

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie
Studijní obor Klinická a toxikologická analýza

**Prekoncentrace a stanovení
perfluorovaných organických kyselin
metodou plynové chromatografie**

Diplomová práce

Praha 2008

Doubravka Maradová

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Radomíra Čabaly, Ph.D., 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 je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 5.4.2008

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za jeho pomoc při shromažďování odborné literatury, za trpělivost a rady poskytnuté během měření a vypracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Martinu Štíchovi za jeho pomoc s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Velký dík patří také mým rodičům, kteří mě ve studiu podporovali a Honzovi za jeho velkou psychickou podporu.

Obsah:

1. Úvod.....	6
2. Teoretická část.....	7
2.1 Perfluorované sloučeniny.....	7
2.2 Toxicita a akumulace PFS v organismu.....	10
2.3 Průmyslová výroba perfluorovaných sloučenin.....	11
2.4 Derivatizace perfluorovaných kyselin v GC.....	12
2.5 Stanovení perfluorovaných sloučenin.....	14
2.5.1 GC-MS.....	14
2.5.2 LC-MS, LC-MS-MS, HPLC-MS.....	16
2.5.3 Další analytické metody.....	20
2.6 Plynová chromatografie.....	23
3. Experimentální část.....	27
3.1 Standardy a chemikálie.....	27
3.2 Přístrojové vybavení.....	27
3.3 Příprava roztoků.....	29
3.3.1 Zásobní roztoky perfluorovaných kyselin v acetonitrilu.....	29
3.3.2 Reálný vzorek vody z teflonové pánve.....	29
3.4 Derivatizace.....	30
3.4.1 Derivatizace PFA na isobutylestery.....	30

3.4.2 Derivatizace perfluorovaných kyselin tepelným rozkladem iontového páru po iontově-párové SPM	30
3.4.3 Derivatizace perfluorovaných kyselin methanolem po extrakci methyl(terc)butyl éterem.....	31
3.5. Analýzy.....	31
3.5.1 GC-ECD.....	31
3.5.2 GC-MS.....	32
3.5.3 HPLC-MS.....	33
4. Výsledky a diskuze.....	34
4.1 GC-ECD.....	34
4.1.1 Srovnání kolon.....	34
4.1.2 Derivatizace perfluorovaných kyselin tepelným rozkladem iontového páru po iontově-párové SPME.....	38
4.1.3 Derivatizace perfluorovaných kyselin methanolem po extrakci methyl(terc)butyl éterem.....	39
4.1.4 SPME extrakce za různých teplot.....	42
4.2 GC-MS.....	43
4.3 HPLC-MS.....	45
4.4 Prekoncentrace a stanovení reálného vzorku vody.....	48
5. Shrnutí.....	54

6. Závěr.....	56
7. Přílohy.....	57
8. Seznam zkratek a symbolů.....	63
9. Použitá literatura.....	66

1. Úvod

Tématem mé diplomové práce je výzkum prekoncentrační problematiky perfluorovaných organických kyselin. Bylo publikováno mnoho stanovení perfluorovaných sloučenin různými analytickými technikami a výsledky některých z nich jsou uvedeny dále v textu. Zatímco se chemici po celém světě již zabývali a stále zabývají stanovením PFS v různých vzorcích, v České Republice není toto téma stále dostatečně zpracováno. Bylo zjištěno, že PFS patří mezi polutanty nacházející se ve všech složkách životního prostředí. Je to dáno jejich odolností vůči odbourávacím procesům a bioakumulativním charakterem těchto látek. S PFS přicházíme do styku v každodenním životě, a proto by jejich stanovení mělo být předmětem našich studií.

Cílem mé práce je vyvinout účinnou prekoncentrační metodu pro stanovení perfluorovaných organických kyselin ve vodě metodou plynové chromatografie.

2. Teoretická část

2.1 Perfluorované sloučeniny

Perfluorované sloučeniny (PFS) jsou perzistentní organické látky, u kterých jsou všechny vodíky v alkylovém řetězci nahrazeny atomy fluoru. Mezi často analyzované PFS patří například perfluorhexanová kyselina (PFHxA), perfluorheptanová kyselina (PFHpA), perfluoroktanová kyselina (PFOA), dále pak perfluoroktansulfonát (PFOS) a perfluoroktansulfonamid (PFOSA), (viz.tabulka č.1). Do skupiny perfluorovaných sloučenin bývají někdy také řazeny telomerní polyfluorované látky, což jsou lineární, polyfluorované sloučeniny, kde perfluorovaná část alkylového řetězce s 6 a více uhlíky je zakončena ethylenovou částí s navázanou funkční skupinou, např. fluorotelomerní alkoholy s obecným vzorcem ($C_xF_{2x+1}CH_2CH_2OH$).

Tabulka č. 1: Fyzikální a chemické vlastnosti některých perfluorovaných sloučenin.

Název sloučeniny	Zkratka	Molekulový vzorec	Molekulová hmotnost	Bod varu (°C)	Bod tání (°C)	Hustota (g/cm^3)
Perfluorohexanová kyselina	PFHxA	$C_6F_{11}COOH$	314,068	157	-	1,762
Perfluoroheptanová kyselina	PFHpA	$C_7F_{13}COOH$	364,078	175	-	1,792
Perfluorooktanová kyselina	PFOA	$C_8F_{15}COOH$	414,088	192	53-60	1,700
Perfluorononanová kyselina	PFNA	$C_9F_{17}COOH$	464,098	218	69-74	-
Perfluorodekanová kyselina	PFDA	$C_{10}F_{19}COOH$	514,108	218	77-83	-
Perfluorotetradekanová kyselina	PFTDA	$C_{14}F_{27}COOH$	714,148	270	131-137	-
Perfluorobutansulfonát	PFBuS	$C_4F_9SO_3^-$	299,100	-	-	-
Perfluorooktansulfonát	PFOS	$C_8F_{17}SO_3^-$	499,140	-	-	-
Perfluorooktansulfonamid	PFOSA	$C_8F_{17}SO_2NH_2$	499,166	-	-	-

Vedle polychlorovaných a polybromovaných látek, kterým byla až do dnešní doby věnována obrovská pozornost, se jedná o další skupinu halogenovaných kontaminantů,

kteřá vykazuje negativní účinky na životní prostředí [1]. PFS jsou bioakumulativní a potenciálně škodlivé syntetické chemikálie, přirozeně se nevyskytující v životním prostředí.

Typická struktura PFS má lineární řetězec se 4 až 13 atomy uhlíku:

$F - (CF_2)_n - X$, $n = 4 - 13$, kde $X = -CH_2-CH_2-OH, -COOH, -SO_3H, -SO_2NH_2$ [2].

Perfluorované sloučeniny jsou mnohem víc teplotně stálé než jejich analogické uhlovodíky. Konkrétně perfluorované karboxylové a alkansulfonové kyseliny jsou z PFS považovány za teplotně nejstabilnější. 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, fotolýze, biodegradaci a procesům v metabolismu [1, 3, 4].

PFS, nejčastěji ve formě alkylsulfonamidů a amidů, jsou využívány v mnoha průmyslových oblastech (např. v textilním průmyslu, papírenství, nebo v zemědělství). Dále se používají jako změkčovadla, v mazacích olejích, nátěrových hmotách, leštidlech a jako složky protipožárních pěn. Speciální hasící pěny obsahují některé perfluorované látky (konkrétně soli perfluoralkansulfonových kyselin), které podporují tvorbu vodní pěny (aqueous film forming foam, AFFF). Používání těchto pěn začalo již v polovině 60. let v USA brzy po jejich objevení. Společnost 3M byla až do roku 2001 největším dodavatelem tohoto produktu především pro americkou armádu. AFFF jsou vhodné k hašení hořlavých kapalin (např. benzínu), a proto ke kontaminaci životního prostředí (zejména povrchové a podzemní vody) perfluorovanými látkami dochází nejčastěji na armádních základnách, letištích a v tréninkových táborech hasičských sborů [3, 5, 6].

Tabulka č.2: Chemické složení hasící pěny FC-203CF Light Water Aqueous Film Forming Foam (3M, St. Paul, USA).

Složka	Procentuální obsah
voda	69-71
diethylenglykolbutylether	20
deriváty fluoralkylamidu	1-5
alkylsulfáty	1-5
perfluoralkylsulfonáty	0,5-1,5
triethanolamin	0,5-1,5
tolyltriazol (inhibitor koroze)	0,05

PFOA se používá jako pomocné činidlo při výrobě polytetrafluorethylenu (PTFE) známého spíše pod názvem Teflon [1, 7, 8]. 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 [9]. Amonná sůl perfluoroktanové kyseliny (APFOA) se používá jako emulgátor při produkci fluoropolymerů a fluoroelastomerů, jako je např. polytetrafluorethylen (PTFE) a polyvinylidenfluorid (PVDF). Tyto materiály jsou potřebné v automobilovém, leteckém a elektronickém průmyslu [10-13].

Deriváty 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.

V zemědělství se využívá *N*-ethylperfluoroktansulfonamid, který patří mezi specifické insekticidy používané proti mravencům a termitům. Jeho metabolitem je bioakumulativní perfluoroktansulfonamid (PFOSA) [14].

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 [15]. Produkce PFOS ve Spojených Státech byla v tomto roce odhadována téměř na 3000 tun. 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.

Protože jsou perfluorované sloučeniny používány ve velké míře více než 40 let, zahájila v roce 2002 americká agentura ochrany životního prostředí (EPA) studii zaměřenou na stanovení PFOA a jí podobných sloučenin. Bylo prokázáno, že tyto sloučeniny jsou vysoce stálé, vyskytují se v životním prostředí a jsou bioakumulativní. EPA zjistila, že expozice PFOA může u hlodavců a primátů způsobit různé efekty zahrnující reprodukční toxicitu, toxicitu jater a rakovinu [16]. Perzistence PFS v životním prostředí je tedy velmi závažným problémem. Na toto téma provedl Yamamoto a kol. [17] studii, v níž se zabývali degradací perfluoroktansulfonátu ve vodném prostředí a v roztoku alkalického 2-propanolu. Vodný i alkalický roztok 2-propanolu byl ozářen nízkotlakovou rtuťovou výbojkou. PFOS byl ve vodném roztoku degradován z 8 % po 1 dnu a z 68 % po 10 dnech. Degradace PFOS v alkalickém roztoku 2-propanolu byla poněkud rychlejší, 76 % po 1 dni a 92 % po 10 dnech. Fotodegradací vznikají dva degradační produkty C_8HF_{17} a $C_8F_{17}OH$.¹

2.2 Toxicita a akumulace PFS v organismu

Kromě perzistence PFS v životním prostředí je další důležitou vlastností jejich akumulace a toxické účinky na organismus. Cílem studie N. Kuda [18] 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 perfluorononanová a

¹ Podle všeobecných podkladů tato sloučenina neexistuje, ale v publikaci Yamamota a kol. je takto uvedena.

perfluorodekanová 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.

Osudem a toxicitou PFOA v životním prostředí pro makrofyty *Myriophyllum Sibiricum* a *Myriophyllum Spicatum* se zabýval Hanson [19]. K analýze bylo použito 12 000 l přírodních (venkovních) mikrokosmických vzorků (v dubletech), které byly smíseny s 0,3, 1, 30 a 100 mg/l sodnou solí PFOA. Vzorky byly kontrolovány a vyhodnocovány každých 35 dní. Koncentrace PFOA ve vzorcích makrofyt byla v prvních sedmi dnech měření u obou rostlinných druhů statisticky zanedbatelná. Koncentrace PFOA mezi 14. a 35. dnem měření byla u *Myriophyllum Spicatum* > 5,7 mg/l. U *Myriophyllum Sibiricum* se koncentrace PFOA ve vzorcích makrofyt v těchto dnech pohybovala kolem > 8,4 mg/l. Odhadnuté riziko pro tyto rostlinné druhy je tedy v běžných koncentracích v životním prostředí zanedbatelné.

2.3 Průmyslová výroba perfluorovaných sloučenin

Perfluorované látky se průmyslově vyrábí 2 různými způsoby. Prvním z nich je proces elektrochemické fluorace, při němž dochází k nahrazení všech atomů vodíku v uhlovodíkovém řetězci atomy fluoru účinkem elektrického proudu. Je to celkem levná metoda, kterou lze získat směs převážně lineárních izomerů, rozvětvených izomerů (15 až 30 %), ale také nečistot s kratším řetězcem. Tato elektrochemická metoda byla používána k výrobě perfluoroktansulfonylfluoridu (PFOSF). Společnost 3M začala s produkcí této látky již roku 1949 [6, 18]. PFOSF je základní chemikálií, ze které se dále produkovaly perfluoralkylsulfonamidoalkoholy, jako např. *N*-ethylperfluoroktansulfonamidethanol (*N*-EtFOSE). Tyto produkty byly v roce 2001 stáhnuty z výroby a nahrazeny analogickými látkami s butylovým základem.

Perfluoralkylsulfonamidalkoholy degradují biotickou oxidací a biotransformačními procesy na perfluoralkylsulfonáty. Konkrétně PFOS se v přírodě uvolňuje z perfluoralkylsulfonamidů, jako je již zmiňovaný *N*-EtFOSE.

Druhým důležitým výrobním procesem PFC je telomerizace, která vychází z reakce pentafluorjodethanu s tetrafluorethylenovými oligomery za vzniku směsi perfluoralkylderivátů. Tyto fluortelomerní deriváty byly používány k výrobě různých telomerních produktů, převážně fluorotelomerních alkoholů (FTOH). To jsou lineární, polyfluorované alkoholy s dlouhým řetězcem (obecně $C_xF_{2x+1}CH_2CH_2OH$), které slouží jako meziprodukty při výrobě inkoustů, vosků, nátěrových hmot, barviv, lepidel, leštidel, těsnění a plastů. FTOH jsou transformovány v atmosféře a metabolizovány v organismech a mikroorganismech na fluortelomerní karboxylové kyseliny (FTCA) a perfluorkarboxylové kyseliny (PFA) [20, 21, 22].

2.4 Derivatizace perfluorovaných kyselin v GC

Z hlediska hodnot bodů varu lze teoreticky měřit PFA přímo metodou GC, ovšem jejich vysoká kyselost (např. pK_a PFOA = 0,35) způsobuje přílišné „chvostování“ jejich píků, což velmi ztěžuje jejich kvantifikaci. Pro analýzu perfluorovaných sloučenin metodou plynové chromatografie je tedy vhodné převést tyto polární látky na těkavější a méně polární látky derivatizací.

Jedna z nejčastějších metod derivatizace kyselin je jejich převedení na methylestery, které jsou méně polární a více těkavé. Metody methylace PFA byly publikovány v několika pracích.

Nejčastěji používanou derivatizační metodou je methylace methanolem za katalýzy kyselinou sírovou [23].

Další používanou metodu popisuje Alzaga [24] ve své práci, jedná se o převedení perfluorovaných kyselin ($C_7 - C_{10}$) na methylestery účinkem methanolu a BF_3 s následným využitím headspace SPME.

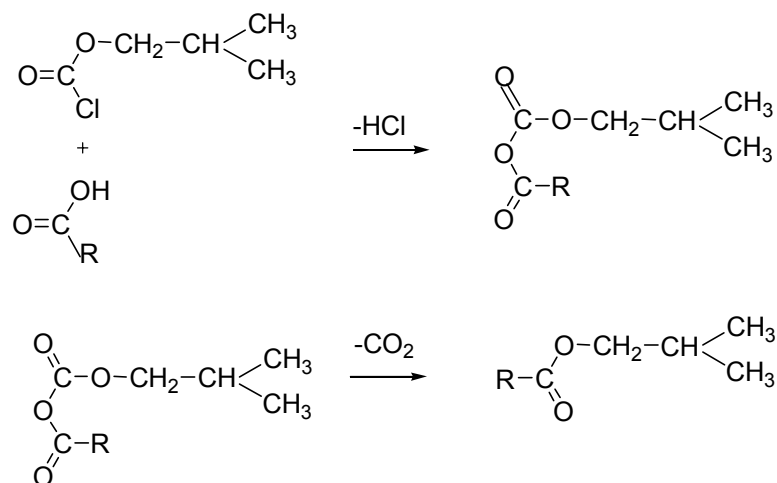
Derivatizační metodu, která využívá reakce s metyljodidem a při které dochází ke vzniku metylesterů využila Moody [25] pro stanovení PFS ve vzorcích podzemní vody pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí s elektronovou ionizací (GC-EI-MS).

Scott a kol. [26] ve své práci použili derivatizaci perfluoralkylkarboxylové kyseliny na její 2,4-difluoranilid působením 2,4-difluoranilinu a N,N-dicyklohexylkarbodiimidu ve vodné fázi a jeho následné stanovení metodou GC-MS.

Pro jednoduchou úpravu vzorků byla použita metoda založená na iontově-párové extrakci na pevné fázi (SPE) za použití triethylaminu, tetrabutylamonium bromidu a cetyltrimethylamonium bromidu, kterou publikovala Saradhi [27]. Extrakce na pevné fázi byla provedena na C₁₈ kolonce s elucí analytů methanolem. Po rozpuštění odparku v acetonitrilu byla směs zderivatizována přidavkem N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu (BSTFA). Tato metoda byla použita pro extrakci produktů po kyselé degradaci metyl-, etyl- a propyl- derivátů fosforečných, thioglykolových a benzoových kyselin a je tedy možné ji využít i pro stanovení více kyselých látek jako jsou PFA.

Dalším možným způsobem derivatizace je metoda založená na iontově-párové extrakci na pevné fázi, kterou popsal Alzaga [28]. Iontový pár kyseliny a tetrabutylamonia byl vyextrahován do PDMS vlákna, ve kterém došlo při zahřátí na teplotu 300°C ke vzniku butylesteru příslušné kyseliny a nejspíše dalšímu produktu tributylaminu, který se dále pravděpodobně rozpadl na další butylové sloučeniny.

Látky obsahující aktivní vodík je možné derivatizovat poměrně novými derivatizačními metodami např. derivatizace PFA na estery reakcí s chlormravenčany. Tímto způsobem můžeme derivatizovat různé druhy kyselin (např. mastné kyseliny, oxokyseliny nebo aminokyseliny) na metylestery, etylestery, butylestery atd. podle druhu činidla - chlormravenčanu. Uhlovodíkový zbytek chlormravenčanu se váže na kyselinu za vzniku daného esteru. Do reakce dále vstupuje pyridin jako katalyzátor a příslušný alkohol, který slouží jako pomocná látka. Reakce v přítomnosti chlormravenčanu isobutylnatého probíhá následovně:



kde R je perfluorovaný řetězec dané kyseliny, činidlem je v tomto případě chlormravenčan isobutylnatý, vzniklé estery jsou tedy isobutylestery. [29, 30, 31].

2.5 Stanovení perfluorovaných sloučenin

2.5.1 GC-MS

GC-MS je jednoduchá a citlivá metoda s vysokou separační účinností a je tedy možné ji využít při stanovení perfluorovaných látek ve složkách životního prostředí.

Nejnovější studie Alzagy a kol. [24] byla zaměřena na vývoj analytické metody stanovení perfluorovaných kyselin v mořských sedimentech po tlakové fluidní extrakci a následném převedení perfluorovaných kyselin (C₇ – C₁₀) na methylestery účinkem methanolu a BF₃ s využitím headspace SPME. Ke stanovení byla použita GC-NCI-MS. Vzorčky povrchového sedimentu byly sbírány během roku 2002 a 2003 na rozdílných místech přístavu v Barceloně. Koncentrace PFOA a PFDA se pohybovaly od hodnot pod mezí detekce do průměrné koncentrace 12 ng/g. Detekce s NCI-MS je vhodnou metodou pro stanovení PFCA v mořských sedimentech s detekčními limity v jednotkách ng/g.

Scott a kol. [25] se ve své studii zabývali stanovením perfluorovaných karboxylových kyselin (PFA) ve vzorcích tkání divoké zvěře, vody z čističek odpadních vod, usazenin a vzorků vody z jezera. Cílem jejich studie bylo vyvinutí metody, která by umožnila detekci (C₂-C₉) PFA ve formě difluoranilidů v jednotkách ng/l a porovnávali výsledky získané ze stanovení GC-MS s HPLC-MS-MS. Naměřené výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 3. Již na první pohled je jasné, že plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí je možné stanovit koncentrace PFA i s kratším řetězcem, zatímco u kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí se koncentrace těchto látek nacházejí pod mezí stanovitelnosti.

Tabulka č. 3: Naměřené hodnoty PFA stanovené různými analytickými metodami.

	GC-MS	GC-MS	LC-MS-MS	LC-MS-MS
Vzorek	(ng/l)	RSD (%)	(ng/l)	RSD (%)
PFHxA	3,3-7,5	37,8	nedetegovatelné	nedetegovatelné
PFHpA	2,0-4,3	23,1	nedetegovatelné	nedetegovatelné
PFOA	27,4-34,0	6,1	30,5-40,2	8,8
PFNA	1,3-2,9	23,6	3,1-5,9	19,7
PFDA	1,3-2,3	21,0	1,6-3,9	30,8

Scott a kol. [32] se dále zabývali stanovením PFA, fluorotelomerních karboxylových kyselin (FTCAs) a fluorotelomerních nenasycených karboxylových kyselin (FTUCAs) ve vzorcích sedimentů. Vzorky byly shromážděny z 9 míst severní Ameriky. Analytická metoda stanovení těchto látek zahrnuje derivatizaci perfluoralkylkarboxylové kyseliny na její 2,4-difluoranilid v přítomnosti 2,4-difluoranilinu a N,N-dicyklohexylkarbodiimidu ve vodné fázi a jeho následné stanovení metodou GC-MS. PFA byly ve vodné matrici derivatizovány na 2,4-difluoranilid. Vzorky z odlehlých míst v Kanadě obsahovaly velmi malé množství PFOA < 0,1-6,1 ng/l. Podstatně vyšší koncentrace PFOA byly nalezeny ve vzorcích na severovýchodě USA. Nejvyšší koncentrace (až 85 ng/l) byly zjištěny ve 2 jižních městských kanadských lokalitách. Přítomnost FTCAs a FTUCAs byla zjištěna ve všech čtyřech amerických a dvou kanadských lokalitách. Dále odebrali vzorky vody

hloubkových profilů (0-60 m pod hladinou) ze středu jezera Ontario v Kanadě. C₂-C₈ PFCAs byly stanoveny metodou GC-MS a nalezeny ve všech hloubkách a to v koncentracích přibližně 1 ng/l. Trifluorooctová kyselina (TFA) byla detekována pouze v hloubkách 0-10 m pod hladinou, zatímco PFOA byla stanovena ve všech vzorcích kromě vzorku odebraného z 60 metrů pod hladinou jezera.

Stanovením koncentrace PFA z hloubkových profilů v moři se dále zabýval Yamashita a kol. [33]

2.5.2 LC-MS, LC-MS-MS, HPLC-MS

Kapalinová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří mezi separační analytické metody, které umožňují detekci nejrůznějších látek jak v biologických matricích tak v životním prostředí. Níže jsou uvedeny zkoumané matrice a výsledky měření publikované v odborných časopisech.

Moody a kol. [15] se ve své studii zabývali stanovením koncentrace PFOS a PFOA. V červnu 2000 došlo během požáru na letišti L.B. Pearson International Airport v Torontu k úniku přibližně 22 000 litrů hasicí pěny, která obsahovala velké množství perfluorovaných sloučenin. Přítomnost pěny byla následně zjištěna v zátocě Etobicoke v Torontu. Moody použila ke stanovení koncentrace PFOS dvě nezávislé analytické techniky: kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí (LC-MS-MS) a ¹⁹F NMR. LC-MS-MS byla použita pro identifikaci a stanovení PFOS a PFOA. Koncentrace PFOS ve vzorcích povrchové vody se pohybovala v rozmezí 1,1x10⁻⁵ - 2,27 μg/ml a koncentrace PFOA byla 11x10⁻⁶ - 11,3x10⁻³ μg/ml. PFOS byl převládající zjištěnou sloučeninou. Nevýhodou této metody je její použitelnost pouze na vzorky, ve kterých se vyskytují perfluorované sloučeniny s 6-10 uhlíky. ¹⁹F NMR byla použita pro stanovení celkové koncentrace perfluorovaných sloučenin, která se pohybovala od nedetekovatelného množství do 17,00 μg/ml. Výhodou této metody je, že může poskytnout cenné informace v krátké době těsně po úniku do životního prostředí. Je ale

méně citlivá, takže je nutná prekoncentrace vzorků. Obě metody dovolují úplné vyhodnocení přítomnosti PFS ve vodných vzorcích a jsou použitelné i pro matrice jiných vzorků.

V další studii se Moody a kol. [34] zabývali dalším stanovením koncentrace perfluorovaných sloučenin v okolí zátoky Etobicoke. Měření bylo zahájeno den po výše zmíněné havárii. Perzistence a toxicita perfluorovaných sloučenin byly zkoumány ve vzorcích povrchové vody a v jaterní tkáni ryb (PFOS se akumuloval převážně v játrech ryb). Celková koncentrace PFOS stanovená kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (LC-MS-MS) po extrakci na pevné fázi v jaterní tkáni ryb se pohybovala v rozmezí od 2,00 do 72,4 $\mu\text{g/g}$. Ve vzorcích povrchové vody bylo možno tyto sloučeniny detekovat po dobu 153 dní. Celková koncentrace PFOS se pohybovala od nedetekovatelného množství (LOD $\sim 1,7 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$) do 2,21 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace PFOA se pohybovala od nedetekovatelného množství (LOD $\sim 9 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g/ml}$) do $11,3 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$.

Cílem studie Olsena [35] a kol. bylo sledování změn koncentrací PFOS, PFOA, N-methyl perfluoroktansulfonamidoacetátu (M 570) a dalších fluorovaných sloučenin v lidské krvi. Vzorky krve byly odebrány dobrovolníkům ve Washington County v Marylandu, Pensylvánii a Virginii v roce 1974 a 1989. Hlavním úkolem studie bylo zjistit jak se během těchto let změnila koncentrace perfluorovaných sloučenin v lidské krvi. Vzorky byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HPLC-MS). Podle této studie můžeme říct, že koncentrace PFOS a PFOA během let 1974 a 1989 významně vzrostla narozdíl od koncentrace M 570, která se pohybovala kolem meze stanovitelnosti. Data z roku 1989 byla dále porovnána s koncentracemi perfluorovaných sloučenin získaných roku 2001 od amerických dobrovolníků ze stejných oblastí. Kromě M 570 nebyl zaznamenán žádný podstatný rozdíl mezi koncentracemi PFOS a PFOA ve vzorcích z roku 1989 a 2001 ($p < 0,05$). Ze získaných koncentrací z roku 2001 vyplývá, že nedošlo k významnému nárustu koncentrací PFOS a PFOA mezi lety 1989 a 2001.

Původní severské kanadské populace jako jsou Inuité a Inuvialuité často loví a konzumují mořské savce, kteří mohou potenciálně obsahovat perfluorované látky.

Z tohoto důvodu provedl Tittlemeier v této oblasti studii zaměřenou na detekci PFOS, PFOA, PFHpA, PFHxA, a dalších perfluorovaných látek ve vzorcích séra kanadské arktické populace metodou LC-MS-MS [36]. Vzorky séra byly shromážděny od roku 1994 do roku 2001 a byly použity ke stanovení obsahu perzistentních organických škodlivin a toxických kovů. PFOS a PFOA byly nalezeny ve všech analyzovaných vzorcích. PFHpA byla detekována v 70 % vzorků zatímco PFHxA pouze v jednom vzorku. Ve všech vzorcích byl z perfluorovaných látek nejvíce zastoupen PFOS, jehož koncentrace se pohybovaly v rozmezí 2,8-57,9 ng/ml. Koncentrace PFOA byla v rozmezí 0,48-5,46 ng/ml.

Cílem Bergerovy studie [37] bylo zhodnocení distribuce PFS v životním prostředí pěti skandinávských zemí a sledování rozdílů koncentrací znečišťujících látek v různých typech matric. Sledovány byly PFOA a PFHxA, interním standardem byla 7H-perfluoroheptanová kyselina (7H-PFHpA). Bylo analyzováno pět různých typů vody, mořská, jezerní a dešťová voda, kanalizační odpad a odpadní voda ze skládek. Nejnižší koncentrace těchto látek byly nalezeny v mořské vodě, přičemž průměrná hodnota PFOA byla 5,2 ng/l. Dále bylo nalezeno 7,8 ng/l v jezerní vodě, 13,1 ng/l v dešťové vodě, 20,5 ng/l v kanalizačním odpadu a 297 ng/l ve vodě ze skládek.

Zdroji perfluoroktanové kyseliny (PFOA) mohou také být upravené a impregnované látky a papír. LC-MS-MS je metoda, kterou Stadalius a kol. [38] použili pro zjištění přítomnosti PFOA v těchto matricích, přičemž využili dvojitě značené ¹³C-PFOA jako interního standardu. Velmi nízké koncentrace PFOA (v ng/g) byly nalezeny v neupravovaném papíru a textilu. V upraveném textilu byla naměřena hodnota 2 ng/g PFOA a v upraveném papíru 5 ng/g.

Butt a kol. [39] se zabývali zjištěním přítomnosti perfluoroalkylovaných sloučenin (PFCs) ve vzorcích jater dvou druhů mořských ptáků *Uria lomioia* a *Fulmaris glacialis*, žijících na ostrovech prince Leopolda v kanadské Arktidě. Autoři shromáždili vzorky *Uria lomioia* v letech 1975, 1993 a 2004 a *Fulmaris glacialis* v letech 1975, 1987, 1993 a 2003. Jako sledované analyty byly vybrány C₇-C₁₅ perfluorované karboxylové kyseliny a jejich prekurzory, 8:2 a 10:2 fluorotelomery, nasycené i nenasycené fluorotelomerní

karboxylové kyseliny (FTCAs, FTUCAs), perfluorooktansulfonát, C₆, C₈ a C₁₀ sulfonát a perfluorooktansulfonamid (PFOSA). K přečištění vzorků byt použit hexafluoropropanol. Játra byla po homogenizaci extrahována terc-butyleterem. Analýza byla provedena metodou HPLC-MS-MS. Naměřené koncentrace PFDA a PFOS se u *Uria lomoia* v letech 1975, 1993 a 2004 nijak podstatně nezměnily a pohybovaly se v rozmezí 0,08-0,76 ng/l. U PFUnA a PFDoA v roce 2004 došlo k výraznějším nárůstu koncentrace na 4,6 ng/l. U *Fulmaris glacialis* došlo roku 1993 k velkému zvýšení koncentrace PFDoA na hodnotu 13,4 ng/g. Koncentrace byla také vyšší v roce 2003 u PFUnA a PFDoA, stejně jako tomu bylo u *Uria lomoia*.

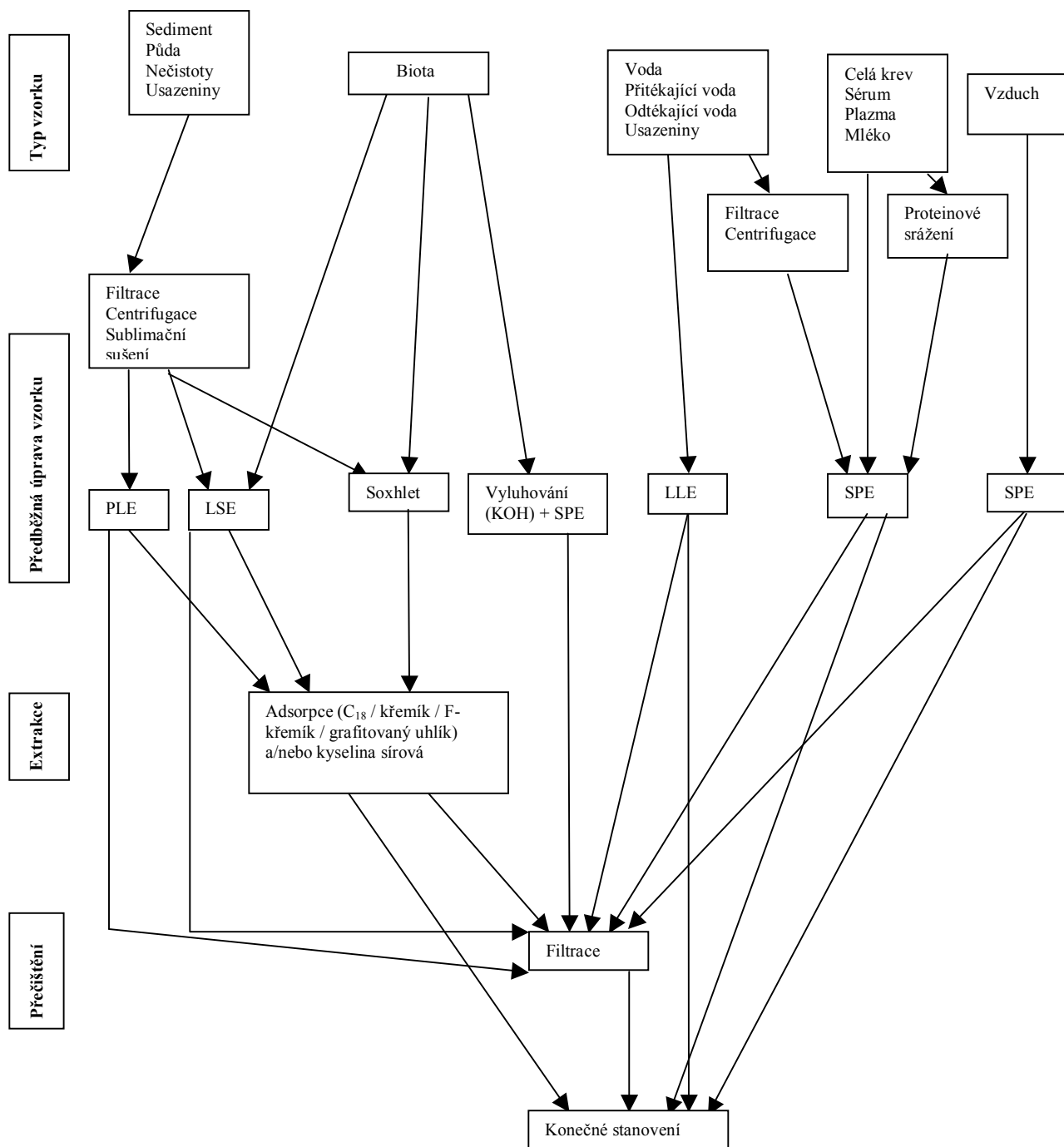
Nakayma a kol. [40] se zabývali vývojem metody stanovení 10 různých PFS v povrchové vodě. Vzorky byly odebrány v Cape Fear v Severní Karolině. Bylo shromážděno 100 vzorků z 80-ti různých lokalit během jara roku 2006. Získané vzorky byly přečištěny extrakcí na pevné fázi a analyzovány vysokoúčinnou plynovou chromatografií. Detegovatelné množství PFS bylo nalezeno ve všech vzorcích, maximální naměřená koncentrace PFOS byla 132 ng/g a PFHpA 329 ng/g. Nejnižší koncentrace perfluorovaných sloučenin byly obecně zjištěny v menších přítocích, naopak nejvyšší v Cape Fear, kde docházelo k jejich větší akumulaci.

Vývojem vysoce citlivé a spolehlivé analytické metody pro stanovení PFOS, PFOA, PFNA a PFOSA v jednotkách ng/l a pg/l ve vzorcích mořské vody se zabýval Yamashita [34]. Vzorky vody byly shromážděny v letech 2002-2004 ze středního až východního Tichého oceánu, jižního Čínského moře, ze středu Atlantského oceánu a z Labradorského moře. PFS byly stanoveny metodou HPLC-MS-MS. PFOA byla nalezena v koncentracích od několika tisíc pg/l ve vzorcích z pobřeží Japonska až do několika desítek pg/l ve vzorcích ze středu Tichého oceánu. PFOA byla hlavním kontaminantem stanoveným v mořské vodě. O něco nižší koncentrace perfluorovaných sloučenin než u PFOA byly zjištěny u PFOS, který byl druhým hlavním kontaminantem.

2.5.3 Další analytické metody

Leeuwen [41] se ve své studii zabývá působením perfluorovaných sloučenin na lidský organismus a na životní prostředí. Zaměřuje se na aktuální techniky pro předběžnou úpravu vzorků, extrakci těchto látek a odstranění iontových a neiontových PFS. SPE je dobrou metodou pro kapalné vzorky a může být plně automatizována. SPE je také nutná pro předběžnou úpravu vzorků například pro odstranění lipidů jejichž přítomnost může ovlivňovat další stanovení. Nejprve byla provedena předběžná úprava vzorků extrakcí. Vzorky vody a vody z čistíren odpadních vod byly přefiltrovány, přičemž může dojít ke ztrátám adsorbci na filtru. Schultz [42] ve své studii uvádí 4 typy filtrů, které jsou vhodné k této filtraci. Jedná se o filtry ze skleněných vláken, nylonu, acetátu celulózy a polyestersulfonu. Vzhledem k různé polaritě PFS se využívá různých druhů extrakcí. Ionizovatelné PFS a sloučeniny s kratším řetězcem (C4-C6) jsou efektivně zachycovány v přítomnosti metanolu a acetonitrilu. U sloučenin s delším řetězcem a méně polárních nebo nepolárních látek je výhodné použít hexan. Na obrázku č.1 jsou uvedeny extrakce a metody přečištění PFA v lidských vzorcích a ve vzorcích životního prostředí. Jak je z tohoto obrázku patrné, je pro různé typy vzorků vhodné použít odlišné způsoby předběžných úprav před jejich konečným stanovením. Například různé druhy vod je třeba nejprve přefiltrovat nebo provést centrifugaci a dále vzorek extrahovat na pevné fázi či kapalinou.

Obr. č. 1 – Schéma předběžné úpravy vzorku, extrakce a metody přečištění PFA v lidských vzorcích a ve vzorcích životního prostředí.



Analýzou C₂-C₁₂ PFS ve vodných vzorcích (řeky, jezera a vodovodu) metodou CE-UV se zabýval Wójcik a kol. [43]. Ke stanovení PFCAs využili 2,4-dinitrobenzoovou kyselinu (2,4-DNBA) jako chromofor pro nepřímou UV detekci. Jako optimální elektrolyt (BGE) byl určen 50 mM TRIS roztok o pH 9,0 s 50% metanolu. Koncentrace PFCAs se v C₂-C₁₂ vzorcích pohybovala od 2 μmol/l do 4 μmol/l. Nejvyšší koncentrace 4 μmol/l byla nalezena v C₁₂ PFCA vzorku.

Dále se analýzou perfluorovaných sloučenin zabýval Song [44] a kol. K jejich stanovení použili velmi citlivou ionizační metodu pro detekci nepolárních látek fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) v negativním módu s přímým dávkováním na kvadrupólový analyzátor (QTOF). Nejnižší limity stanovení (LOD) pro C₆₀ a pentafluoromethylecyklohexan byly určeny na 15 pg, což odpovídá asi 0,2 fmol. Zjistili, že s rostoucí elektronovou afinitou (EA) vzrůstá citlivost stanovení.

2.6 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je analytická metoda, která umožňuje identifikaci a stanovení nejen plynů, ale i všech látek, které lze převést definovaným způsobem na páry. Je definována jako fyzikálně-chemická metoda separace látek ze směsi na základě distribuce mezi dvě heterogenní fáze (stacionární, realizovanou sorpčně aktivní látkou a mobilní fází – nosným plynem). Jde o jednoduchou, citlivou metodu s vysokou separační účinností a rozsáhlými aplikačními možnostmi. Díky těmto vlastnostem lze této metody využít při stanovení perfluorovaných látek ve složkách životního prostředí. Dále je uvedena pouze teorie a popis parametrů používaných běžně v GC, které byly nezbytně nutné pro provedení této práce.

Retenční charakteristiky

Látky studované metodou GC lze kvalitativně charakterizovat tzv. retenčními charakteristikami. Základními retenčními charakteristikami jsou:

t_M – mrtvý retenční čas odpovídá průměrné době, kterou molekuly analytu stráví v mobilní fázi (u GC-FID měřeno nastříknutím např. methanu, u GC-ECD dávkováním vzduchu)

t_R – retenční čas je celková doba, po kterou molekuly analytu setrvávají v koloně; přesněji v měřicím systému od místa nástřiku do místa detekce

t_R' – redukovaný retenční čas odpovídá průměrné době, kterou stráví molekuly analytu ve stacionární fázi

$$t_R' = t_R - t_M \quad (1-1)$$

k – retenční faktor je poměr času, který stráví molekuly analytu ve stacionární fázi a času, který stráví v mobilní fázi, používá se pro obecné vyjádření retence a nezávisí na rozměrech kolony

$$k = t_R' / t_M \quad (1-2)$$

Kromě těchto základních retenčních veličin byly vypracovány ještě další metody kvalitativní analýzy v GC, které ovšem v této práci nejsou používány a jsou uvedeny v mnoha monografiích zabývajících se teorií GC.

Charakteristiky měřicího zařízení

Pro přesné a správné určení limitu detekce (limit of detection, *LOD*) a limitu stanovení (limit of quantitation, *LOQ*) je nezbytná znalost složek signálu měřicího zařízení. Signál měřicího zařízení *S* je tvořen příspěvkem analytu *S_i*, matrice vzorku *S_n* a instrumentace GC *S_{instr}* ($S = S_i + S_n + S_{instr}$). Pro signál analytu *S_i* platí, že je přímo úměrný koncentraci analytu *c_i* a citlivosti měřicího zařízení. Citlivost je vyjádřena jako součin konstrukčních vlastností *K* a specifických vlastností analytu *a_i*. Nezbytnou podmínkou správné kalibrace měřicího zařízení je neměnnost jeho citlivosti v použitém koncentračním intervalu analytu. Vztah mezi signálem, citlivostí, linearitou a koncentrací analytu lze pak vyjádřit vztahem:

$$S_i = (Ka_i) c_i^l \quad (1-3a)$$

Linearita výstupu měřicího zařízení je vyjádřena třemi parametry, které se nazývají koeficient linearity, lineární dynamický rozsah a chyba linearity.

Koeficient linearity *l* je definován jako směrnice funkční závislosti $\log S = f(\log c_i)$ a lze ho vypočítat ze zlogaritmované formy rovnice 1-3a:

$$\log S_i = \log(Ka_i) + l \log c_i \quad (1-3b)$$

$$l = \frac{\log S_i - \log(Ka_i)}{\log c} \quad (1-4)$$

Jako lineární je označováno měřicí zařízení, jehož koeficient lineariry je blízký jedné ($l = 1$). Koeficient lineariry nejnvýznamněji ovlivňuje signál detektoru a měl by být znám pro použité měřicí zařízení a rozsah množství daného analytu. Jelikož koeficient lineariry je mocninou, mění významně velké hodnoty signálu oproti signálům malým. Koeficient lineariry tedy výrazně ovlivňuje tvar elučního píku, a tak i chromatografická vyhodnocení šířky píku, účinnosti, polohy údolí částečně rozlišených píků atd.

Lineární dynamický rozsah je rozsah množství analytu, v němž je citlivost detektoru konstantní v rámci zvolené chyby lineariry, proto pro měřicí zařízení může existovat několik lineárních dynamických rozsahů v rámci zvolené tolerovatelné chyby lineariry (obvykle 5%), tj. $1 \in \langle 0,95, 1,05 \rangle$.

Chyba lineariry představuje předem dohodnutou akceptovatelnou míru odchylek od konstantní hodnoty citlivosti při zachování konstantní hodnoty koeficientu lineariry.

V ý p o č e t LOD a LOQ

V případě hodnoty koeficientu lineariry l blízkému jedné mohou být mez detekce a mez stanovitelnosti vypočítány ze společné směrodatné odchylky regrese $SDR_{[RČ1]}$ (odpovídá hodnotě SD lineární regrese v anglické verzi programu Origin nebo „chybě střední hodnoty“ v programu Excel), kterou získáme lineární regresí závislosti signálu na koncentraci. Pro výpočet LOD je pak brána hodnota signálu rovna $3 \times SDR$ a pro LOQ hodnota $10 \times SDR$. Dosadíme-li za nejmenší signál trojnásobek SDR a za koncentraci LOD do rovnice 1-3a, pak pro $l \sim 1$ dostaneme:

$$LOD = \frac{3SDR}{(Ka_i)} \quad (1-5)$$

Obdobně, dosadíme-li za nejmenší signál pro kvantifikaci desetinásobek SDR a za koncentraci LOQ do rovnice 1-3a, pak pro $l \sim 1$ dostaneme:

$$LOQ = \frac{10SDR}{(Ka_i)} \quad (1-6)$$

Citlivost měřícího zařízení nejsnáze zjistíme z rovnice 1-3b kalibrační závislosti experimentálních dat. Pokud se linearity výrazněji odchylují od jedné, je nutné přejít k výpočtu LOD a LOQ z logaritmické závislosti plochy píku na logaritmu koncentrace, dle vztahu (1-3b). Lineární regresí této logaritmické závislosti získáme společnou směrodatnou odchylku regrese SDR' , která je ovšem odlišná od SDR zmíněné v předchozím případě. Pak je za hodnotu signálu dosazeno $3 \times SDR'$ pro LOD a $10 \times SDR'$ pro $LOQ_{[RC2]}$. Po úpravě dostáváme vztahy pro výpočet LOD (1-7) a LOQ [45-47].

$$LOD = \sqrt[l]{\frac{10^{3SDR'}}{Ka_i}} \quad (1-7)$$

$$LOQ = \sqrt[l]{\frac{10^{10SDR'}}{Ka_i}} \quad (1-8)$$

3. Experimentální část

3.1 Standardy a chemikálie

Byly použity tyto standardy: perfluorhexanová kyselina (<95 %), perfluoroktanová kyselina (95 %, obě Fluka, Lancaster), perfluorheptanová kyselina (<95 %), perfluornonanová kyselina (97 %), perfluordekanová kyselina (98 %), perfluorundekanová kyselina (95 %), perfluordodekanová kyselina (95 %, všechny Sigma–Aldrich, St. Luis, USA).

Použitými chemikáliemi byl hexan (99% Baker Analyzed, Mallinckrodt Baker B.V., Regente, Holandsko), diethyleter, isobutylalkohol (všechny p.a., Lach.-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká Republika), tetrabutylamonium bromid, methyl(terc) butyl éter (oba <98 % Fluka, Steinheim, Německo), pyridin (99 %), chlormravenčan isobutylnatý (98 %, oba Aldrich, Steinheim, Německo) kyselina sírová (95-97 %), síran sodný (99 %, oba Merck, Darmstadt, Německo), redestilovaný methanol a voda (Milli-Q Plus, Millipore).

3.2 Přístrojové vybavení

Téměř všechny analýzy jsem provedla na plynovém chromatografu PU 4600, (Unicam Analytical Systems, York Street, Cambridge, CB 12PX, Velká Británie) s detektorem elektronového záchytu (ECD). Nosným plynem byl dusík (5.0 Linde Technoplyn). Většina měření byla uskutečněna na nízko polární koloně SPB-5 Supelco délky 15 m a vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm . Pro srovnání separace na různých polárních stacionárních fázích byly použity tyto kolony: SPB-1 (Supelco, 30 m, 0,25 ID, film 0,25 μm , 100 % dimethylpolysiloxan), SPB-20 (Supelco, 15 m, 0,25 ID, film 1 μm , 20 % difenyl, 80 % dimethylpolysiloxan), SPB-35 (Supelco, 30 m, 0,25 ID, film 1 μm , 35 % difenyl, 65%), ZB-1701 (Phenomenex, Torrance, USA, 15 m, 0,25 ID, film 0,25 μm , 14 % kyanopropylfenyl, 86 % dimethylpolysiloxan), Supelcowax 10 (Supelco,

30 m, 0,25 ID, film 0,25 μm , polyetylenglykol) a SP-2340 (Supelco, 60 m, 0,25 ID, 0,2 μm , 100 % kyanopropylsiloxan. K zakoncentrování vzorků bylo použito 100 μm polydimethylsiloxanové vlákno (PDMS, Supelco, Bellefonte, USA). Sběr dat a zpracování výsledků bylo provedeno v programu CSW 1.3. (DataApex s.r.o., Jinonice, Česká Republika). Dále bylo měřeno na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem GCMS-GP5050A, (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) s kolonou SPB-5 Supelco délky 15 m o vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm a kolonou SPB-35 délky 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 1 μm . K dispozici byl hmotnostní detektor s EI ionizací (energie 70 eV) a liner pro SPME (ID 1 mm). Ke sběru dat a zpracování výsledků byl použit program LabSolution (GCMSsolution 1.0, Shimadzu). K měření byl také použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem (Bruker Daltonics, Esquire 3000) s kolonou Prontosil o délce 200 mm, vnitřním průměru 2,0 mm a zrnění 3,0 μm . Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Bruker Daltonics DataAnalysis 3.3. Při derivatizaci byly vzorky vytřepávány na třepačce (Vortexgenie 2, Scientific Industrie, Hampshire, Velká Británie) a promíchávány v ultrazvukové lázni (Sonorex RK 100, Bandelin, Barlen, Německo). Při optimalizaci byly vzorky zahřívány na digitálním termostatu (SBH130DC, Stuart, Barloworld Scientific, Staffordshire, Velká Británie). K zakoncentrování reálných vzorků byla použita rotační odparka (Rotavapor EL 130, Büchi, Flawil, Švýcarsko). K pipetování vzorků sloužily automatické pipety 1-5 ml, 100-1000 μl a 10-100 μl (všechny Biohit, Helsinky, Finsko), 50-250 μl (Eppendorf, Hamburg, Německo) a 5-4 μl (Labsystems, Helsinky, Finsko). K dávkování do plynového chromatografu byla použita 5 μl stříkačka a plynotěsná 10 μl stříkačka (obě Hamilton, Reno, USA). Teflonová pánev neznáme značky byla vyrobena roku 2007 v Itálii.

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Zásobní roztoky perfluorovaných kyselin v acetonitrilu

Byly připraveny zásobní roztoky 7 perfluorovaných kyselin. Kyseliny perfluorhexanové (PFHxA), kyseliny perfluoroheptanové (PFHpA), kyseliny perfluorooktanové (PFOA), kyseliny perfluorononanové (PFNA), kyseliny perfluorodekanové (PFDA), perfluoroundekanové kyseliny (PFUnA) a kyseliny perfluorododekanové (PFDoA). Bylo naváženo přibližně přesně 50 mg jednotlivých kyselin, které byly kvantitativně převedeny do polypropylenových odměrek a doplněny do 5 ml acetonitrilem. Tím byly získány zásobní roztoky o koncentracích PFHxA 10,12 mg/ml, PFHpA 10,12 mg/ml, PFOA 10,12 mg/ml, PFNA 10,00 mg/ml, PFDA 10,01 mg/ml, PFUnA 10,04 mg/ml a PFDoA 5,02 mg/ml, která byla z důvodu úspory standardu připravena v poloviční koncentraci.

Pro derivatizaci iontově párovou extrakcí byly výše uvedené zásobní roztoky PFA v acetonitrilu naředěny vodou na požadované koncentrace 0,5, 1 a 2 µg/ml.

3.3.2 Reálný vzorek vody z teflonové pánve

Destilovaná voda o objemu 300 ml byla 10 minut povařena v teflonové pánvi (používané cca 4 měsíce) a poté zakonzentrována na objem 2 ml na vakuové rotační odparce.

3.4 Derivatizace

3.4.1 Derivatizace perfluorovaných kyselin na isobutylestery

Derivatizace PFA byla provedena v polypropylenových vialkách a objemu 2 ml. Reakční médium bylo připraveno o tomto složení: 20 μ l roztoku příslušné kyseliny v acetonitrilu (viz. 3.3.1.), 168 μ l acetonitrilu, 8 μ l isobutylalkoholu, 4 μ l pyridinu a 10 μ l chlormravenčanu isobutylatého jako reakčního činidla. Směs byla míchána 20 s v ultrazvukové lázni a poté nechána v klidu po dobu 8 minut. S přidavkem 200 μ l hexanu byla celá směs 1 minutu třepána na třepačce, nakonec byla odebrána horní hexanová fáze do čisté vialky [29, 30, 31].

3.4.2 Derivatizace perfluorovaných kyselin tepelným rozkladem iontového páru po iontově-párové SPME

Pro iontově párovou extrakci PFA bylo použito PDMS vlákno. Aby bylo vlákno čisté a připravené pro analýzu, musela být nejprve provedena jeho kondicionace zahřátím na teplotu 250°C po dobu 60-ti minut. Poté byly do skleněné vialky odebrány 4 ml připraveného roztoku PFA ve vodě (viz. 3.3.2.) o koncentraci 1 μ g/ml a přidáno 100 μ l 0,5M tetrabutylamonium bromidu jako extrakčního činidla. Vialka s připravenou směsí byla následně plynotěsně uzavřena a bylo do ní vsunuto vlákno. Vlákno bylo celé ponořeno do této směsi a extrakce proběhla za stálého míchání magnetickým míchadlem při laboratorní teplotě po dobu 30-ti minut. Poté bylo dávkováno do GC [27].

3.4.3 Derivatizace perfluorovaných kyselin methanolem po extrakci methyl(terc)butyl éterem

Další derivatizace pro použití PDMS vlákna byla provedena následujícím způsobem. Do polypropylenových mikrozku mávek typu Eppendorf bylo dávkováno 100 μl vodného roztoku příslušné kyseliny o koncentracích 0,5, 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$, přidáno 25 μl 50 % kyseliny sírové a 600 μl MTBE. Vzniklý roztok byl míchán na třepačce po dobu 1 minuty. Poté byla do čisté skleněné vialky odebrána horní éterová fáze, která byla ihned odpařena proudem dusíku do sucha. K odparku bylo přidáno přibližně 0,16 g bezvodého síranu sodného, 10 μl methanolu a 30 μl koncentrované kyseliny sírové. Vialka s připravenou směsí byla následně plynotěsně uzavřena a zahřívána na teplotu 80 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo do vialky vsunuto vlákno a 10 minut probíhala adsorbce methylesteru PFA do vlákna [23].

3.5 Analýzy

3.5.1 GC-ECD

Na plynovém chromatografu PU 4600 s detektorem elektronového záhytu (ECD) byly nejprve analyzovány standardy isobutylesterů perfluorovaných kyselin. Měření bylo provedeno za těchto podmínek: teplota detektoru 300 $^{\circ}\text{C}$, teplota injektoru 250 $^{\circ}\text{C}$, teplota kolony 50 $^{\circ}\text{C}$ a 60 $^{\circ}\text{C}$, měřicí proud detektoru 120 a tlak nosného plynu byl 2 bary. Průtoková rychlost 1 ml/min odpovídala u kolony SPB-5 tlaku 56 kPa, u SPB-20 tlaku 62 kPa, u SPB-1 tlaku 141 kPa, u Supelcowaxu 124 kPa, u SPB-35 tlaku 119 kPa a u kolony SP-2340 tlaku 175 kPa. Všechny analýzy byly provedeny izotermálně při teplotách kolony 50 a 60 $^{\circ}\text{C}$.

Vzorky PFA byly po iontové párové extrakci změřeny na SPB-5 koloně při teplotním programu od 50 $^{\circ}\text{C}$ (3 min, 3 min splitless), 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 200 $^{\circ}\text{C}$ (10 min).

Stejná kolona byla také použita pro analýzu PFA po derivatizaci methanolem a extrakcí metyl(terc)butyl éterem. Během analýz byla teplota detektoru nastavena na 300°C, teplota injektoru 300°C a počáteční teplota kolony 40°C. Ostatní parametry byly stejné jako při analýze isobutylesterů PFA. Analýzy byly provedeny při teplotním programu od 40 °C (3 min, 2 min splitless) 5 °C/min do 70 °C (0 min), 15 °C/min do 220 °C (3 min).

Reálný vzorek získaný povařením destilované vody v teflonové pánvi byl analyzován GC-ECD za stejných podmínek jako PFA po derivatizaci methanolem a extrakcí metyl(terc)butyl éterem.

3.5.2 GC-MS

Isobutylestery byly po derivatizacích proměřeny i na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem na koloně SPB-30 (30 m, 0,25 ID, 1 µm). Pro všechna měření bylo zvoleno toto nastavení: teplota injektoru 250 °C, teplota MS interface 300 °C, 3 minuty splitless, konst. průtok kolonou 1 ml/min. Měření bylo provedeno v SIM módu pro hmoty m/z 69, 169 a 519 odpovídající fragmentům CF₃ a C₃F₇. Teplotní program byl nastaven od 40 °C (5 min), 15 °C/min do 200 °C (3 min).

Dále byl na koloně SPB-30 změřen reálný vzorek vody z teflonové pánve. Při tomto měření byly zachovány stejné parametry měření jako u analýzy tohoto vzorku na GC-ECD (4.1., odst. 3). Teplota injektoru a MS interface byla 250 °C, 3 minuty splitless, průtok kolonou 1 ml/min. Měření bylo provedeno v SCAN módu v rozsahu m/z 50 – 500. Teplotní program byl nastaven od 40 °C (3 min, 2 min splitless), 5 °C/min do 70 °C (0 min), 15 °C/min do 220 (10 min).

3.5.3 HPLC-MS

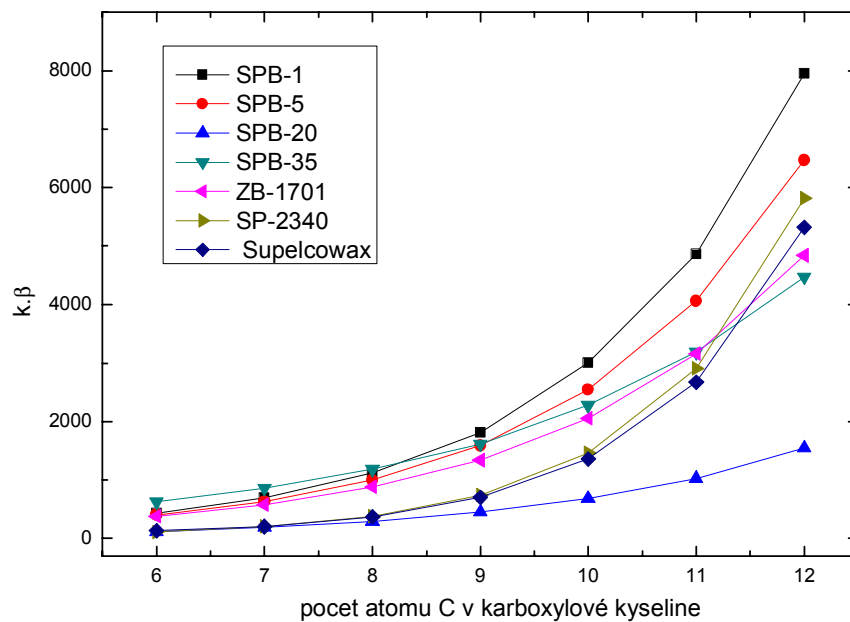
Zásobní roztoky PFA v acetonitrilu (4.3.1.) byly naředěny vodou na koncentrace 0,8, 4, 20 a 100 µg/ml a bez jakékoli derivatizační úpravy stanoveny na HPLC-MS s negativní chemickou ionizací v ESI módu při m/z 413. Byla použita kolona Prontosil (200 mm, 2,0 ID a 3,0 µm). Mobilní fázi byl acetonitril, voda a octan amonný o pH 3,6 v poměru 55 : 15 : 30, průtok kolonou 1 ml/min a maximální tlak 195 bar.

4. Výsledky a diskuze

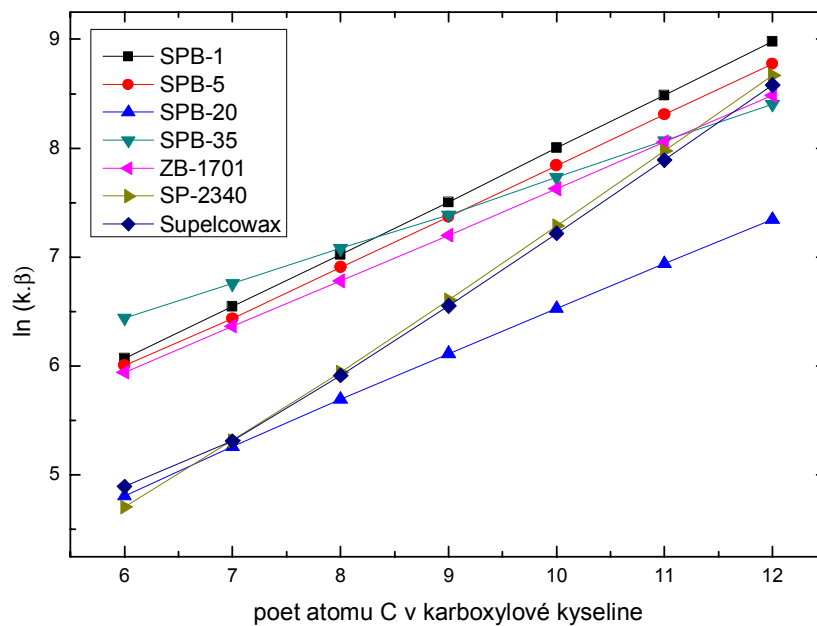
4.1 GC-ECD

4.1.1 Srovnání kolon

Pro výběr nejvhodnější kolony na separaci perfluorovaných kyselin bylo postupně instalováno do plynového chromatografu s ECD detektorem sedm různě polárních kolon. Před kolonu byla navíc vložena 1 m dlouhá kapilára (capillary trap) sloužící k zachycení málo těkavých nečistot, které by jinak mohly znehodnocovat kolonu. Na každé koloně byl změřen mrtvý čas a nastaven objemový průtok kolonou 1 ml/min, dále byl měřen směsný vzorek isobutylesterů sedmi perfluorovaných kyselin (PFH_xA, PFHpA, PFOA, PFNA a PFDA, PFUnA, PFDoA) a nakonec byl proměřen slepý vzorek reakční směsi bez přidaných kyselin. Jelikož byly k dispozici kolony o různých délkách a tloušťkách stacionární fáze, k jejich porovnání posloužily retenční faktory k příslušných isobutylesterů perfluorovaných kyselin korigované fázovým poměrem kolon, které jsou za konstantních experimentálních podmínek nezávislé na parametrech kolon. Byla vynesena závislost korigovaných retenčních faktorů k na počtu atomů uhlíků perfluorovaných kyselin pro jednotlivé kolony (obrázek č. 2 a 3). Kolony jsou v legendě seřazeny podle vzrůstající polarity stacionární fáze od nepolární SPB-1 až po polární Supelcowax.



Obr. č. 2 - Závislost retenčních faktorů k' korigovaných fázovým poměrem kolon na počtu atomů uhlíku v perfluorovaném řetězci kyselin pro jednotlivé kolony, izotermálně při teplotě kolony 60°C, detektoru 300°C a injektoru 250°C.



Obr. č. 3 – Logaritmičká závislost retenčních faktorů k , korigovaných fázovým poměrem kolon na počtu atomů uhlíku v perfluorovaném řetězci kyselin pro jednotlivé kolony. Stejně podmínky analýzy jako u obr. č. 2.

Analýzy byly provedeny izotermálně při teplotách kolony 50 a 60 °C. Podle závislosti retenčních faktorů k na počtu atomů uhlíku v perfluorovaném řetězci kyselin při obou teplotách byla zjištěna určitá vzájemná podobnost chromatogramů. Při teplotě 60 °C ale došlo k lepšímu oddělení analytů, doba analýzy byla kratší a píky byly méně rozmyté. Na obrázku č. 3 je vidět, že všechny kolony, kromě SPB-35, SP-2340 a Supelcowaxu mají téměř stejnou směrnici. Směrnice závislosti udává příspěvek CF_2 skupiny a vzrůstá s polárností kolony. S rostoucím příspěvkem CF_2 skupiny by mělo růst i rozlišení jednotlivých členů homologické řady PFA za stejných experimentálních podmínek. Bohužel ovšem docházelo na těchto kolonách k eluci asymetrických píků. Fázovým poměrem bylo nutné násobit z důvodu odlišné tloušťky filmu u SPB-20, tak aby byly výsledky srovnatelné mezi kolonami. Podle velikosti naměřených hodnot se teoreticky

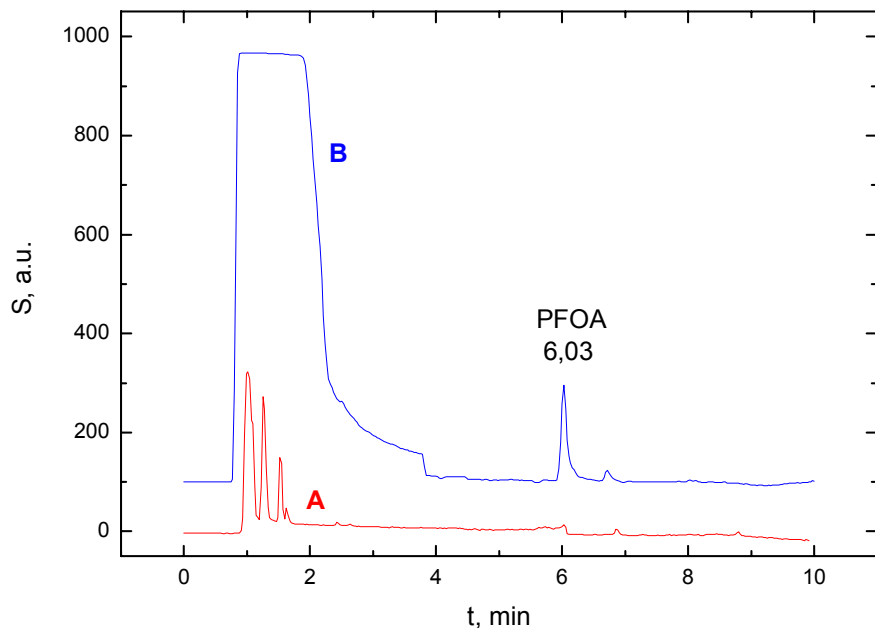
vhodnou kolonou jeví i SPB-1, protože má vysoké retenční faktory k , korigované fázovým poměrem. Z důvodu velmi pomalé analýzy na této koloně a chvostujících píků ke konci analýzy byla za nejvhodnější nakonec vybrána kolona SPB-5, na které jsou všechny píky isobutylesterů perfluorovaných kyselin výrazně separovány a jejich separace je velmi rychlá a účinná. V tabulce jsou znázorněny průměrné retenční faktory a jejich směrodatné odchylky pro jednotlivé kyseliny na různých kolonách, ($n = 3$).

Tabulka č. 4 - Průměrné retenční faktory a směrodatné odchylky jednotlivých PFA na různých kolonách, teplota kolony 60°C.

kolona	SPB-1		SPB-5		SPB-20		SPB-35		ZB-1701		SP-2340		Supelco-wax	
	β													
	250		250		62,5		62,5		250		50		250	
počet uhlíků	k	SD	k	SD	k	SD	k	SD	k	SD	k	SD	k	SD
6	1,70	0,019	1,62	0,000	1,95	0,00	2,51	0,008	1,51	0,014	0,44	0,009	0,53	0,000
7	2,73	0,038	2,53	0,007	3,08	0,008	3,44	0,011	2,28	0,022	0,81	0,039	0,81	0,000
8	4,41	0,064	4,00	0,005	4,74	0,00	4,74	0,016	3,44	0,019	1,52	0,017	1,48	0,000
9	6,94	0,37	6,35	0,000	7,22	0,012	6,48	0,086	5,28	0,033	2,96	0,026	2,80	0,005
10	11,84	0,23	10,17	0,009	10,95	0,012	9,13	0,037	8,10	0,045	5,85	0,071	5,45	0,005
11	19,18	0,256	16,25	0,012	16,47	0,045	12,75	0,042	12,46	0,084	11,63	0,145	10,69	0,026
12	31,36	0,344	25,87	0,052	24,78	0,025	17,89	0,063	19,10	0,104	23,26	0,412	21,68	0,073

4.1.2 Derivatizace PFA tepelným rozkladem iontového páru po iontově-párové SPME

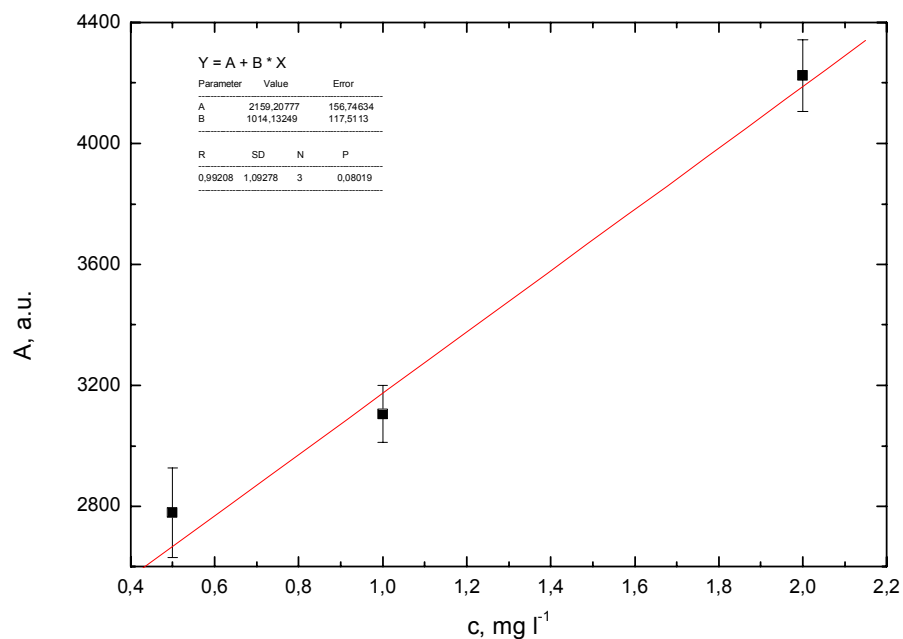
SPB-5 kolona byla po výše uvedených analýzách zvolena jako nejvhodnější pro analýzu PFA. Nejprve byla provedena derivatizace a analýza PFOA. Tato kyselina s 8 atomy uhlíku se nachází uprostřed řady našich standardů a navíc je průmyslově nejvíce využívána a v reálných vzorcích stanovována v nejvyšších koncentracích. PFOA o koncentracích 10, 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$ byla zderivatizována iontově párovou extrakcí na pevné fázi a stanovena GC-ECD při teplotním programu uvedeném v kapitole 3.5.1. Z obrázku č. 6 je patrné že plocha píku PFOA o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ je minimální, pík je nesymetrický a rozmytý. Proto jsme v další analýze přistoupili k vyšší koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Porovnáním poměru šumu a signálu PFOA při koncentracích 10 a 50 $\mu\text{g/ml}$ bylo zjištěno, že při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ je plocha píku PFOA reprodukovatelná, pík je poměrně symetrický a není rozmytý (obr. č. 4). Minimální stanovitelná koncentrace PFOA 50 $\mu\text{g/ml}$ po derivatizaci iontově párovou extrakcí tedy vypovídá o nedostatečné citlivosti této metody.



Obr. č. 4 - Chromatogramy butylesteru kyseliny perfluoroktanové po iontové párové extrakci na pevné fázi: **A** - 10 $\mu\text{g/ml}$ a **B** - 50 $\mu\text{g/ml}$, teplota detektoru 300 $^{\circ}\text{C}$, teplota injektoru 300 $^{\circ}\text{C}$, teplotní program: 50 $^{\circ}\text{C}$ (3 min, 2 min splitless) 10 $^{\circ}\text{C/min}$ do 200 $^{\circ}\text{C}$ (10 min).

4.1.3 Derivatizace perfluorovaných kyselin methanolem po extrakci methyl(terc)butyl éterem

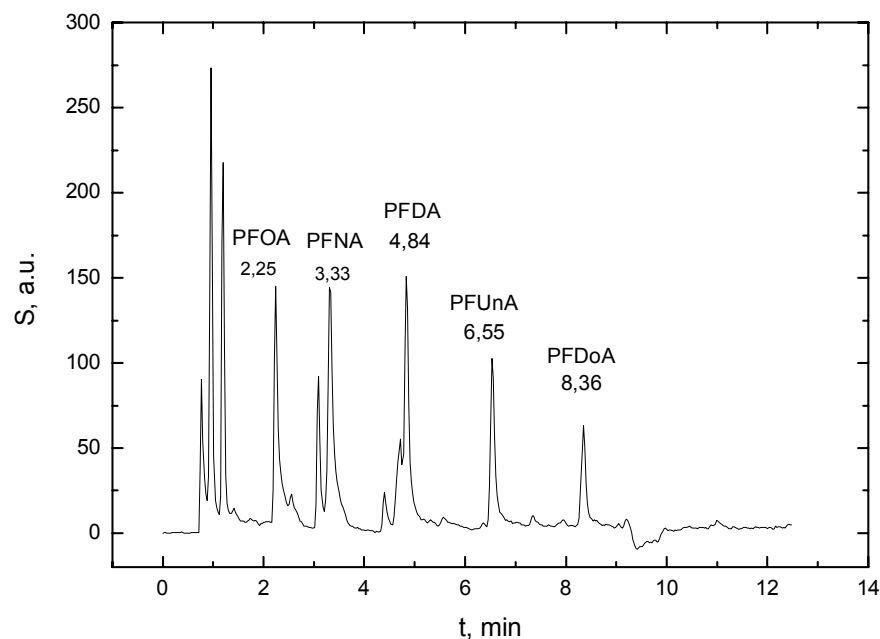
Po zjištění nedostatečné citlivosti předchozí metody byla provedena analýza PFA po extrakci methyl(terc)butyl éterem. Nejprve byly připraveny roztoky PFOA o koncentracích 0,5, 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$ a změřena kalibrační řada (obr. č. 5). Teplotní program a podmínky analýzy jsou popsány v kapitole 3.5.1.



Obr. č. 5 – Kalibrační závislost methylesteru kyseliny perfluoroktanové, teplota detektoru 300 °C, teplota injektoru 300 °C, teplotní program: 40 °C (3 min, 2 min splittles), 5 °C/min do 70 °C (0 min), 15 °C/min do 220 °C (3 min).

Byla stanovena mez detekce PFOA 0,065 µg/ml a mez stanovitelnosti 0,078 µg/ml. Derivatizace methanolem po extrakci methyl(terc)butyl éterem se tedy jeví jako poměrně citlivá úprava PFA a může být dále použita pro prekoncentraci reálného vzorku.

Dále byl za stejných podmínek jako u obr. č. 5 změřen směsný vzorek PFA (obr. č. 6)

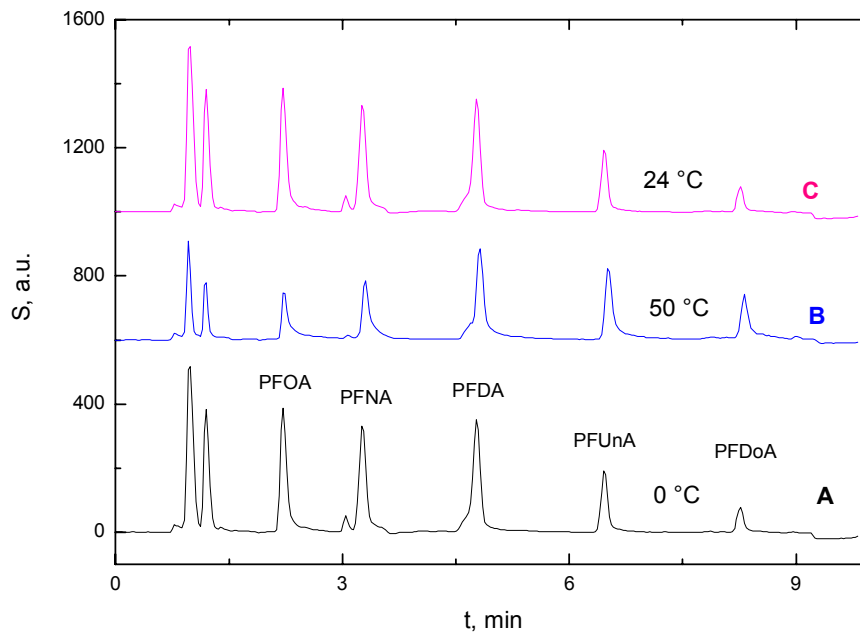


Obr. č. 6 – Chromatogram směsného vzorku perfluorovaných kyselin (všechny 1 $\mu\text{g/ml}$) zderivatizovaných na methylestery, extrakce za laboratorní teploty, (podmínky měření viz. obr. č.5).

Jak je z obrázku č. 6 vidět, došlo k rozdělení všech perfluorovaných kyselin. Menší pík předcházející PFNA a PFDA se nepodařilo identifikovat, tyto píky se nachází i ve slepém vzorku a ani změnou teplotního programu se je nepodařilo odseparovat od kyselin. Reálným vysvětlením může být přítomnost látek, které jsou při analýze uvolňovány z PDMS vlákna a proto se objevují ve všech analýzách. Tyto píky byly později identifikovány GC-MS jako cyklopolysiloxany a tím potvrzeno jejich uvolňování z PDMS vlákna.

4.1.4 SPME extrakce za různých teplot

Jelikož byla derivatizace po extrakci methyl(terc)butyl éterem účinnou a citlivou derivatizační metodou, byla provedena její optimalizace. PFA byly extrahovány na PDMS vlákno při laboratorní teplotě a teplotách 0 a 50 °C . Chromatogram směsného vzorku PFA zderivatizovaných na methylestery a extrahovaných do vlákna za laboratorní teploty je znázorněn výše (obrázek č. 8). Extrakce PFA do PDMS vlákna při laboratorní teplotě a teplotách 0 a 50 °C jsou znázorněny na obr. č. 7.



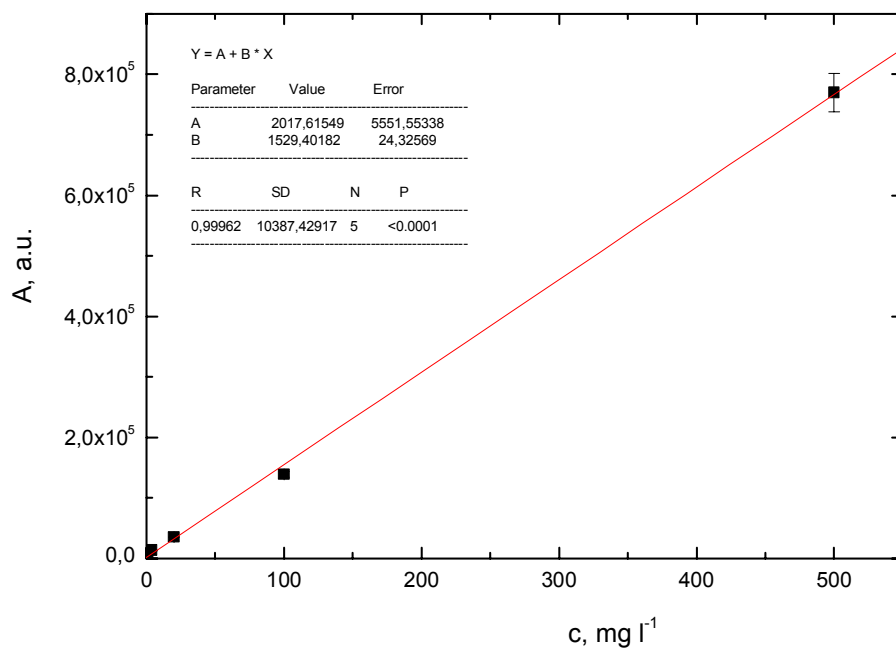
Obr. č. 7 – Chromatogram směsného vzorku perfluorovaných kyselin (všechny 1 µg/ml) zderivatizovaných na methylestery, extrakce při teplotě 0 °C (A), při teplotě 50 °C (B) a při laboratorní teplotě (C), (podmínky měření viz. obr. č. 5).

Jak je z obrázku č. 7 patrné, mají píky směsného vzorku PFA zderivatizovaných na methylestery extrakcí při laboratorní teplotě téměř všechny stejnou intenzitu. Ke

snižování intenzity a plochy píku dochází až s rostoucí délkou uhlíkového řetězce, protože dochází ke snižování tenze páry za dané teploty. U kratších perfluorovaných kyselin dochází při chlazení na 0 °C až k dvojnásobnému zvýšení intenzity píků PFA a snižuje se také vliv vedlejších píků. Například u PFDA došlo ke koeluci s vedlejším píkem a vznikl jeden rozmytý pík. Při zahřívání na teplotu 50 °C vzrostla intenzita málo těkavých kyselin, více těkavé PFA mají stejnou intenzitu jako při extrakci za laboratorní teploty. Pro kyseliny s delším řetězcem (PFUnA a PFDA) je tedy vhodnější zvolit extrakci při vyšší teplotě (50 °C), naopak kyseliny s kratším řetězcem (PFOA – PFDA) je výhodnější extrahovat za snížené teploty (0 °C). Jako optimální byla nakonec zvolena extrakce při laboratorní teplotě, kdy intenzita píků není tolik ovlivněna délkou perfluorovaného řetězce.

4.2 GC-MS

K porovnání detekčních limitů a limitů stanovitelnosti GC-ECD, GC-MS a HPLC-MS byly proměřeny kalibrační závislosti směsi sedmi perfluorovaných kyselin na GC-MS. Kalibrační řada obsahovala vzorky jednotlivých PFA o koncentraci 0,8, 4, 20, 100 a 500 µg/ml zderivatizovaných chlormravenčanem metodou uvedenou v kapitole 4.4.1. Teplotní program a podmínky analýzy jsou popsány v kapitole 5.2. Ze získaných údajů byly vyneseny kalibrační závislosti pro výpočet linearity, meze stanovitelnosti a detekce. Zde je uvedena jako příklad kalibrační závislost isobutylesteru PFHxA (obr. č. 8) Ostatní kalibrační závislosti všech isobutylesterů jsou uvedeny v příloze (obr. č. 15 až 20).



Obrázek č. 8 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluorhexanové ve splitless módu. Teplota injektoru 250 °C, teplota MS interface 300 °C. Teplotní program od 40 °C (5 min), 15 °C/min do 200 °C (3 min).

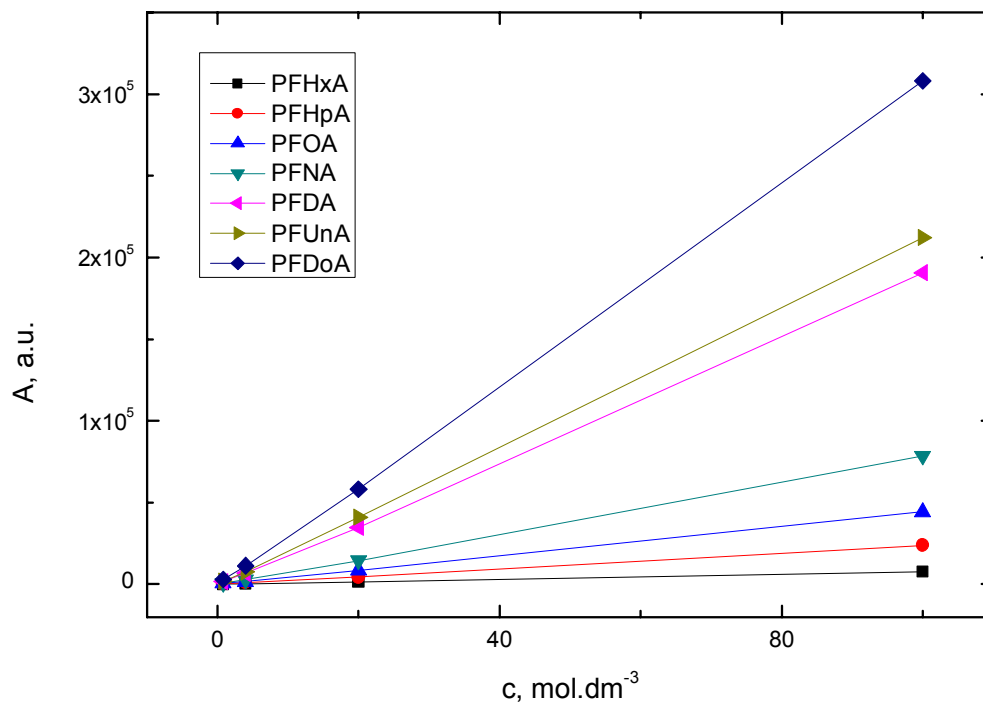
Tabulka č. 5 – Detekční limity a limity stanovitelnosti isobutylesterů perfluorovaných kyselin ve splitless módu, GC-MS

	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
PFHxA	15,0	51,0
PFHpA	9,42	9,43
PFOA	8,00	8,01
PFNA	35,4	59,1
PFDA	1,20	4,30
PFUnA	1,20	3,50
PFDoA	2,00	6,80

V tabulce jsou uvedeny meze detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé PFA změřené GC-MS. Nejnižší mez detekce mají PFDA a PFUnA, naopak nejvyšší PFHxA. Mez stanovitelnosti je nejmenší u PFUnA a nejvyšší u PFHxA.

4.3 HPLC-MS

Pro porovnání citlivosti HPLC-MS s GC-ECD a GC-MS byly dále proměřeny naředěné zásobní roztoky PFA v acetonitrilu o koncentracích 0,8, 4, 20, 100 µg/ml bez jakékoli derivatizační úpravy metodou HPLC-MS s negativní chemickou ionizací v ESI módu. Podmínky analýzy jsou popsány v kapitole 3.5.3. Na obrázku č. 9 jsou znázorněny kalibrační závislosti všech PFA při různých koncentracích.



Obr. č. 9 - Kalibrační závislosti jednotlivých PFA o koncentracích 0,8, 4, 20 a 100 µg/ml. Mobilní fáze acetonitril, voda a octan amonný o pH 3,6 v poměru 55 : 15 : 30, průtok kolonou 1 ml/min a maximální tlak 195 bar.

Tabulka č. 6 – Detekční limity a limity stanovitelnosti perfluorovaných kyselin HPLC-MS.

	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
PFHxA	0,113(3)	0,113(4)
PFHpA	0,169	0,170
PFOA	0,010(0)	0,010(1)
PFNA	0,159	0,160
PFDA	0,151(2)	0,151(4)
PFUnA	0,142(1)	0,142(2)
PFDoA	0,142	0,143

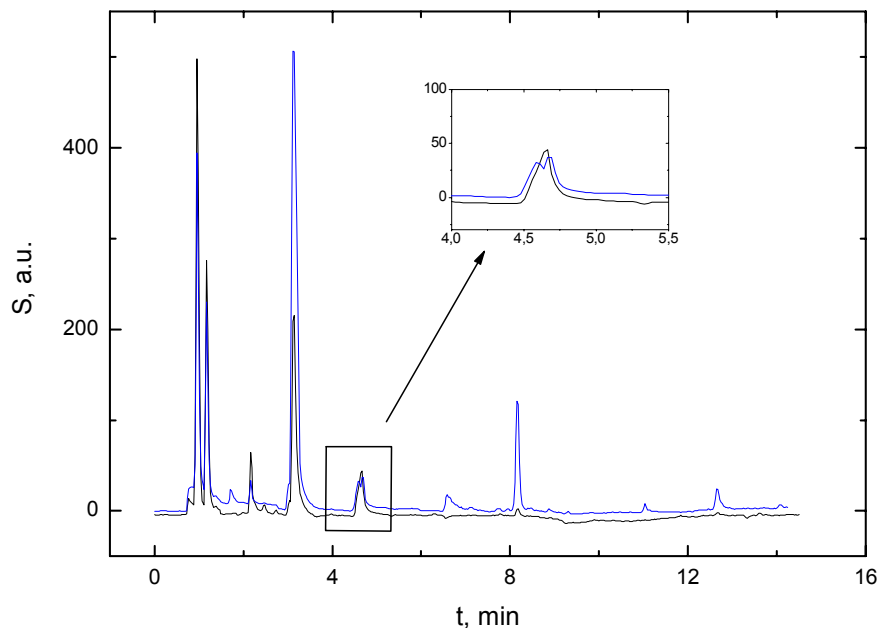
Nejnižší mez detekce 0,01 µg/ml byla určena u PFOA mez stanovitelnosti 0,01 µg/ml také u PFOA. Nejvyšší limit detekce 0,169 µg/ml a stanovitelnosti 0,170 µg/ml byl určen u PFHpA.

Po naměření kalibračních závislostí na GC-ECD, GC-MS a HPLC-MS byla porovnána citlivost těchto analytických přístrojů pro analýzu perfluorovaných kyselin. Porovnáním naměřených LOD a LOQ hodnot methylesterů PFA po extrakci methyl(terc)butyl éterem (GC-ECD), isobutylesterů PFA po extrakci chlormravenčanem isobutylnatým (GC-MS) a PFA bez derivatizační úpravy (HPLC-MS) bylo zjištěno, že stanovení PFA metodami GC-ECD a HPLC-MS je z těchto tří technik, nehledě na způsob derivatizace, nejcitlivější a určené hodnoty meze detekce a stanovitelnosti se pohybují v desetinách µg/ml. Hodnoty určené GC-MS a se pohybovaly v jednotkách až desítkách µg/ml. Z tohoto

porovnání vyplývá, že pro další analýzy PFA je vhodnější dát přednost GC-ECD nebo HPLC-MS před GC-MS.

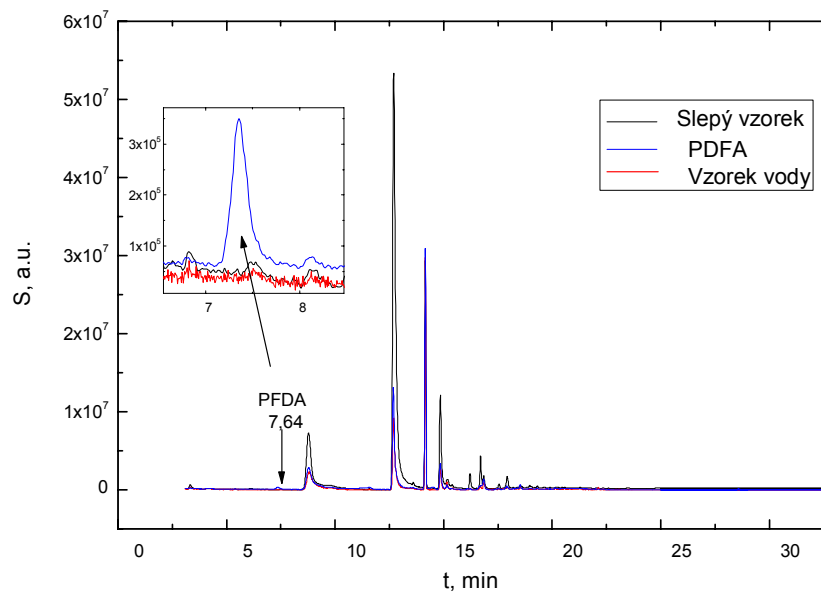
4.4 Prekoncentrace a stanovení reálného vzorku

Bylo zjištěno a následně publikováno v odborných časopisech, že se PFS mimo jiné vyskytují také v teflonovém nádobí. Například PFOA se používá jako pomocné činidlo při výrobě polytetrafluoretylenu (PTFE) známého spíše pod názvem Teflon. Z tohoto důvodu byly provedeny pokusy s teflonovou pánví, aby byla prokázána přítomnost či nepřítomnost těchto látek. Vzorek vody byl připraven a zakoncentrován postupem uvedeným v kapitole 4.3.3, poté derivatizován metodou (viz. kap. 4.4.3). a stanoven na plynovém chromatografu s ECD detektorem. Podmínky analýzy jsou popsány v kapitole 5.1.

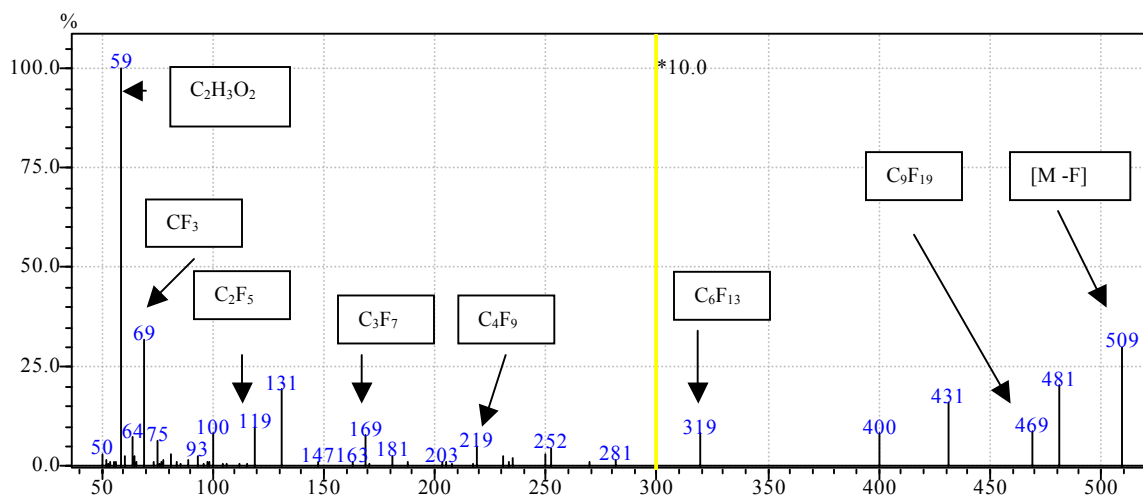


Obr. č. 10 – GC-ECD chromatogram vzorku vody z teflonové pánve (modrý) a slepého vzorku (černý) PFA po extrakci methyl(terc)butyl éterem a derivatizaci na methylester. Teplota detektoru a injektoru byla 300°C, teplotní program od 40°C (3 min, 2 min splittles), 5°C/min do 70°C, 15°C/min do 220°C (3 min).

Jak je z tohoto obrázku vidět, v kritické oblasti kde eluuje PFDA se nachází i pík slepého vzorku. Podle zkušeností z předchozích měření to může znamenat že PDMS vlákno uvolňuje látky se stejným retenčním časem jako PFDA nebo se opravdu může jednat o pík PDFA. Pro úplné vyloučení přítomnosti či nepřítomnosti PDFA i jiných PFS byla analýza reálného vzorku ověřena i na GC-MS. Kromě píku u 4. minuty (v rámečku) se v reálném vzorku nachází další píky s vyšší intenzitou než u slepého vzorku, u těchto píků však nebyla zjištěna žádná shoda s perfluorovanými kyselinami.

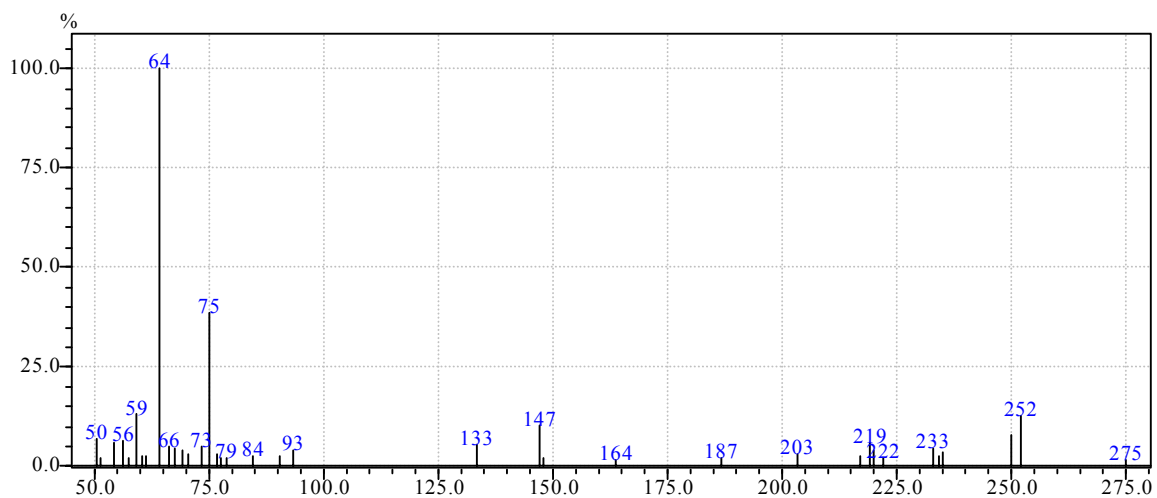


Obr. č. 11 – GC-MS chromatogram vzorku vody z teflonové pánve (růžový), slepého vzorku (černý) a standardu PFDA (modrý) po extrakci methyl(terc)butyl éterem a derivatizaci na methylester. Podmínky měření stejné jako u obrázku č. 10.

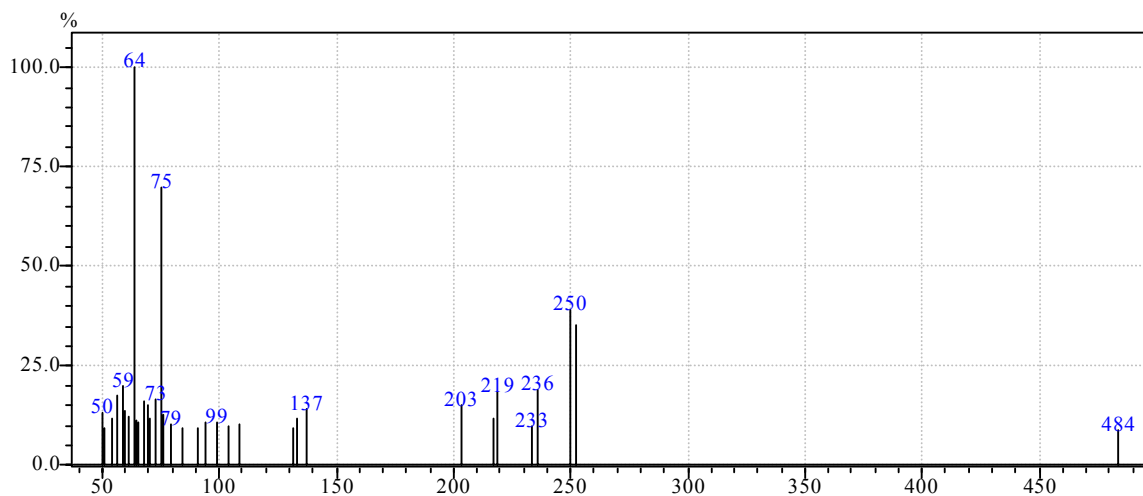


Obr. č. 12 – Hmotnostní spektrum standardu PFDA zderivatizovaného na methylester po extrakci methyl(terc)butyl éterem v čase maxima píku 7,64 min. Teplota injektoru a MS interface byla 250°C, splitless od 3. minuty, průtok kolonou 1 ml/min. Měření bylo provedeno v SCAN módu v rozsahu m/z 50 – 500. Teplotní program od 40 °C (3 min, 2 min splitless), 5 °C/min do 70 °C (0 min), 15 °C/min do 220 (10 min).

Hmoty m/z 69, 169 a 519 svědčí o přítomnosti methylesteru v roztoku standardu PFDA.



Obr. č. 13 – Hmotnostní spektrum slepého vzorku zderivatizovaného na methylester po extrakci methyl(terc)butyl éterem ve stejném čase jako u obr. č. 12. Podmínky měření stejné jako u obr. č. 12.



Obr. č. 14 – Hmotnostní spektrum vzorku vody z teflonové pánve zderivatizovaného na methylester po extrakci methyl(terc)butyl éterem ve stejném čase jako u obr. č. 12. Podmínky měření stejné jako u obr. č. 12.

V tomto hmotnostním spektru vody z teflonové pánve nejsou přítomny žádné fragmenty dokazující přítomnost PFDA ani jiné PFA. Tímto bylo dokázáno, že teflonová pánve v neuvolňuje žádné perfluorované sloučeniny množství detekovatelném touto analytickou metodou.

5. Shrnutí

1. Bylo provedeno srovnání kapilárních kolon pro izotermální separaci perfluorovaných kyselin. Jako nejvhodnější byla vybrána kolona SPB-5, na které došlo k výrazné separaci isobutylesterů PFA, jejich separace byla ve srovnání s ostatními kolonami rychlá a účinná.

2. Byla vyzkoušena metoda stanovení perfluorovaných kyselin ($C_6 - C_{12}$) pomocí plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu po převedení PFA na butylestery tepelným rozkladem iontového páru v nástřikovém prostoru GC po iontově-párové SPME. Tato metoda nevykazovala vysokou citlivost stanovení ($50 \mu\text{g/ml}$), proto nebyla pro další analýzy použita.

3. Dále byla vypracována citlivá metoda stanovení methylesterů perfluorovaných kyselin ($C_6 - C_{12}$) po extrakci methyl(terc)butyl éterem metodou plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu. Byla určena mez detekce PFOA $0,065 \mu\text{g/ml}$ a mez stanovitelnosti PFOA $0,078 \mu\text{g/ml}$.

4. Na GC-MS byly proměřeny kalibrační závislosti všech isobutylesterů PFA a určeny meze detekce a stanovitelnosti pro tyto látky. Nejnížší mez detekce $1,2 \mu\text{g/ml}$ a mez stanovitelnosti $4,3 \mu\text{g/ml}$ byla určena u perfluordekanové kyseliny. Nejvyšší mez detekce $15,0 \mu\text{g/ml}$ a mez stanovitelnosti $51,0 \mu\text{g/ml}$ byla určena u kyseliny perfluorhexanové.

5. Na HPLC-MS byly proměřeny kalibrační závislosti všech PFA a určeny meze detekce a stanovitelnosti pro tyto látky. Nejnížší mez detekce $0,01 \mu\text{g/ml}$ byla určena u PFOA mez stanovitelnosti $0,01 \mu\text{g/ml}$ také u PFOA. Nejvyšší limit detekce $0,169 \mu\text{g/ml}$ a stanovitelnosti $0,170 \mu\text{g/ml}$ byl určen u PFHpA.

6. Byla porovnána citlivost analytických přístrojů GC-ECD, GC-MS a HPLC-MS pro analýzu perfluorovaných kyselin. Porovnáním naměřených LOD a LOQ hodnot methylesterů PFA po extrakci methyl(terc)butyl éterem (GC-ECD), isobutylesterů PFA po derivatizaci chlormravenčanem isobutylnatým (GC-MS) a PFA bez derivatizační úpravy (HPLC-MS) bylo zjištěno, že stanovení PFA metodami GC-ECD a HPLC-MS je z těchto tří technik, nehledě na způsob derivatizace, nejcitlivější a určené hodnoty meze detekce a stanovitelnosti se pohybují v desetinách $\mu\text{g/ml}$. Hodnoty určené GC-MS a se pohybovaly v jednotkách až desítkách $\mu\text{g/ml}$. Z tohoto porovnání vyplývá, že pro další analýzy PFA je vhodnější dát přednost GC-ECD nebo HPLC-MS před GC-MS. Vzhledem k tomu, že kalibrace byla na GC-MS provedena bez předchozí prekoncentrační úpravy vzorků a tudíž detekční limity byly až stonásobně vyšší než u GC-ECD s prekoncentrací vzorků, je možné že při využití prekoncentrační techniky analýzy PFA na GC-MS dojde k výraznému poklesu detekčních limitů jednotlivých kyselin.

7. Bylo provedeno stanovení perfluorovaných kyselin v reálném vzorku vody z teflonové pánve. Při daném rozmezí hodnot LOD a LOQ, které tato metoda poskytuje se v reálném vzorku vody z teflonové pánve nepodařilo nalézt žádné perfluorované sloučeniny.

6. Závěr

Cílem diplomové práce bylo vyvinout účinnou prekoncentrační metodu pro stanovení perfluorovaných organických kyselin ve vodě metodou plynové chromatografie.

Nejprve byla vybrána nejvhodnější kolona pro separaci PFA, a to kapilární kolona SPB-5.

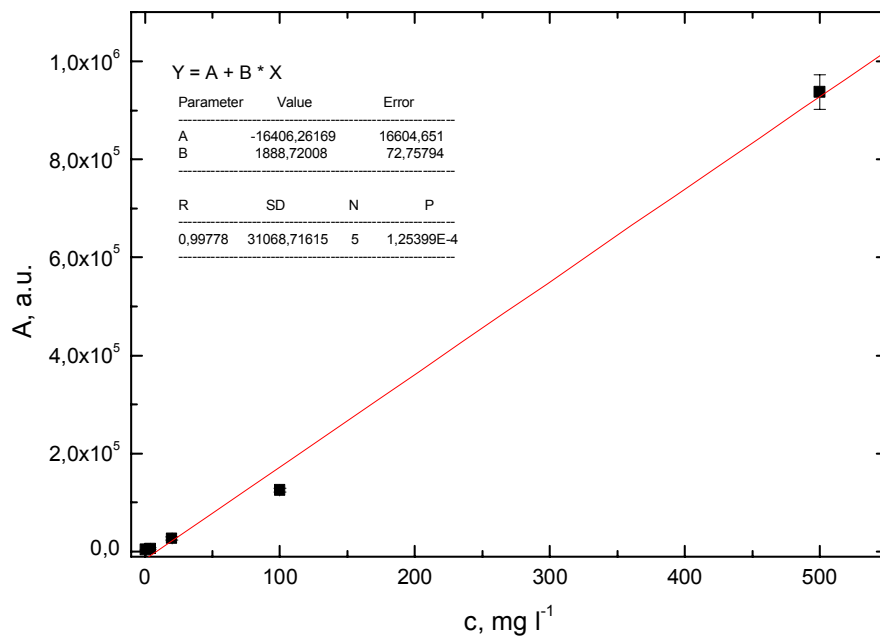
Dále bylo přistoupeno k prekoncentraci vzorků. Po zjištění nedostatečné citlivosti derivatizace PFA na isobutylestery byla vypracována a optimalizována derivatizace perfluorovaných kyselin ($C_6 - C_{12}$) methanolem po extrakci methyl(terc)butyl éterem metodou GC-ECD. Tato prekoncentrační metoda byla dostatečně citlivá (LOD a LOQ v desetinách $\mu\text{g/ml}$) a mohla být dále použita pro prekoncentraci reálného vzorku vody.

Bylo zjištěno, že při daném rozmezí hodnot LOD a LOQ, které tato metoda poskytuje se v reálném vzorku vody z teflonové pánve nepodařilo nalézt žádné perfluorované sloučeniny.

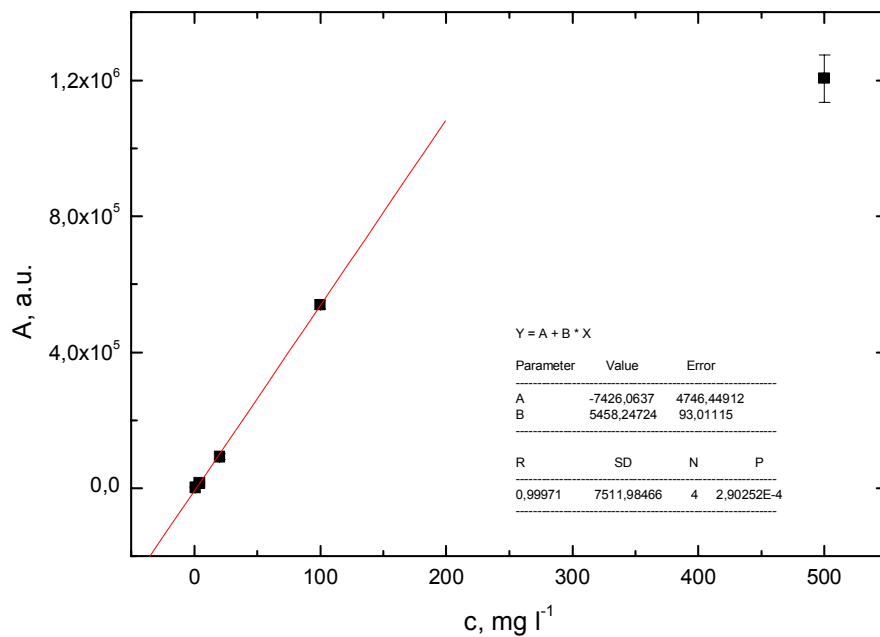
Z tohoto důvodu bychom se měli v budoucnu zabývat dalšími způsoby prekoncentrace a úpravami vzorků, při kterých bychom byli schopni detekovat PFA v ještě nižších koncentracích.

7. Přílohy

Kalibrační závislosti isobutylesterů perfluorovaných kyselin, GC-MS.

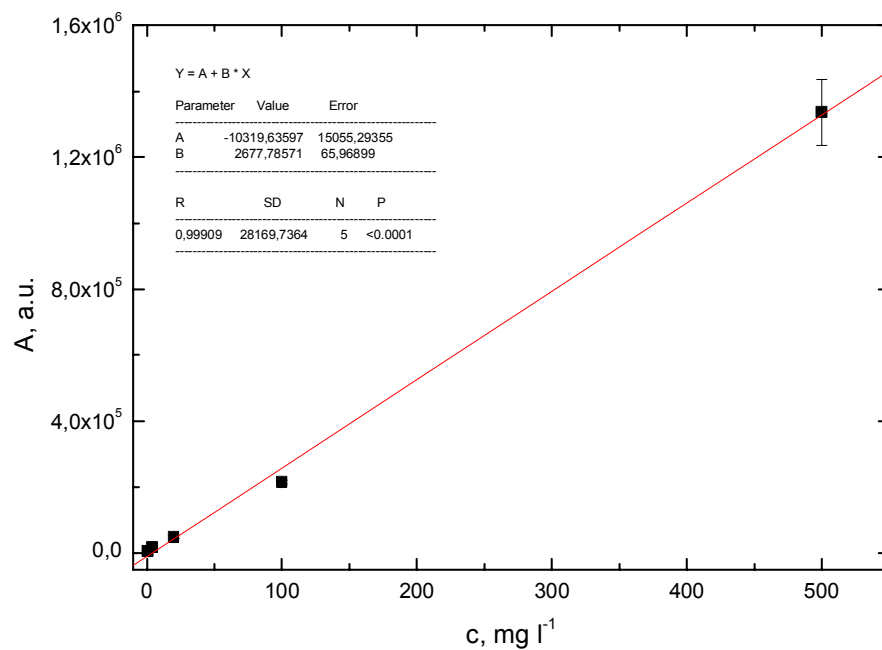


Obrázek č. 15 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluorheptanové ve splitless módu (GC-MS). Podmínky měření stejné jako u obrázku č. 8.

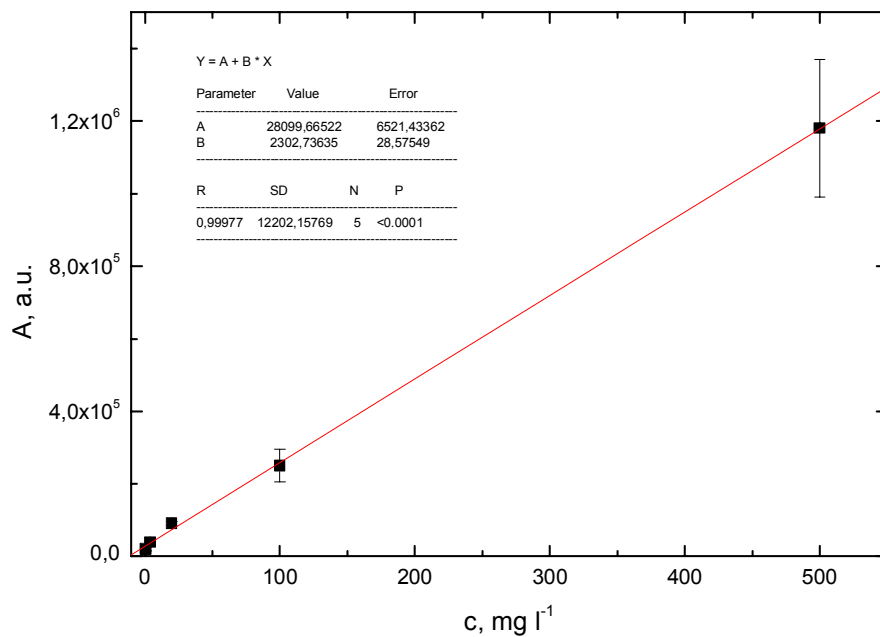


Obrázek č. 16 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové ve splitless módu (GC-MS). Podmínky měření stejné jako u obrázku č. 8.

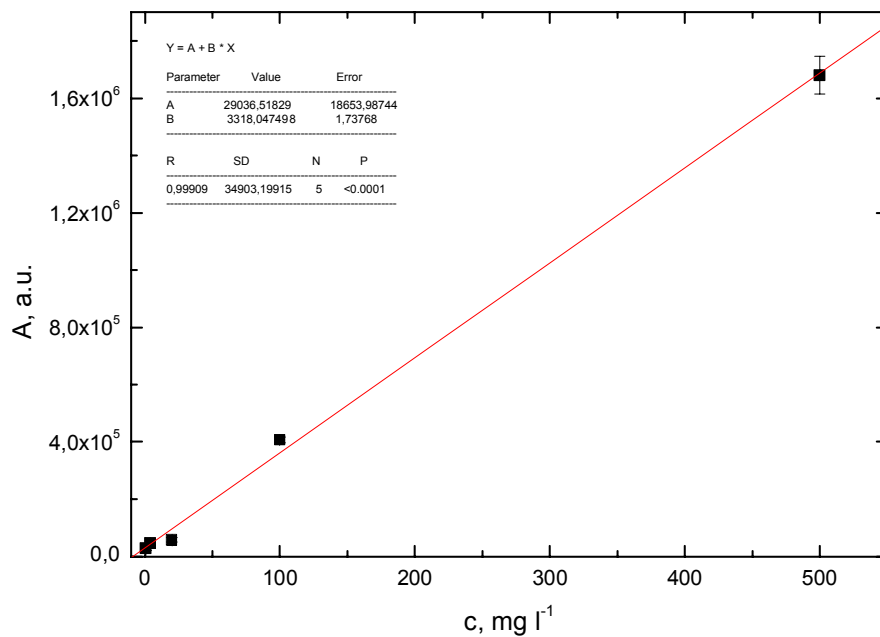
Kalibrační závislost PFOA byla určena pouze v koncentračním rozmezí od 0,8 do 100 µg/ml. Koncentrace 500 µg/ml nebyla zahrnuta z důvodu velmi velké odchylky od lineárního průběhu, což mohlo být způsobeno hrubou chybou při stanovení.



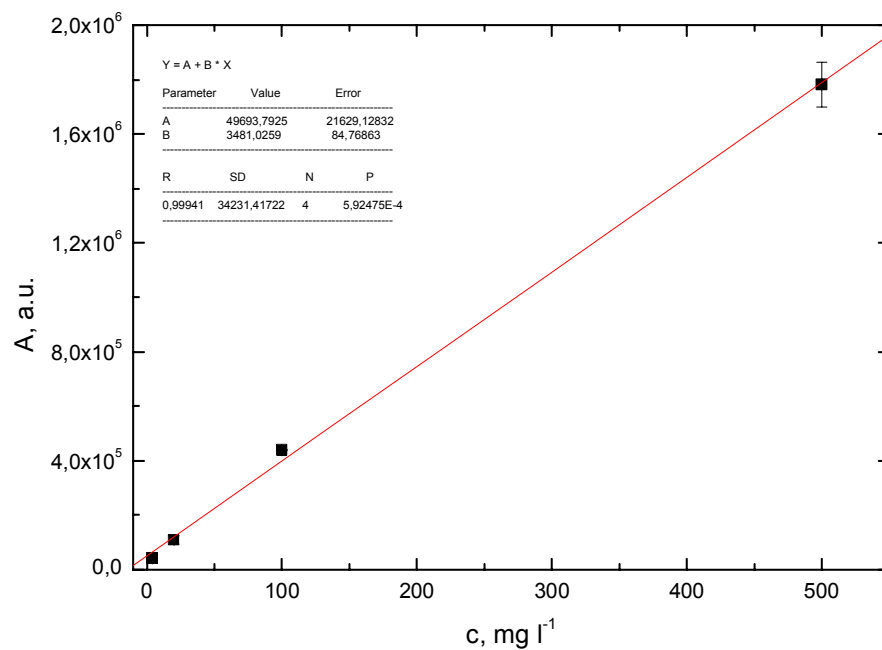
Obrázek č. 17 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluoromonanové ve splitless módu (GC-MS). Podmínky měření stejné jako u obrázku č. 8.



Obrázek č. 18 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordekanové ve splitless módu (GC-MS). Podmínky měření stejné jako u obrázku č. 8.



Obrázek č. 19 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluorundekanové ve splitless módu (GC-MS). Podmínky měření stejné jako u obrázku č. 8.



Obrázek č. 20 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordodekanové ve splitless módu (GC-MS). Podmínky měření stejné jako u obrázku č. 8.

8. Seznam zkratek a symbolů

A - plocha píku

a.u. - arbitrární jednotka signálu (Arbitrary unit)

AFFF - speciální protipožární pěna (Aqueous film forming foam)

a_i - fyzikální vlastnosti analytu

APFOA - amonná sůl perfluoroktanové kyseliny

c - molární koncentrace

EPA - agentura ochrany životního prostředí USA (Environmental Protection Agency)

FTCA - fluortelomerní karboxylová kyselina

FTOH - fluortelomerní alkohol

FTUCAs - fluorotelomerní nenasycená karboxylová kyselina

GC-ECD - plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu

GC-EI-MS - plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a ionizací nárazem elektronů

GC-MS - plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

GC-NCI-MS - plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a negativní chemickou ionizací

H - výškový ekvivalent teoretického patra

IP extrakce - iontově-párová extrakce

k - retenční faktor

L - délka kolony

l - koeficient linearity

LC-MS-MS - kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

LLE - extrakce kapaliny kapalinou

LOD - limit detekce

LOQ - limit stanovitelnosti

LSE - extrakce kapalina - pevná látka

M 570 - *N*-methylperfluoroktansulfonamidacetát

m/z - poměr hmotnosti a náboje

MTBE - methyl(terc)butyl eter

N-EtFOSE - *N*-etylperfluoroktansulfonamidetanol
NIST knihovna MS spekter amerického úřadu pro standardizaci
PDMS - polydimethylsiloxan
PFA - perfluorovaná kyselina
PFS - perfluorovaná sloučenina
PFCA - perfluorkarboxylová kyselina
PFDA - perfluordekanová kyselina
PFDoA - perfluordodekanová kyselina
PFHpA - perfluorheptanová kyselina
PFHxA - perfluorhexanová kyselina
PFNA - perfluornonanová kyselina
PFOA - perfluoroktanová kyselina
PFOS - perfluoroktansulfonát
PFOSA - perfluoroktansulfonamid
PFOSF - perfluoroktansulfonylfluorid
PFUnA - perfluorundekanová kyselina
PLE - tlaková extrakce kapalinou
PTFE - polytetrafluorethylen (Teflon)
PVDF - polyvinylidenfluorid
S - signál
SD - směrodatná odchylka
SIM - detekce iontu o zvolené hodnotě *m/z*
SPE - extrakce na tuhé fázi
SPME - mikroextrakce na tuhé fázi
t - čas
T - teplota
TG - triglycerid
t_M - mrtvý čas mobilní fáze
t_R - retenční čas

t_R' - redukovaný retenční čas

u - lineární průtoková rychlost

V - objem

$w_{1/2}$ - šířka píku v polovině výšky

^{19}F NMR - nukleární magnetická rezonance izotopu ^{19}F

9. Použitá literatura

- [1] Hájková, K.; Tomaniová, M.; Hajšlová, J.
Perfluorované perzistentní kontaminanty v potravních řetězcích
www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-10-04.pdf
- [2] de Voogt P.; Sáez M.
Analytical chemistry of perfluoralkylated substances
Trends in Analytical Chemistry, **25**, 326-342 (2006)
- [3] Moody, C. A.; Field, J. A.
Perfluorinated Surfactants and the Environmental Implications of Their Use in Fire-Fighting Foams
Environ. Sci. Technol., **34**, 3864-3870 (2000)
- [4] Tseng, C. L.; Liu, L. L.; Chen, C. M.; Ding, W. H.
Analysis of Perfluorooctansulfonate and Related Fluorochemicals in Water and Biological Tissue Samples by Liquid Chromatography-ion Trap Mass Spectrometry
J. Chromatogr. A., 1105, 119-126 (2006)
- [5] Schultz M. M.; Barofsky D. F.; Field J. A.
Quantitative Determination of Fluorotelomer Sulfonates in Groundwater by LC-MS/MS
Environ. Sci. Technol., **38**, 1828-1835 (2004)
- [6] Sinclair E.; Mayack D. T.; Roblee K.; Yamashita N.; Kannan K.
Occurrence of Perfluoroalkyl Surfactants in Water, Fish, and Birds from New York State
Arch. Environ. Contam. Toxicol., **50**, 398-410 (2006)
- [7] Martin, J. W.; Muir, D. C. G.; Moody, C. A.; Ellis, D. A.; Kwan, W. C.; Solomon, K. R.; Mabury, S.
Collection of Airborne Fluorinated Organics and Analysis by Gas Chromatography/Chemical Ionization Mass Spectrometry
Anal. Chem., **74**, 584-590 (2002)
- [8] Mawn, M. P.; McKay, R. G.; Ryan, T. W.; Szostek, B.; Powley, C. R.; Buck, R. C.

Determination of Extractable Perfluorooctanoic Acid (PFOA) in Water, Sweat Simulant, Saliva Simulant, and Methanol from Textile and Carpet Samples by LC-MS-MS

Analyst, **130**, 670-678 (2005)

- [9] Flaherty, J. M.; Connolly, P. D.; Decker, E. R.; Kennedy, S. M.; Ellefson, M. E.; Reagen, W. K.; Szostek B.

Quantitative Determination of PFOA in Serum and Plasma by LC-MS-MS

J. Chromatogr. B, **819**, 329-338 (2005)

- [10] González-Barreiro C.; Martínez-Carballo E.; Sitka A.; Scharf S.; Gans O.

Method optimization for determination of selected perfluorinated alkylated substances in water samples

Anal. Bioanal. Chem., **386**, 2123-2132 (2006)

- [11] Villagrasa M.; López de Alda M.; Barceló D.

Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry: a review

Anal. Bioanal. Chem., **386**, 953-972 (2006)

- [12] Hashikawa Y.; Kawasaki M.; Waterland R. L.; Hurley M. D.; Ball J. C.; Wallington T. J.; Sulbaek Anderson M. P.; Nielsen O. J.

Gas phase UV and IR absorption spectra of $C_xF_{2x+1}CHO$ ($x = 1-4$)

Journal of Fluorine Chemistry, **125**, 1925-1932 (2004)

- [13] Kaiser M. A.; Larsen B. S.; Kao C. C.; Buck R. C.

Vapor Pressures of Perfluorooctanoic, -nonanoic, -decanoic, -undecanoic, and -dodecanoic Acids

J. Chem. Eng. Data, **50**, 1841-1843 (2005)

- [14] Kannan K.; Choi J. W.; Iseki N.; Senthilkumar K.; Kim D. H.; Masunaga S.; Giesy J. P.

Concentrations of perfluorinated acids in livers of birds from Japan and Korea

Chemosphere, **49**, 225-231 (2002)

- [15] 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**, 545-551 (2002)
- [16] Kärrman, 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**, 864-870 (2005)
- [17] Yamamoto, T.; Noma, Y.; Sakai, S. I.; Shibata, I.
Photodegradation of Perfluorooctan Sulfonate by UV Irradiation in Water and Alkaline 2-propanol
Environ. Sci. Technol., **41**, 5660-5665 (2007)
- [18] 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 β -Oxidation
Biol. Pharm. Bull., **26**, 47-51 (2003)
- [19] Hanson, M. Z.; Small, J.; Sibley, P. K.; Boudreau, T. M.; Brian, R. A.; Mabury, S. A.; Solomon, K. R.
Microcosm Evaluation of the Fate, Toxicity, and Risk to Aquatic Macrophytes from Perfluorooctanoic Acid (PFOA)
Arch. Environ. Contam. Toxicol., **49**, 307-316 (2005)
- [20] Jahnke A.; Ahrens L.; Ebinghaus R.; Berger U.; Barber J. L.; Temme C.
An improved method for the analysis of volatile polyfluorinated alkyl substances in environmental air samples
Anal. Bioanal. Chem., **387**, 965-975 (2007)
- [21] Houde, M.; Martin, J. W.; Letcher, R. J.; Salomon, K. R.; Muir, D. C. G.
Biological Monitoring of Polyfluoroalkyl Substance: A Review
Environ. Sci. Technol., **40**, 3463-3473 (2006)
- [22] Dinglasan, M. J. A.; Ye, Y.; Edwards, E. A.; Mabury, S. A.
Fluorotelomer Alcohol Biodegradation Yields Poly- and Perfluorinated Acids
Environ. Sci. Technol., **38**, 2857-2864 (2007)

- [23] Wu, F.; Gabryelski, W.; Froese, K.
Improved Gas Chromatography Methods for Micro-volume Analysis of Haloacetic Acids in Water and Biological Matrices
Analyst, **127**, 1318-1323 (2002)
- [24] Alzaga, R.; Salgado-Pentinal, C.; Jover, E.; Bayona, J. M.
Development of procedure for the determination of perfluorocarboxylic acids in sediments by pressurised fluid extraction, headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatographic-mass spectrometric determination
J. Chromatogr. A, **1083**, 1-6 (2005)
- [25] Moody C. A.; Field J. A.
Determination of Perfluorocarboxylates in Groundwater Impacted by Fire-Fighting Activity
Environ. Sci. Technol., **33**, 2800-2806 (1999)
- [26] Scott, B. F.; Moody, C. A.; Spencer, C.; Small, J. M.; Muir, D. C. G.; Mabury, S. A.
Analysis for Perfluorocarboxylic Acids/Anions in Surface Waters and Precipitation Using GC/MS and Analysis of PFOA from Large-Volume Samples
Environ. Sci. Technol., **40**, 6405-6410 (2006)
- [27] Saradhi Vijaya, U. V. R.; Prabhakar, S.; Jagadeshwar, R. T.; Vairamani, M.
Ion-pair solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometric determination of acidic hydrolysis products of chemical warfare agents from aqueous samples
J. Chromatogr. A, **1129**, 9-13 (2006)
- [28] Alzaga, R.; Peña, A.; Ortiz, L.; Bayona, J., M.
Determination of Linear Alkylbenzenesulfonates in Aqueous Matrices by Ion-pair Solid-phase Microextraction-in port Derivatization-Gas Chromatography-Mass Spectrometry
J. Chromatogr. A, **999**, 51-60 (2003)
- [29] Hušek P.
Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents
J. Chromatogr. B, **717**, 57-91 (1998)

- [30] Hušek P.; Šimek P.; Matucha P.
Smooth Esterification of Di- and Tricarboxylic Acids with Methyl and Ethyl Chloroformates in
Gas Chromatographic Profiling of Urinary Acidic Metabolites
Chromatographia, **58**, 623-630 (2003)
- [31] Maradová D.
Stanovení C₇ a C₈ perfluorovaných kyselin metodou plynové chromatografie
Bakalářská práce, Katedra analytické chemie (2006)
- [32] Scott, B. F.; Spencer, C.; Mabury, S. A.; Muir, D. C. G
Poly and Perfluorinated Carboxylates in North American Precipitation
Environ. Sci. Technol., **40**, 7167-7174 (2006)
- [33] Yamashita, N.; Kannan, K.; Taniyasu, S., I.; Horii, Y., Petrick, G., Gamo, T.
A global survey of perfluorinated acids in oceans
Marine Pollution Bulletin., **51**, 658-668 (2005)
- [34] Moody, C. A.; Martin, J. W.; Kwan, W. C.; Muir, D. C. G.; Mabury, S. A.
Determination of Perfluorinated Surfactants in Surface Water Samples by Two Independent Analytical
Techniques: Liquid chromatography/ tandem mass spectrometry and ¹⁹F NMR
Anal. Chem., **73**, 2200-2206 (2001)
- [35] G. W. Olsen, H. -Y. Huang, J. Helzlsouer, K. J. Hansen, J. Butenhoff, J. H. Mandel
Historical Comparison of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorooctanoate and Other Fluorochemicals in
Human Blood
Environmental Health Perspectives, **113**, 539-545 (2005)
- [36] Tittlemier, S.; Ryan, J. J.; Oostdam, Van J.
Presence of Anionic Perfluorinated Organic Compounds in Serum Collected from Northern Canadian
Populations
Organohalogen Compounds, **66**, 4009-4014 (2004)
- [37] Berger, U.; Jarnberg, U.; Kallenborn, R.
Perfluorinated Alkylated Substance (PFAS) in the European Nordic Environment
Organohalogen Compound, **66**, 4046-4052, (2004)

- [38] Stadalius, M.; Connoly, P.; L'Empereur, K.; Flaherty, J. M.; Isemura, T.; Kaiser, M. A.; Knaup, W.; Noguchi, M.
A method for the low-level (ng/g) determination of Perfluorooctanoate in paper and textile by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry
J. Chromatogr. A., **1123**, 10-14 (2006)
- [39] Butt, C. M.; Mabury, S. A.; Muir, D. C. G.; Braune, B. M.
Prevalence of long-chained Perfluorinated Carboxylates in Seabirds from the Canadian Arctic between 1975 and 2004
Environ. Sci. Technol., **41**, 3521-3528 (2007)
- [40] Nakayama, S.; Strynar, M. J.; Helfant, J.; Egeghy, P.; Ye, X.; Lindstrom, A. B.
Perfluorinated compounds in the Cape Fear Drainage Basin in North Carolina
Environ. Sci. Technol., **41**, 5271-5276 (2007)
- [41] Leeuwen, Van S. P. J.; Boer, de J.
Extraction and clean-up strategies for analysis of poly- and perfluoralkyl substance in environmental and human matrices
J. Chromatogr. A., **1153**, 172-185 (2007)
- [42] Schultz, M. M., Baforsky D. F., Field J. A.
Quantitative Determination of Fluorotelomer Sulfonates in Groundwater by LC MS/MS
Environ. Sci. Technol., **38**, 1828-1835 (2004)
- [43] Wójcik, L.; Korczak, K.; Szostek, B.; Trojanowicz, M.
Separation and Determination of Perfluorinated Carboxylic Acids using Capillary Zone Electrophoresis with Indirect Photometric Detection
J. Chromatogr. A., **1128**, 290-297 (2006)
- [44] Song, L.; Wellman, A. D.; Yao, H.; Adcock, J.
Elektron Capture Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spektrometry: Analysis of Fullerenes, Perfluorinated Compounds and Pentafluorbenzyl derivatives
Rapid commun. in Mass Spektrometry, **21**, 1343-1351 (2007)

[45] Smolková E.; Feltl L.

Analýza látek v plynném stavu

Praha, SNTL (1991)

[46] Opekar F.; Jelínek I.; Rychlovský P.; Plzák Z.

Základní analytická chemie

Praha, Nakladatelství Karolinum (2003)

[47] Štulík K. a kol.

Analytické separační metody

Praha, Nakladatelství Karolinum (2004)