

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Bc. NICOLETTE HATASOVÁ

Fluórované mikropolutanty v životnom prostredí

Fluorinated micropollutants in the environment

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, pod odborným vedením prof. RNDr. Tomáše Cajthamla, Ph.D. a konzultanta Mgr. Jaroslava Semeráda. V práci jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu, v souladu s právními předpisy a vnitřními předpisy Univerzity Karlovy. Tato práce nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13.8.2019

Bc. Nicolette Hatasová

Podakovanie

Touto cestou by som sa rada poďakovala svojmu vedúcemu diplomovej práce, prof. RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, rady a čas strávený pri vypracovaní tejto práce. Poďakovanie patrí taktiež Mgr. Jaroslavovi Semerádovi za jeho pomoc, čas a energiu strávenú pri experimentálnej časti práce. Vďaka patrí aj ostatným členom laboratória environmentálnej biotechnológie na Mikrobiologickom ústave AV ČR, hlavne RNDr. Jane Holecovej. V neposlednom rade chcem poďakovať aj svojej rodine, ktorá ma po celý čas morálne podporovala a verila v moje úspešné absolvovanie magisterského štúdia.

Abstrakt

Perfluórované látky (PFCs) sa radia medzi perzistentné organické polutanty. Ich rozsiahle použitie v koncových produktoch určených pre nás, spotrebiteľov vedie k nárastu ich výskytu v povrchovej a podzemnej vode, pôde a vzduchu a celkovo vo svetovom ekosystéme. V tejto diplomovej práci bola vyvinutá metóda na stanovenie 19 perfluórovaných látok. Táto metóda bola použitá pre detekciu PFCs v reálnych vzorkách pitnej vody a vo vzorkách čistiarenskeho kalu v Českej republike. Metóda je založená na pre-extrakcii vzoriek a následnej kvapalinovej chromatografii s hmotnostným detektorom s negatívnou chemickou ionizáciou (LC-MS). Na stanovenie vodných vzoriek bola vyvinutá metóda extrakcie na pevnej fáze (SPE), pomocou ktorej boli vyhodnotené reálne koncentrácie PFCs v 8 vzorkách pitnej vody z ČR. Celkový súčet koncentrácií analyzovaných PFCs vo vzorkách bol 4 – 23 ng/L. Pri spracovaní čistiarenskeho kalu pomocou zrýchlenej extrakcie rozpúšťadlom (ASE) bol pozorovaný maticový efekt, ktorý ovplyvňoval ionizáciu a viedol k falošným, pozitívnym resp. negatívnym výsledkom. Pre odstránenie maticových látok boli použité kolónky SPE ENVI-Carb. Pomocou takto optimalizovanej metódy bolo analyzovaných celkovo 23 vzoriek čistiarenských kalov z rôznych lokalít v ČR. Najviac zastúpená látka vyskytujúca sa v životnom prostredí, perfluóroktán sulfonát (PFOS), bol detegovaný v reálnych vzorkách kalu v rozmedzí 5 – 386 ng/g. Celková koncentrácia C4-C14 perfluórovaných karboxylových kyselín vo vzorkách kalu dosahovala hodnôt až 126 ng/g. Najvyšší výskyt PFOS a perfluóroktánovej kyseliny (PFOA) v kale bol spojený s čistiarňami v blízkosti priemyselnej oblasti.

Kľúčové slová: fluórované látky, PFOS, stanovenie, monitoring

Abstract

Perfluorinated compounds (PFCs) are considered as persistent organic pollutants. Their extensive use in various products leads to increase of their occurrence in surface and ground water, soil, air and, generally, in the global ecosystem. In this diploma thesis, method for detection and quantification of 19 perfluorinated compounds was developed. This method was used for analysis of real drinking water and sewage sludge samples from Czech Republic. It is based on pre-extraction step and consecutive liquid chromatography with mass spectrometry, using negative chemical ionization (LC-MS). We developed a method for analysis of water samples, using solid-phase extraction (SPE). Using this method, concentrations of PFCs in 8 samples of drinking water from Czech Republic were evaluated. Total concentration of analyzed PFCs was 4 – 23 ng/L. Processing of sewage sludge samples using accelerated solvent extraction (ASE) showed matrix effect, which influenced ionization and led to false positive/negative results. For suppression of the matrix compounds, we used SPE Envi-Carb columns. Using this optimised method, 23 sewage sludge samples from different locations in Czech Republic were analyzed. The most represented PFC in the environment, perfluorooctane sulfonate (PFOS), was detected in concentrations 5 – 386 ng/g. Total concentration of C4-C14 perfluorinated carboxylic acids in sewage sludge samples reached 126 ng/g. The highest concentrations of PFOS and PFOA were connected with water treatment plants in vicinity of industrial production.

Key words: fluorinated compounds, PFOS, determination, monitoring

OBSAH

1. ÚVOD	- 10 -
2. TEORETICKÁ ČASŤ	- 11 -
2.1 OBECNÉ VLASTNOSTI (PER)FLUÓROVANÝCH LÁTKO	- 11 -
2.1.1 Štruktúra perfluórovaných látok	- 11 -
2.2 VYUŽITIE (PER)FLUÓROVANÝCH LÁTKO	- 13 -
2.2.1 Zdravotníctvo	- 16 -
2.2.2 Agrochemikálie	- 16 -
2.2.3 Povrchovo aktívne látky a obalové materiály	- 16 -
2.3 VÝSKYT (PER)FLUÓROVANÝCH LÁTKO	- 17 -
2.3.1 Atmosférická depozícia	- 17 -
2.3.2 Produkty osobnej starostlivosti	- 17 -
2.3.3 Potraviny a obalové materiály	- 18 -
2.3.4 Ryby a vodný ekosystém	- 18 -
2.3.5 Pôda a sediment	- 19 -
2.3.6 Kaly z čistiarní odpadových vôd	- 19 -
2.4 TOXICITA PFCS A ÚČINKY NA ŽIVÉ ORGANIZMY	- 20 -
2.4.1 Toxické efekty na organizmy	- 20 -
2.4.2 Bioakumulácia v organizmoch	- 22 -
2.5 LEGISLATÍVNE OPATRENIA TÝKAJÚCE SA PFCS	- 24 -
2.6 METÓDY DETEKcie A KVANTIFIKÁCIE PFCS V ŽIVOTNOM PROSTREDÍ	- 26 -
2.6.1 Analýza PFCS	- 26 -
2.6.2 Extrakčné techniky	- 27 -
3. CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE	- 29 -
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	- 30 -
4.1 POUŽITÝ MATERIÁL A PRÍSTROJE	- 30 -
4.1.1 Štandardy	- 30 -
4.1.2 Použitý materiál a chemikálie	- 30 -
4.1.3 Analyzovaný materiál	- 31 -
4.1.4 Prístrojové vybavenie	- 32 -
4.2 Postup práce	- 32 -
4.2.1 Úprava vzoriek	- 33 -
4.2.2 Umelá kontaminácia vzoriek	- 34 -
4.2.3 Extrakcia pevných a vodných vzoriek	- 34 -

4.2.4	Prečistenie extraktov.....	- 36 -
4.2.5	Analytické stanovenia	- 39 -
5.	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	- 40 -
5.1	VÝVOJ LC-MS/MS METÓDY	- 40 -
5.1.1	Naladenie hmotnostného spektrometra	- 40 -
5.1.2	Optimalizácia chromatografických podmienok	- 41 -
5.1.3	Validácia LC-MS/MS metódy.....	- 43 -
5.2	ANALÝZA KVAPALNÝCH VZORIEK	- 44 -
5.2.1	Vplyv pH na extrakciu vodných vzoriek	- 45 -
5.3	EXTRAKČNÁ METÓDA PRE PEVNÉ VZORKY	- 46 -
5.3.1	Testovanie rôznych podmienok pre ASE extrakciu	- 46 -
5.3.2	Vplyv pH rozpúšťadla na extrakciu.....	- 49 -
5.3.3	Matricový efekt	- 49 -
5.4	ZAVEDENIE METODIKY NA PREČISTENIE VZORIEK.....	- 51 -
5.4.1	SPE kolónky so sorbentom	- 52 -
5.4.2	Metóda QuEACHERS.....	- 54 -
5.4.3	Zhodnotenie účinnosti prečistovacích metód.....	- 54 -
5.5	STANOVENIE KONCENTRÁCIE PFCs V REÁLNYCH VZORKÁCH	- 56 -
5.5.1	Koncentrácia PFCs v reálnych vodných vzorkách	- 56 -
5.5.2	Koncentrácia PFCs vo vzorkách kalu z ČOV.....	- 57 -
6.	ZÁVER	- 61 -
7.	LITERATÚRA.....	- 62 -

Zoznam skratiek

ACN	Acetonitril
AFFF	Vodná hasiaca pena (z angl. Aqueous fire-fighting foam)
ASE	Zrýchlená extrakcia rozpúšťadlom (z angl. Accelerated solid extraction)
ČOV	Čistiareň odpadových vôd
EDCs	Endokrinné disruptory (z angl. Endocrine Disrupting Chemicals)
EO	Ekvivalentní obyvatelia
EtFOSA	<i>N</i> -etyl perfluórooktyl sulfonamid (z angl. <i>N</i> -Etyl perfluorooctyl sulfonamid)
FA	Kyselina mravčia (z angl. Formic acid)
FOCs	Fluórované org. látky (z angl. Fluorinated organic compounds)
FOSA	Perfluóroktánsulfonamid
GC	Plynová chromatografia (z angl. Gas chromatography)
HPLC	Vysoko účinná kvapalinová chromatografia (z angl. High performance liquid chromatography)
LOD	Limit detekcie (z angl. Limit of Detection)
LOQ	Limit kvantifikácie (z angl. Limit of Quantification)
ME	Matricový efekt (z angl. Matrix effect)
MeFBSA	<i>N</i> -Metyl perfluorobutane sulfonamid
MeOH	Metanol
MQ	Milli-Q voda, ultra čistá voda
MRM	Monitorovanie vybraných reakcií (z angl. Multiple reaction monitoring)
MS	Hmotnostná spektrometria (z angl. Mass spectrometry)
OECD	Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development)
N/D	Nedetekovaný (z angl. Not detected)
PCB	Polychlórované bifenyly

PCPs	Produkty osobnej starostlivosti (z angl. Personal Care Products)
PFBA	Perfluórobotánová kys. (z angl. Perfluorbutyric acid)
PFBS	Perfluórobotán sulfónát (z angl. Perfluorobutane sulfonate)
PFCs	Perfluórované zlúčeniny (z angl. Perfluorinated compounds)
PFDA	Perfluórodekánová kys. (z angl. Perfluorodecanoic acid)
PFDoA	Perfluórododekánová kyselina (z angl. Perfluorododecanoic acid)
PFHpA	Perfluóroheptánová kys. (z angl. Perfluoroheptanoic acid)
PFHxA	Perfluórohexánová kys. (z angl. Perfluorohexanoic acid)
PFHxDA	Perfluórohexadekánová kys. (z angl. Perfluorohexadecanoic acid)
PFHxS	Perfluórohexán sulfónát (z angl. Perfluorohexane sulfonate)
PFNA	Perfluórononánová kys. (z angl. Perfluorononanoic acid)
PFOA	Perfluóroktánová kys. (z angl. Perfluorooctanoic acid)
PFODA	Perfluóroktadekánová kys. (z angl. Perfluorooctadecanoic acid)
PFOS	Perfluóroktán sulfónát (z angl. Perfluorooctane sulfonate)
PFOSA	Perfluóroktán sulfónamid (z angl. Perfluorooctanesulfonamide)
PFPeA	Perfluóropentánová kys. (z angl. Perfluoropentanoic acid)
PFTeDA	Perfluórotetradekánová kys. (z angl. Perfluorotetradecanoic acid)
PFTTrDA	Perfluórotridekánová kys. (z angl. Perfluorotridecanoic acid)
PFUdA	Perfluóroundekánová kys. (z angl. Perfluoroundecanoic acid)
PIGE	Spektroskopia γ -žiarenia (z angl. Particle-induced γ -ray emission)
POPs	Perzistentné org. polutanty (z angl. Persistent organic pollutants)
ppm	Milióntina celku (10^{-6}), (z angl. Parts-per-million)
rpm	Počet otáčok za minútu (z angl. Revolutions per minute)
SPE	Extrakcia tuhou fázou (z angl. Solid phase extraction)

1. ÚVOD

V posledných rokoch sa čoraz častejšie stretávame s pojmom environmentálne znečistenie. Synteticky vyrábané látky distribuované rôznymi spôsobmi do životného prostredia, tzv. antropogénne polutanty sú neprehliadnuteľnou súčasťou nášho každodenného života. V poslednej dobe sa objavujú publikácie zdôrazňujúce prítomnosť perfluórovaných látok (PFCs, z angl. perfluorinated compounds) v životnom prostredí. Všetky PFCs, ktoré nájdeme v akejkoľvek forme v životnom prostredí sú antropogénne [1]. Prekurzory perfluóroalkylsulfonátov a perfluóroalkylkarboxylových kyselín podliehajú teplotným a metabolickým transformáciám za vzniku konečných produktov, ktoré ďalej nedegradujú. Tieto látky patria medzi perzistentné zlúčeniny s preukázanou schopnosťou bioakumulácie a dopadom na ľudí a biotu. Ich jedinečné chemické a fyzikálne vlastnosti z nich robia významnú súčasť priemyselnej výroby [2]. Perfluórované látky sa využívajú už od 50. rokov minulého storočia v rôznych odvetviach priemyslu. Vďaka ich dielektrickým vlastnostiam, vysokej odolnosti voči teplu a znižovaniu povrchového napätia prinášajú pevné, odolné a trvanlivé materiály [3].

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Obecné vlastnosti (per)fluórovaných látok

Fluórované látky (FOCs) majú mimoriadne chemické, fyzikálne aj biologické vlastnosti. Napríklad vysokú energiu väzby C-F (cca $466 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) alebo vysokú elektronegativitu (4,0) atómu fluóru. [4]. Silná väzba uhlík-fluór je odolná voči fotolýze, hydrolyze a mikrobiálnej degradácii [2]. V nasledujúcej tabuľke sú zhrnuté vlastnosti fluóru.

Tab. 1: Fyzikálne-chemické vlastnosti fluóru.

Vlastnosť	Hodnota	Vlastnosť	Hodnota
Atómové číslo	9	Van der Waalsov polomer [pm]	135
Atómová hmotnosť	18,998	Teplota varu [°C]	-188,1
Ionizačná energia [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]	1680,6	Teplota topenia [°C]	-218,6
Elektrónová afinita [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]	332,6	Oxidačný potenciál [V]	2,65
Iónový polomer F^- [pm]	133	Elektronegativita	4,0

Fluór ako jeden z halogénov je vďaka svojim výnimočným vlastnostiam využívaný vo farmaceutickom priemysle na výrobu liečiv, pri produkcii agrochemikálii (pesticídov, insekticídov), výrobe teflónových výrobkov, povrchovo aktívnych látok či rôznych vodeodolných náterov, farieb a repelentov [5],[6]. Tepelná stabilita väzby C-F väzby, odolnosť voči biotickým, chemickým a mechanickým vplyvom, odpudzovanie vody, oleja prispeli k nadmernej výrobe týchto látok [7].

2.1.1 Štruktúra perfluórovaných látok

PFCs sú zložené z reťazca s rôznym počtom uhlíkov, na ktorého konci sa nachádza hydrofóbná časť molekuly, ktorá je substituovaná rôznymi funkčnými skupinami. Hydrofóbná časť molekuly minimalizuje povrch, ktorý je v kontakte s polárnym rozpúšťadlom, vytvára tenkú vrstvu alebo micely, čím dochádza napr. k odpudzovaniu vody, mastnoty a pod. Schéma 1 predstavuje všeobecný vzorec

pre perfluórovanú látku. V závislosti na látke sa mení funkčná skupina ako aj počet uhlíkov v molekule.

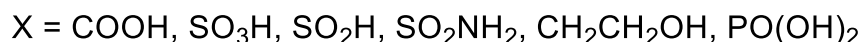
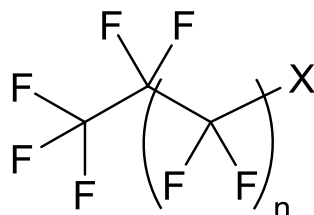


Schéma 1.: Všeobecný vzorec perfluórovanej látky.

PFCs delíme na niekoľko skupín látok. Sú pomerne novým typom polutantu v životnom prostredí, a preto v slovenskom jazyku ešte nie je úplne vyvinuté názvoslovie. V českom jazyku sa používa aj skratka PFOS – perfluorované organické sloučeniny, čo však môže byť mätúce, pretože anglická skratka PFOS označuje perfluóroktán sulfonát. V tejto práci bude všeobecný názov perfluórovaných zlúčenín značený skratkou PFCs a jednotlivé názvy zlúčenín budú písané celým slovom alebo skratkou z anglického jazyka. Najvýznamnejšie skupiny PFCs sú nasledujúce [8]:

- Perfluóralkylkarboxylové kyseliny - PFCAs
- Perfluóralkyl sulfónáty - PFASs
- Perfluóroktán sulfónamidy - FOSAs
- Fluórované telomerné alkoholy - FTOHs
- Perfluóroktán sulfónamid ethanolu - FOSEs
- Fluórované nasýtené telomerné kyseliny - FTAs
- Fluórované nenasýtené telomerné kyseliny - FTUAs
- Perfluóralkyl sulfináty - PFASis
- Perfluóralkylfosfonové kyseliny - PFAPAs
- Perfluóroktano sulfónamido-octové kyseliny - FOSAAs

V tabuľke 2 je prehľad charakteristík jednotlivých PFCs, ktoré sú zároveň použité v tejto práci. Jedná sa konkrétne o 13 perfluóralkylkarboxylových kyselín (PFCAs), 3 perfluóralkyl sulfonáty a 3 perfluóralkyl sulfonamidy.

Tab. 2: Príklady PFCs s rôznymi funkčnými skupinami.

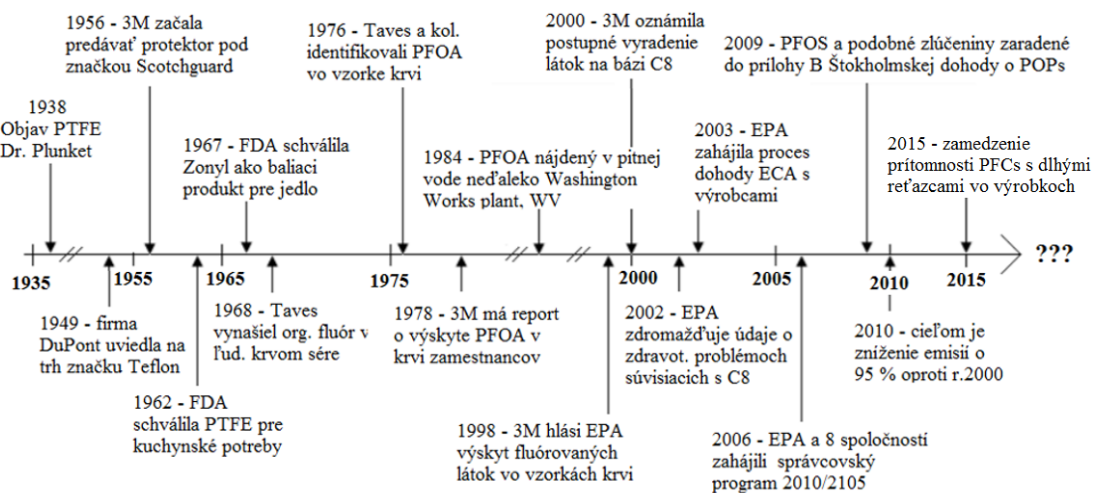
PERFLUÓRALKYLKARBOXYLOVÉ KYSELINY (PFCAs)				
LÁTKA	Skratka	Sum.vzorec	CAS	M_r (g/mol)
Perfluórobutánová kyselina	PFBA	$C_4HF_7O_2$	375-22-4	214,04
Perfluóropentánová kyselina	PFPeA	$C_5HF_9O_2$	375-85-9	264,05
Perfluórohexánová kyselina	PFHxA	$C_6HF_{11}O_2$	307-24-4	314,05
Perfluóroheptánová kyselina	PFHpA	$C_7HF_{13}O_2$	375-85-9	364,06
Perfluóroktánová kyselina	PFOA	$C_8HF_{15}O_2$	335-67-1	414,07
Perfluórononánová kyselina	PFNA	$C_9HF_{17}O_2$	375-95-1	464,08
Perfluórodekánová kyselina	PFDA	$C_{10}HF_{19}O_2$	335-76-2	514,09
Perfluóroundekánová kyselina	PFUdA	$C_{11}HF_{21}O_2$	2058-94-8	564,09
Perfluórododekánová kyselina	PFDoA	$C_{12}HF_{23}O_2$	307-55-1	614,10
Perfluórotridekánová kyselina	PFTTrDA	$C_{13}HF_{25}O_2$	72629-94-8	664,11
Perfluórotetradekánová kyselina	PFTeDA	$C_{14}HF_{27}O_2$	376-06-7	714,11
Perfluórohexadekánová kyselina	PFHxDA	$C_{16}HF_{31}O_2$	67905-19-5	814,13
Perfluóroktadekánová kyselina	PFODA	$C_{18}HF_{35}O_2$	16517-11-6	914,14
PERFLUÓROALKYL SULFÓNÁTY				
LÁTKA	Skratka	Sum.vzorec	CAS	M_r (g/mol)
Perfluórohexán sulfónát draselný	PFHxS	$C_6F_{13}KO_3S$	3871-99-6	438,20
Nonafluórobután sulfónát draselný	PFBS	$C_4F_9KO_3S$	29420-49-3	338,19
Perfluóroktán sulfónát	PFOS	$C_8HF_{17}O_3S$	45298-90-6	499,12
PERFLUÓROALKYL SULFÓNAMIDY				
LÁTKA	Skratka	Sum.vzorec	CAS	M_r (g/mol)
<i>N</i> -Etyl perfluóroktyl sulfónamid	EtFOSA	$C_{10}H_6F_{17}NO_2S$	4151-50-2	527,20
Perfluóroktán sulfónamid	PFOSA	$C_8H_2F_{17}NO_2S$	754-91-6	499,15
<i>N</i> -Metyl perfluórobutane sulfónamid	MeFBSA	$C_5H_4F_9NO_2S$	68298-12-4	313,14

2.2 Využitie (per)fluórovaných látok

V roku 1937 Joseph H. Simons patentoval metódu na výrobu PFCs elektrochemickou fluoráciou [9]. V tej dobe to predstavovalo energeticky náročnú metódu, ktorá podstúpila ešte niekoľko zmien. PFAS boli teda spočiatku vyrábané elektrochemickou fluoráciou. Metóda funguje na pôsobení elektrického prúdu

na elektrolyt, v našom prípade prvotnú fluórovanú zlúčeninu. Zjednodušene, elektrický prúd spôsobí výmenu atómov vodíku za atómy fluóru. Počas tohto procesu sa vytvára zmes rôzne dlhých rozvetvených alebo cyklických izomérov [10]. Túto upravenú syntézu začala v štyridsiatych rokoch minulého storočia využívať firma 3M Company (Minnesota Mining and Manufacturing Company). Táto firma ktorá začala s celosvetovou produkciou fluórovaných chemikálií vo forme karboxylových a sulfónových kyselín. Od polovice minulého storočia tieto látky našli uplatnenie ako súčasť protipožiarnej peny, pesticídov, ochranných sprejov a neprilnavých povrchov v kuchynskej výbave [7]. V neskorších 70.tych rokoch sa začala na syntézu využívať telomerizácia. Predstavuje ďalší spôsob výroby perfluórovaných látok, pričom syntézou vznikajú kratšie lineárne reťazce. Práve nerozvetvené reťazce sú zaujímavé z komerčného a priemyselného hľadiska.

Komerčné využitie PFCs za poslednú polovicu storočia narastalo vďaka veľmi dobrým vlastnostiam týchto látok. Priemyselná výroba týchto látok a ich využitie koncovými spotrebiteľmi má finálne za následok šírenie do životného prostredia. Na nasledujúcom obrázku sú zobrazené dôležité míľniky od objavenia cez masovú výrobu PFCs až po dnešné obmedzenia a zákazy.



Obr. 1: Časová os zobrazujúca dôležité momenty v histórii PFCs [11].

V nasledujúcej časti budú predstavené prírodné a antropogénne látky obsahujúce fluór, ich využitie v domácom ako aj priemyselnom prostredí a následne bude popísaná ich toxicita a akumulácia v rôznych typoch organizmov.

Podľa použitia je možné rozdeliť PFCs na tri veľké skupiny. Fluóropolyméry, ktoré sa vyskytujú v obalových materiáloch, zdravotníctve či elektronike. Vyznačujú sa najmä vysokou odolnosťou a stabilitou. Druhú skupinu tvoria fluórorepelenty, ktoré sú obsiahnuté v náterových farbách, hasiacich penách alebo kobercoch. Treťou skupinou sú fluórosurfaktanty, ktoré sú využívané pre svoje odpudivé vlastnosti k vode (napr. u textílií) a oleju, odolnosť voči mastnote. Medzi dva najzávažnejšie kontaminanty zo skupiny perfluóralkylových, polyfluóralkylových látok (PFASs) patrí perfluóroktán sulfónát (PFOS) a perfluóroktánová kyselina (PFOA), ktoré radíme medzi surfaktanty. Tieto látky sa vyznačujú hydrofóbnym kompletne fluórovaným reťazcom s hydrofilnou koncovou skupinou.

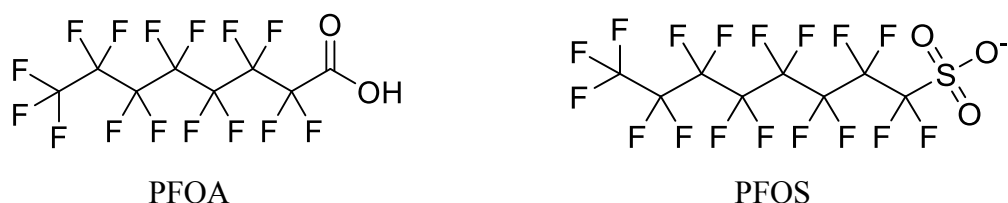


Schéma 2: Štruktúrne vzorce PFOA a PFOS.

V tabuľke 3 je stručne popísané využitie PFCs v priemysle ako aj v domácnostiach.

Tab. 3: Príklady najvýznamnejšieho využitia PFCs.

VYUŽITIE		
Obalové materiály	Krabičky, papiere, vrecká od popcornu, papierové taniere.	[12]
Textílie a koža	Nepremokavé textílie, antireflexné povrchy.	[13]
Hasiace peny	Vodné hasiace peny (AFFF) tvoriace film na hasenie uhľovodíkových palív.	[14]-[16]
Fotografický priemysel	Alifatické PFCs ako zmáčadlo na povrchovo bezchybnú tvorbu fotografií, ochranná vrstva papiera.	[13]

2.2.1 Zdravotníctvo

Fluórované zlúčeniny sú v súčasnej dobe častokrát používané v zdravotníctve, a to pri syntéze antidepresív, protizápalových látok, antibiotík, antimalarík a anestetík. Syntézou antineoplastického činidla 5-fluorouracil v r. 1957 (preukázal vysokú protirakovinovú aktivitu inhibíciou enzýmu thymidylát syntázy) sa spustila vlna syntéz látok obsahujúcich fluór [17],[18]. Niekoľké štúdie preukázali, že výhodou zámény fluóru za vodík je minimálna zmena stérických vlastností v mieste receptora. Van der Waalsov polomer (aproximácia veľkosti atómu) fluóru je 1,47 Å a leží medzi polomerom kyslíka 1,52 Å a vodíka 1,20 Å [19]. Napriek tomu, že je polomer fluóru je o trochu väčší než vodík, štúdie preukázali len malé zmeny stérických vlastností, a preto môžeme pozorovať vysoké využitie pri vývoji nových liečiv [20],[21].

2.2.2 Agrochemikálie

V poľnohospodárstve fluórované látky našli svoje využitie v podobe agrochemikálií. Až 30 % agrochemikálií obsahujúcich fluór vzniká jednoduchým pripojením trifluórmetylovej funkčnej skupiny k aromatickému kruhu. Fluórované látky sú využívané vo forme herbicídov, insekticídov, fungicídov a regulátorov rastu. Účinne využívané sú v prípade ničenia škodcov, mravcov a hlodavcov prenášajúcich choroby [6]. V súčasnosti sa stále hľadajú finančne menej náročné metódy na prípravu látok využívaných v tomto odvetví.

2.2.3 Povrchovo aktívne látky a obalové materiály

Perfluóroktánsulfónyl fluorid (POSF) sa už roky používa ako povrchovo aktívna látka pri výrobe kobercov, kože, obalov a rôznych tkanín. Polyméry na báze POSF sa nakoniec transformujú na známe perfluóroktán sulfónát (PFOS). Povrchovo aktívne látky (tenzidy, surfaktanty) sa primárne vyrábajú elektrochemickými a fluoračnými technikami [1]. Tenzidy a ich vlastnosti súvisia s chemickými a fyzikálnymi vlastnosťami látok (popísané v kapitole 2.1.1 o štruktúre týchto látok). Hydrofóbna časť molekuly, ktorá je orientovaná na vonkajšiu stranu obsahuje perfluórované (resp. fluórované) reťazce. Čím dlhší je reťazec PFCs, tým je jeho rozpustnosť v polárnych rozpúšťadlách menšia. Schaidler a spol. v nedávnej dobe podrobili analýze fluórovaných látok viac ako 400 vzoriek papierových kelímok, obalov na jedlo

z fastfoodov, krabíc od pizze a kartónov od džúsu naprieč USA, pričom merali hodnoty celkového fluóru pomocou techniky PIGE (Particle Induced γ -ray Emission) tzv. spektroskopie γ -žiarenia, ktorá dokáže určiť celkový fluór v tuhej fáze. Táto vedecká skupina preukázala, že až 46 % kontaktných papierových obalov obsahovalo fluór v dávkach vyšších než 16 nmol/cm² [12]. Medzi povrchovo aktívne látky patria aj hasiace peny, ktoré sa využívajú na hasenie uhl'ovodíkových reťazcov [13].

2.3 Výskyt (per)fluórovaných látok

2.3.1 Atmosférická depozícia

Do nepriamej atmosférickej depozície môžeme zaradiť prachové častice prítomné vo vzduchu ako aj v domácnostiach. Nezanedbateľné množstvo PFOS bolo nájdené v prachu víriacom sa v domácnosti v koncentrácii 26,9 ng/g a taktiež v automobiloch v koncentrácii 15,8 ng/g. Tu sa vyskytoval aj perfluórobutyrát, ktorý sa naopak v kanceláriách nevyskytoval. V kancelárskych priestoroch prevažovali najmä PFCs s dlhými reťazcami [7].

2.3.2 Produkty osobnej starostlivosti

Každodenné používanie kozmetických prípravkov môže byť spojené s prenosom PFCs do organizmu. V prípade kozmetiky ide o priamy kontakt produktu s pokožkou, čím sa tieto zlúčeniny dostávajú priamo do organizmu. V medzinárodnej nomenklatúre kozmetických prísad (INCI), používané pod názvom polyfluóralkylfosfátové estery (PAPs), boli analyzované v rôznych vzorkách krémov, rúžov a pod. Fujii a kol. preukázali koncentrácie perfluórovaných karboxylových kyselín vo vzorkách produktov osobnej starostlivosti (PCPs), ktoré v produkte pre koncového spotrebiteľa označovali použitie PAPs. Koncentrácie boli stanovované v 21 vzorkách dekoratívnej kozmetiky a opaľovacích krémov. Potvrdený bol obsah 19 μ g/g PFCAs v opaľovacích krémoch a koncentrácie 5,9 μ g/g v dekoratívnej kozmetike. Vzorky, ktoré neobsahovali PAPs v nich neboli detegované ani koncentrácie PFCAs, čo označuje jasný zdroj týchto látok v kozmetických výrobkoch [22]. Predpokladom je, že produkty osobnej hygieny môžu taktiež prispievať k zvýšeným koncentráciám perfluórovaných látok v prachových časticiach.

2.3.3 Potraviny a obalové materiály

Kanadská štúdia preukázala prítomnosť PFCs v obalových materiáloch, ktoré obsahovali najmä PFO. Hodnota 3,6 ng/g PFOA bola zistená v pripravenom popcornu z mikrovlnnej rúry [23]. Ako bolo objasnené vyššie, samotné potraviny obsahujú PFCs nie sú jediným zdrojom vstupu do organizmu. Medzi zdroj PFCs patria aj obalové materiály [1].

V roku 2019 prebehla v Číne štúdia výskytu PFCs v okolí fluoro-chemického priemyselného parku. Ovocie a zelenina pestované v okolí obsahovali 370 ng/L perfluórovaných látok, dominantné boli hlavne kyseliny. PFBA sa vyskytovala najmä v poľnohospodárskej pôde, ovocí a zelenine, zatiaľ čo PFOA v zavlažovacej vode a výrobkoch. Obsah PFCs v zavlažovacej vode pre polia sa so vzdialenosťou od parku znižoval, čo dokazuje ovplyvnenie okolia z chemického prostredia [24]. Španielska štúdia Ericson a kol. preukázala PFOS, PFOA a PFHpA vo viac ako 30 potravinových výrobkoch kúpených na rôznych miestach. V prepočte sa priemerná konzumácia PFOS u dospelého človeka s váhou približne 70 kg pohybovala v hodnotách 62,5 - 74,2 ng. Mliečne výrobky a mäso, zelenina, ovocie boli hlavnými zdrojmi PFOS. Bolo potvrdené, že potraviny obsahujúce PFCs môžu byť kontaminované zároveň zo samotných obalov výrobkov [23].

2.3.4 Ryby a vodný ekosystém

Ústav chémie a analýzy potravín v Prahe v spolupráci s Výskumným ústavom rybárskym vo Vodňanoch uskutočnili v rokoch 2005-2007 monitorovacie štúdie vo vodných ekosystémoch na zistenie prítomnosti perfluórovaných kontaminantov v Českej republike. Vzorky pečene u jalca hlavatého (*Leuciscus cephalus*) a pleskáča vysokého (*Abramis brama*) boli odobrané na 18 rôznych lokalitách. Výsledkom tohto prieskumu bol dokázaný výskyt FOSA v 13 vzorkách z jalca hlavatého v pečeni o koncentrácii 10,1 – 198,5 ng/g. Hladiny verejne známeho analytu PFOS odpovedali výsledkom z iných európskych štúdií o výskyte PFCs vo vodných ekosystémoch [25]. Najviac kontaminovanou lokalitou na PFCAs je rieka Labe. Koncentrácie však nevykazujú veľmi vysoké hodnoty v porovnaní s inými krajinami [26].

Viacere experimenty preukázali prítomnosť PFCs v podzemných a povrchových vodách. Štúdium podzemnej vody na Taiwane preukázalo koncentrácie PFOS

až 76,8 ng/L. Zároveň bolo preukázané, že PFCs ako PFHxA, PFOS, PFHpA a PFOA, teda zlúčeniny s krátkym uhlíkovým reťazcom sa do podzemnej vody dostávajú ľahšie. Reťazce C6-C10 sú častejšie absorbované do sedimentu [27].

Znečistenie vody je do značnej miery spôsobené používaním perfluórovaných látok v hasiacich penách pri požiaroch. Peny využívajúce sa pri nácviokoch hasenia požiarov sú najčastejšie ponechané na výcvikovom mieste a vstrebávajú sa rovno do pôdy [14]. Analýza vo vzorkách rýb preukázala vysoké hodnoty PFOS v pečeni rýb v hodnotách 2,0 – 72,9 µg/g. Viaceré vzorky boli odobrané z okolia letiska, kde v tom čase došlo pred 7 mesiacmi k úniku hasiacej peny. V týchto vzorkách boli viac nahromadené PFCs s dlhšími reťazcami ako PFTeDA [15]. Hasiace peny zároveň ovplyvňujú vtáky, ktorým odstraňujú vrchnú vrstvu mazu a vtáky následne zomierajú na hypotermiu [28].

2.3.5 Pôda a sediment

Gellrich a kol. študovali výskyt a pôsobenie PFCs na vzorkách pôdy v Nemecku. Spomedzi 10 PFCAs a 4 sulfonátov bol najrýchlejšie adsorbovaný na pôdu PFBA. Výsledky tiež preukázali, že dlhší reťazec PFHxS bol v pôde zadržovaný o 5 týždňov dlhšie než PFBA [29]. Bečanová a kol. analyzovali sediment z rieky Morava v Zlínskom kraji na základe 70 vzoriek počas jedného roka. Celkový obsah PFCs bol v rozmedzí 0,3 – 6,8 ng/g. Preukázali, že najviac zastúpeným spomedzi PFCs bol PFOS a taktiež krátke reťazce PFHxS a PFHpS, ktoré sa v súčasnosti používajú ako náhrada za legislatívne zakázané PFOA a PFOS a ich deriváty [30]. Štúdie preukazujú kontamináciu pôdy, v ktorých kumulujú PFCs, hlavne v poľnohospodárskych oblastiach, kde sa využíva čistiarenský kal na hnojenie polí. Problémom sú prítomné prekurzory PFOS ako aj konečné nedegradovateľné produkty [11].

2.3.6 Kaly z čistiarní odpadových vôd

Zdrojom kontaminácie PFCs môže byť aj používanie kontaminovaného čistiarenskeho kalu [2]. Kal je možné aplikovať na pôdu, spáliť ho alebo skládkovať [31]. Pri jednotlivých použitíach kalu je potrebné zhodnotiť a minimalizovať negatívne účinky na životné prostredie. V závislosti od geografickej polohy a počtu obyvateľov, ktorým čistiareň slúži obsahuje kal nemalé množstvo škodlivín. Produkcia kalu z ČOV celosvetovo rastie rok od roka budovaním nových kanalizačných a komunálnych sietí.

Napriek tomu, že kaly môžu obsahovať ťažké kovy, PCB alebo PCDD/F ich používanie v poľnohospodárstve stále pretrváva [2]. Aplikácia na pôdu je možná len v prípade dôkladnej stabilizácie a odvodnenia. Perfluórované látky boli sledované na vzorkách čistiarenských kalov vo Švédsku, Fínsku, Islande, Nórsku a na Faerských ostrovoch. Analyzovaných bolo 119 rôznych vzoriek kalov z menovaných štátov. PFOS bol nameraný v nasledujúcich hodnotách vo Švédsku 2644 pg/g, Dánsku 1041 pg/g a Nórsku 1023 pg/g. PFOA bola najviac zastúpená na Faerských ostrovoch v hodnotách 3792 pg/g [32]. Štúdia Sun a kol. zo Švajčiarska poukazuje na výskyt dlhých perfluórovaných reťazcov v stabilizovaných splaškových kaloch z 20 komunálnych ČOV. Hodnoty PFCAs sa pohybovali v rozmedzí 14-50 ng/g sušiny. Koncentrácie PFOS až do 600 ng/g [33]. 14 rôznych PFCs bolo detegovaných v kale z ČOV v Hong Kongu v roku 2010. Jednalo sa o zlúčeniny s dlhšími reťazcami a hodnoty pre PFOS dosahovali až 46,2 ng/g v čistiarenskom kale. Vysoké boli aj hodnoty PFNA 23 ng/g a PFTA približne 46 ng/g [34]. Každopádne, vhodným udržateľným riešením problému s hromadiacim sa kalom môže byť aj zvýšenie spracovania kalu k zisku tepelnej energie, čím by sa množstvo odpadu minimalizovalo [35]-[37].

Kal obsahujúci PFCs aplikovaný do životného prostredia je však aktuálnym problémom a jeho prečistenie nie je dostatočné. V Česku zatiaľ nie sú zverejnené štúdie o prečisťovacích technikách možných aplikácie na čistiarenskom kale a aj to bol jeden z dôvodov k vzniku tejto diplomovej práce.

2.4 Toxicita PFCs a účinky na živé organizmy

2.4.1 Toxické efekty na organizmy

Už na začiatku tohto storočia bola preukázaná koncentrácia PFCs v ng/mL v ľudskej krvi, čo vzbudilo pozornosť rôznych inštitúcií vedúcu k obmedzeniu použitia týchto látok [11]. Dvojročná štúdia publikovaná v roku 2017 preukázala polčas eliminácie $t_{1/2}$ PFOS, PFOA a PFHxS z krvi u 106 zúčastnených mužov a žien. Potvrdila súvislosť medzi pohlavím a vylučovaním PFCs z organizmu. Najdlhší polčas bol preukázaný u PFHxS, konkrétne u mužov 7,4 roka a u žien 4,7 roka. Pre PFOS boli nehľadiac na pohlavie priemerné hodnoty 3,4 roka a pre PFOA 2,7 roka [38].

Agentúra EPA (Agentúra pre ochranu životného prostredia) vydala v roku 2017 dokument, v ktorom uvádza doposiaľ preukázané vplyvy PFCs na ľudský organizmus. Epidermologické štúdie preukázali spojitosť medzi vystavením organizmu PFCs a hladinou cholesterolu v krvi. Boli preukázané zvýšené pečenevé enzýmy, poruchy imunitných odpovedí a taktiež poruchy funkcie štítnej žľazy. PFOA je zaradený do skupiny potencionálnych karcinogénov pre človeka [39].

Štúdia z roku 2008 preukázala súvislosť medzi výživou a obsahom PFOS a PFOA v plazme. Vyššie hladiny PFOS boli zistené u žien, ktoré konzumovali väčšie množstvo červeného mäsa (hovädzie, jahňacie, bravčové), popcornu, chipsov a pod. u ktorých sa predpokladá vylúhovanie PFOS z obalových materiálov [40].

EPA v roku 2009 vydala odporúčanie na limity pre PFOS v pitnej vode 200 ng/L a pre PFOA 400 ng/L. V tejto štúdií vychádzali z hodnôt toxicity pre pečeň. Väčšina toxikologických testov sa spravidla robí na potkanoch, ktorí sú schopní eliminovať tieto látky rýchlejšie než ľudský organizmus. Akútna toxicita pre PFOS u potkanov, LD₅₀ bola určená v hodnote 251 mg/kg telesnej váhy [41]. Pri testoch na akútnu toxicitu u potkanov bola použitá aj PFOA. Letálna dávka LD₅₀ sa pohybovala bez ohľadu na pohlavie v rozmedzí 430-680 mg/kg [42].

U gravidných myší boli preukázaná zvýšená novorodenecká úmrtnosť [55]. Štúdie preukazujú, že využitie myší a potkanov k určeniu rýchlosti eliminácie PFCs z organizmu nie je veľmi spoľahlivé, pretože v porovnaní s ľudským telom sú menšie a látky dokážu eliminovať rýchlejšie [43].

Pri chronických testoch na opiciach boli pri podávaní PFOS pozorované prejavy ako je znížená hmotnosť a naopak zvýšená hmotnosť pečene [41]. Toxikologické testy na hlodavcoch trvajúce 1-21 mesiacov preukázali zmeny v oblasti pankreasu, metabolizmu lipidov a pečene a taktiež pokles váhy u jednotlivcov [44]. Štúdie na chronickú toxicitu a karcinogenitu PFOS boli pozorované na skupine 70 samcov a samíc potkanov v dávkach 0,5; 2,0; 5,0 a 20 mg/kg počas 104 týždňov. Boli pozorované hepatotoxické a karcinogénne účinky na potkany, ktoré konzumovali draselnú soľ PFOA v potrave [45].

Prírodné aj antropogénne zdroje fluórovaných látok prispievajú k biogeochemickému cyklu fluóru. Sopečná činnosť ako prirodzená cesta úniku fluóru do ovzdušia masívne prispieva k emisiám fluóru. Tie ovplyvňujú ľudí najmä z expozície povrchovej vody a môžu viesť k toxickému pôsobeniu pre zvieratá [46].

Medzi PFCs patria aj perfluóralkylové a polyfluóralkylové látky, ktoré sú vysoko perzistentné a niektoré z nich sú spájané s problémami imunitného systému, dokonca rakoviny u živých organizmov.

Boli tiež pozorované zmeny hormonálnej aktivity u človeka. Štúdia Lopez a kol. preukázala u detí vo veku 6-9 rokov znížené hladiny testosterónu/estrogénu v tele v porovnaní s referenčnou skupinou. Testovaná skupina detí žila v blízkosti závodu na výrobu PFCs (spoločnosť 3M). Hormonálne zmeny a ovplyvnenie reprodukčného vývoja spôsobili neskorší nástup puberty v porovnaní s referenčnou skupinou [47].

V literatúre môžeme taktiež nájsť štúdie o vplyve PFCs na imunitný systém. Štúdia detí vo veku 5-7 rokov na Faerských ostrovoch preukázala zníženie imunitnej odpovede na očkovanie voči tetanu pri požívaní pitnej vody obsahujúcej zvýšené množstvo PFOS (27,0 ng/L). Z nedostatočného množstva štúdií však nie je možné potvrdiť, že sa jedná o všeobecný efekt pôsobenia PFCs na imunitný systém [48].

Využitie fluóru v molekule môže taktiež v niektorých prípadoch znižovať tvorbu toxických metabolitov pri detoxikácii v organizme [20],[21]. Niektoré štúdie naznačujú, že vylučovanie močom je rozhodujúce pri znižovaní toxicity perfluórkarboxylátov [1].

2.4.2 Bioakumulácia v organizmoch

Expozícia človeka PFCs sa nemusí týkať len priameho kontaktu so spotrebiteľským výrobkom. Z hľadiska životného prostredia je problém najmä v ich bioakumulatívnej schopnosti. Bioakumulácia priamo súvisí s dĺžkou reťazca PFCs. Prekurzory PFCs transformované na konečné produkty napr. PFOS už nie sú schopné ďalšej metabolickej premeny, hromadia sa v organizme a preukazujú toxické efekty na rôznych trofických úrovniach.

Bioakumulácia perfluórovaných látok v morskom aj sladkovodnom ekosystéme je spojená s malým a veľkým cyklom vody. Cirkulácia vody v zemskom ekosystéme spôsobuje diaľkový transport týchto chemikálií. Už v roku 1985 upozornil Jaffe R., a kol. na diaľkový transport polutantov na príklade skládky v okolí Niagarských vodopádov, na ktorú bolo uložených približne 8000 ton chemického odpadu spojeného s výrobou antropogénnych látok. Veľké množstvo látok uniklo do okolitého sedimentu, čím sa dostali aj do organizmov rýb žijúcich v jazere Ontário, Kanada. Experiment preukázal akumuláciu týchto látok v telách rýb vzdialených do 300 km od skládky.

Štúdiá Kurunthachalam a kol. predstavuje široké spektrum pôsobenia PFCs na celý potravinový reťazec. Analyzovaná bola voda, riasy, slávky (*Dreissena polymorpha*), bičko čiernoúste (*Neogobius melanostomus*), ostriež čierny (*Micropterus dolomieu*) a iné. Koncentrácie PFOS pre bezstavovce boli približne tisíckrát vyššie ako u okolitej vody. Zistené koncentrácie u lososa boli približne 20krát vyššie než u predchádzajúcej trofickej úrovne. U norka boli zistené koncentrácie PFOS v priemere 18 000 ng/g. V porovnaní s lososom u ktorého bol PFOS v koncentrácii 100 ng/g ide o takmer dvadsaťnásobnú hodnotu. PFOS sa viaže najmä na proteíny, hromadí sa v pečeni a krvi. Z dôvodu preukázanej akumulácie PFOS v krvi a pečeni bol u druhov na vyšších trofických úrovniach zistený vyšší biomagnifikačný faktor (BMF) [49].

Transport perzistentne organických polutantov bol potvrdený stovkami rôznych vedeckých prác. V roku 2004 skupina Martina a spol. z Univerzity v Toronte skúmala množstvo PFOS a PFCAs na vzorkách polárnej líšky, norka, rýb a polárnych medveďov v rôznych lokalitách v okolí polárneho kruhu. PFOS bol najviac zastúpený vo vzorkách pečene ľadového medveďa až v koncentrácii 3,1 µg/g čistej váhy. Dvoma rôznymi technikami bolo preukázané, že vzorky všetkých zvierat obsahovali perfluórované látky s C9-C15 uhlíkovými reťazcami [51]. Koncentrácie PFCs v ikrách pstruha hnedého v Michiganskom jazere boli nájdené v koncentrácii 350 ng/g [1].

V roku 2018 Chiesa M.L. a kol. bolo odobraných 90 vzoriek úhorov z Gardského jazera v Taliansku, ktoré boli pred analýzou vypitvané a lyofilizované. V niektorých analyzovaných jedincoch sa vyskytovalo 11 PFCs. Najčastejšie sa vyskytujúcim analytom bol PFOS v koncentráciách $0,89 \pm 0,58$ ng/g živej hmotnosti. Riečne ako aj morské ekosystémy môžu byť ovplyvnené sezónnymi vplyvmi, ktoré môžu meniť koncentráciu PFCs pri procese premiešavania alebo rýchlosti toku [52],[53].

Jednou z možných ciest na prístup PFOS do ľudského organizmu sú potraviny. Tie však môžu obsahovať herbicídy a iné látky využívané na obranu rastlín voči škodcom. Bioakumulácia bola zistená aj v zelenine, najmä v listovom šaláte, melóne, ktoré neďaleko priemyselného parku v Číne mali bioakumulačný faktor až 3 - 46krát vyšší než v prípade iného ovocia [24]. Poľnohospodárstvo je priamo spojené so živočíšnou výrobou a taktiež produkciou základných potravín. Nepriamou cestou PFCs môže byť práve pastva dobytká, ktorý je ďalej využívaný na konzumáciu v potravinovej pyramíde. Kanadská štúdiá preukázala priemernú dávku pre dospelého človeka

250 ng v rôznych výrobkoch. Najvyššie množstvo PFNA s obsahom 4,5 ng/g a PFOS 2,7 ng/g obsahovali hovädzie steaky. To nasvedčuje tomu, že nedegradujúce PFCs sú súčasťou potravinového reťazca. Súčasných výsledkov je ale nedostatočné množstvo a z toho dôvodu nie je možné potvrdiť príjem potravy ako hlavnú cestu expozície PFCs [23].

Český vedecký tím analyzoval obsah perfluórovaných látok v dovážaných rybách ako sú tresky, sardinky či tuniaky z Baltského mora. Výskum preukázal, že PFOS bol jedným z dominantných kontaminantov v analyzovanom materiáli v koncentrácii 0,7 až 12,8 ng/g [54]. Tento fakt upozorňuje na to, že PFCs sú taktiež súčasťou potravín, ktoré sú distribuované do krajín po celom svete. Tieto látky podliehajú akumulácii v potravinom reťazci, z ktorého ich nie je možné napriek legislatívnym opatreniam a zákazom odstrániť. Agentúra EPA potvrdila bioakumulačný faktor pre ryby v rozmedzí 1000-4000 [39].

S akumuláciou súvisí aj kontaminácia pitnej vody, ktorá bola preukázaná na zvýšenej hladine perfluórovaných látok v ľudskej krvi v rôznych oblastiach sveta ako napríklad v Nemecku, Japonsku a Západnej Virgínii [55]-[57]. Štúdie preukazujú výrazný vplyv kumulácie PFCs v biote a aj to bolo jedným z dôvodov na zavedenie legislatívnych opatrení v podobe obmedzení používania či úplného zákazu. Akumulácia a s ňou spojená bioaugmentácia naprieč trofickými úrovňami, na ktorých vrchole sa nachádza človek je sledovaná. Počas posledných rokov sa zákaz niektorých PFCs dostáva do legislatívy. Aktuálna situácia je popísaná v nasledujúcej kapitole.

2.5 Legislatívne opatrenia týkajúce sa PFCs

V súčasnosti existuje viac ako 3000 rôznych perfluórovaných látok a s radou z nich prichádzame počas života do kontaktu. Napriek tomuto množstvu sa v legislatíve vymedzuje len PFOS a PFOA. Napriek legislatívnemu opatreniu PFOS a PFOA existujú tisíce iných perfluórovaných látok s ktorými prichádzame počas života do kontaktu.

Najväčší výrobca PFCs látok spoločnosť 3M sa v roku 2000 dobrovoľne rozhodla o zastavení výroby týchto látok. V roku 2009 bol PFOS vrátane jeho solí zaradený do Štokholmského dohovoru a stali sa súčasťou zoznamu perzistentných organických

polutantov [58]. Perfluórované látky, konkrétne PFOA a jej deriváty sú na úrovni Európskej únie sledované v Smernici Európskeho parlamentu a Rady 2013/39/EÚ, v ktorej sú jasne definované normy a najvyššie prípustné koncentrácie. V Českej republike je PFOS zaradený medzi nebezpečné látky s účinnosťou od 22.12.2018 podľa nariadenia vlády č. 401/2015 Sb. o ukazovateľoch a hodnotách prípustného znečistenia povrchových vôd a odpadových vôd.

Normy pre perfluóroktánovú kyselinu a jej deriváty sú uvedené v nasledujúcej tabuľke [59].

Tab. 4: Normy pre PFOA a jej deriváty.

Kategória	Hodnoty
RP – NEK Vnútrozemské povrchové vody	$6,5 \times 10^{-4}$ [µg/L]
RP – NEK Ostatné povrchové vody	$1,3 \times 10^{-4}$ [µg/L]
NPK – NEK Vnútrozemské povrchové vody	36,0 [µg/L]
NPK – NEK Ostatní povrchové vody	7,2 [µg/L]
NEK Biota (ryby)	9,1 [µg/kg čerstvej hmotnosti]

1) NEK – normy environmentálnej kvality; 2) NPK – najvyššia prípustná kapacita, 3) RP – ročný priemer.

Od roku 2013 bola PFOA výborom členských štátov určená za látku perzistentnú, bioakumulatívnu a toxickú. V júni roku 2019 sa PFOA stala súčasťou prílohy A Štokholmského dohovoru o perzistentných organických polutantoch. Bolo schválených zopár päťročných výnimiek pri použití hasiacich pien, výrobe polovodičov, textílií na odpudenie oleja, výroba plastových častí automobilov [60]. Nariadenie vydalo od 4. júla 2020 zákaz výroby a predaja PFOA a ich solí ako samostatných látok, ale neuplatňuje sa to na výrobky vyrobené pred týmto dátumom.

2.6 Metódy detekcie a kvantifikácie PFCs v životnom prostredí

2.6.1 Analýza PFCs

GC-MS

V súčasnej dobe sa radia medzi dve najpoužívanejšie techniky na analýzu pevných a kvapalných matric zo životného prostredia LC-MS/MS a GC-MS/MS. Pomocou plynovej chromatografie boli zistené koncentrácie PFCAs v biologických vzorkách alebo podzemnej vode. Táto metóda je vhodná pre prchavé látky, kvôli ich vysokej volatilite. Ide o náročnú metódu, pred každou analýzou je potrebná tzv. derivatizácia vzoriek. Pre analýzu čistiarenských kalov je najčastejšie využívaná LC-MS/MS práve z dôvodu vynechania derivatizačného kroku a vyššej citlivosti metódy.

LC-MS

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou detekciou patrí medzi veľmi citlivé separačné metódy určené na kvantitatívnu analýzu. Je to jedna z mála separačných metód, ktoré dokážu detegovať už veľmi nízke koncentrácie v radoch stoviek ng/L. Pri stanovení koncentrácií PFCs vo vzorkách kalu sa využíva v štúdiách po celom svete [33],[34],[61],[62]. Detekcia perfluórovaných látok je náročná na zavedenie metodiky. Na základe rozsiahlej rešerše skupiny Valsecchi a kol. je zjavné, že najčastejšou metódou na stanovenie perfluórovaných látok ako napríklad perfluóralkyl sulfonátov je kvapalinová chromatografia s trojitou kvadrupólovou tandemovou hmotnostnou spektrometriou. Ako iónový zdroj slúži elektrosprej a meranie prebieha v negatívnom móde [7], [54],[62].

Matricový efekt

Sledované analyty môžu byť pri analýze ovplyvnené prítomnosťou koextraktov z matrice. Nameraná odozva na detektore môže byť vyššia, resp. nižšia v závislosti na ovplyvnení ionizácie. Tento jav sa nazýva matricový efekt (ME) a pri kvantifikovaní látok pomocou LC-MS v kombinácii s ionizáciou elektrosprejom je pomerne častým javom [62]. Dôvodom prítomnosti ME je častokrát koelúcia interferujúcich zlúčenín alebo adsorpcia vysokomolekulárnych látok, napr. lipidov, na matricu [61]. Na preukázanie matricového efektu existujú rôzne metódy.

2.6.2 Extrakčné techniky

Pevné matrice

Extrakčné techniky na stanovenie PFCs sa líšia hlavne na základe použitej matrice, v ktorej chceme dané látky detegovať. Pri úprave vzoriek kalu je dôležitá ich predúprava vysušením mrazom a homogenizáciou. Rovnakou predúpravou vzoriek aká bola použitá v tejto práci postupoval aj Sun pri analýze kalu z ČOV vo Švajčiarsku [33].

Llorca a kol. analyzovali 13 PFCAs v čistiarenskom kale. Extrakcia prebiehala pomocou ASE, prečistenie SPE a výsledné koncentrácie boli merané pomocou LC-MS/MS s hmotnostným analyzátorom vo forme iónovej pasce. Vo všetkých piatich vzorkách kalu bolo preukázaných 18 PFCs [62]. Liu a kol. zistili, že vyššia T pri použití ASE generovala viac suspendovaných častíc a extrakty boli náročnejšie na filtrovanie. Na extrakciu sa používajú rôzne rozpúšťadlá ako metanol, acetonitril alebo metanol v pomere s vodou [63].

Medzi bežné postupy na spracovanie čistiarenských kalov sa používa Soxhletova extrakcia, tá sa však vyznačuje dlhším spracovaním a vysokou spotrebou rozpúšťadla. Medzi výhodnejšie metódy môžeme zaradiť ASE (zrýchlenú extrakciu rozpúšťadlom), ktorú pri analýze kalu používal napr. Zhang a kol. pri analýze čistiarenského kalu [64]. Ďalšou z metód je MSPD (disperzia matrice na tuhej fáze), pri ktorej je možné čistenie priamo s extrakciou čo skrátí čas metódy [65].

Vodné vzorky

Extrakčné metódy sa líšia v závislosti na matrici. Vodné vzorky boli vo viacerých štúdiách analyzované pomocou C18 kolóniek, ktoré boli následne eluované metanolom [15]. Pri extrakcii sa často v literatúre uvádza použitie Oasis WAX kolóniek s reverznou fázou s kondicionáciou kolónky MeOH s pozmenenou bazicitou/kyslosťou. Tieto kolónky, ale nefungujú pri extrakcii hydrofóbných zlúčenín [64]. Druhým najviac používaným typom je HLB kolónka s vyváženou zmesou hydrofilno-lipofilného sorbentu, ktorá je vhodná na extrakciu dlhších reťazcov ako napr. PFSA, PFCAs [2]. Taktiež sa používajú Superclean ENVI-18 a ENVI-Carb extrakčné kolónky.

Biologické vzorky

Jednoduchším variantom na extrakciu PFCs napríklad z krvných vzoriek sú QuEChERS, sorbenty na odstránenie nežiadúcich molekúl s vysokou molekulovou hmotnosťou [48]. Predstavujú jednoduchú a lacnú náhradu na prečistenie, ale nefungujú na komplexnejšie matrice.

Odstránenie matricového efektu

Najviac používanou metódou na preukázanie matricového efektu je použitie interného štandardu alebo fortifikácia kalibrácie matricou, ktorá bola využitá aj pri zisťovaní koncentrácie PFCs vo vzorkách rýb a kale [62]. Túto metódu taktiež využili aj Zhang a kol. pri odstraňovaní ME [64]. Metóda vedie k zníženiu koncentrácie v matrici pomocou jednoduchého nariadenia, čo však nie vždy musí priniesť očakávané zníženie/zvýšenie ionizácie. Ovplynenie pH mobilnej fáze môže v niektorých prípadoch viesť k potlačeniu zvýšenej ionizácie a v kombinácii s SPE k dobrým výsledkom bez ME. Prejav matricového efektu môže byť u rôznych matric rôzne veľký alebo sa nemusí prejaviť vôbec [62]. Ma a kol. preukázali využitie ENVI-Carb kolóniek na odstránenie matricového efektu [34].

3. CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

- Vývoj novej metódy na LC-MS/MS.
- Optimalizácia postupu na prípravu rôznych vzoriek pre stanovenie PFCs.
- Stanovenie koncentrácií PFCs v reálnych vzorkách kalu z ČOV a pitnej vody.
- Hodnotenie obsahu PFCs v reálnych vzorkách v Českej republike.

4. EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

4.1 Použitý materiál a prístroje

4.1.1 Štandardy

Heptafluorobutyric acid ($\geq 98\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
N-Etyl perfluorooctylsulfonamide ($\geq 95\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
N-Metylperfluorobutanesulfonamide	SynQuest Labs, Inc., USA
Perfluorooctadecanoic acid ($\geq 95\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Perfluorotetradecanoic acid ($\geq 97\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Perfluorodecanoic acid ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich, Nemecko
Perfluorododecanoic acid ($\geq 96\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Perfluoroheptanoic acid ($\geq 98\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Perfluorohexadecanoic acid ($\geq 95\%$)	Apollo Scientific, UK
Perfluorohexanoic acid ($\geq 98\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Perfluoro-n-octanoic acid ($\geq 98\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Perfluorononanoic acid ($\geq 97\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Perfluorooctansulfonamide ($\geq 95\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Perfluoropentanoic acid ($\geq 98\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Perfluorotridecanoic acid ($\geq 97\%$)	Sigma-Aldrich, Nemecko
Perfluoroundecanoic acid ($\geq 97\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Potassium nonafluorobutanesulfonate ($\geq 98\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA
Potassium perfluorohexane-1-sulfonate ($\geq 98\%$)	SynQuest Labs, Inc., USA

4.1.2 Použitý materiál a chemikálie

Acetón	VWR, ČR
Acetonitril pre HPLC (99,95%)	VWR, ČR
Captiva EMR lipid, 3mL, 300 mg	Agilent Technologies, USA
Dusík (99,99%)	Linde, ČR
ENVI-carb kolóny, 12 mL, 1g	Sigma-Aldrich, ČR
ENVI-carb kolóny, 6 mL, 500 mg	Sigma-Aldrich, ČR
Hydroxid amónny (28-30%)	Sigma-Aldrich, ČR
Kyselina chlorovodíková (35%, p.a.)	LachNer, ČR

Kyselina mravčia ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich, ČR
Kyselina mravčia (98-100%)	Riedel-de Haën, Nemecko
Metanol pre HPLC	VWR, ČR
Metanol pre LC-MS	VWR, ČR
Morský piesok	LachNer, ČR
OASIS®HLB 6cc (200 mg)	Waters, ČR
Papierové filtre (0,45 μm)	Macherey-Nagel, Nemecko
Parafilm PM-996	Sigma-Aldrich, USA
Superclean ENVI-florisil 3mL, 500 mg	Sigma-Aldrich, ČR
QuEChERS	Sigma-Aldrich, ČR

4.1.3 Analyzovaný materiál

Reálne vzorky boli získané z rôznych lokalít v Českej republike. V nasledujúcej tabuľke 5 je zobrazená veľkosť čistiarene, tzn. malá čistiareň používaná v oblasti s maximálne 10 tisíc ekvivalentných obyvateľov (EO) a veľká ČOV, ktorá slúži pre viac ako 10 tisíc EO.

Tab. 5: Vzorky kalu z ČOV.

ČOV pre > 10 tisíc EO			ČOV pre < 10 tisíc EO			ČOV - neupresnené		
Kal č.	EO (tis.)	Dátum	Kal č.	EO (tis.)	Dátum	Kal č.	EO (tis.)	Dátum
1	31	9/2018	12	3	8/2018	20	<10	5/2018
2	13	2/2019	13	5	2/2019	21	<10	4/2014
3	10	11/2018	14	5	2/2019	22	<10	5/2018
4	>100	2/2019	15	8	2/2019	23	<10	6/2015
5	>100	2/2019	16	1,9	2/2019			
6	184	10/2017	17	6	3/2019			
7	31	2/2019	18	5	9/2018			
8	10	3/2019	19	9	3/2019			
9	14	3/2019						
10	72	8/2018						
11	>100	8/2018						

Pri extrakcii sa použila aj vzorka pôdy, konkrétne nekontaminovaná piesočnato-hlinitá pôda (podľa Nováka 20-30 % častíc <0,01 mm) odobraná 10 cm pod povrchom.

4.1.4 Prístrojové vybavenie

Analytické váhy AE 240	Mettler, Švajčiarsko
ASE 200 Accelerated solvent extractor	Dionex, USA
Analytické váhy AdventurePro	Ohaus, USA
Centrifúga MIKRO 220R	Hettich, Nemecko
Centrifúga EBA 200	Hettich, Nemecko
Hmotnostný detektor Qtrap 4500	AB Sciex
Kvapalinový chromatograf Nexera x2 HPLC system	Schimadzu, Japan
HPLC Kolona XselectCSHTMC18 2,5 μ m	Waters,
Lyofilizátor	Labio, ČR
Magnetická miešačka MS-H-S	Dlab, Čína
Mraznička MDF- U333	Sanyo, Japonsko
Ph-meter pH 7110 set	Inolab s.r.o., ŠR
Pipety 10 μ L -10 mL	Biohit, Brand
SPE Vacuum manifold	Waters, USA
Ultrazvukový kúpeľ K-12	Kraintek, ČR
Váhy PM460	Mettler, Švajčiarsko
Vortex mixer ZX Classic VELP	Scientifica, Taliansko

4.2 Postup práce

Práca bola zameraná na dokázanie prítomnosti koncentrácie istej skupiny perfluórovaných látok, ktorých výskyt je možné predpokladať podľa literatúry v pitnej vode a taktiež vo vzorkách čistiarenských kalov. Stanovované látky sú zobrazené v tabuľke 2. Ako prvá bola vyvinutá nová metóda na LC-MS/MS. Zároveň boli optimalizované chromatografické podmienky a gradient mobilnej fáze. Výsledné podmienky sú uvedené v kapitole 5. - Výsledky. Pred stanovením obsahu PFCs v reálnych vzorkách bolo potrebné vyvinúť správny postup spracovania vodných a pevných vzoriek, vybrať najlepšiu extrakčnú metódu a nakoniec vyvinutou metódou stanoviť koncentrácie PFCs v reálnych vzorkách. Stručný prehľad a jednotlivé kroky pri analýze sú zobrazené v nasledujúcej schéme 3.

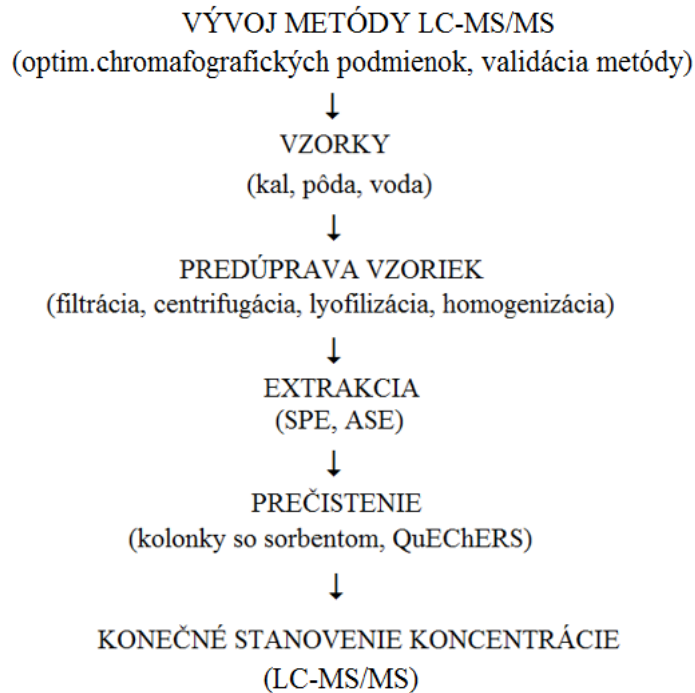


Schéma 3: Súhrnný postup analýzy.

Všetky analýzy uskutočnené pomocou LC-MS/MS boli vyhodnocované pomocou programu Analyst a MS Excel.

4.2.1 Úprava vzoriek

Pevné vzorky

Odobrané vzorky kalu z čistiarní odpadových vôd boli čiastočne vlhké, a preto ich bolo potrebné vysušiť mrazom, teda využiť metódu lyofilizácie. Väčšina vzoriek bola v tekutom stave, takže boli pomocou centrifugy (5500 rpm, 10 min) zbavené nadbytočnej vody a uložené do plastových kádiniiek, prekryté gázou a uložené do mrazničky o teplote -20 °C. Po minimálne 4 hodinách boli zmrazené vzorky preložené do lyofilizátora. Trvanie lyofilizácie v rozmedzí 2-10 dní sa líšilo v závislosti na obsahu vody vo vzorku. Čím boli vzorky viac vlhké, tým dlhšia bola doba sušenia. Po vysušení boli následne všetky vzorky zhomogenizované v trecej miske a pripravené na extrakciu. Každá vzorka bola ďalej analyzovaná v troch paralelách.

Vodné vzorky

Vodné vzorky boli odobrané z úpravni pitných vôd a boli skladované v chlade pri 4°C. Všetky vzorky pitnej vody boli pod vakuom prefiltrované cez papierový filter (poréznosť 0,5 µm). Vzorky boli po tomto kroku pripravené na extrakciu. Každá vzorka bola spracovaná v troch paralelách pre čo najpresnejšie výsledky.

4.2.2 Umelá kontaminácia vzoriek

Pevné vzorky

V prvom kroku bola využitá fortifikácia rôznych matric na čo najpresnejšie stanovenie výťažnosti danej metódy. Pevné aj kvapalné štandardy boli použité na prípravu štandardného roztoku v acetóne. Na umelú kontamináciu bol použitý morský piesok a kal č.12. Po navážení 35 gramov každej z matric bol postupne pridávaný štandardný roztok v acetóne tak, aby výsledná koncentrácia PFCs v matrici bola 1 µg/g. Acetón bol v tomto prípade zvolený pre jeho rýchle odparovanie pri izbovej teplote. Po jeho úplnom odparení boli jednotlivé matrice zhomogenizované a použité na extrakciu. Všetky štandardy boli tesne uzatvorené a uchované v chlade, aby nedošlo k odparovaniu.

Vodné vzorky

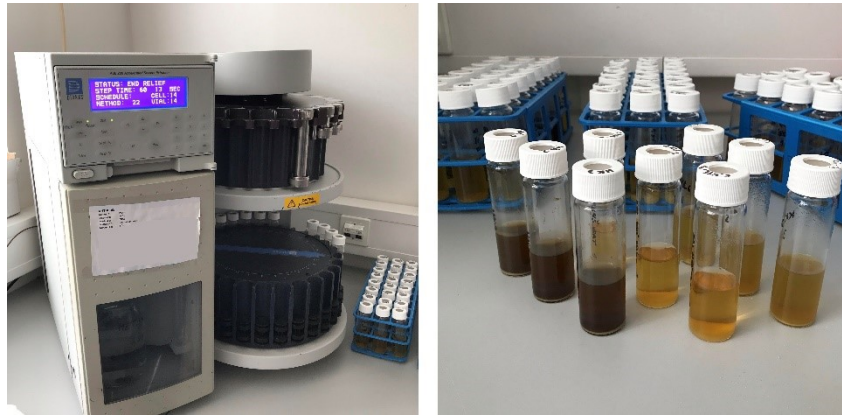
Pripravený štandardný roztok o koncentrácii 10 µg/mL PFCs v metanole bol použitý na umelú kontamináciu vody z kohútika, ktorá bola odobraná v objeme 2 L do odmerného valca. Výsledná koncentrácia bola rovná 1,5 ng/mL. Po dôkladnom premiešaní bolo pripravených deväť paralelných vzoriek, každá o objeme 100 mL. Takto pripravené vzorky boli ďalej zakoncentrované pomocou extrakcie pevnou fázou (SPE – solid phase extraction).

4.2.3 Extrakcia pevných a vodných vzoriek

Pevné vzorky

Na extrakciu pevných vzoriek bola použitá ASE. Reálne ako aj fortifikované vzorky boli rovnakým spôsobom odvážené v rozmedzí 1-3 gramov do kovovej patry. Každá vzorka bola extrahovaná z kovovej cely o objeme 11 mL. Do spodnej časti patry bol umiestnený papierový filter, na ktorý boli nasýpané približne 1-2 gramy morského piesku. Nasledovala vzorka homogenizovaného kalu, ktorý bol vo vrchnej

časti opäť doplnený morským pieskom, papierovým filtrom a patrona bola dôkladne uzatvorená a očistená od prebytočného piesku, aby pri extrakcii nedošlo k jej pretečeniu. Analýza jednej vzorky trvala približne 30 minút. Na obrázku 2 sú zobrazené obrázky z experimentu počas extrakcie a po jej ukončení.



Obr. 2: ASE extraktor (vľavo), vzorky kalov po extrakcii (vpravo).

Boli vyskúšané štyri rôzne metódy pre ASE analýzu. Umelo kontaminované boli vzorky piesku, pôdy a dvoch rôznych kalov (kal č. 16 a 18). Extrakcia všeobecne prebieha za zvýšenej teploty a tlaku, čo urdzuje rozúšťaadlo v kvapalnom stave. Taktiež boli uskutočnené extrakcie pomocou MeOH o HPLC kvalite obsahujúceho 1 % kyseliny mravčej (v/v) a metanolu obsahujúceho 1 % hydroxidu amónneho (v/v). Po odskúšaní rôznych metód a vyhodnotení výťažností bola zvolená jedna, ktorou boli neskôr extrahované všetky umelo kontaminované aj reálne vzorky.

Vodné vzorky

Na extrakciu vodných vzoriek pitnej vody boli použité polypropylénové kolónky OASIS®HLB 6cc (200 mg). Postup extrakcie bol zvolený podľa experimentu Loos a kol. [69]. Kondicionácia kolóniek bola podľa odporúčania výrobcu pre všetky paralely rovnaká v poradí 5 mL MQ (milli-Q voda, ultra čistá voda; $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$) voda a 5 mL MeOH. Po extrakcii bola do vopred zvážených 8mL vial kolónka vymytá 6 mL MeOH o LC-MS kvalite. Extrakt bol zakoncentrovaný odparením pod prúdom dusíka pri izbovej teplote dosucha. Finálne boli vzorky rozpustené v 1 mL metanolu a ponechané približne 5 minút v ultrazvuku, aby pomocou sonifikácie došlo k homogenizácii vzoriek. Tieto vzorky narozdiel od pevných vzoriek nebolo potrebné

d'alej prečisťovať, a preto boli prevedené do 2mL vial a analyzované priamo LC-MS/MS.

4.2.4 Prečistenie extraktov

Matričný efekt sa prejavil len u pevných vzoriek, z toho dôvodu sa prečistenie extraktov týkalo len pevných vzoriek. Po prvotnom vyextrahovaní fortifikovaných vzoriek bolo zistené, že dochádza k ovplyvneniu ionizácie na hmotnostnom detektore, čo sa u vodných vzoriek neprejavilo. Podľa viacerých vedeckých článkov pri extrakcii dochádza k tomuto javu [49], [66]. Z toho dôvodu boli vyskúšané viaceré prečisťovacie metódy na odstránenie matričných molekúl s vysokou molekulárnou hmotnosťou ako sú napríklad lipidy. Pred každým jedným prečistením bola časť vzorku, najčastejšie 1,5 mL, po ASE extrakcii centrifugovaná (5500 rpm, 15 minút) a 1,0 mL supernatantu bol prevedený do 2 mL uzatvárateľnej vialy, z ktorej bola vzorka neskôr aplikovaná na prečisťovaciu kolónku. Niektoré z prečisťovacích metód vyžadovali podľa odporúčaní výrobcu kondicionáciu kolóny pred samotným aplikovaním vzorky z dôvodu vyššej pravdepodobnosti zachytenia nechcených analytov. V nasledujúcej časti sú popísané jednotlivé typy použitých kolóniek pre prečistenie vzoriek kalu.

Tab. 6: Použitie rôznych typov kolón na prečistenie extraktov.

Typ kolóny	Kondicionácia	Objem vzorky	Výplach
ENVI-Florisil 3mL, 500 mg	X	1,6 mL + 0,4 mL H ₂ O +20μL kys.mravčia	0,4 mL 80:20 MeOH*:H ₂ O + FA*
ENVI-Carb 12mL, 1 g	X	2,0 mL	2,5 mL MeOH
ENVI-Carb 6mL, 500 mg	1mL MeOH*	1,0 mL+ 10μL kys.mravčia	2,5 mL MeOH*
ENVI-Carb 6mL, 500 mg	X	1 mL+ 10μL kys.mravčia	2,5 mL MeOH*
ENVI-Carb 6mL, 500 mg	X	1,0 mL + 10μL kys.mravčia	2 x 2,5 mL MeOH*
EMR Captiva lipid 3 mL, 300 mg	X	1,6 mL + 0,4 mL H ₂ O +20μL kys.mravčia	0,4 mL 80:20 MeOH:H ₂ O
EMR Captiva lipid 3 mL, 300 mg	X	1,6 mL + 0,4 mL H ₂ O +20μL kys.mravčia	0,8 mL MeOH*

*MeOH /metanol obsahujúci 1 % kys.mravčej (v/v/v)

Captiva EMR-Lipid (3 mL, 300 mg)

Táto kolónka nebola použitá na základe literatúry, ale bola vyskúšaná pre prípadné odstránenie lipidov z matrice. Kolóna o objeme 3 mL so sorbentom 300 mg bola použitá na odstránenie nežiadúcich lipidov bez straty analytov vo vzorke. Bolo odobraných 1,6 mL supernatantu, ktorý bol doplnený o 0,4 mL H₂O (20 % celkového objemu vzorky). V tomto prípade bola bez predošlej kondicionácie aplikovaná nariadená vzorka priamo na kolónku. Po gravitačnom prietoku nasledovalo prečistenie 0,4 mL MeOH:H₂O v pomere 4:1. Prečistená vzorka bola prevedená do 2 mL vialy, zriedená v pomere 1:1 v MeOH a pripravená na LC/MS analýzu.

ENVI-Carb SPE kolóny (12 mL, 1 g)

Na základe literatúry boli použité kolónky ENVI-Carb SPE o objeme 12 mL obsahujúca 1 g sorbentu. Tieto kolónky využívali na odstránenie ME [34]. Do 4 mL sklenenej vialky boli prevedené 2 mL vzorky, ktorá bola doplnená o 20 μL kyseliny mravčej a bez predchádzajúcej kondicionácie bola vzorka aplikovaná priamo na kolónu.

Prečistená vzorka bola odobraná do 4 mL vialy. Premytie prebehlo celkom dvakrát. Po aplikovaní vzorky nasledovalo 2,5 mL MeOH okysleného kys. mravčou (1% roztok). Následne bola vymenená viala a kolóna bola dodatočne premytá 2,5 mL okysleného MeOH (1% FA) z dôvodu nedostatočného prepláchnutia po prvom premývaní. ENVI-Carb kolónky boli použité na základe literatúry, v ktorej boli použité na prečistenie extraktov zo sedimentu a kalu z ČOV [49],[64],[67].

ENVI-Carb SPE kolóny (6 mL, 500 mg)

Pri zvolení menšej kolóny bol odobraný objem 1 mL supernatantu a bol okyslený 10 µL kys. mravčej. Kolónka bola kondicionovaná 1 mL MeOH (1% FA). Aplikovaná vzorka bola spolu s prvým premytím 2,5 mL MeOH (1% FA) odobraná do 4 mL zväzanej vialy a nasledovalo druhé prepláchnutie 2,5 mL MeOH (1% FA).

ENVI-Florisil SPE kolónky (3 mL, 500 mg)

Pri tomto type kolóniek sa postupovalo podľa návodu výrobcu. Pri prečistení pomocou florisilových kolóniek bolo 1,6 mL vzorky nariadených 0,4 mL H₂O (20 % celkového objemu) a okyslených 20 µL kys. mravčej. Bez kondicionácie bola vzorka priamo aplikovaná na kolónu a prepláchnutá 0,4 mL MeOH:H₂O (1% FA) v pomere 4:1. Zo zväzanej objemu bola prevedená časť do 2 mL vialky, kde bola zriedená v pomere 1:1 s metanolom.

Všetky vialy boli zväžené pred čistením a po prečistení a jednotlivé extrakty boli odobrané do 2 mL uzatvárateľnej vialky. Z každej prečisťovacej kolóny boli pripravené tri paralely. Takto pripravené vzorky boli pripravené na nasledujúcu LC-MS/MS analýzu.

Sorbenty typu QuEChERS

Prečistenie extraktov bolo vyskúšané aj pomocou tzv. QuEChERS (Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-Safe) za základe viacerých štúdií, kde používali tieto sorbenty na prečistenie extraktov ako aj na odstránenie matricového efektu [63],[68]. V tejto práci boli konkrétne použité tri typy: C18, Z-Sep, PSA všetky v 3 paralelách. QuEChERS boli použité podľa návodu výrobcu a sorbent v podobe bieleho prášku bol prisýpaný v množstve 10 mg do 2 mL vialy, ktorá bola na malú chvíľu ponechaná

vo vortexe. Po prečistení boli vzorky centrifugované (6000 rpm, 10 min) a odobrané do nových 2mL vial, v ktorých boli priamo aplikované na LC-MS/MS.

4.2.5 Analytické stanovenia

Všetky vzorky pitných vôd a prečistené vzorky kalu boli analyzované pomocou kvapalinového chromatografiu Nexera x2 s hmotnostným spektrometrom Sciex QTRAP 4500, ktorý pracuje v režime trojitého kvadrupólu a poskytuje sken v móde MRM (Multiple reaction monitoring). Všetky výsledky tejto diplomovej práce sú uvedené v nasledujúcej kapitole.

5. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Táto diplomová práca bola zameraná predovšetkým na vývoj metódy pre stanovenie PFCs v kale z ČOV a v surovej pitnej vode. V druhej časti tejto práce bola nová metóda aplikovaná na detekciu a kvantifikáciu stanovovaných analytov v reálnych vzorkách. Vďaka tejto metóde bol získaný screening reálnych čistiarenských kalov a potvrdenie prítomnosti PFCs v pitnej vode v rôznych oblastiach Českej republiky.

5.1 Vývoj LC-MS/MS metódy

5.1.1. Naladenie hmotnostného spektrometra

Pomocou štandardných roztokov v zmesi MeOH : H₂O : FA (50,0 : 49,9 : 0,1) boli nastavené optimálne podmienky hmotnostného spektrometra pre ionizáciu a detekciu stanovovaných perfluórovaných látok. Pomocou softvéru Analyst boli nájdené optimálne parametre MRM metódy. Pre každý analyt boli zvolené dva tranzitné prechody. Prvý z nich bol intenzívnejší a slúžil na kvantifikáciu látok a druhý (konfirmačný) slúžil na potvrdenie štruktúry (identifikáciu) analytu. Jednotlivé MRM prechody, ich deklastračný potenciál, kolízna energia a výstupný potenciál na kolíznej cele pre 19 PFCs sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tab. 7: Parametre MRM metódy.

MRM→ Analyt↓	Q1	Q3	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
PFBA	213	169	-40	-12	-13
	213	69	-40	-58	-19
PFPeA	263	219	-40	-10	-11
	263	69	-40	-52	-7
PFHxA	313	269	-45	-12	-7
	313	119	-45	-24	-5
PFHpA	363	319	-45	-14	-7
	363	169	-45	-22	-13
PFOA	413	369	-50	-14	-15
	413	169	-50	-24	-5
PFNA	463	419	-60	-14	-9
	463	219	-60	-24	-9

PFDA	513	469	-65	-18	-11
	513	219	-65	-24	-15
PFUdA	563	519	-65	-16	-11
	563	319	-65	-24	-13
PFDoA	613	569	-65	-18	-13
	613	319	-65	-26	-13
PFTrDA	663	619	-65	-20	-13
	663	169	-65	-34	-5
PFTeDA	713	669	-70	-18	-17
	713	169	-70	-34	-5
PFHxDA	813	769	-90	-22	-21
	813	219	-90	-34	-9
PFODA	913	869	-100	-24	-19
	913	219	-100	-38	-7
PFBS	299	80	-30	-62	-7
	299	99	-30	-54	-5
PFHxS	399	80	-90	-88	-7
	399	99	-90	-72	-9
PFOS	499	80	-110	-106	-7
	499	99	-110	-96	-9
PFOSA	498	78	-115	-82	-5
	498	64	-115	-130	-9
MeFBSA	312	219	-80	-22	-13
	312	65	-80	-52	-7
EtFOSA	526	169	-95	-34	-7
	526	219	-95	-32	-15

Q1/Q3– MRM prechod na prvom/treťom kvadrupóle, DP – deklastračný potenciál, CE – kolízna energia, CXP – výstupný potenciál na kolíznej cele

Boli testované optimálne podmienky iónového zdroja (turbo sprej) pre docielenie najlepšej ionizácie PFCs. Boli vyskúšané rôzne hodnoty napätia na iónovom zdroji, konkrétne -2500; -3500 a -4500 V, ktoré ovplyvňujú vznik a intenzitu prekurzorových iónov. Taktiež boli vyskúšané rôzne teploty v poradí 250 °C, 350 °C, 450 °C, 550 °C a 650 °C. Za najvhodnejšie podmienky bola zvolená teplota 350 °C a napätie -4500 V.

5.1.2 Optimalizácia chromatografických podmienok

Optimalizácia vhodných podmienok bola predpokladom pre odseparovanie analytov na čo má vplyv stacionárna fáza. Pri analýze PFCs na LC-MS/MS sa najčastejšie používa C18 (oktadecyl) reverzná stacionárna fáza [49], [62]. Bolo potrebné zaistiť čo najvhodnejšie zloženie mobilnej fázy, rýchlosť prietoku a teplotu kolóny. Cieľom bolo zistenie kombinácie týchto parametrov, ktorá mala poskytnúť odseparovanie všetkých analyzovaných perfluorovaných látok v priateľnom čase

a zachovať pri tom vhodné podmienky pre zvolenú stacionárnu fázu. Pri vzniku novej metódy bol použitý len jeden typ kolóny, XSelect® C18 (2,5µm; 2,1 x 75 mm). Bola vyskúšaná rôzna teplota kolóny v rozmedzí 30-45 °C, aby bola zistená optimálna teplota pre následnú validáciu. Taktiež bol nastavovaný prietok v rozmedzí od 0,2 do 0,6 ml.min⁻¹, konečná hodnota bola ponechaná na hodnote 0,6 ml.min⁻¹. Ako eluent bola finálne použitá mobilná fáza v zložení acetonitril a zmes acetonitrilu s vodou o kvalite MQ s prídavkom kyseliny mravčej 0,5% podľa Chambers a kol. [62]. V tabuľke 8 sú uvedené chromatografické podmienky použité pre zvolenú metódu.

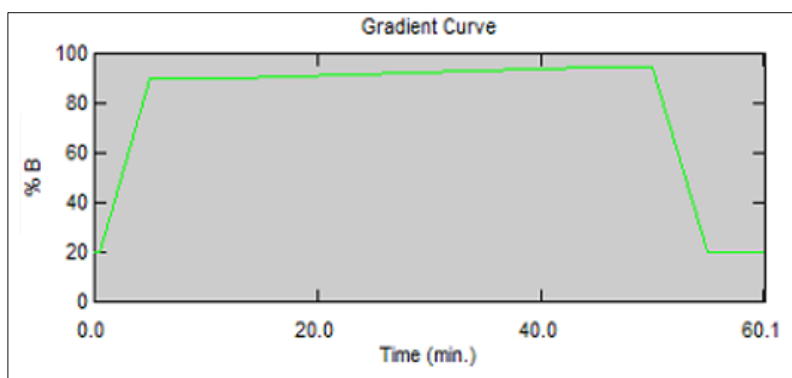
Tab. 8: Chromatografické podmienky použité pri meraní.

Meranie	Podmienky
Typ kolóny	Xselect CSH™ C18 2,5µm
Rozmery kolóny [mm]	2,1 x 75
Teplota kolóny [°C]	45
Mobilná fáza	A : 20% ACN v MQ + 0,5% FA (v/v/v) B : ACN + 0,5% (v/v/v)
Prietok [ml.min ⁻¹]	0,6
Čas / vzorka [min]	60

Najlepšia separácia píkov bola dosiahnutá pri použití gradientu, ktorý sa nachádza v tabuľke 9, z toho dôvodu bola táto metóda využívaná pre všetky analýzy.

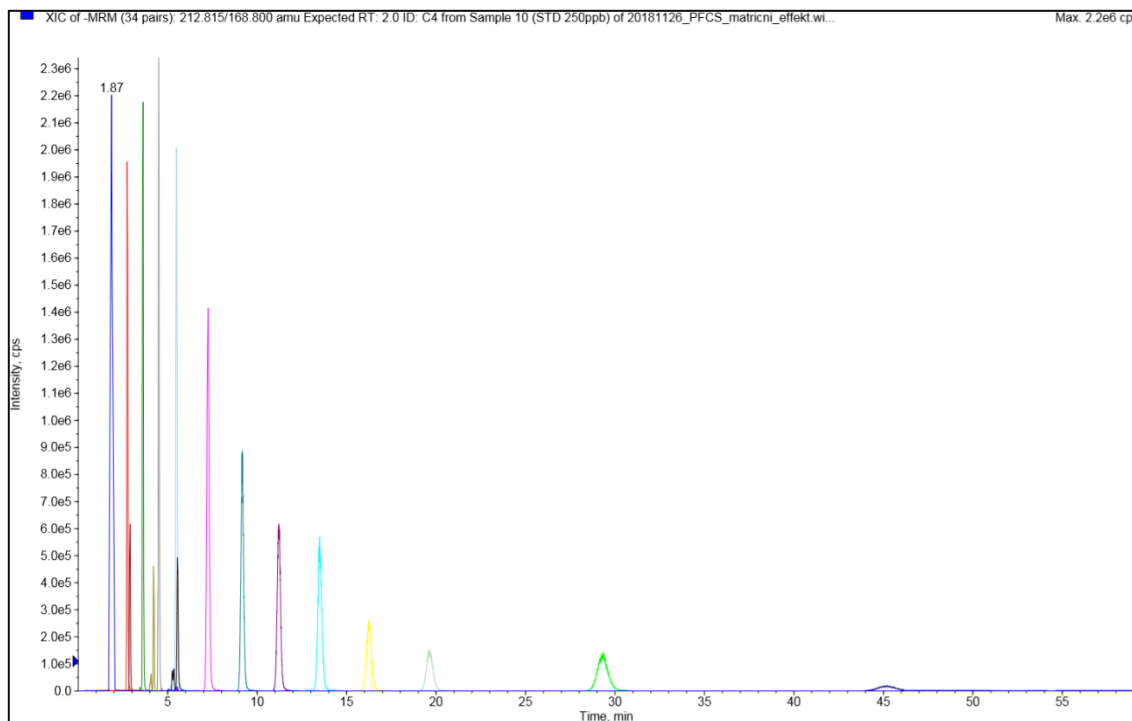
Tabuľka 9: Gradient pre separáciu na LC-MS/MS.

Čas [min]	% B
0,01	20
0,50	20
5,0	90
7,50	90
12,0	90
45,0	95
50,0	95
55,0	20
60,0	20



Kolóna XSelect® preukázala spoľahlivé odseparovanie jednotlivých látok. Analýza vzorku prebiehala 60 minút, čo bolo považované za optimálne, keďže dlhé reťazce PFCs (C16-C18) vykazovali retenčné časy 30-45 minút. V porovnaní

s literatúrou, kde sa časy pohybovali do 30 minút bola analýza dlhšia, ale väčšina analýz čistiarenských kalov nezahŕňa najdlhšie C16 a C18 PFCs, ktorá majú najdlhšie retenčné časy [66].



Obr. 3: Chromatografický záznam separácie stanovovaných PFCs v štandardnom roztoku o koncentrácii 250 ng/mL.

5.1.3 Validácia LC-MS/MS metódy

Kalibrácia

Kalibračná závislosť bola pripravená v rozmedzí koncentrácie 0,1 - 100 ng/mL. Limity detekcie a kvantifikácie boli určené pomocou šumu a výšky píku pre jednotlivé analyty. Limit detekcie bol vypočítaný pomerom trojnásobku šumu analytu a výšky píku a limit detekcie ako pomer desiatnásobku šumu analytu a výšky píku pre daný analyt.

Tab. 10: Základné validačné parametre LC-MS/MS metódy.

Parameter→ Analyt↓	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]	Rozsah kalibrácie [ng/mL]	R ²	t [min]
PFBA	0,07	0,17	0,10 - 100	0,9915	1,31
PFPeA	0,04	0,15	0,10 - 100	0,9917	2,15
PFHxA	0,21	0,70	0,50 - 100	0,9973	3,00
PFHpA	0,08	0,26	0,10 - 100	0,9973	3,84
PFOA	0,09	0,30	0,10 - 100	0,9970	4,76
PFNA	0,03	0,09	0,10 - 100	0,9966	6,27
PFDA	0,02	0,08	0,10 - 100	0,9977	8,11
PFUdA	0,02	0,07	0,10 - 100	0,9989	10,02
PFDoA	0,12	0,41	0,50 - 100	0,9989	12,18
PFTTrDA	0,16	0,54	0,50 - 100	0,9981	14,65
PFTeDA	0,12	0,41	0,25 - 100	0,9990	17,67
PFHxDA	0,14	0,45	0,25 - 100	0,9991	26,49
PFODA	0,21	0,71	0,50 - 100	0,9983	40,63
PFBS	0,10	0,33	0,10 - 100	0,9996	2,37
PFHxS	0,05	0,17	0,10 - 100	0,9957	3,67
PFOS	0,01	0,02	0,10 - 100	0,9978	4,93
PFOSA	0,19	0,62	0,50 - 100	0,9991	3,35
MeFBSA	0,13	0,42	0,25 - 100	0,9999	2,19
EtFOSA	0,19	0,65	0,50 - 100	0,9954	4,10

5.2 Analýza kvapalných vzoriek

Kvapalné vzorky, ktorých výsledky sú uvedené v tejto kapitole slúžili najmä na potvrdenie prítomnosti perfluórovaných látok aj v iných typoch matric nachádzajúcich sa v životnom prostredí na území ČR.

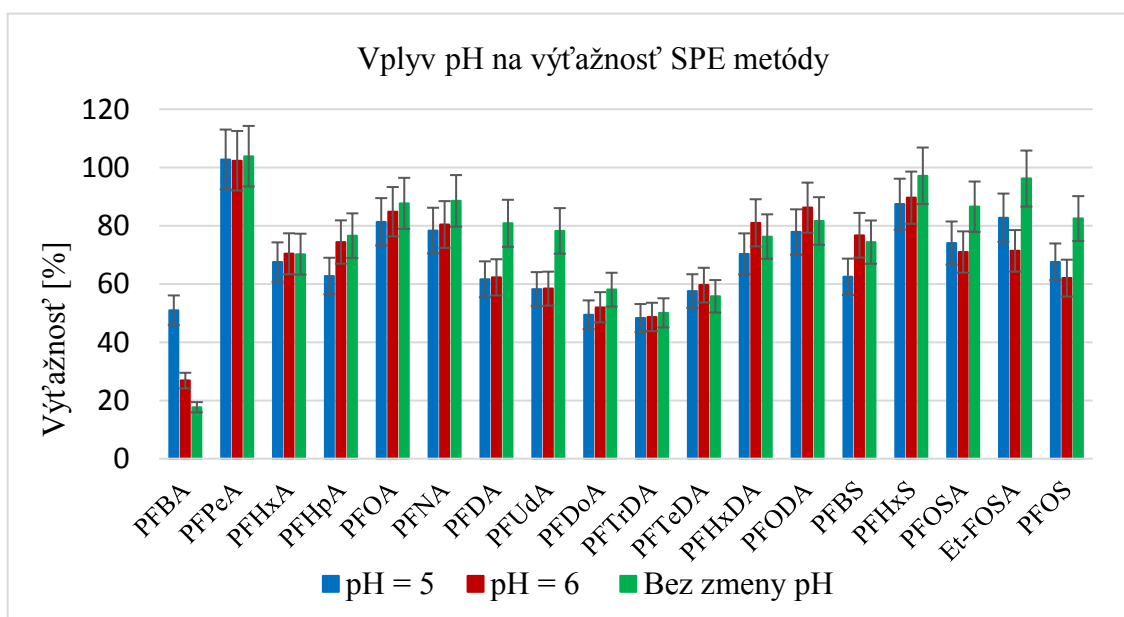
Pre štúdium kontaminácie pitnej vody vo vzorkách z lokalít v ČR bola vytvorená optimálna metóda pomocou SPE, ktorá bola následne použitá na zistenie koncentrácie PFCs v reálnych vzorkách. Reálne vzorky vody boli odobrané z úpravne pitných vôd a pred analýzou ponechané v chladničke o teplote približne 4 °C. Tento postup je zaužívaný pri predúprave vzoriek kalu [53]. Pred samotnou analýzou boli vzorky homogenizované dôkladným pretrepaním.

Na extrakciu boli podľa literatúry použité kolónky OASIS®HLB 6cc (200 mg) [69]. Podrobný postup je popísaný v experimentálnej časti tejto práce. Na rozdiel od Loos a kol., ktorých postup bol pozmenený a boli použité nasledovné kroky: kondicionácia 5 mL MeOH a 5 mL MQ vody, premytie kolónky 2 mL MQ vody, presušenie 15 minút a elúcia 6 mL MeOH. Extrakty boli odparené

pod prúdom dusíka pri izbovej teplote na približný objem 1 mL. Vialky boli zvážené pre stanovenie presného objemu a časť extraktu bola odobraná na LC-MS/MS analýzu. Pri analýzach pitnej vody na prítomnosť PFCs sa literatúre uvádza aj extrakcia pomocou Oasis WAX kolóniek, ale tie v tejto práci neboli testované, keďže HLB kolónky preukázali dostatočnú výťažnosť a ich použitie bolo následne aplikované aj na reálne vzorky hodnotené v závere tejto práce.

5.2.1 Vplyv pH na extrakciu vodných vzoriek

Prvým krokom pri analýze bola validácia metódy. Arvaniti a kol. preukázali, že zníženie pH spôsobí u vodných vzoriek zvýšenie elektrostatického odpudzovania a zároveň zvýši koncentráciu kationových skupín, ktoré sú dostupnejšie pre interakciu s negatívne nabitými perfluórovanými karboxylátmi, sulfonátmi a pod. Týmto krokom môžu neionizované formy intenzívnejšie reagovať s náplňou SPE kolóniek [61]. Hodnota pH analyzovanej vody z kohútiku bola rovná 7,5. Tri paralely vzoriek boli pomocou kyseliny chlorovodíkovej upravené na hodnotu pH 5 a ďalšie tri paralely na hodnotu 6. Posledné tri paralely zostali bez úpravy pH. Metóda okyslenia vzorky na pH 5 sa prejavila ako najlepšia a z toho dôvodu bola zvolená aj pri analýze reálnych vzoriek. Výhodou tejto metódy bola taktiež rovnaká hodnota pH pre všetky vzorky reálnych pitných vôd. Na nasledujúcom grafe sú zobrazené výťažnosti jednotlivých metód extrakcie umelo kontaminovanej vody z kohútika.



Obr. 4: Výťažnosti metód SPE v závislosti na zmene pH vzorky.

5.3 Extrakčná metóda pre pevné vzorky

Na základe rešerše o extrahovaní kalov a sedimentu obsahujúceho PFCs bola zvolená zrýchlená extrakcia rozpúšťadlom (ASE), ktorou boli extrahované vzorky čistiarenskeho kalu z rôznych lokalít v Českej republike [67], [49]. Schröder a kol. porovnali účinnosť troch rôznych spôsobov extrakcie PFCs z kalu, a to pomocou Soxhletovej extrakcie, SVE (extrakcia pár z pôdnej matrice) a ASE. Najlepšie bola vyhodnotená metóda ASE a aj na základe tohto zdroja bola táto metóda použitá pri analýze PFCs [67]. Predbežné výsledky extrakcie preukázali prítomnosť niektorých PFCs z vybraných štandardných látok, a preto bolo možné začať s hľadaním správneho postupu a optimalizáciou novej metódy na stanovenie presných koncentrácií na reálnych vzorkách. V nasledujúcej kapitole je popísaný presný postup.

5.3.1 Testovanie rôznych podmienok pre ASE extrakciu

Na základe literatúry boli vyskúšané rôzne podmienky ASE na umelo kontaminovanom morskom piesku a umelo kontaminovanom kale z ČOV č.12. Príprava jednotlivých vzoriek pred ASE extrakciou je detailne popísaná v kapitole 4.2.3. Metóda 1 [70], metóda 2 [63], metóda 3 [62], metóda 4 bola pridaná na základe zavedeného extrakčného postupu v laboratóriu environmentálnej biotechnologie Akadémie vied ČR a metóda 5 [71].

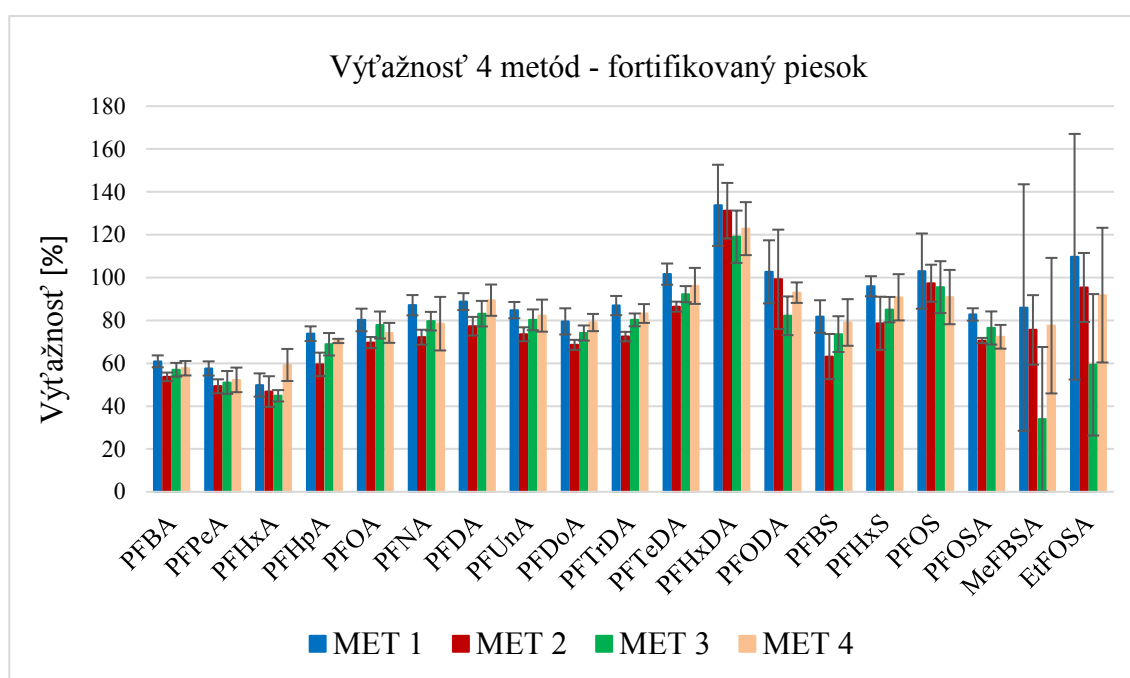
Tab. 11: Podmienky štyroch metód použitých pri ASE.

Parameter	ASE METÓDA				
	1.	2.	3.	4.	5.
Rozpúšťadlo	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH:H ₂ O (1:2)
Teplota [°C]	150	60	110	80	100
Tlak [psi]	1500	1200	1500	1500	1500
Predohrev [min]	6	5	5	5	5
Ohrev [min]	7	5	6	5	5
Prečistenie [sec]	60	120	60	60	60
Výplach [vol]	60%	30%	100%	80%	100%

Statický čas [min]	10	5	7	5	5
Počet cyklov	3	3	3	3	3

Extrakcia každej matrice prebiehala zakaždým v troch paralelách pre čo najpresnejšie stanovenie výťažnosti. Jednotlivé koncentrácie boli určené na základe kalibračnej závislosti štandardných rozotokov.

Vzorka fortifikovaného morského piesku bola extrahovaná 4 metódami na preukázanie výťažnosti. Výťažnosť vybranej metódy by sa mala približovať hodnote 100 % u všetkých analytov.



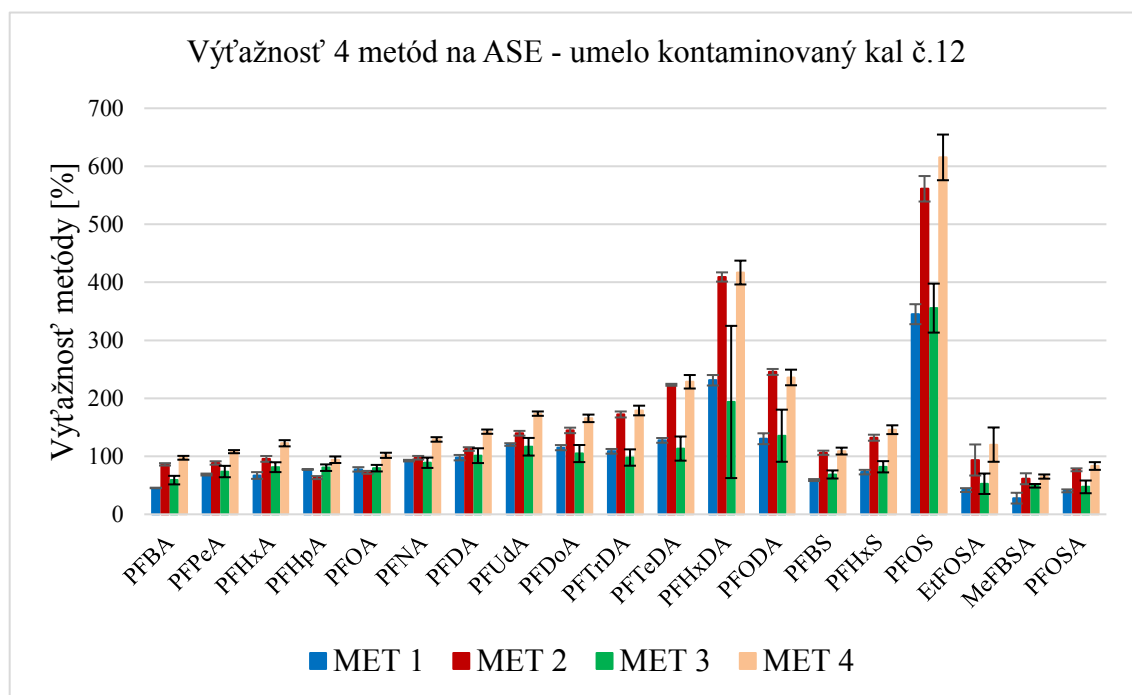
Obr. 5: Výťažnosť rôznych metód (morský piesok).

U väčšiny látok bola variabilita výťažnosti medzi metódami pomerne malá. Najväčšie rozdiely môžeme pozorovať u MeFBSA a EtFOSA, PFBS. U týchto analytov metóda 2 resp. 3 poskytovala nízku výťažnosť. Metódy 1 a 4 poskytovali konzistentné výsledky. Keďže extrakcia metódou 4 trvala približne polovicu času oproti metóde 1, z praktických dôvodov bola pre ďalšie extrakcie zvolená metóda 4.

Kombinácia výťažnosti a kratšieho času extrakcie u metódy 4 rozhodli o jej použití pre nasledovné extrakcie. Táto metóda bola použitá pri všetkých nasledujúcich extrakciách na ASE.

V rámci testovania nových metód extrakcie bola taktiež použitá metóda č.5, ktorá ale nie je uvedená v nasledujúcom grafe. Pri tejto metóde bol použitý MeOH s vodou v pomere 1:2, ale toto rozpúšťadlo nebolo vhodné pre použitie na ASE, pretože samotná extrakcia nebola úspešná.

Z nasledujúceho grafu je zrejmé, že u niektorých analytov dochádzalo k ME, ktorý sa prejavil ako falošne ovplyvnená výťažnosť. Pre zistenie metódy, ktorou by neboli extrahované látky spôsobujúce ME boli 4 metódami vyextrahované aj vzorky umelo kontaminovaného kalu. ME bol spozorovaný už pri prvej ASE extrakcii fortifikovaného kalu zásobným roztokom o koncentracii 10 µg/mL v acetóne na výslednú koncentráciu 1,0 µg/g. U každého vzorku sa ME prejavil inak. Očakávaná 80% – 120% výťažnosť sa napríklad u PFOS v met. 2 a 4 prejavila takmer šesťnásobne.



Obr. 6: Výťažnosť rôznych metód na ASE (fortifikovaný kal č.12).

Powely a kol. extrahovali kal pre zistenie koncentracii PFCs s dĺžkou reťazca C6-C14. Reťazce C9-C14 (v tejto práci navyše PFBA, PFPeA, PFTrDA, PFHxDA, PFODA, PFBS, PFHxS, PFOS, PFOSA, EtFOSA, MeFBSA) u všetkých testovaných metód v ich práci vykazovali výťažnosti 150 – 220 % [66]. Výsledky v tejto práci boli podobné ako popisujú autori tohto článku. Je potrebné brať do úvahy, že každá matrica môže spôsobovať iný ME (pozitívny, negatívny) s rôznou intenzitou.

V ďalšej časti práce bolo potrebné nájsť čo najlepší postup na prečistenie vyextrahovaných vzoriek, a tým dosiahnuť odstránenie ME.

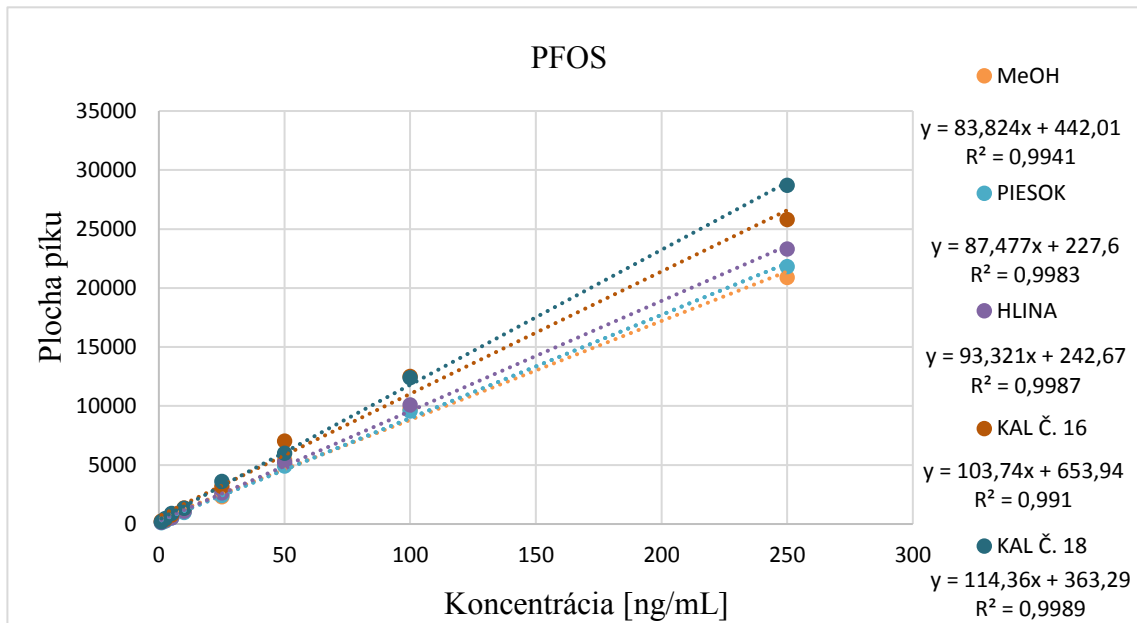
5.3.2 Vplyv pH rozpúšťadla na extrakciu

Kal č.3 bol umelo kontaminovaný na výslednú koncentráciu 1,0 µg/g a bol extrahovaný metódou 4 s parametrami, ktoré sú popísané v tabuľke 10. Výťažnosť môže u niektorých analytov ovplyvniť pH rozpúšťadla. Boli vyskúšané rôzne postupy extrakcie, pričom sa do rozpúšťadla pridávala kyselina alebo zásada. Okyslenie MeOH pomocou kyseliny mravčej 1 % (v/v) spôsobilo vyššiu výťažnosť látok spôsobujúcich ME, čo viedlo k falošne ovplyvnenej výťažnosti u dlhších reťazcov perfluórovaných kyselín (C11-C18). Naopak, bola skúsená aj alternatíva, a to alkalické prostredie MeOH docielené prídavkom hydroxidu amónneho, taktiež v 1 % (v/v). Prídavok hydroxidu amónneho do extrakčného činidla spôsobil opačný efekt a u väčšiny analytov s krátkym uhlíkovým reťazcom (C4-C7) bola nameraná výťažnosť metódy len približne 50 %. Pri pridaní kyseliny do rozpúšťadla boli vyextrahované látky, ktoré spôsobovali ME. Naopak, v prípade prídania báze by namerané hodnoty boli nižšie než skutočné. Napriek vyskúšaniu rôznych spôsobov extrakcie bola pre budúce analýzy zvolená metóda extrakcie za použitia MeOH bez aditív.

5.3.3 Matricový efekt

Na základe predbežných výsledkov boli pozorované nezvykle vysoké výťažnosti, preto bolo potrebné otestovať prítomnosť ME v rôznych matriciach. Bolo vyskúšané umelé kontaminovanie extraktov z rôznych matric v kalibračnej rade 1-100 ng/mL na základe experimentu Sun a kol., ktorý chceli preukázať ME analyzovaním kalibrácií štandardných roztokov v extraktoch rôznych matric [64]. V tejto práci boli analyzované extrakty z morského piesku, pôdy a dvoch rôznych kalov z ČOV (kal č.16 a 18). V nasledujúcom grafe sú zobrazené kalibračné priamky v týchto matriciach.

Ovplyvnenie vzoriek matričným efektom závisí na samotnej matrici aj na konkrétnych analytoch [48].



Obr. 7: Kalibračné zvislosti PFOS v rôznych matriciach

Pri porovnaní smernice kalibračnej priamky MeOH a dvoch rôznych matričiek, kalov z malých čistiarň odpadových vôd (t.j. <10 tisíc EO), je jednoznačne viditeľné ovplyvnenie ionizácie pri stanovení. Na základe nasledujúcej rovnice (1) bol vypočítaný matričný efekt pre jednotlivé analyty u štyroch extraktov z umelo kontaminovaných matričiek. Výpočtom je podiel hodnoty smernice kalibračnej priamky u fortifikovanej matričky a kalibračnej priamky čistého rozpúšťadla [64], [72].

Obr. 7: Kalibračné zvislosti PFOS v rôznych matriciach

$$ME_{ionizácia} [\%] = \frac{a_{matrička \text{ spikovaná po extrakcii}}}{a_{rozpúšťadlo}} \times 100 \quad (1)$$

a – smernica priamky

Pokiaľ by sa hodnota matričného efektu rovnala 100 %, v tom prípade by k ME nedochádzalo [73]. V tabuľke 11 je zjavné, že extrakcia je u väčšiny látok bola sprevádzaná ME.

Tab. 12: Matricový efekt jednotlivých PFCs v rôznych matriciach.

Matrica→ Analyt↓	Matricový efekt [%ME]			
	PIESOK	PÔDA	KAL č.16	KAL č.18
PFBA	101,9	104,4	128,2	158,0
PFPeA	92,4	97,0	119,2	158,0
PFHxA	91,0	98,3	113,0	122,6
PFHpA	98,4	102,1	128,0	143,4
PFOA	104,4	111,3	123,8	136,4
PFNA	100,7	116,8	113,3	117,3
PFDA	105,0	115,1	142,7	169,5
PFUdA	111,2	126,3	177,0	170,2
PFDoA	105,0	120,9	181,8	165,8
PFTTrDA	111,8	123,7	192,6	184,2
PFTeDA	115,5	138,0	208,4	222,1
PFHxDA	117,2	123,1	243,8	326,1
PFODA	131,5	121,0	272,2	507,0
PFBS	86,6	91,7	119,5	133,9
PFHxS	104,7	111,4	114,1	160,4
PFOS	97,4	105,4	116,2	136,5
PFOSA	94,4	109,6	100,1	118,0
MeFBSA	102,3	98,1	103,1	115,5
EtFOSA	120,9	120,1	75,6	92,8

Podľa vypočítaných hodnôt v percentách môžeme usúdiť, že takmer u všetkých analytov dochádzalo k ovplyvneniu signálu. Skreslený výsledok nastal vplyvom zvýšenej resp. zníženej ionizácie. Spomínaný Sun a kol. preukázali zmenu ionizácie, pričom u niektorých analytov dochádzalo k zníženiu o 13 % alebo k zvýšeniu ionizácie až o 24 %. V tejto štúdii, pri analýze extraktu z kalu, zdôraznili potlačenie ionizácie u zlúčenín PFBA, PFOS a zvýšenie ionizácie u PFHxA, PFOA. V extraktoch pevných matric použitých v tejto práci bol pozorovaný pozitívny ME. U väčšiny analytov dochádzalo k zvýšeniu ionizácie a tá sa prejavila zvýšením smernice kalibračnej priamky. U oboch matric kalu sa prejavila zvýšená ionizácia v rozmedzí od 172 až do 407 % u PFODA.

5.4 Zavedenie metodiky na prečistenie vzoriek

Vodné vzorky nebolo potrebné prečisťovať, a preto sa táto kapitola venuje len pevným matriciam. Po prvotnom vyextrahovaní fortifikovaných vzoriek bolo zistené, že dochádza k ovplyvneniu ionizácie na hmotnostnom spektrometre. Z toho dôvodu boli

vyskúšané viaceré prečisťovacie metódy na odstránenie molekúl spôsobujúcich pravdepodobne zmienený ME. Pred každým prečistením bola časť vzorku po ASE extrakcii centrifugovaná (5500 rpm, 15 minút) a supernatant bol na odobraný do 2 mL uzatvárateľnej vialy, z ktorej bol neskôr aplikovaný na prečisťovaciu kolónku. Niektoré z metód vyžadovali na základe odporúčaní výrobcu kondicionáciu kolóny.

5.4.1 SPE kolónky so sorbentom

V práci boli vyskúšané 4 rôzne typy prečisťovacích kolóniek, pričom ENVI-Carb kolóny v dvoch rôznych objemoch. Všetky vyskúšané postupy sú zobrazené v tabuľke 6.

Captiva EMR-Lipid (3 mL, 300 mg)

V diplomovej práci boli vyskúšané kolónky Captiva EMR-Lipid, ktoré vo všeobecnosti predstavujú veľmi selektívnu metódu na odstránenie lipidov s minimálnym potlačením iónov stanovovaného analytu. Boli vyskúšané dva spôsoby prečistenia. Prvý sa riadil protokolom výrobcu kolóniek, táto metóda mala nízku výťažnosť. Bolo vyskúšané dvojnásobné premytie kolónky, no ani tento spôsob nemal pozitívny vplyv na výsledky. Pri zriedení vzorky s vodou došlo k zakaleniu čo mohlo znamenať zrážanie nepolárnych látok vrátane sledovaných analytov, ktoré boli zachytené na sorbente EMR kolónky [74]. To sa prejavilo najmä u PFCs s dlhšími reťazcami PFHxDA, PFODA, ale aj PFBS, EtFOSA výťažnosťou 40 - 60 %. Pri ďalších prečisteniach tieto kolónky neboli použité.

ENVI-Carb SPE kolóny (12 mL, 1 g)

Použitie ENVI-Carb SPE kolóny bolo zvolené z dôvodu odlišnej stacionárnej fáze, konkrétne reverznej fáze. ENVI-Carb vo forme kolóniek alebo sypkého sorbentu boli použité pri analýzach rôznych typov matric a zaznamenali úspech pri stanovovaní PFCs [49],[64], [66]. Pri porovnaní použitia s literatúrou boli zvolené aj pre analýzu vzoriek ČOV v tejto práci [16], [34]. Uhlíkový sorbent sa skladá z prepojených uhlíkových vrstiev a ich neporézna štruktúra umožňuje rýchlu adsorpciu nežiadúcich zložiek obsiahnutých v stanovovanom analyte. Perfluórované reťazce nemajú afinitu k uhlíkovému sorbentu a neinteragujú s ním. Z tohto dôvodu boli zvolené ako jedna z prečisťovacích metód. Množstvo analytu potrebné na nadávkovanie bolo pri príprave

troch paralel priveľké a tak boli tieto typy kolóniek vymenené za menšie s objemom 6 ml a 500 mg sorbentu.

ENVI-Carb SPE kolóny (6 mL, 500 mg)

SPE kolóny o objeme 6 mL obsahujúce 500 mg sorbentu boli zvolené po predošlom vyskúšaní väčšieho typu (12 mL, 1 g). Väčšie kolónky pre nedostatočný objem vyextrahovanej vzorky kalu neboli pri experimente použiteľné. Pri menšom type bola vyskúšaná kondicionácia aj prečistenie bez kondicionácie. Bolo zistené, že kondicionácia pri tomto postupe nie je vhodným riešením, pretože dochádzalo k zadržiavaniu analytov na sorbente a výťažnosti metódy nedosahovali viac ako 60 %. Vo všetkých nasledujúcich meraniach sa používal postup bez počiatočnej kondicionácie. Pri dôkladnej analýze bolo zistené, že kolónku bolo potrebné eluovať dvojnásobným objemom, pretože pri finálnom preplachu 2,5 mL metanolu nedochádzalo k elúcii celého množstva prečistenej vzorky. Bolo vyskúšané prečistenie s dvojnásobným konečným preplachom, ktoré sa preukázalo ako účinná metóda na prečistenie vzoriek.

ENVI-Florisil SPE kolónky (3mL, 500 mg)

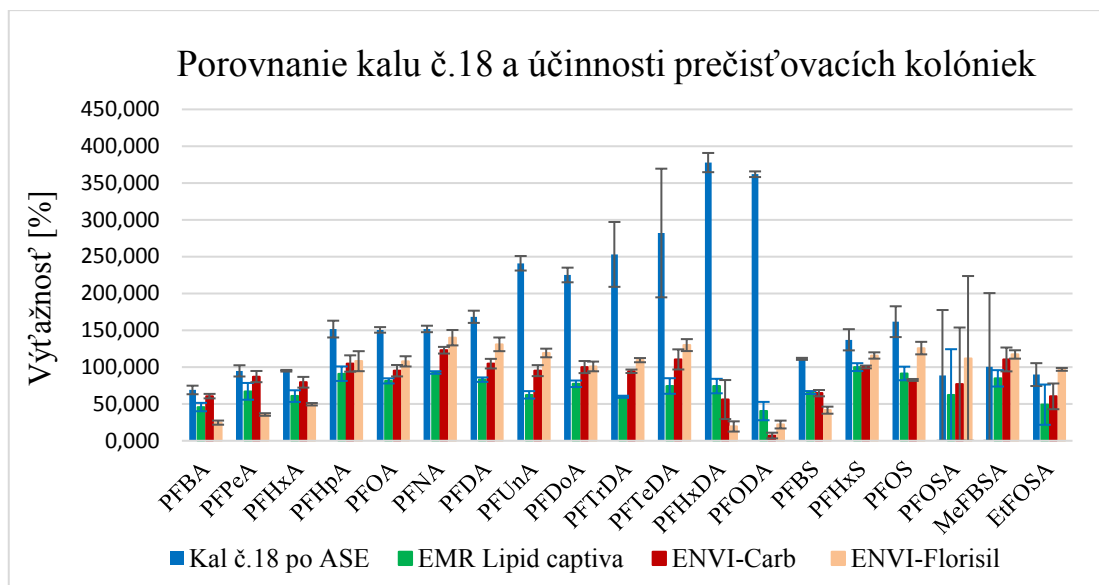
Pri prečistení boli vyskúšané aj kolónky ENVI-Florisil SPE. Tento typ kolón má veľmi polárny sorbent, ktorý absorbuje polárne zlúčeniny za použitia normálnej fázy. Medzi klasické použitie patria analýzy PCB, nitrozlúčenín, pesticídov a herbicídov. analytu. Han a kol. použili Florisil na odstránenie polárnych látok z matrice [74]. Pri zriedení vzorky s vodou dochádzalo k zakaleniu čo mohlo znamenať zrážanie nepochárnych látok vrátane sledovaných analytov, ktoré boli zachytené na sorbente EMR kolónky [74]. To sa prejavilo u všetkých analytov ako výťažnosť v rozmedzí 20 – 120 %. Pre PFCAs tieto kolóny nepreukázali účinnosť. Dochádzalo k zadržiavaniu analytov na sorbente u PFHxDA a PFODA. Táto metóda bola úspešná len pre malé množstvo analytov, väčšina z nich zostávala zachytená na sorbente. V porovnaní z metódou ENVI-Carb bola účinnosť nízka a z toho dôvodu bola táto metóda vylúčená pri ďalších experimentoch.

5.4.2 Metóda QuEChERS

Použité sorbenty C18, Z-Sep, PSA boli zvolené na základe ich vlastností odstraňujúcich vysokomolekulárne látky [68], [73]. Všetky typy boli použité na základe návodu výrobcu s drobnými úpravami v použitých objemoch a navážkach. V porovnaní s prečisťovacími kolónkami uvedenými v predchádzajúcej podkapitole bola ich účinnosť menšia a častokrát dochádzalo k adsorpcii analytov na povrch sorbentu. Najlepšie výťažnosti sa javili u typu PSA, a preto bola otestovaná prečisťovacia metóda, pri ktorej sa aplikovalo do vzorky extraktu rôzne množstvo PSA sorbentu v hodnotách 10 mg, 20 mg a 30 mg. Výsledky preukázali, že zvyšujúci sa počet miligramov sorbentu u niektorých analytov vôbec nemal vplyv na prečistenie. U analytov s kratším reťazcom dochádzalo k zníženiu koncentrácie analytu v dôsledku zachytávania analytu na sorbente. Tieto sorbenty sú vhodným spôsobom na odstránenie vysokomolekulárnych látok napríklad u pesticídov, ale v prípade perfluórovaných látok nedochádzalo k chcenému odstráneniu ME [68].

5.4.3 Zhodnotenie účinnosti prečisťovacích metód

Napriek štúdiám pri ktorých používali QuEChERS napríklad na prečistenie extraktov z krvných vzoriek, v prípade tejto diplomovej práce sorbenty neboli pri aplikácii na čistiarenské kaly aplikovateľné [48]. Ako najvhodnejšie z hľadiska odstránenia ME pri analýze PFCs z čistiarenskeho kalu sa javili SPE kolónky. Na nasledujúcom grafe sú zobrazené výťažnosti jednotlivých SPE kolón použitých pre odstránenie ME z umelo kontaminovaného kalu.



Obr. 8 – Porovnanie výťažnosti vzorky kalu č.18 po extrakcii a po prečistení rôznym typom kolóniek.

Obrázok 8 porovnáva výťažnosť v jednotkách % pre pôvodnú vzorku kalu po ASE extrakcii spolu s výťažnosťou získanou pomocou použitia prečisťovacích kolóniek ENVI-Carb s elúciou dvojnásobného množstva objemu.

Z grafu vyplýva, že metóda použitá na zbavenie sa ME bola účinná. Pre analyty so zdanlivými výťažnosťami 60-380 % bolo prečistenie pomocou uhlíkového sorbentu účinné a obdržaných 60-120 % s výnimkou PFHxDA a PFOA odpovedalo očakávanej výťažnosti pre jednotlivé analyty. Očakávané výťažnosti pre jednotlivé analyty boli zrovnateľné z hodnotami z umelo kontaminovaného piesku. Z grafu taktiež vyplýva, že PFCs s dlhými uhlíkovými reťazcami C16 a C18 zostali pravdepodobne adsorbované na sorbente a nebolo možné ich z kolóny vymyť. Powley a kol. pri testovaní ME obdržali výťažnosti u PFTeDA 241 % a z toho dôvodu taktiež volili používanie ENVI-Carb vo forme sypkého sorbentu [66]. Táto metóda bola účinná pre karboxylové kyseliny s uhlíkovým reťazcom od C4 do C14, stanovované sulfonáty a sulfonamidy. Pre overenie správnosti metódy bol roztok PFCs v MeOH aplikovaný na kolónky ENVI-Carb. Výťažnosť sa pohybovala od 80 do 110%. Z toho dôvodu boli v ďalších experimentoch zvolené ENVI-Carb kolónky ako hlavná metóda na odstránenie ME a k stanoveniu koncentrácií reálnych vzoriek.

V tejto diplomovej práci boli vytvorené dve nové metódy na určenie koncentrácie PFCs v reálnych vzorkách čistiarenského kalu a vo vzorkách pitnej vody z rôznych

lokalít v Českej republike. V nasledujúcej kapitole sú zhrnuté výsledky nameraných reálnych koncentrácií v oboch typoch matric.

5.5 Stanovenie koncentrácie PFCs v reálnych vzorkách

5.5.1 Koncentrácia PFCs v reálnych vodných vzorkách

Osem reálnych vzoriek pitnej vody bolo analyzovaných po validácii metódy, ktorá je podrobne popísaná v kapitole 5.2. Každá vzorka pitnej vody pochádzala z úpravne pitných vôd a jej pH bolo upravené na hodnotu 5. Extrahované vzorky boli analyzované na LC-MS/MS a vyhodnotenú koncentrácie sú v tabuľke 13.

Tab. 13: Namerané koncentrácie PFCs v reálnych vzorkách pitnej vody

Koncentrácia PFCs v pitnej vode [ng/L]								
Odber → Analyt↓	1	2	3	4	5	6	7	8
PFBA	0,47	0,40	0,60	0,42	0,17	0,14	0,60	0,30
PFPeA	0,70	1,28	2,51	0,99	0,44	0,45	1,68	1,63
PFHxA	3,74	3,89	4,34	3,64	1,85	1,44	4,98	1,46
PFHpA	2,24	3,11	5,76	1,20	0,76	0,59	2,40	0,97
PFOA	0,07	0,63	0,74	0,63	0,03	0,03	0,22	0,15
PFNA	0,07	0,15	0,21	0,13	0,04	0,02	0,07	0,06
PFDA	0,10	0,11	0,10	0,07	0,02	0,02	0,07	0,03
PFUnA	0,09	0,06	0,10	0,06	0,04	0,13	0,10	0,05
PFDoA	0,08	0,05	0,07	0,06	0,02	0,04	0,13	0,02
PFTTrDA	0,05	0,05	0,05	0,05	0,02	0,04	0,05	0,02
PFTeDA	0,09	0,05	0,07	0,09	0,02	0,02	0,04	0,01
PFHxDA	0,06	0,01	0,01	N/D	N/D	N/D	0,02	N/D
PFODA	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
PFBS	0,38	1,07	2,46	1,69	0,23	0,21	1,14	1,08
PFHxS	0,36	0,49	0,49	0,76	0,23	0,16	0,60	0,23
PFOS	1,03	3,98	5,41	5,43	0,30	0,30	1,26	0,86
Suma	9,52	15,32	22,95	16,02	4,15	3,53	13,34	6,87

1, 3, 4 – Surová voda; 2, 5, 6 – Voda z úpravne; 7, 8 – Voda z kohútika.

Vodné vzorky, u ktorých nebol analyt detegovaný sú označené ako N/D. Vplyvom prekoncentrácie analytu pomocou SPE boli dosiahnuté LOD metódy približne 500krát nižšie než LOD LC-MS stanovenia. Vo všetkých vzorkách boli preukázané koncentrácie v jednotkách ng/L PFCs až na výnimku najdlhšieho uhlíkového reťazca

PFODA, v niektorých prípadoch aj PFHxDA. Najzastúpenejšie boli analyty s kratšími reťazcami, konkrétne PHxA, PFHpA, PFOS a PFBS. Vo svete sú v súčasnosti analyzované pitné vody kontaminované dvoma najvyskytovanějšími PFCs a to PFOS a PFOA. V Katalánsku testovali pitnú vodu na zistenie obsahu spomínaných analytov. Výsledkom bol výpočet denného príjmu PFOS a PFOA pre človeka žijúceho v danej oblasti. Hodnoty boli rovné 3,9 ng/deň pre PFOS a 4,8 ng/deň pre PFOA [75]. V porovnaní s pitnou vodou v ČR sa hodnoty PFOS v niektorých vzorkách rovnali hodnotám 4,0 – 5,4 ng/L pitnej vody. Štúdia Hölzer a kol. pitnej vody v Nemecku preukázala koncentrácie PFOA v rozmedzí 500 – 640 ng/L čo je v porovnaní so vzorkami z ČR stonásobne vyššie množstvo [76]. Na záver bol stanovený celkový obsah PFCs v pitnej vode. Po sčítaní nameraných koncentrácií všetkých analytov v pitnej vode bol obsah PFCs v rozmedzí od 3,53 – 22,95 ng/L. V porovnaní s inými krajinami sú tieto hodnoty u väčšiny analytov rovnaké alebo menšie. Je nutné podotknúť, že analyzované množstvo pitných vôd v tejto diplomovej práci nebolo dostatočné na preukázanie reprezentatívneho vzorku pre celé územie ČR. Jednalo sa o malý počet individuálnych vzoriek pitnej vody na našom území, z ktorých nie je možné vyvodiť všeobecný záver. V ČR sa tejto problematike venovalo zatiaľ len malé množstvo vedeckých skupín [30],[54].

5.5.2 Koncentrácia PFCs vo vzorkách kalu z ČOV

Reálne vzorky kalov získané z 23 ČOV v Českej republike boli analyzované na základe novo vytvorenej metódy. Postup stanovenia koncentrácie je zobrazený v nasledujúcej tabuľke 14.

Tab. 14: Kompletná analýza reálnych vzoriek kalov z ČOV.

Postup	Podmienky jednotlivých krokov
1. Zmrazenie vzoriek kalu	- 20 °C
2. Lyofilizácia vzoriek	- 80 °C
3. Homogenizácia	
4. Extrakcia pomocou ASE	Metóda 4 – rozpúšťadlo: metanol (1% FA), teplota 80 °C, tlak 1500 psi, počet cyklov 3, statická fáza: 5 min
5. Prečistenie vzoriek od matričného efektu	ENVI-Carb kolónky (6 mL, 500 mg), bez kondicionácie, 1 mL vzorky + 10 µL kys. mravčia, premytie 4 x 2,5 mL MeOH (1% FA)
6. Zakoncentrovanie vzorky	Odparenie MeOH na výsledky objem ± 2 mL
7. LC-MS/MS	Vyhodnotenie koncentrácií v reálnych vzorkách

U reálnych vzoriek bol zvýšený elučný objem MeOH na dvojnásobok oproti fortifikovaným vzorkám. Bola aplikovaná elúcia 4 x 2,5 mL MeOH, aby došlo k čo najväčšiemu uvoľneniu prečistených analytov z ENVI-Carb kolónky. Vzorky boli v tomto prípade veľmi nariadené a takto nízke koncentrácie by nebolo možné analyzovať. Z tohto dôvodu boli počas dvoch dní ponechané v digestore na odparenie rozpúšťadla na približne 2 mL. V nasledujúcej tabuľke 15 sú zobrazené výsledky reálnych vzoriek kalu získaných z ČOV na rôznych miestach ČR.

Tab. 15: Výsledné koncentrácie reálnych vzoriek kalu z ČOV v ČR

Analyt → ČOV ↓	KONCENTRÁCIA [ng/g]																	SUMA		
	PFBA	PFPeA	PFHxA	HFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFTrDA	PFTeDA	PFBS	PFHxS	PFOS	PFOSA	EtFOSA	MeFBSA	COOH	SO ₃	SO ₂ NH ₂
1	33,0	20,1	22,9	7,9	13,2	3,3	11,6	3,4	5,8	1,3	3,3	1,1	N/D	15,8	N/D	N/D	N/D	125,7	17,0	N/D
2	14,5	14,0	12,4	3,9	N/D	1,2	5,1	2,7	3,0	N/D	N/D	6,5	N/D	14,8	N/D	N/D	N/D	56,8	21,4	N/D
3	7,3	13,4	22,1	N/D	10,4	2,2	13,1	2,5	7,0	N/D	N/D	N/D	N/D	14,5	N/D	N/D	N/D	77,8	14,5	N/D
4	N/D	N/D	4,2	N/D	N/D	N/D	3,2	1,9	2,2	N/D	N/D	N/D	N/D	14,2	N/D	N/D	N/D	11,6	14,2	N/D
5	N/D	N/D	13,1	N/D	N/D	N/D	4,0	1,6	2,9	N/D	N/D	N/D	N/D	14,6	N/D	N/D	N/D	21,5	14,6	N/D
6	N/D	N/D	13,1	1,6	19,3	1,2	12,3	3,1	8,8	1,6	3,7	N/D	N/D	340,4	1,0	N/D	N/D	64,8	340,4	1,0
7	6,6	N/D	N/D	N/D	6,7	1,3	5,4	1,2	3,0	N/D	N/D	N/D	N/D	13,9	N/D	N/D	N/D	24,1	13,9	N/D
8	N/D	N/D	N/D	N/D	6,4	1,5	8,6	1,2	4,9	N/D	2,5	N/D	N/D	10,6	N/D	N/D	N/D	25,1	10,6	N/D
9	N/D	N/D	N/D	N/D	3,2	2,4	13,6	2,0	3,8	N/D	N/D	N/D	N/D	5,5	N/D	N/D	N/D	25,0	5,5	N/D
10	N/D	N/D	N/D	N/D	7,2	1,2	3,4	2,6	3,3	1,2	1,9	N/D	N/D	386,0	38,1	N/D	N/D	20,9	386,0	38,1
11	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0,1	N/D	N/D	N/D	N/D	5,1	N/D	N/D	N/D	0,1	5,1	N/D
12	N/D	N/D	N/D	N/D	7,8	N/D	5,6	N/D	2,5	N/D	N/D	N/D	N/D	6,9	N/D	N/D	N/D	16,0	6,9	N/D
13	N/D	N/D	9,2	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	10,7	N/D	N/D	N/D	9,2	10,7	N/D
14	N/D	N/D	3,6	3,5	22,3	2,2	11,8	2,2	6,2	1,5	3,3	N/D	N/D	9,9	N/D	N/D	N/D	56,7	9,9	N/D
15	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	5,4	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	9,9	N/D	N/D	N/D	5,4	9,9	N/D
16	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	4,6	N/D	2,2	N/D	N/D	N/D	N/D	19,1	N/D	N/D	N/D	6,8	19,1	N/D
17	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	4,6	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	9,0	N/D	N/D	N/D	4,6	9,0	N/D
18	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	10,8	N/D	9,7	3,6	5,4	N/D	N/D	12,0	N/D	N/D	N/D	29,5	12,0	N/D
19	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	4,7	N/D	1,9	N/D	N/D	N/D	N/D	9,0	N/D	N/D	N/D	6,6	9,0	N/D
20	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	5,9	2,8	7,1	2,3	3,6	N/D	N/D	16,2	N/D	N/D	N/D	21,7	16,2	N/D
21	N/D	N/D	4,7	N/D	4,0	1,0	1,7	0,9	2,0	1,0	1,6	N/D	N/D	7,0	1,2	N/D	N/D	16,8	7,0	1,2
22	N/D	N/D	4,6	N/D	11,0	2,1	9,0	2,1	3,5	1,2	2,2	2,0	N/D	5,3	N/D	N/D	N/D	35,7	7,2	N/D
23	N/D	N/D	N/D	N/D	2,9	1,0	2,2	0,9	1,4	0,7	N/D	N/D	N/D	4,5	N/D	N/D	N/D	9,0	4,5	N/D

Hodnoty v tabuľke 15 odpovedajú priemeru koncentrácií PFCs z troch paralelných stanovení u ktorých bola chyba menšia než 20 %. Chyba merania sa pohybovala v hodnote približne 20 %. LOD boli približne 10krát vyššie než LOD u analytickej metódy. Limit detekcie bol ovplyvnený rôznymi navážkami a rôznym objemom extrakčného činidla po ASE extrakcii.

Reálne vzorky kalov z 23 ČOV v Českej republike potvrdili predpokladanú prítomnosť PFCs stanovovaných analytov. Napriek prvotným komplikáciám sprevádzaným ME bola vynájdená metóda na odstránenie ionizácie a vzorky po prečistení cez ENVI-Carb kolónky preukázali spoľahlivé výsledky. Predpoklad pre PFOS a PFOA v najvyššom zastúpení boli preukázané a PFOS bol prítomný vo všetkých vzorkách kalu v rozmedzí 4,5 – 386,0 ng/g, zatiaľ čo PFOA nebol preukázaný vo všetkých vzorkách, ale taktiež sa vyskytoval v koncentráciách do 22,3 ng/g.

Celková suma PFCAs dosahovala naprieč sériou analyzovaných vzoriek hodnoty v rozmedzí 0,1 – 125,7 ng/g. Koncentrácie PFOS v kale č.6 a č. 10. zastúpené v koncentráciách 340,4 a 386,0 ng/g. Namerané koncentrácie je možné vysvetliť lokalitou týchto dvoch ČOV. Jednalo sa o ČOV v okolí farmaceutického zariadenia a priemyselnej oblasti. Výsledky sú porovnateľné s výsledkami štúdie Sun a kol., ktorý preukázali tri až šesť krát vyššiu prítomnosť PFOS u 3 z 20 ČOV, v ktorých bol analyzovaný anaeróbne stabilizovaný splaškový kal v okolí Zürichu. Hodnoty 28 – 637 ng/g boli vysvetlené umiestnením ČOV v blízkosti továrne na povrchové úpravy materiálov [33]. Analýza čistiarenskeho kalu vedeckou skupinou Ma a kol. taktiež potvrdila výskyt PFOS vo Švédsku v priemere 2644 pg/kg a v Dánsku 1041 pg/g kalu [32].

V porovnaní s inými krajinami, v ktorých boli koncentrácie PFCs pozorované sú výsledky v ČR porovnateľné. I na našom území bola potvrdená spomedzi PFCs najvyššia koncentrácia u PFOS.

Novo vytvorená metóda preukázala výskyt PFCs v sledovaných matriciach a ich prítomnosť v životnom prostredí na území ČR. V porovnaní s inými krajinami sveta boli koncentrácie PFCs porovnateľné. U vysokých hodnôt PFOS v ČOV kale je možné predpokladať rovnaký dôvod ako v prípade kalu zo Švajčiarska, umiestnenie ČOV v blízkosti priemyselnej oblasti [33].

6. ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bol vývoj novej metódy pre stanovenie PCFs, jej validácia a následné využitie pre analýzu reálnych vzoriek z čistiarní odpadových vôd a pitnej vody na rôznych miestach v Českej republike. Najprv bola automaticky optimalizovaná metóda na hmotnostnom spektrometre. Nasledovne boli optimalizované podmienky ionizácie na hmotnostnom spektrometre. Ďalším krokom bol výber vhodných extrakčných postupov pre vodné a pevné matrice. Bola optimalizovaná a validovaná metóda pre vodné vzorky s využitím SPE pre-extrakčného kroku. Ďalej bola vyvinutá metóda na extrakciu pevných matric a odstránenie pozorovaného matričného efektu (ME), ktorý ovplyvňoval výsledky. Pre minimalizáciu ME sme otestovali rôzne druhy adsorbentov vo forme kolóniek alebo sypkého sorbentu. Najlepší postup bol dosiahnutý použitím ENVI-Carb kolónky. Napokon bolo analyzovaných 9 reálnych vzoriek pitnej vody a 23 vzoriek kalu z ČOV v ČR. Celkový obsah PFCs vo vzorkách pitnej vody sa pohyboval v rozmedzí 3,5 – 23 ng/L. Obsah PFOS bol v rozmedzí 0,3 – 5,4 ng/g. Pevné vzorky kalu obsahovali koncentrácie PFCAs až do 125,7 ng/g. Koncentrácie PFOS boli detegované vo vzorkách kalu v koncentráciách do 386 ng/g. Celkový obsah 19 PFCs v ČOV sa pohyboval od 5,2 do 445,0 ng/g. Vzorky v tejto práci nie je možné považovať za reprezentatívne pre celé územie Českej republiky, ale vďaka získaným hodnotám koncentrácií PFCs v kale a vo vzorkách pitnej vody môžeme usúdiť, že výsledky sú porovnateľné s výsledkami v iných krajinách sveta.

7. LITERATÚRA

- 1 Giesy, J.P.; Kannan, K.: These bioaccumulative compounds occur globally, warranting further study. *Environmental science & technology* (2002).
- 2 Dasu, K.; Nakayama, S.F.; Yoshikane, M.; Mills, M.A.; Wright, J.M.; Ehrlich, S.: An ultra-sensitive method for the analysis of perfluorinated alkyl acids in drinking water using a column switching high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **46–54**, 1494 (2017).
- 3 OECD(2013), OECD/UNEP Global PFC Group, Synthesis paper on per- and polyfluorinated chemicals (PFCs), Environment, Health and Safety, Environ.Directorat,OECD. Dostupné z URL: <https://www.oecd.org/env/ehs/risk-management/PFC_FINAL-Web.pdf> [cit. 17.7.2018]
- 4 Lewandowski, G.; Meissner, E.; Milchert, E.: Special applications of fluorinated organic compounds. *Journal of Hazardous Materials* **A136**, 385–391 (2006).
- 5 Berger, R.; Resnati, G.; Metrangolo, P.; Weber, E.; Hulliger, J.: Organic fluorine compounds: a great opportunity for enhanced materials properties. *Chemical Society Reviews* **40**, 3496–3508 (2011).
- 6 Theodoridis, G.: Fluorine-Containing Agrochemicals: An Overview of Recent Developments. Fluorine and the Environment. *Agrochemicals, Archaeology, Green Chemistry & Water*, 121–175 (2006).
- 7 Fraser, A. J.; Webster, T. F.; Watkins, D. J.; Strynar, M. J.; Kato, K.; Calafat, A. M.; McClean, M. D.: Polyfluorinated compounds in dust from homes, offices, and vehicles as predictors of concentrations in office workers' serum. *Environment International* **60**, 128–136 (2013).
- 8 Reference and handling guide: Perfluoroalkyl compounds. Dostupné z URL: <https://well-labs.com/docs/pfc_reference_handling_guide.pdf> [cit. 27.6.2019]
- 9 US Pat 2519983A. Simons, J. H.: Electrochemical process of making fluorine-containing carbon compounds. USA 22.8.1950
- 10 EU Pat 0643155B1. Thomas M.: Process for preparing fluorochemicals. 28.10.1998.
- 11 Lindstrom, A. B.; Strynar, M. J.; Libelo, E.L.: Polyfluorinated Compounds: Past, Present, and Future. *Environmental Science & Technology* **45**(19), 7954–7961 (2011).

- 12 Schaidler, L. A.; Balan, S. A.; Blum, A.; Andrews, D. Q.; Strynar, M. J.; Dickinson, M. E.; Peaslee, G. F.: Fluorinated Compounds in U.S. Fast Food Packaging. *Environmental Science & Technology Letters* **4**(3), 105–111 (2017).
- 13 US Pat 3666478A. Groh, M.; Oetiker, A.: Photographic material containing aliphatic perfluoro compounds. 30.5.1989.
- 14 Moody, C. A.; Field, J. A.: Perfluorinated Surfactants and the Environmental Implications of Their Use in Fire-Fighting Foams. *Environmental Science & Technology* **34**(18), 3864–3870 (2000).
- 15 Moody, C.A., et al.: Monitoring Perfluorinated Surfactants in Biota and Surface Water Samples Following an Accidental Release of Fire-Fighting Foam into Etobicoke Creek. *Environmental Science & Technology*, **36**(4), 545-551 (2002).
- 16 Moody, C. A.; Kwan, W. C.; Martin, J. W.; 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. *Analytical Chemistry* **73**(10), 2200–2206 (2001).
- 17 Brockman, R. W.; Davis, J. M.; Stutts, P.: Metabolism of uracil and 5-fluorouracil by drug-sensitive and by drug-resistant bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **40**, 22–32 (1960).
- 18 Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V.: Fluorine in medicinal chemistry. *Chemical Society Reviews* **37**(2), 320–330 (2008).
- 19 Bondi, A.: Van der Waals Volumes and Radii. *Journal of Physical Chemistry* **68**(3), 441–451 (1964).
- 20 Park, B.K.; Kitteringham, N.R.; O'Neill, P.M.: Metabolism of fluorine containing drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **41**, 443-70 (2001).
- 21 O'Hagan, D.; Rzepa, H. S.: Some influences of fluorine in bioorganic chemistry. *Chemical Communications* **7**, 645–652 (1997).
- 22 Fujii, Y.; Harada, K. H.; Koizumi, A.: Occurrence of perfluorinated carboxylic acids (PFCAs) in personal care products and compounding agents. *Chemosphere* **93**(3), 538–544 (2013).
- 23 Ericson, I.; Martí-Cid, R.; Nadal, M.; Van Bavel, B. et al: Human Exposure to Perfluorinated Chemicals through the Diet: Intake of Perfluorinated Compounds in Foods from the Catalan (Spain) Market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(5), 1787–1794 (2008).

- 24 Li, P.; Oyang, X.; Zhao, Y. et al: Occurrence of perfluorinated compounds in agricultural environment, vegetables, and fruits in regions influenced by a fluorine-chemical industrial park in China. *Chemosphere* **225**, 659–667 (2019).
- 25 Perfluorované kontaminanty ve vodním ekosystému České republiky. Dostupné z URL: <http://www.recetox.muni.cz/nc/res/file/2007/8_nove_typy_polutantu.pdf> [cit.12.7.2019]
- 26 Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.: *Chemie prvků. Svazek 2*. Praha, Informatorium, 1993.
- 27 Lin, Y.-C.; Lai, W. W.-P.; Tung, H.; Lin, A. Y.-C.: Occurrence of pharmaceuticals, hormones, and perfluorinated compounds in groundwater in Taiwan. *Environmental Monitoring and Assessment*, **187**(5), (2015).
- 28 Allen, R.; Stickley, Jr.; Twedt D.J.; Heisterberg J.F.; Mott D.F.; Glahn F.: *Wildlife Society Bulletin* **14**(4), 412-418 (1986).
- 29 Gellrich, V.; Stahl, T.; Kepper, T. P.: Behavior of perfluorinated compounds in soils during leaching experiments. *Chemosphere* **87**(9), 1052–1056 (2012).
- 30 Bečanová, J.; Komprdová, K.; Vrana, B.; Klánová, J.: Annual dynamics of perfluorinated compounds in sediment: A case study in the Morava River in Zlín district, Czech Republic. *Chemosphere* **151**, 225–233 (2016).
- 31 Milčák, P.: Možnosti termického využívání kalu v kotli s cirkulující fluidní vrstvou. *Energie z biomasy-seminář Brno*, 67-71 (2003).
- 32 Kallenborn, R.; Berger, U.; Järnberg, U.: Perfluorinated alkylated substances (PFAS) in nordic environment. *TemaNord* **552**, (2004).
- 33 Sun, H.; Gerecke, A. C.; Giger, W.; Alder, A. C.: Long-chain perfluorinated chemicals in digested sewage sludges in Switzerland. *Environmental Pollution* **159**(2), 654–662 (2011).
- 34 Ma, R.; Shih, K.: Perfluorochemicals in wastewater treatment plants and sediments in Hong Kong. *Environmental Pollution* **158**(5), 1354–1362 (2010).
- 35 Medzinárodný seminár „Technika a technológie v odpadovom hospodárstve 2009“, Zvolen. Dostupné z URL: <https://kelt.tuzvo.sk/sites/default/files/ttoh_2009.pdf> [cit.20.5.2019]

- 36 Demko, J.: *Environmentálne aspekty zhodnocovania a zneškodňovania čistiarenských kalov*. 1.vydanie, Výskumný ústav vodného hospodárstva, 2003.
- 37 Karkulár, D.: Čistiarenské kaly pre niekoho hodnotné hnojivo, pre iných nebezpečný odpad. Dostupné z URL: <https://kelt.tuzvo.sk/sites/default/files/ttoh_2009.pdf> [cit. 30.7.2019]
- 38 Li, Y.; Fletcher, T.; Mucs, D.; Scott, K.; Lindh, C. H.; Tallving, P.; Jakobsson, K.: Half-lives of PFOS, PFHxS and PFOA after end of exposure to contaminated drinking water. *Occupational and Environmental Medicine* **75**(1), 46–51 (2017).
- 39 Technical Fact Sheet – Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoic Acid (PFOA), 2017. Dostupné z URL:< https://www.epa.gov/sites/production/files/201712/documents/ffrofactsheet_contaminants_pfos_pfoa_11-20-17_508_0.pdf> [cit. 20.7.2019]
- 40 Halldorsson, T.I.; Fei, C.; Olsen, J.; Lipworth, L.; McLaughlin, J.K.; Olsen, S.F.: Dietary predictors of perfluorinated chemicals: a study from the Danish National Birth Cohort. *Environmental science & technology* **42**, 8971–7 (2008).
- 41 Goldenthal, E. I.: Final Report, Ninety Day Subacute Rhesus Monkey Toxicity Study, International Research and Development Corporation, Study No. 137-090, *U.S. EPA Administrative Record* (1978).
- 42 Kennedy, G. L.; Butenhoff, J. L.; Olsen, G. W.; O'Connor, J. C.; Seacat, A. M.; Perkins, R. G.; Farrar, D. G.: The Toxicology of Perfluorooctanoate. *Critical Reviews in Toxicology* **34**(4), 351–384 (2004).
- 43 Grandjean, P.; Clapp, R.: Changing Interpretation of Human Health Risks from Perfluorinated Compounds. *Public Health Reports* **129**(6), 482–485 (2014).
- 44 Biegel, L. B.; Hurtt, M. E.; Frame, S. R.; O'Connor, J. C.; Cook, J. C.: Mechanisms of extrahepatic tumor induction by peroxisome proliferators in male CD rats. *Toxicological Sciences* **60**(1), 44–55 (2001).
- 45 Thomford, P.J: 104-week dietary chronic toxicity and carcinogenicity study with perfluorooctane sulfonic acid potassium salt (PFOS; T-6295) in rats. *Covance Laboratories Inc*; 6329–183 (2002).
- 46 Tressaud, A.: Fluorinated compounds in our environment: Fluorine, friend or foe for humanity. *Fluorine*, 151–239 (2019).

- 47 Lopez-Espinosa, M.-J.; Mondal, D.; Armstrong, B. G.; Eskenazi, B.; Fletcher, T.: Perfluoroalkyl Substances, Sex Hormones, and Insulin-like Growth Factor-1 at 6–9 Years of Age: A Cross-Sectional Analysis within the C8 Health Project. *Environmental Health Perspectives* **124**(8), 1269–1275 (2016).
- 48 Grandjean, P.; Andersen, E. W.; Budtz-Jørgensen, E.; Nielsen, F.; Mølbak, K.; Weihe, P.; Heilmann, C.: Serum Vaccine Antibody Concentrations in Children Exposed to Perfluorinated Compounds. *Journal of the American Medical Association* **307**(4), (2012).
- 49 Kurunthachalam K. et al.: Perfluorinated Compounds in Aquatic Organisms at Various Trophic Levels in a Great Lakes Food Chain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **48**, 559–566 (2005).
- 51 Martin J.W. et al.: Identification of Long-Chain Perfluorinated Acids in Biota from the Canadian Arctic. *Environmental Science & Technology* **38**(2), 93 (2004).
- 52 Chiesa, L. M.; Nobile, M.; Pasquale, E.; Balzaretto, C.; Cagnardi, P.; Tedesco, D.; Arioli, F. Detection of perfluoroalkyl acids and sulphonates in Italian eel samples by HPLC-HRMS Orbitrap. *Chemosphere* **193**, 358–364 (2018).
- 53 Zhao, Z.; Xie, Z.; Tang, J.; Sturm, R.; Chen, Y.; Zhang, G.; Ebinghaus, R.: Seasonal variations and spatial distributions of perfluoroalkyl substances in the rivers Elbe and lower Weser and the North Sea. *Chemosphere* **129**, 118–125 (2015).
- 54 Hrádková, P.; Poustka, J.; Hloušková, V.; Pulkrabová, J.; Tomaniová, M.; Hajšlová, J.: Perfluorinated compounds: occurrence of emerging food contaminants in canned fish and seafood products. *Czech Journal of Food Sciences* **28**, 333–342 (2010).
- 55 Lau, C.; Anitole, K.; Hodes, C.; Lai, D.; Pfahles-Hutchens, A.; Seed, J. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences* **99**(2), 366–94 (2007).
- 56 Calafat, A. M.; Wong, L. Y.; Kuklennyik, Z.; Reidy, J. A.; Needham, L. L. Polyfluoroalkyl chemicals in the U.S. Population: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2004 and Comparisons with NHANES 1999–2000. *Environmental Health Perspectives* **115**(11), 1596–1602 (2007).
- 57 Saito, N.; Harada, K.; Inoue, K.; Sasaki, K.; Yoshinaga, T.; Koizumi, A. Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan. *Journal of Occupational Health* **46**, 49–59 (2004).

- 58 Domingo, J. L.: Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds. *Environment International* **40**, 187–195 (2012).
- 59 Směrnice evropského parlamentu a rady 2013/39/EU. Dostupné z URL:<<https://eurlex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/?uri=celex%3A32013L0039>> [cit.14.3.2019]
- 60 Geneva meeting agrees global ban on PFOA, with exemptions. Dostupné z URL:<<https://chemicalwatch.com/77163/geneva-meeting-agrees-global-ban-on-pfoa-with-exemptions>> [cit.1.8.2019]
- 61 Arvaniti, O. S.; Andersen, H. R.; Thomaidis, N. S.; Stasinakis, A. S.: Sorption of Perfluorinated Compounds onto different types of sewage sludge and assessment of its importance during wastewater treatment. *Chemosphere* **111**, 405–411 (2014).
- 62 Llorca, M.; Farré, M.; Picó, Y.; Barceló, D.: Development and validation of a pressurized liquid extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for perfluorinated compounds determination in fish. *Journal of Chromatography A* **1216**(43), 7195–7204 (2009).
- 62 Chambers, E.; Wagrowski-Diehl, D. M.; Lu, Z.; Mazzeo, J. R.: Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B* **852**(1-2), 22–34 (2007).
- 63 Liu, X.; Krebs, K.; Guo, Z.; Roache, N.: Method development for liquid chromatographic/triple quadrupole mass spectrometric analysis of trace level perfluorocarboxylic acids in articles of commerce. *Journal of Chromatography A* **1216**(18), 3910–3918 (2009).
- 64 Zhang, T.; Sun, H.; Gerecke, A. C.; Kannan, K.; Müller, C. E.; Alder, A. C.: Comparison of two extraction methods for the analysis of per- and polyfluorinated chemicals in digested sewage sludge. *Journal of Chromatography A* **1217**(31), 5026–5034 (2010).
- 65 Zuloaga, O.; Navarro, P.; Bizkarguenaga, E.; Iparraguirre, A.; Vallejo, A.; Olivares, M.; Prieto, A.: Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Analytica Chimica Acta* **736**, 7–29 (2012).
- 66 Powley, C.R.; George, S.W.; Ryan, T.W.; Buck, R.C.: Matrix effect-free analytical methods for determination of perfluorinated carboxylic acids in environmental matrixes. *Analytical Chemistry* **77**, 6353–6358 (2005).
- 67 Schröder, H. F.: Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with

- mass spectrometry and tandem mass spectrometry after pressurised liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents. *Journal of Chromatography A* **1020**(1), 131–151 (2003).
- 68 Plassmann, M. M.; Schmidt, M.; Brack, W.; Krauss, M.: Detecting a wide range of environmental contaminants in human blood samples—combining QuEChERS with LC-MS and GC-MS methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**(23), 7047–7054 (2015).
- 69 Loos, R.; Locoro, G.; Huber, T.; Wollgast, J.; Christoph, E. H.; de Jager, A.; Zaldívar, J.-M.: Analysis of perfluorooctanoate (PFOA) and other perfluorinated compounds (PFCs) in the River Po watershed in N-Italy. *Chemosphere* **71**(2), 306–313 (2008).
- 70 Li, J. et al: Development of extraction methods for the analysis of perfluorinated compounds in human hair and nail by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1219 (2012).
- 71 Jelic, A.; Gros, M.; Ginebreda, A.; Cespedes-Sánchez, R.; Ventura, F.; Petrovic, M.; Barcelo, D.: Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research* **45**(3), 1165–1176 (2011).
- 72 University of Taru, Quantitative estimation of matrix effect, recovery and process efficiency. Dostupné z URL: <https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/54-quantitative-estimation-matrix-effect-recovery-process-efficiency> [cit. 29.6.2019]
- 73 Lehotay, S.J.; Mastovska, K.; Lightfield, A.R.; Gates, R.A.: Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, *The Journal of AOAC International* **93**, 355–367 (2010).
- 74 Han, L.; Matarrita, J.; Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J.: Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. *Journal of Chromatography A* **1449**, 17–29 (2016).
- 75 Domingo, J. L.; Ericson-Jogsten, I.; Perelló, G.; Nadal, M.; Van Bavel, B.; Kärrman, A.: Human Exposure to Perfluorinated Compounds in Catalonia, Spain: Contribution of Drinking Water and Fish and Shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(17), 4408–4415 (2012).
- 76 Hölzer, J.; Midasch, O.; Rauchfuss, K.; Kraft, M.; Reupert, R.; Angerer, J.; Wilhelm, M.: Biomonitoring of Perfluorinated Compounds in Children and Adults Exposed to Perfluorooctanoate-Contaminated Drinking Water. *Environmental Health Perspectives* **116**(5), 651–657 (2008).

