn 50 % jedinců
- 3M - americká společnost
- EPA - agentura ochrany životního prostředí USA (Environmental Protection Agency)
- PFC - perfluorované spoučeniny
- PFA - perfluorované kyseliny
- PFS – perfluorovaná sloučenina
- PFOS - perfluoroktansulfonát
- PFHxA – perfluorhexanová kyselina
- PFHpA - perfluorheptanová kyselina
- PFOA - perfluoroktanová kyselina
- PFNA – perfluornonanová kyselina
- PFDA - perfluordekanová kyselina
- PFUnA - perfluorundekanová kyselina
- PFDoA - perfluordodekanová kyselina
- PFAs – perfluorované mastné kyseliny
- TG - triglyceroly
- TFE - tetrafluorethylen
- PTFE – polytetrafluorethylen
- NOEC – No Observable Effect Concentration
- CAS – Chemical Abstract

# 1. ÚVOD

Naše společnost vyrábí řadu nebezpečných perzistentních chemických látek, se kterými se příroda neumí vypořádat. Tyto látky mohou zatěžovat nejen životní prostředí, ale i poškozovat lidský organismus.

Stanovení toxicity látek je časově i finančně velmi nákladné a často je nutné utratit velké množství zvířat. Proto se hledají alternativní metody stanovení toxicity, které by ušetřily čas, peníze a zvířata. K tomu účelu byla standardizována i alternativní metoda stanovení akutních a chronických toxicit zástavou pohybu červů *Tubifex tubifex* (nitěnka větší) [1].

Perfluorované látky jsou perzistentní sloučeniny s bioakumulačním potenciálem. Do prostředí jsou uvolňovány z míst výroby, ze skládek odpadů, při běžném používání v průmyslu i domácností.

Na základě mnoha studií byly perfluorované látky zjištěny na mnoha místech světa. V abiotické složce prostředí (ovzduší, voda, vzduch) i v biotické složce prostředí, jak u zvířat, tak i u lidí. Nejvyšší hladiny těchto látek byly nalezeny na vrcholu potravního řetězce u predátorů (polární medvěd, polární liška), jejichž hlavní potravou jsou ryby. V krvi lidí, kteří pracovali při výrobě perfluorovaných látek byly koncentrace mnohonásobně vyšší než je tomu u průměrné populace [2].

Cílem mé práce je stanovit toxikologické hodnoty solí vybraných perfluorovaných organických kyselin. V publikované literatuře jsou totiž přesné údaje o těchto veličinách mnohdy vzácné a často se značně liší.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Pokusný objekt *Tubifex tubifex* (Nitěnka větší)

Systematické zařazení : Říše ANIMALIA

Podříše POLYCYTOZOA

Vývojová větev PROTOSTOMIA

Kmen ANNELIDA

Třída OLIGOCHAETA

Řád CLITELLATA

Rod TUBIFICIDA

Druh TUBIFEX

*Tubifex tubifex*, česky nitěnka větší se schematicky řadí do výše zmíněných skupin. Patří k řádu maloštětinatců, přesněji sladkovodních maloštětinatců. Ti mají na každém článku 8 štětinek.

Nervová soustava je žebříčkovitá a je uložena na břišní straně těla. Základem cévní soustavy maloštětinatců je pulzující hřbetní a břišní céva. V předních člancích těla jsou obloukovité laterální cévy, které spojují hřbetní a břišní cévy a jsou rozšířené v pomocná čili auxiliární srdce. Těla těchto živočichů jsou díky přítomnosti červeného krevního barviva hemoglobinu zabarvena červeně. Maloštětinatci dýchají celým povrchem těla a krev je okysličována v husté síti kožních vlasečnic. Cévní soustava maloštětinatců je soustavou uzavřenou.

Nitěnky se rozmnožují pohlavně i nepohlavně. Při rozmnožování nepohlavním dochází k rozpadu těla na tělní fragmenty, které pak dorůstají v nové jedince.

Nitěnkovití tvoří kolonie, vyskytují se téměř výlučně v nejvrchnějších vrstvách dna vod krytých nánosem bahna. Některé druhy žijí zavrtány přední částí těla do bahna a jejich zadní část vyčnívá ven z vody a zadečkem vykonává vlnivý pohyb, kterým ve vodě vytvářejí vír a to jim umožňuje dýchání i ve vodách s nižším obsahem kyslíku. Potravou nitěnkovitým nejčastěji bývá detrit a bakterie, přičemž nitěnky nevybírají jednotlivé části potravy, ale pohlcují veškerý materiál na dně. Nestravitelné zbytky pak vyvrhují análním otvorem [1,5].



Obr.1 *Tubifex tubifex* [3].



Obr.2 Kolonie nítěnek *Tubifex tubifex* [4].



## 2.2 Testované látky

Perfluorované sloučeniny (PFC) jsou skupina látek synteticky fluorovaných, jejichž délka alkylovaného perfluorovaného řetězce kolísá od 4 do 14 atomů uhlíků. Typická struktura PFC má lineární řetězec :  $F - (CF_2)_n - X$ , kde  $n = 3 - 13$  a  $X = -CH_2-OH$ ,  $-COOH$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_2NH_2$ .

Mezi nejrozšířenější perfluorované organické kyseliny můžeme zařadit perfluorhexanovou kyselinu (PFHxA), perfluorheptanovou kyselinu (PFHpA), perfluoroktanovou kyselinu (PFOA). PFC jsou bioakumulativní a potenciálně škodlivé syntetické chemikálie, přirozeně se nevyskytující v životním prostředí. Většina dostupných dat se týká sloučenin s osmi atomy uhlíku.

U fluorovaných organických sloučenin jsou pozorovány jedinečné fyzikální, chemické a biologické vlastnosti. Tyto sloučeniny jsou mnohem více teplotně stálé než jejich analogické uhlovodíky. Vazba fluor-uhlík je nejsilnější jednoduchou vazbou prvku s uhlíkem, ovšem její síla je závislá na aktuální struktuře molekuly. Vzhledem k vysoké energii vazby jsou téměř všechny z organických fluorovaných sloučenin odolné vůči hydrolyze, fotolyze, biodegradaci a procesům v metabolismu [2, 6].

Tab.1 Fyzikální a chemické vlastnosti vybraných perfluorovaných kyselin [7]

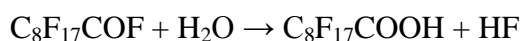
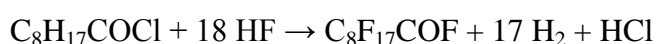
Zkr atka	Název sloučeniny	Molekulový vzorec	Molá rní hmot nost	p K <sub>a</sub>
PF OA	perfluoroktanová kyselina	$C_7F_{15}COOH$	414, 1	0 ,35
PF NA	perfluornonanová kyselina	$C_8F_{17}COOH$	464, 1	0 ,36
PF DA	perfluordekanová kyselina	$C_9F_{19}COOH$	514, 1	0 ,37
PF UnA	Perfluorundekanová kyselina	$C_{10}F_{21}COOH$	564, 1	-
PF DoA	perfluordodekanová kyselina	$C_{11}F_{23}COOH$	614, 1	-

V průmyslové výrobě jsou používány dva způsoby výroby PFC

1. Elektrochemickou cestou

2. Telomerací – produkty nejsou plně fluorované, ale mají perfluorovaný lineární alkylový řetězec s ethylenovou skupinou a další funkční skupinou.

Pro výrobu perfluoroktanové kyseliny (PFOA) elektrochemickou cestou se používá jako výchozí látka oktanoylchlorid. Reakce je dvoustupňová, přičemž výsledný produkt je získán hydrolyzou perfluoroktanoylfluoridu z první reakce. Průběh reakce je naznačen následujícími rovnicemi:



Telomerace je radikálová reakce, při níž vzniká z monomeru a iniciátoru polymerní produkt. Ve výrobním procesu telomerace reaguje jodopentafluorethan s n jednotkami tetrafluorethylenu (TFE) a následně s ethylenem. V další fázi je podle způsobu použití jod substituován funkční skupinou.

Nejdůležitějším rozdílem mezi oběma výrobními postupy je podoba finálního produktu. Elektrochemickou fluorací mohou vznikat všechny typy perfluorovaných látek, v závislosti na výchozím materiálu a jeho čistotě. Dále je důležitým rozdílem také čistota finálních produktů a cena. Látky vyrobené telomerací obsahují velmi málo vedlejších produktů, které je navíc snadné od nežádoucího oddělit. Telomerací se vyrábějí výjimečně drahé produkty. Naproti tomu produkty vyrobené elektrochemicky obsahují až 30 % nežádoucích větvených řetězců, jedná se o relativně levný postup [2].

Perfluorované látky mají speciální fyzikální a chemické vlastnosti, jsou chemicky inertní, vysoce tepelně stabilní a snižují povrchové napětí. Odpuzují jak vodu, tak i olej.

V současné době se tyto látky většinou používají:

1. jako aditiva do hasících pěn a do hydraulických tekutin,
2. ve fotografickém průmyslu,
3. při výrobě pokovovaných předmětů,
4. při výrobě polovodičů,
5. ve fotolitografii.

Perfluoroktanová kyselina se používá jako pomocné činidlo při výrobě polytetrafluorethylenu (PTFE) známého spíše pod názvem Teflon [2].

PTFE je dále součástí různých laboratorních pomůcek, (jako jsou např. SPE kolonky) a dalších fluoropolymerů. Perfluoroktanová kyselina může být přítomna ve stopových množstvích v těchto produktech a lze ji detekovat v běžných rozpouštědlech užívaných v HPLC. Deriváty perfluoroktansulfonátu (PFOS) a perfluorovaných kyselin (PFA) jsou používány na ochranu koberců, textilií, oděvů, nábytku, čalounění a výrobků z kůže proti znečištění. Tyto látky (tzv. „supersurfactants“) jsou schopné modifikovat vlastnosti povrchů těchto materiálů a poskytovat jim odolnost proti špíně, olejovitým látkám a vodě [8].

V květnu roku 2000 ohlásila společnost 3M zastavení produkce PFOS a PFOA (složky v přípravku Scotchgard, který zvyšoval odolnost povrchů vůči barevným skvrnám), kvůli jejich stálosti v životním prostředí. Rozhodnutí snížit produkci těchto sloučenin bylo částečně podmíněno stanovením koncentrací PFOS ve vzorcích krve obyvatel Spojených Států, Japonska, Evropy a Číny. Stanovené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 10-100 µg/l [9].

V roce 2002 americká agentura ochrany životního prostředí (EPA) zahájila studii zaměřenou na stanovení PFOA a jí podobných sloučenin, které se používají více než 40 let. Prokázalo se, že tyto sloučeniny jsou vysoce stálé, vyskytují se v životním prostředí a jsou bioakumulativní. Expozice PFOA může u hlodavců a primátů způsobit různé efekty zahrnující reprodukční toxicitu, toxicitu jater a rakovinu [10].

Kromě perzistence PFS v životním prostředí je další důležitou vlastností jejich akumulace a toxické účinky na organismus. Cílem studie N. Kuda [11] bylo porovnání ukládání triglyceridů (TG) perfluorovaných mastných kyselin (PFFAs) s různou délkou řetězce v samčích a samičích játrech potkanů. Měření bylo provedeno spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm. Perfluoroheptanová a perfluorooktanová kyselina neměly na samčí játra žádný vliv narozdíl od perfluorononanové a perfluorodekanové kyseliny, které způsobily akumulaci TG. Perfluoroheptanová, perfluorooktanová a perfluorononanová kyselina neměly žádný vliv na samičí játra, zatímco perfluorodekanová kyselina akumulovala TG ve stejném množství jako u samečků. Tyto výsledky ukazují, že PFFAs vyvolávají ukládání triglyceridu, ale jejich míra akumulace není závislá na jejich rozdílných chemických strukturách [8].

Bylo prokázáno, že fluorované telomery mohou být metabolizovány v trávicím systému na PFOA a příbuzné látky. Perzistence PFOA je však extrémně vysoká – tato látka, která v přírodě plně nedegraduje byla nalezena v ekosystémech a tkáních zvířat a lidí po celém světě. Nejvyšší hladiny těchto látek jsou nalézány na vrcholu potravního řetězce u predátorů, jejichž hlavní potravou jsou ryby. V průmyslových oblastech, kde se vyrábí tyto látky byly hladiny několikanásobně vyšší.

V publikované literatuře jsou údaje o toxicitě vzácné. Z dostupných dat je PFOA akutně i chronicky netoxická [2].

Tab. 2 Toxicita PFOA [2]

Toxici ta	Typ organismu	Exponovaný druh	Výsledky (mg/l)
í	Akutn	Bakterie	Luminiscenční bakterie
			30 min $EC_{50} = 722$
		Řasy	Zelená chaluha
			96 h $EC_{50} > 1000$
	Ryby	Střevle	96 h $LC_{50} = 300$
ická	Chron	Řasy	Zelená chaluha
		Ryby	Střevle
			14 d $EC_{50} = 43$
			30 d $NOEC > 100$

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část byla vypracována na Státním zdravotním ústavu v Centru pracovního lékařství.

#### 3.1 Použité chemikálie a pomůcky

Tab. 3 Testované látky

zkratka	název	vzorec	CAS	$M_r$
-	Chlorid manganatý dihydrát	$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	-	143,8 4
-	Hydroxid sodný	NaOH	1310-73-2	40,00
PFOA	Perfluoroktanová kyselina	$C_7F_{15}COOH$	335-67-1	414,1
PFNA	perfluornonanová kyselina	$C_8F_{17}COOH$	375-95-1	464,1
PFDA	perfluordekanová kyselina	$C_9F_{19}COOH$	335-76-2	514,1
PFUnA	perfluorundekanová kyselina	$C_{10}F_{21}COOH$	2058-94-8	564,1
PFDoA	perfluordodekanová kyselina	$C_{11}F_{23}COOH$	206-203-2	614,1

Tab.4 Laboratorní sklo

Petriho miska	Ø	1
	80mm	ks
Petriho miska	Ø	1
	40mm	5ks

Kádinka	250	2
	ml	ks
Kádinka	25m	6
	l	ks
Odměrná baňka	25m	1
skleněná	l	ks
Odměrná baňka	25m	6
plastová	l	ks
Pinzeta kosmetická		1
		ks
Špičky		2
		ks

Tab. 5 Laboratorní přístroje

Analytické váhy	APX – 100, Denver instrument
Ultrazvuková lázeň	RK 100, Bandelin Sonorex
Pipeta automatická	Biohit proline
pH metr	model 370, Orion

### 3.2 Postup při stanovování EC<sub>50</sub>

EC<sub>50</sub> je efektivní (účinná) koncentrace, při které reaguje 50 % jedinců z testovaného souboru, která byla stanovena ze závislosti velikosti toxického účinku na koncentraci. Její výpočet byl proveden metodou dle Weillové [1a] citované v [1].

#### 3.2.1 Příprava roztoků referenční látky

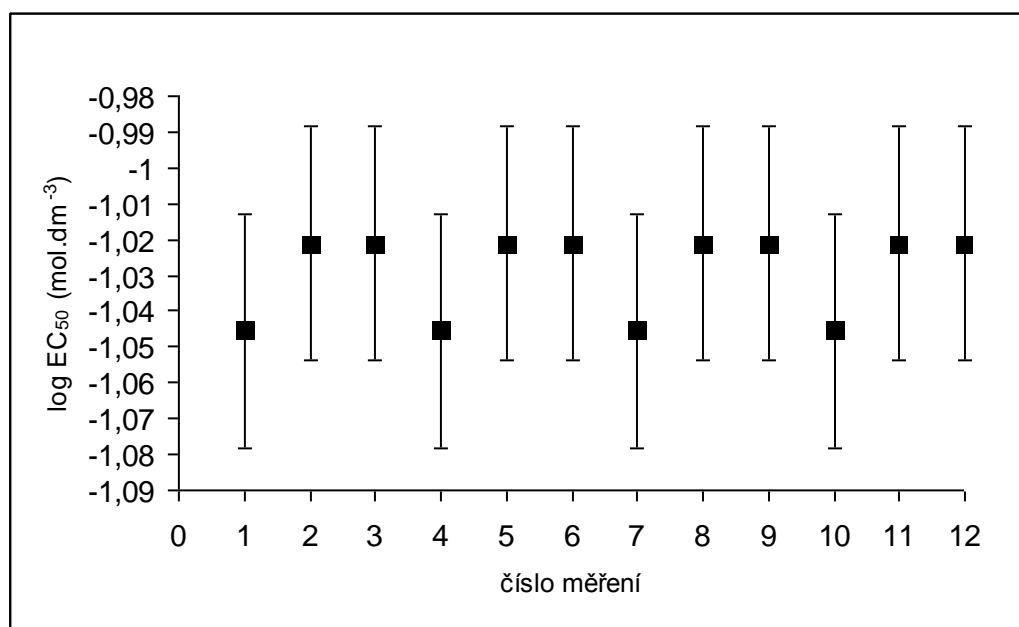
Přesné množství chloridu manganatého  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (asi 1,8000 g přesně) bylo rozpuštěno ve 25ml destilované vody, čímž byl získán roztok o základní koncentraci  $c_0$ . Takto získaný základní roztok byl ředěn následujícím způsobem:

8 ml základního roztoku ( $c_0$ ) + 2,1 ml dest. vody → koncentrace  $c_1$

8 ml roztoku o koncentraci ( $c_1$ ) + 2,1 ml dest. vody → koncentrace  $c_2$

atd.[1]

Z hodnot  $\text{EC}_{50}$  stanovených pro referenční látku byl sestaven regulační diagram (Obr. 3) pro kontrolu pokusného objektu. Hodnota  $\text{EC}_{50}$  referenční látky je hodnotou dlouhodobě stanovovanou s horní a dolní mezí a slouží ke kontrole správnosti měření a použitelnosti nitěnek. Pro výpočet  $\text{EC}_{50}$  touto metodou jsou nezbytná 4 ředění.



Obr. 3 Regulační diagram  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ke kontrole správnosti měření a použitelnosti nitěnek

### 3.2.2 Příprava roztoků PFA

Bylo naváženo přibližně přesně 0,0100 g testované látky, která byla v odměrné plastové baňce doplněna na objem 25 ml destilovanou vodou. Aby se látka ve vodě rozpustila, byla odměrná baňka vložena do teplé vody na 10 min za působení ultrazvuku.

Připravený roztok byl velmi kyselý, což nevyhovovalo nitěnkám, proto byl roztok upraven titrací hydroxidem sodným NaOH na neutrální pH za použití kalibrovaného pH-metru.

Další postup přípravy roztoků se opakoval jako v předešlém případě u referenční látky.

Navážky byly přepočítávány na molární koncentrace.

### 3.2.3 Postup měření

Měření probíhalo za laboratorní teploty (20 - 25°C). Připraveny byly destilovaná voda, Petriho misky, pinzeta, stopky, filtrační papír a kolonie nitěnek *Tubifex tubifex*. Z kolonie nitěnek byla oddělena část do Petriho misky s vodou. Do další misky bylo odpipetováno přibližně 1 ml vzorku. Z kolonie pak bylo šetrně odděleno šest přibližně stejně velkých nitěnek, které byly osušeny na filtračním papíru a následně vloženy do Petriho misky se vzorkem, ve kterém byly exponovány. Byla sledována zástava pohybu a po uplynutí přesně tří minut byl zaznamenán počet nehybných jedinců. Tento údaj se používá k výpočtu akutní toxicity, který byl vyjádřený pomocí  $EC_{50}$  [1]. Pokus byl opakován pro každou koncentraci celkem třikrát vždy na nových nitěnkách.

### 3.2.4 Výpočty $\log EC_{50}$

Z hodnot získaných experimentálním měřením na nitěnkách, lze vypočítat  $\log EC_{50}$  metodou podle Weillové [1a] ze vztahu:

$$\log EC_{50} = \log D_a + \log R_w \cdot (f+1)$$

$D_a$  – nejnižší koncentrace ze čtyř potřebných pro výpočet

$f$  – tabelovaná konstanta pro jednotlivé kombinace počtu mrtvých nitěnek

$R_w$  – poměr mezi dvěma následujícími koncentracemi (vyšší koncentrace / nižší koncentrace, tedy  $>1$ )

Interval spolehlivosti  $L_{1,2}$  pro 95% hladinu významnosti je dán vztahem:



$$L_{1,2} = \log EC_{50} \pm 2 \cdot \sigma_f \cdot \log R_w$$

$\sigma_f$  - tabelovaná hodnota odchylky, která přísluší dané konstantě  $f$  [1].

### 3.3 Postup při stanovování $ET_{50}$

$ET_{50}$  je efektivní (účinný) čas, při kterém reaguje 50 % jedinců z testovaného souboru, který byl stanoven ze závislosti velikosti toxického účinku na čase. Jeho výpočet byl proveden pomocí speciálního počítačového programu LOGISTICKÁ METODA STANOVENÍ  $LD_{50}$ , SZÚ, upraveného pro výpočet  $ET_{50}$ .

#### 3.3.1 Postup měření

Použity byly stejné roztoky referenční látky, roztoky zkoumaných látek a postup jako při stanovení  $EC_{50}$  s rozdílem expozice.

Byla sledována zástava pohybu nitěnek ve 3 min přesně, v 15 min, 0,5 hod a dále po půl hodině až do pěti hodin přesně. Byl zaznamenán počet nehybných jedinců, který slouží k výpočtu  $ET_{50}$ . Pokus byl opakován pro každou koncentraci celkem třikrát vždy na nových nitěnkách.

#### 3.3.2 Výpočty $\log ET_{50}$

Z hodnot získaných experimentálním měřením na nitěnkách, lze vypočítat  $\log ET_{50}$  pomocí speciálního počítačového programu LOGISTICKÁ METODA STANOVENÍ  $LD_{50}$ , SZÚ, upraveného pro výpočet  $ET_{50}$ .

Do tohoto programu byly vkládány hodnoty času v minutách a k tomu příslušné počty nehybných jedinců pokusného objektu *Tubifex tubifex*.

## 4. VÝSLEDKY

### Stanovení EC<sub>50</sub> v roztocích PFA s neupraveným pH

EC<sub>50</sub>, je koncentrace, při které reaguje zástavou pohybu 50 % nitěnek. Tento údaj se používá ke stanovení akutní toxicity.

Perfluorované kyseliny jsou bílé pevné látky, které se musí rozpustit ve vodě, přirozeném prostředí pro nitěnky. Tyto kyseliny bývají běžně pro analytické účely rozpouštěny v organických rozpouštědlech. Bylo prozkoušeno několik metod, než bylo zjištěno, jak perfluorované kyseliny rozpustit ve vodě. Nakonec byly rozpouštěny v teplé vodě za působení ultrazvuku.

Bylo změřeno pH kyselin, to se pohybovalo okolo pH 3 (Tab. 6). V těchto vodných roztocích byl poprvé proveden test na *Tubifex tubifex*, který slouží k zjištění akutní toxicity vyjádřené pomocí EC<sub>50</sub>. Po třech minutách expozice se všichni jedinci dále hýbali. Nitěnky na kyseliny reagovaly, ne zástavou pohybu, ale silnými deformacemi jejich těla; krabatěly se, scvrkávaly, vytékala jim krev. Test byl proveden třikrát.

Tab. 6 pH vodných roztoků perfluorovaných kyselin

zkratka	vzorec	c (mol/dm <sup>3</sup> )	pH před úpravou	pH po úpravě
PFOA	C <sub>7</sub> F <sub>15</sub> COONa	0,579 · 10 <sup>-3</sup>	3,20	7,03

PFNA	C8F17COONa	0,538 . 10 <sup>-3</sup>	3,41	6,94
PFDA	C9F19COONa	0,528 . 10 <sup>-3</sup>	3,54	7,01
PFUnA	C10F21COONa	0,432 . 10 <sup>-3</sup>	3,98	6,98
PFDoA	C11F23COONa	0,444 . 10 <sup>-3</sup>	4,07	7,05

### Stanovení EC<sub>50</sub> v roztocích PFA s upraveným pH

Pro *tubifex tubifex* je pH 3 velmi kyselé prostředí, což je možná důvod, proč docházelo k deformacím na jejich těle. Proto byly kyseliny titrovány na pH neutrální hydroxidem sodným (Tab. 6). V těchto roztocích byl proveden druhý pokus. Po třech minutách nebyly pozorovány žádné změny, nitěnky se hýbaly a žádné deformace na jejich těle již nebyly patrné. Test byl proveden třikrát.

Jelikož na vodné roztoky solí perfluorovaných kyselin nitěnky nereagovaly, nebylo možné roztoky dále ředit a test na *Tubifex tubifex* nám tedy ukázal, že vodné roztoky solí PCF jsou pro vodní ekosystém akutně netoxické ve zvoleném koncentračním rozsahu.

### Stanovení ET<sub>50</sub> na *Tubifex tubifex*

Výsledky jsou uvedeny v Tab. 7-8 a v Obr. 5-7.

Stanovení ET<sub>50</sub>, efektivního času, při kterém reaguje zástavou pohybu 50 % nitěnek, bylo provedeno stejným způsobem, jako určení akutní toxicity. Pouze byly pokusné objekty exponovány až 5 hod ve zkoumaných roztocích. Počet nehybných jedinců byl zapisován po půl hodinách.

Test byl proveden třikrát pro každou látku (Tab.7).

Tab.7 Závislost počtu nehybných nitěnek na čase v neutrálních vodných roztocích sodných solí perfluorovaných

čas (min)	počet nehybných nitěnek				
	PFOA <sup>-</sup>	PFNA <sup>-</sup>	PFDA <sup>-</sup>	PFUnA <sup>-</sup>	PFDoA <sup>-</sup>
3	0-0-0*	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
15	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0	0-0-0
30	0-0-0	0-0-0	1-0-0	4-2-4	1-0-1

60	0-0-0	0-0-0	4-4-3	5-5-5	1-1-2
90	0-0-0	0-0-0	5-4-5	6-6-5	1-1-2
120	0-1-0	1-0-0	5-4-6	6-6-6	1-2-2
150	1-2-1	1-0-0	5-5-6	-	2-2-3
180	1-2-1	1-0-0	6-6-6	-	3-3-3
210	1-2-2	2-2-1	-	-	3-4-3
240	1-3-2	2-2-1	-	-	4-5-3
270	2-4-3	2-2-1	-	-	4-5-3
300	3-4-4	3-4-4	-	-	5-5-3

\* 0-0-0 Hodnoty počtu nehybných jedinců ve třech opakovaných pokusech. Číslice udává počet nehybných jedinců od 0 do 6.

Na nitěnkách byly během testu pozorovány silné deformace na tělech. Tyto deformace byly výraznější s časem a délkou řetězce perfluorovaných látek. Pokusný objekt se během testu rozpadal za živa, krabatěl se, krvácel (Obr. 4).



Obr. 4 Fotografie nitěnek

Z hodnot získaných experimentálním měřením na nitěnkách, bylo vypočítáno  $ET_{50}$  (min) (Tab. 8) pomocí speciálního počítačového programu LOGISTICKÁ METODA STANOVENÍ  $LD_{50}$ , SZÚ, upraveného pro výpočet  $ET_{50}$ . Tímto způsobem byl pro každý roztok zjištěn i  $ET_{95}$  a  $ET_5$ .

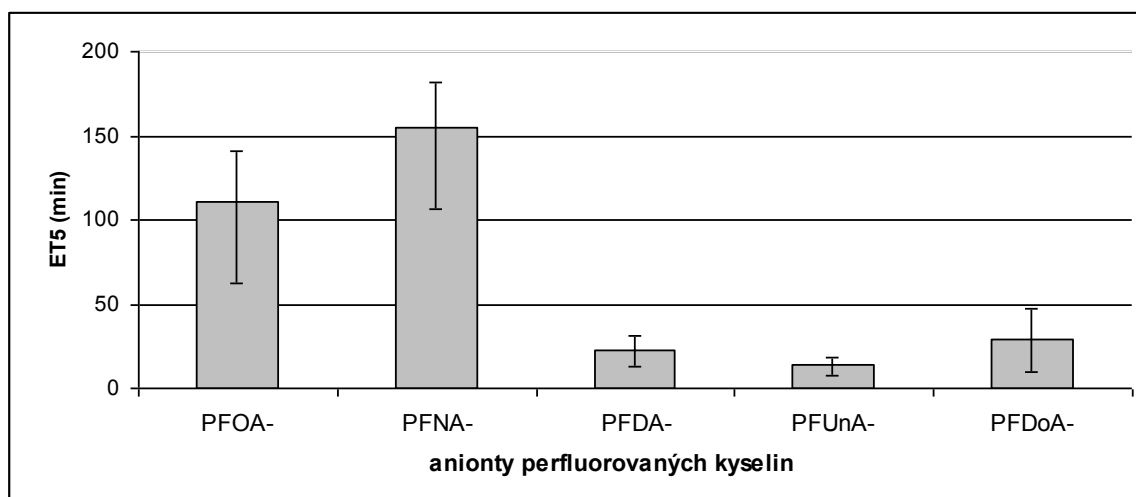
Tab. 8 Efektivní časy v neutrálních vodných roztocích sodných solí PFA

zkratka	Dávka	Vypočtená (min)	Interval spolehlivosti	
			Dolní mez (95%)	Horní mez (95%)
PFOA	$ET_5$	111	62	141
	$ET_{50}$	274	240	347
	$ET_{95}$	675	471	1687
PFNA	$ET_5$	155	106	181
	$ET_{50}$	284	257	339
	$ET_{95}$	519	405	972
PFDA	$ET_5$	23	12	32
	$ET_{50}$	59	47	70
	$ET_{95}$	151	118	233
PFUnA	$ET_5$	13	7	18
	$ET_{50}$	32	25	39
	$ET_{95}$	74	56	130
PFDoA	$ET_5$	13	7	18
	$ET_{50}$	176	143	221
	$ET_{95}$	1073	627	3328

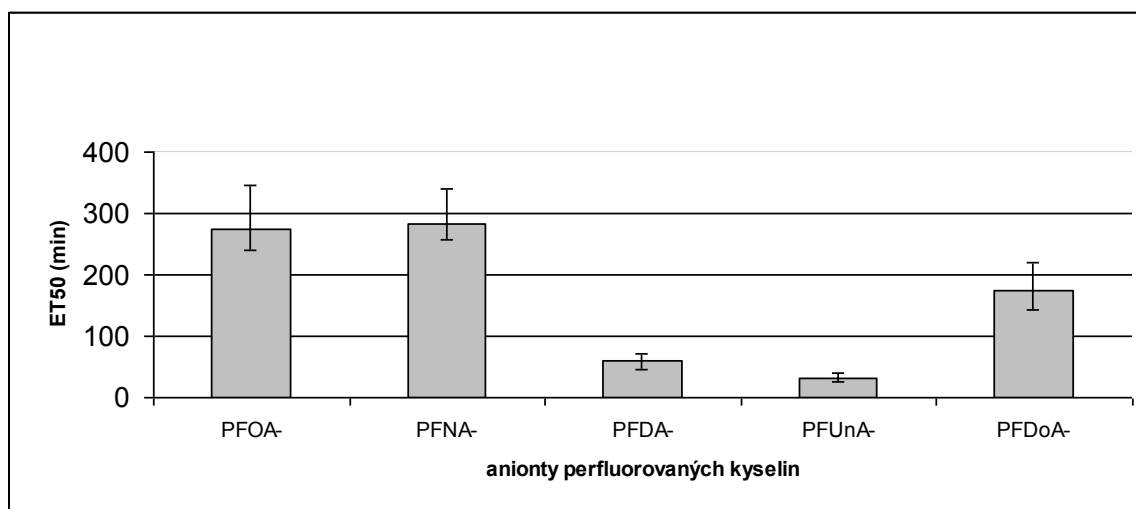
Výsledky byly graficky zpracovány (Obr. 5-7). Z grafů je patrné, že nitěnky po delší době na roztoky reagují zástavou pohybu. Pomocí Studentova t-testu [12] bylo zjištěno, že rozdíl výsledků  $ET_{50}$  mezi vodnými roztoky solí kyseliny perfluoroktanové a

perfluornonanové není statisticky významný na hladině významnosti 0,05 a může být vysvětlen náhodnými chybami obou stanovení. U ostatních roztoků PFC bylo zjištěno, že rozdíly výsledků  $ET_{50}$  jsou statisticky významné na hladině významnosti 0,05.

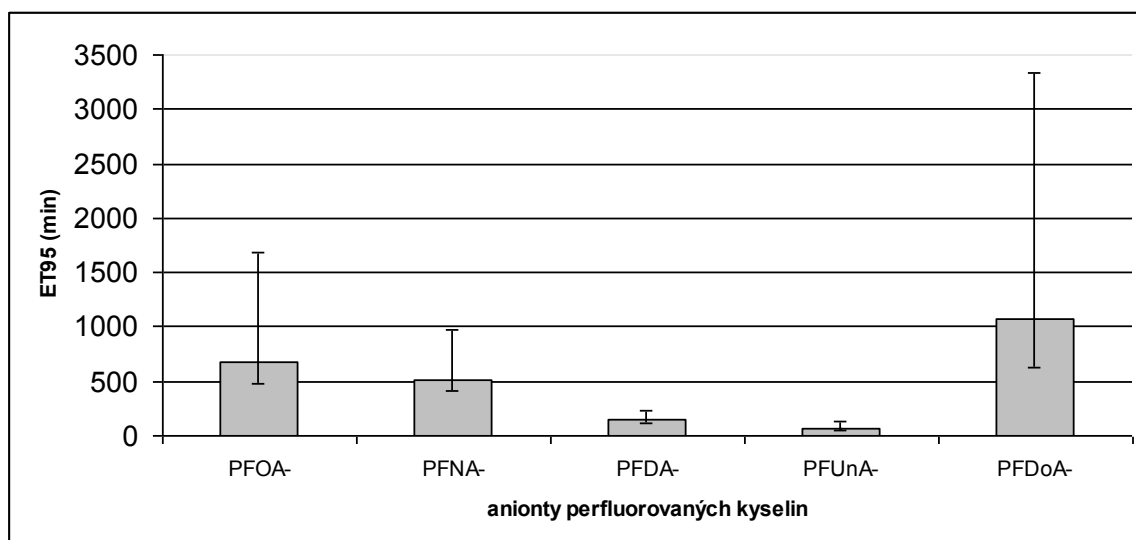
Z obrázků 5-7 je patrné, že nejvíce škodlivý je vodný roztok soli kyseliny perfluorundekanové. V této kyselině do půl hodiny expozice 50 % jedinců znehybní. Ve vodném roztoku soli perfluordekanové kyseliny znehybní 50 % jedinců do jedné hodiny expozice. Ve vodném roztoku soli perfluordodekanové kyseliny znehybní 50 % jedinců do tří hodin expozice. Ve vodných roztocích solí kyselin perfluoroktanové a perfluornonanové, mezi kterými není statisticky významný rozdíl, znehybní 50 % jedinců až po 4,5 hodinách expozice, tzn. že čas, který trvá k znehybnění 50 % jedinců je 9krát delší, než u vodného roztoku soli kyseliny perfluorundekanové.



Obr. 5  $ET_5$  aniontů perfluorovaných kyselin



Obr. 6  $ET_{50}$  aniontů perfluorovaných kyselin



Obr. 7 ET<sub>95</sub> aniontů perfluorovaných kyselin

## 5. ZÁVĚR

Cílem mojí bakalářské práce bylo určit toxicitu solí perfluorovaných organických kyselin .

Série údajů o akutní toxicitě byla rozšířena o vodné roztoky sodných solí perfluorovaných kyselin s počty uhlíků od 8 do 12. Zkoumané látky jsou akutně netoxické na vodní ekosystém, ve zvoleném koncentračním rozsahu, jak jsme pokusně prokázali.

Byl zjištěn efektivní čas ET<sub>50</sub> pro každý stanovovaný roztok, při kterém reaguje 50 % jedinců zástavou pohybu.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Tichý, M., Rucki, M.: *Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů Tubifex tubifex*. Pracov. Lék., 48, 1996, No. 6, p. 225 – 230.

[1a] Weil, C. S.: *Tables for convenient calculation of median effective dose (LD<sub>50</sub> a ED<sub>50</sub>) and instruction in their use*. Biometrics, 8, 1952, p. 249-263

[2] Hájková, K.; Tomaniová, M.; Hajšlová, J.: *Perfluorované perzistentní kontaminanty v potravních řetězcích*. VVF: PROJ/ 2004/ deklas

[3] Obrázek 1. *Tubifex tubifex*. Dostupné z URL:

< <http://www.gymfry.cz/zmp0506/melichova/> > [cit. 17.3.2008]

[4] Obrázek 2. Kolonie nítěnek *Tubifex tubifex*. Dostupné z URL:

< <http://www.esg.montana.edu/dlg/aim/annelid/img/ball.jpg> > [cit. 17.3.2008]

[5] Lellák, J.; Kořínek, V.; Fott, V.; Kořínková, J.; Punčochář, P.: *Biologie vodních živočichů*. Univerzita Karlova, 1985

[6] Moody, C. A.; Field, J. A.

*Perfluorinated Surfactants and the Environmental Implications of Their Use in Fire-Fighting Flaks* Environ. Sci. Technol., 34, 3864-3870 (2000)



- [7] Dufková, V.: *Stanovení perfluorovaných polutantů metodou GC a GC – MS*. Praha, 2007. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra analytické chemie.
- [8] Maradová, D.: *Prekoncentrace a stanovení perfluorovaných organických kyselin metodou plynové chromatografie*. Praha, 2008. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra analytické chemie.
- [9] Moody, C. A.; Martin, J. W.; Kwan, W. C.; Muir, D. C. G.; Mabury, S. A. *Monitoring Perfluorinated Surfactants in Biota and Surface Water Samples Following an Accidental Release of Fire-Fighting Foam into Etobicoke Creek*. Environ. Sci. Technol., 36, p. 545-551 (2002)
- [10] Kärmmann, A.; Bavel, Van B.; Järnberg, U.; Hardell, L.; Lindström, G. *Development of Solid-Phase Extraction . HPLC/Single Quadrupole MS Method for Quantification of Perfluorochemicals in Whole Blood*. Anal. Chem., 77, p. 864-870 (2005)
- [11] Kudo, N.; Kawashima, Y. *Induction of Triglyceride Accumulation in the Liver Rats by Perfluorinated Fatty Acids with Different Carbon Chain Lengths: Comparison with Induction of Peroxisomal  $\beta$ -Oxidation*. Biol. Pharm. Bull., 26, p. 47-51 (2003)
- [12] Studentův t- test. Dostupné z URL:  
< [http://vfu-www.vfu.cz/stat/FVL/Cviceni/Studentuv\\_t.htm](http://vfu-www.vfu.cz/stat/FVL/Cviceni/Studentuv_t.htm) > [cit. 21.4.2008]
- [13] Tichý, M.: *Toxikologie pro chemiky. Toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativní*. Praha: Karolinum, 2003. 2.vydání. s. 18 – 20. ISBN 80-246-0566-X

