

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Lucie Otrubová

URČENÍ TOXICITY POLYFLUOROVANÝCH A
PERFLUOROVANÝCH ORGANICKÝCH LÁTEK

Toxicity determination of polyfluorinated and perfluorinated
organic substances

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Radomír Čabala Ph.D.

Praha 2011

PROHLÁŠENÍ:

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

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

V Praze dne 1.6.2011

.....

Lucie Otrubová

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

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. a Doc. RNDr. Miloňovi Tichému, DrSc. za trpělivost, cenné připomínky a odborné rady při vypracování této bakalářské práce a v neposlední řadě bych ráda poděkovala své mamince za podporu během celého studia.

ABSTRAKT:

Cílem bakalářské práce bylo stanovit toxicitu fluorotelomerních alkoholů pomocí testu na nitěnkách *Tubifex tubifex*. Tato metoda patří mezi alternativní, které jsou rychlejší, levnější, ale zároveň jejich výsledky mají stejnou hodnotu jako ty z klasických testů. Toxicita byla měřena jako ET_{50} , což je účinný čas, při kterém reaguje 50 % exponovaných nitěnek zástavou pohybu. Pro kontrolu správnosti měření bylo stanoveno EC_{50} referenční látky, $MnCl_2 \cdot H_2O$, jejíž index akutní toxicity je $\log(EC_{50}) = -0,845 \pm 0,033$ [\log (mmol/l)]. EC_{50} je účinná koncentrace, při které byla pozorována zástava pohybu 50 % exponovaných nitěnek. Jako testované látky byly použity 1H,1H,2H,2H-perfluoroktan-1-ol a 1H,1H,2H,2H-perfluordekan-1-ol. Byly připraveny jejich nasycené roztoky v destilované vodě a v 5 % dimethylsulfoxidu a koncentrace těchto roztoků byly změřeny na GC-MS metodou absolutní kalibrace. K určení velikosti vlivu dimethylsulfoxidu na nitěnky byl stanoven jeho $\log(EC_{50})$ po 2,5 hodinách expozice.

KLÍČOVÁ SLOVA:

fluorotelomerní alkoholy, alternativní metoda, nitěnka (*Tubifex tubifex*)

ABSTRACT:

The goal of the bachelor thesis was the determination of toxicity of fluorotelomer alcohols. The toxicity was measured as ET_{50} by the oligochaete *Tubifex tubifex*. This test belongs to group of alternative methods which are faster and cheaper but they provide reliable data as well as the presently used classical methods. ET_{50} is the exposure time when 50 % of *Tubifex tubifex* individuals stop moving. EC_{50} of manganese chloride dihydrate was measured for the control of its correctness of determination and its acute toxicity indice is equal to $\log(EC_{50}) = -0,845 \pm 0,033$ [\log (mmol/l)]. EC_{50} is the concentration of the tested substance when 50 % of *Tubifex tubifex* individuals stop moving. 1H,1H,2H,2H-perfluorooctan-1-ol and 1H,1H,2H,2H-perfluorodecan-1-ol were the tested substances. Distilled water and solution of dimethyl sulfoxide in water (5 %) were used to prepare the saturated solutions of the tested substances. The concentrations of the saturated solutions were determined on GC-MS by absolute calibration method. The value of $\log(EC_{50})$ for dimethyl sulfoxide solution was measured to determine how it influences *Tubifex tubifex* during exposure time of 2,5 hours.

KEY WORDS:

fluorotelomer alcohols, alternative method, *Tubifex tubifex*

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK	6
2	ÚVOD.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Fluorotelomerní alkoholy	9
3.2	Alternativní metody testování toxicity chemických látek	12
3.3	Nitěnka větší (<i>Tubifex tubifex</i>).....	14
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
4.1	Standardy a chemikálie.....	16
4.2	Přístrojové vybavení	16
4.3	Příprava roztoků.....	17
4.3.1	Příprava nasycených roztoků FTOH v destilované vodě	17
4.3.2	Příprava nasycených roztoků FTOH v 5 % dimethylsulfoxidu.....	17
4.3.3	Příprava roztoků na kalibraci.....	18
4.3.4	Příprava roztoků referenční látky pro měření EC ₅₀	18
4.4	Extrakce nasyceného roztoku FTOH etherem	19
4.5	Analýza GC-MS	19
4.6	Postup měření ET ₅₀ na nitěnkách	19
4.7	Postup při měření EC ₅₀ dimethylsulfoxidu.....	20
4.8	Postup měření EC ₅₀ referenční látky	20
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	21
5.1	Měření koncentrace FTOH v nasyceném roztoku	21
5.2	Měření ET ₅₀	25
5.3	Měření EC ₅₀ dimethylsulfoxidu.....	26
5.4	Měření EC ₅₀ referenční látky.....	26
6	ZÁVĚR.....	28
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	29

1 SEZNAM ZKRATEK

6-2 FTOH	1H,1H,2H,2H-perfluoroktan-1-ol
6-2 FTA	6-2 fluorotelomerní kyselina
6-2 FTUA	6-2 fluorotelomerní nenasycená kyselina
8-2 FTOH	1H,1H,2H,2H-perfluordekan-1-ol
8-2 FTAL	8-2 fluorotelomerní aldehyd
A	plocha píku
a.u.	arbitrární jednotka signálu (arbitrary unit)
BA _i	biologická účinnost látky i
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
D _a	nejnižší koncentrace potřebná k výpočtu EC ₅₀
DMSO	dimethylsulfoxid
ECVAM	Evropské centrum pro validaci alternativních metod (European Centre for the Validation of Alternative Methods)
EI	elektronová ionizace
EC ₅₀	účinná koncentrace, při které reaguje 50 % exponovaných jedinců
ET ₅₀	účinný čas, při kterém reaguje 50 % exponovaných jedinců
f	matematická funkce
FTOH	fluorotelomerní alkoholy
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
QSAR	kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností (Quantitative Structure-Activity Relationships)
L _{1,2}	interval spolehlivosti pro 95 % pravděpodobnost
m/z	poměr hmotnosti a náboje
NIST	knihovna MS spekter (National Institute of Standards and Technology, USA)
OECD	Organizace pro ekonomickou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development)
p.a.	pro analýsi
PFBA	perfluorobutanová kyselina
PFC	perfluorované látky

PFCA	perfluorované karboxylové kyseliny
PFHxA	perfluorohexanová kyselina
PFNA	perfluorononanová kyselina
PFOA	perfluorooktanová kyselina
PFOS	perfluorooktansulfonát
PFPeA	perfluoropentanová kyselina
P_i	rozdělovací koeficient chemikálií mezi n-oktanol a vodu
R	poměr mezi dvěma následujícími koncentracemi (vyšší koncentrace/nížší koncentrace)
REACH	chemická legislativa v rámci Evropské Unie (Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals)
SCAN	detekce všech iontů ve zvoleném rozsahu m/z
SIM	detekce iontu o zvolené hodnotě m/z
SZÚ	Státní zdravotní ústav
x_i	vlastnost příslušející struktuře látky
σ_f	tabelovaná konstanta

2 ÚVOD

Fluorotelomerní alkoholy (FTOH) patří do skupiny polyfluorovaných látek, jejichž přítomnost byla stanovena po celém světě. Výroba polyfluorovaných látek začala až v 2. polovině 20. století, a proto je výzkum teprve v počátcích a publikovaných článků o vlastnostech FTOH je nedostatek. Předmětem studií je najít mechanismus transportu FTOH do vzdálených míst od oblastí průmyslu, optimalizovat jejich detekci, určit toxicitu a zjistit jejich osud v organismech i v životním prostředí.

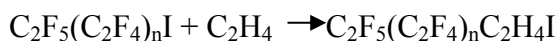
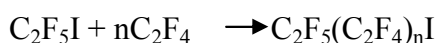
K určení toxicity lze využít dvou způsobů, klasické metody testování na zvířatech nebo alternativní metody. Ty klasické jsou často drahé a časově náročné. Cílem bakalářské práce je určit toxicitu 1H,1H,2H,2H-perfluoroktan-1-olu (6-2 FTOH) a 1H,1H,2H,2H-perfluordekan-1-olu (8-2 FTOH) pomocí testu na nitěnkách *Tubifex tubifex*. Tento test patří mezi *in vitro* metody využívající nižší organismy, a proto byl zařazen mezi alternativní metody.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Fluorotelomerní alkoholy

FTOH jsou lineární organické látky s obecným vzorcem $F(CF_2)_n C_2H_4OH$ [1]. Díky silné kovalentní vazbě mezi fluorem a uhlíkem mají jedinečné fyzikální, chemické a biologické vlastnosti. Například jsou tepelně stabilní, vysoce chemicky inertní a patří mezi povrchově aktivní látky, které odpuzují vodu i mastné látky [2, 3]. FTOH našly široké využití v průmyslu jako meziprodukt při výrobě barviv, lepidel, vosků, inkoustů, leštidel, těsnění, plastů, oblečení, koberců a kůže [4, 5].

Perfluorované látky (PFC) se vyrábějí dvěma způsoby. První z nich je elektrochemická fluorace, při které jsou všechny atomy vodíku nahrazeny fluorem. Druhý způsob je telomerace, kterou vznikají FTOH. Proces výroby začíná syntézou 1H,1H,2H,2H-perfluoralkyl jodidu podle následujících rovnic:



V další části výroby je jod nahrazen funkční skupinou, v našem případě $-OH$. Telomerací vznikají pouze lineární látky s malým obsahem vedlejších produktů, které lze snadno oddělit. PFC vyrábějí procesem telomerace například firmy DuPont, Atofina a AsahiGlass [3, 6]. Celosvětová produkce FTOH v letech 2000-2002 byla $5 \cdot 10^6$ kg za rok a z toho bylo 40 % vyrobeno v Severní Americe [7].

PFC se akumulují v životním prostředí, což je jeden z důvodů, proč byla jejich přítomnost stanovena po celém světě, i v arktických oblastech [8]. Koncentrace PFC byly naměřeny i ve vzorcích lidské krve, kde byly hodnoty vyšší u populace žijící v místě výroby nebo na území, které je znečištěné PFC [9]. Expozice lidí je možná z pitné vody, prachu v domácnostech, z jídla nebo uvolněním látek z obalů na potraviny [10 - 13]. Všeobecně platí, že nejvyšší koncentrace PFC se nacházejí v predátorech, kteří jsou na vrcholu potravního řetězce, jako je polární medvěd v arktických oblastech [11, 14].

K zhodnocení škodlivosti FTOH jako prekurzoru perfluorovaných karboxylových kyselin (PFCA) bylo důležité zjistit jejich osud v organismech i v životním prostředí. Ve většině studií byl používán 8-2 FTOH jako testovaná látka, protože ze všech perfluorovaných alkoholů je v průmyslu nejvíce používáný.

V jedné studii byl potkanům orálně podán radioaktivně značený 8-2 FTOH o koncentraci 5 a 125 mg/kg. Maximální koncentrace 8-2 FTOH byla v plasmě naměřena 1 hodinu po podání. Poté koncentrace rychle klesala a za méně než 5 hodin nebyla naměřena žádná koncentrace. Většina dávky byla z těla eliminována stolicí, kde bylo stanoveno více než 70 % a z toho 37-55 % v původní formě. Méně než 4 % byla z těla eliminována močí, která obsahovala nízkou koncentraci perfluorooktanové kyseliny (~1 %). V exkretech a v plasmě byla stanovena perfluorohexanová kyselina (PFHxA, $F(CF_2)_5COOH$). 7 dní po podání bylo naměřeno 4-7 % z dávky ve tkáních, nejvíce v tuku, játrech, štítné žláze a nadledvinách. Při dermální expozici po dobu 6 hodin bylo 37 % dávky z kůže odpařeno a 29 % bylo odstraněno vymytím. Během 7 dní po podání bylo eliminováno méně než 0,1 % močí, 0,2 % stolicí a v tkáních nebyla naměřena žádná koncentrace. Z těchto důvodů nebylo při dalších studiích dermální podání použito [15].

Biotransformace 8-2 FTOH byla studována na izolovaných hepatocytech potkana. Z 8-2 FTOH vznikl přechodný 8-2 fluorotelomerní aldehyd (8-2 FTAL, $CF_3(CF_2)_7CH_2CHO$). Jako konečné a stálé metabolity byly stanoveny perfluorooktanová kyselina (PFOA) a v menším množství perfluorononanová kyselina (PFNA). Metabolity 6-2 FTOH byly odlišné pouze délkou řetězce [16].

Při sledování rozdílů v metabolismu 8-2 FTOH mezi jednotlivými druhy zvířat bylo zjištěno, že 8-2 FTOH je značně metabolizován v potkanech a myších. Naproti tomu je málo metabolizován v lidském organismu a ještě méně v pstruzích [19].

Bioakumulace PFC je způsobena pomalou eliminací a díky enterohepatálnímu cyklu [11]. Biologický poločas závisí na typu PFC, druhu zvířete a v některých případech na pohlaví jedince. U potkanů je poločas 100 dní, u člověka je to už 5,4 roků a biologický poločas PFOA je u samice potkana 2-4 hodiny, u samce je to 4-6 dní [20, 21].

Biodegradace 8-2 FTOH byla studována i v půdě, kde byl mechanismus podobný jako v bahně a v bakteriální kultuře. Po 90 dnech expozice bylo v půdě stanoveno 60 % z celkového množství sledované dávky, z toho bylo více než 35 % ireverzibilně vázáno, přibližně 25 % bylo ve formě PFOA, 4 % PFHxA a PFNA nebyla naměřena [17].

Po 180 dnech expozice bylo v půdě stanoveno přibližně 67 % z celkového množství sledované dávky 6-2 FTOH, z toho bylo 30 % perfluoropentanové kyseliny (PFPeA, $F(CH_2)_4COOH$), 8 % PFHxA, 2 % perfluorobutanová kyselina (PFBA, $F(CH_2)_3COOH$)

a 15 % 5-3 kyselina. Po 90 dnech expozice bylo v bakteriální kultuře celkové množství sledované dávky 6-2 FTOH přibližně 60 %, z toho 23 % 6-2 FTUA ($F(CH_2)_5CF=CHCOOH$), 16 % 5-2 FTOH, 6 % 6-2 FTA, 6 % 5-3 FTA a 5 % PFHxA. Poločas rozpadu 6-2 FTOH byl v půdě i v bakteriální kultuře méně než 2 dny [18].

FTOH jsou těkavé, a proto se šíří atmosférou. Jejich doba existence v atmosféře je přibližně 20 dní, kdy dochází k reakci s OH radikály a ke vzniku PFOA a dalších PFCA. Velikost výtěžku PFOA se pohybuje v rozmezí 1-10 % podle toho, v jakém ročním období dochází k reakci nebo na jakém místě. V období zimy je koncentrace PFOA nižší, protože fotochemická aktivita je snižena, nová PFOA vzniká minimálně a stávající je z atmosféry odstraňována ukládáním. Množství FTOH a jejich metabolitů je v oblasti průmyslu větší než ve vzdálených regionech [22]. V roce 2005 byla naměřena maximální koncentrace 8-2 FTOH na severní polokouli 190 pg/m^3 oproti tomu na jižní polokouli pouze 14 pg/m^3 [23].

PFC se do arktických oblastí dostávají dvěma způsoby. První z nich je transport FTOH atmosférou, což bylo potvrzeno nejen naměřenými hodnotami koncentrace v atmosféře, ale i analýzou vzorků sněhu, které byly získány z ledovců v arktických oblastech Kanady. Místa vzorkování byla vybrána tak, aby koncentrace PFC byla reprezentována pouze množstvím ukládaným z atmosféry a nebyla ovlivněna jinými přírodními podmínkami. Nejvrchnější vrstva představovala ukládání mezi lety 2004 a 2005. Ve všech vzorcích byla stanovena přítomnost perfluorooktansulfonátu (PFOS) a PFCA v řádech pg/l , konkrétně 13,1-53,7 pg/l PFOA [24]. Druhá možnost transportu PFC do vzdálených arktických oblastí je přes oceán, což je považováno za hlavní způsob, i když je přenos zpomalen díky oceánskému proudění [25].

Informace o toxicitě FTOH nejsou úplné a je zapotřebí ještě dalších studií pro potvrzení stávajících zjištění. Při expozici 8-2 FTOH bylo u potkanů naměřeno zvětšování jater a postupné poškozování jaterních buněk. Bylo zjištěno, že hepatotoxicitu způsobuje metabolit PFOA, která se akumuluje v játrech. Velikost toxicity závisela na délce trvání expozice a na velikosti dávky [26, 27].

Bylo určeno, že PFC potlačují sekreci cytokinů z imunitních buněk, a proto byly zařazeny mezi imunotoxické látky [28]. Dále byly koncentrace PFC naměřeny v mozku, což naznačuje, že dokážou projít přes hemoencefalitickou bariéru. Jestli jsou i neurotoxické, je stále zkoumáno [11].

Velice důležitá otázka zní, jestli FTOH ovlivňují i reprodukci. Teprve v roce 2009 vyšla studie, která o tomto informuje. Čtyřměsíční Zebřičky pruhované (*Danio rerio*) byly exponovány 8-2 FTOH po dobu čtyř týdnů různými koncentracemi, z nichž maximální byla 270 µg/l. U samic množství testosteronu a estradiolu výrazně vzrostlo, naproti tomu u samců množství testosteronu kleslo a estradiolu vzrostlo. Dále bylo pozorováno snížené množství vytvořených jiker a mlíčí, řidnutí obalu kolem jiker a zmenšil se jejich průměr [29]. Poškození syntézy steroidů může být způsobeno změnou vlastností membrány buněk, konkrétně narušením signalizační kaskády cAMP [30]. Při studii 6-2 FTOH byla jako příčina reprodukční toxicity určena inhibice aktivity endokrinních žláz [31]. Bylo zjištěno, že k přenosu PFC na mláďata ptáků dochází přes vajíčka a u savců přes placentu nebo v menší míře mateřským mlékem [32].

3.2 Alternativní metody testování toxicity chemických látek

REACH (Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals) je nová chemická legislativa v rámci Evropské Unie od roku 2007. Jeden z hlavních cílů je, aby byly od roku 2020 používány pouze chemické látky se známými vlastnostmi, a bylo tak zamezeno nebezpečným účinkům chemikálií na zdraví člověka a životní prostředí. Aby bylo možné tento plán splnit, je potřeba testů, ze kterých jsou rychle získány výsledky. Dále REACH prosazuje snížení množství laboratorních zvířat, na kterých jsou založeny klasické testy, proto jsou vyvíjeny alternativní metody, které lépe splňují podmínky REACH [33].

Určování toxicity chemických látek na nitěnkách patří mezi alternativní metody, které jsou rychlejší, levnější, ale zároveň jejich výsledky mají stejnou hodnotu jako ty z tradičních testů [33]. Alternativní metody také splňují podmínky 3R (Reduce, Refine, Replace), které usilují o snížení počtu laboratorních zvířat, zlepšení jejich podmínek nebo jejich nahrazení [34].

Mezi alternativní metody patří *in vitro* a *in silico*. *In vitro* metody využívají tkáňové kultury, buňky orgánů a nižší organismy. Nejpropracovanější metoda *in silico*, odhady výpočtem, je analýza QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) [34].

Zabývá se kvantitativními vztahy mezi chemickou strukturou látek a jejich biologickou účinností, což lze popsat jednoduchou rovnicí:

$$BA_i = f(x_i)$$

BA_i – biologická účinnost látky i , f – matematická funkce, x_i – vlastnost příslušející struktuře látky.

Odpůrci alternativních metod tvrdí, že výsledky získané na nižších organismech nelze uplatnit na člověka. Díky rovnicím QSAR lze však získat kvantitativní vztah mezi toxickými indexy, které byly stanoveny různými biologickými testy. Jako fyzikálně-chemická vlastnost je nejčastěji používán rozdělovací koeficient chemikálií mezi *n*-oktanol a vodu (P_i), který ovlivňuje distribuci látky v organismu. Pro sérii chemických látek, které byly stanoveny různými metodami lze napsat rovnice:

$$BA_{ij} = f(\log P_i)$$

$$BA_{ik} = f(\log P_i)$$

Po jejich úpravě vznikne konečná rovnice:

$$BA_{ij} = f(BA_{ik})$$

Tato rovnice vyjadřuje korelaci mezi biologickými účinnostmi pro sérii chemických látek naměřenými různými metodami, což lze použít pro extrapolaci mezi biologickými druhy [35].

Každá nová metoda musí být testována a schválena, což může trvat i několik let. Tímto se zabývá organizace ECVAM (European Centre for Validation of Alternative Methods) a částečně i OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Po legalizaci metody by měla mít v praxi přednost před tradičními testy díky tomu, že nepoužívá vůbec nebo jen minimální počet zvířat [35].

3.3 Nitěnka větší (*Tubifex tubifex*)

Toxicita FTOH byla stanovena pomocí testu na nitěnkách *Tubifex tubifex*, a proto je zde popsáno jejich systematické zařazení, základní popis těla a jejich výskyt.

Systematické zařazení [36]:

Říše: Živočichové (*Animalia*)

Podříše: Mnohobuněční živočichové (*Metazoa*)

Kmen: Kroužkovci (*Annelida*)

Třída: Máloštětinatci (*Oligochaeta*)

Řád: Nitěnky (*Plesiopora*)

Čeleď: Nitěnkovití (*Tubificidae*)

Tělo nitěnky je dlouhé až 9 cm a homonomně segmentované až na 130 článků (Obr. 1). Na každém článku kromě prvního jsou štětiny, dva svazky břišních a dva svazky hřbetních. Rod *Tubifex* má typické vějířovité a vlasovité tvary štětín hřbetních svazků, které se nacházejí před opaskem [37]. U pohlavně dospělých jedinců je vytvořen opasek, který můžeme nalézt na 11. až 12. článku [38].



Obrázek č. 1: nitěnka *Tubifex tubifex* [38]

Živí se detritem a bakteriemi, které tráví z pohlčeného materiálu. Za jeden den jimi projde až pětinasobek jejich hmotnosti [39]. V každém článku se nachází jeden pár metanefridií, které jsou základními orgány vylučovací soustavy.

Cévní soustava je tvořena hřbetní a břišní cévou, které jsou spojené obloukovitými cévami. Pulzující obloukovité cévy představují primitivní srdce, které se jinak nazývá auxiliární [40]. Krev obsahuje červené barvivo, hemoglobin, díky kterému je nitěnka růžově zbarvená [38].

Nervová soustava se skládá z velkého páru hlavových ganglií a dále v každém článku na břišní straně jedním párem menších ganglií. Jednotlivá ganglia jsou spojena příčnými a podélnými spojkami [40].

Nitěnky jsou zástupci máloštětinatců, kteří se rozmnožují pohlavně a patří mezi hermafrodity, proto vytvářejí samčí i samičí pohlavní buňky [38].

Nitěnka větší je nejhojnější sladkovodní druh v celé Evropě [37, 38]. Můžeme ji najít v čistých vodách vysokohorských jezer, ale i v znečištěném prostředí, například u ústí kanalizace mlékáren [37, 38, 39]. Největší množství nitěnek se nachází v bahně stojatých vod, kde tvoří červený polštář z tisíce jedinců (Obr. 2). Přední částí těla jsou zavrtány do kanálku vyztuženého hlenem a zadní částí těla si vlnivým pohybem přihánějí vodu s dostatkem kyslíku [39, 41]. Dýchají celým povrchem těla nebo stěnou střevní [38, 39]. Jsou tolerantní na nedostatek kyslíku, bez kterého mohou vydržet několik desítek dnů [39]. Čím méně je kyslíku, tím větší množství hemoglobinu obsahuje krev, a proto jsou více červeně zbarveny [38].



Obrázek č. 2: Kolonie nitěnek

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Příprava nasycených roztoků a měření jejich koncentrace bylo provedeno na Chemickém ústavu Přírodovědné fakulty Univerzity Karlovy v Praze a určení toxicity pomocí testu na nitěnkách bylo uskutečněno na Státním zdravotním ústavu v Centru hygieny práce a pracovního lékařství.

4.1 Standardy a chemikálie

Použitými standardy byly 1H,1H,2H,2H-perfluoroktan-1-ol (97 %, Sigma-Aldrich, Velká Británie) a 1H,1H,2H,2H-perfluordekan-1-ol (97 %, Sigma-Aldrich, Japonsko).

Tabulka č. 1: Vlastnosti testovaných fluorotelomerních alkoholů

Zkratka	Název alkoholu	Molekulový vzorec	Molekulová hmotnost	Skupenství
6-2 FTOH	1H,1H,2H,2H- -perfluoroktan-1-ol	$C_6F_{13}CH_2CH_2OH$	364	kapalina
8-2 FTOH	1H,1H,2H,2H- -perfluordekan-1-ol	$C_8F_{17}CH_2CH_2OH$	464	pevná látka

Použitými chemikáliemi byly acetonitril (p.a., Fluka, USA), terc-butyl methyl ether (>98 % , Fluka, Steinheim, Německo), dimethylsulfoxid (čistý, Lachema, Česká republika) a dihydrát chloridu manganatého (extra pure, Merck).

4.2 Přístrojové vybavení

Koncentrace fluorotelomerních alkoholů byla měřena na plynovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem GCMS-QP5050A, Shimadzu (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) s kolonou DB-5MS (Agilent Technologies, USA) délky 30 m o vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μ m (5 % difenyl, 95 % dimethylpolysiloxan). Nosným plynem bylo helium (5.0, Linde). K analýze látek

byl použit hmotnostní spektrometr s EI ionizací. Ke sběru dat byl využit program LabSolution a k interpretaci hmotnostních spekter knihovna NIST 08.

Vzorky byly váženy na analytických vahách (APX-100, Denver Instrument). K pipetování byly použity automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko). Pro urychlení rozpouštění FTOH byla využita ultrazvuková lázeň (Sonorex, RK 100, Bandelin, Barlen, Německo). Při extrakci byly FTOH vytřepány na třepačce (Vortexgenie 2, Scientific Industries, Hampshire, Velká Británie).

Na SZÚ byl $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ vážen na analytických vahách (AB265-S/FACT, Mettler Toledo, Švýcarsko) a roztoky byly pipetovány pipetami Finnpiquette (Thermo Labsystems, Finsko) a Nichipet Ex (Nichiryo, Japonsko).

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Příprava nasycených roztoků FTOH v destilované vodě

Bylo naváženo asi 20 mg přesně 8-2 FTOH, kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 250 ml a přibližně do 3/4 baňky byla přidána destilovaná voda. Do druhé odměrné baňky o objemu 250 ml bylo pipetováno 100 μ l 6-2 FTOH a také přibližně do 3/4 objemu baňky byla přidána destilovaná voda. Pro rychlejší rozpouštění FTOH byla použita ultrazvuková lázeň, kam byly odměrné baňky opakovaně vloženy na 10 minut. Aby bylo zaručeno, že roztoky jsou nasycené, bylo sledováno, aby u 8-2 FTOH zůstalo na dně baňky několik zrněk alkoholu a u 6-2 FTOH jeho kapka.

4.3.2 Příprava nasycených roztoků FTOH v 5 % dimethylsulfoxidu

Dimethylsulfoxid (DMSO) byl použit pro zvýšení rozpustnosti FTOH, a proto bylo naváženo asi 45 mg přesně 8-2 FTOH, kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněno 5 % roztokem DMSO ve vodě. Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo pipetováno 11 μ l 6-2 FTOH a doplněno 5 % DMSO. Na dně baňky bylo opět vidět několik zrníček 8-2 FTOH a v druhé baňce kapka 6-2 FTOH. Rychlost rozpouštění byla zvýšena pomocí ultrazvukové lázně stejně jako u nasycených roztoků FTOH v destilované vodě.

4.3.3 Příprava roztoků na kalibraci

V článku [15] bylo publikováno, že rozpustnost 6-2 FTOH je ve vodě 15 µg/ml a 8-2 FTOH je 148 ng/ml. Podle těchto údajů se zvolil rozsah kalibrace.

Na začátku byly připraveny zásobní roztoky tak, že bylo naváženo asi 50 mg přesně 8-2 FTOH, kvantitativně převedeno do odměrné baňky a doplněno do 50 ml acetonitrem. Do druhé odměrné baňky bylo pipetováno 30 µl 6-2 FTOH a doplněno do 50 ml acetonitrem. Takto byl přichystán roztok 8-2 FTOH o koncentraci 1036 µg/ml a roztok 6-2 FTOH o koncentraci 1044 µg/ml.

Při přípravě roztoků na kalibraci 8-2 FTOH byl nejdříve připraven pomocný roztok, protože bylo potřeba přichystat roztoky o nízké koncentraci a pro zajištění co největší přesnosti nebyl pipetován objem menší než 20 µl. Pomocný roztok o koncentraci 5 µg/ml byl připraven pipetováním 24 µl zásobního roztoku do odměrné baňky, která byla doplněna do 5 ml acetonitrem. I všechny ostatní roztoky kalibrace byly přichystány do odměrných baněk o objemu 5 ml a vždy doplněny acetonitrem. Roztok o koncentraci 500 ng/ml byl připraven pipetováním 500 µl pomocného roztoku, roztok o koncentraci 200 ng/ml pipetováním 200 µl, koncentrace 100 ng/ml pipetováním 100 µl a 20 ng/ml pipetováním 20 µl pomocného roztoku. Roztok o koncentraci 10 ng/ml byl přichystán ze 100 ng/ml pipetováním 500 µl.

Roztoky na kalibraci 6-2 FTOH byly také připraveny do odměrných baněk o objemu 5 ml a vždy doplněny acetonitrem. Ze zásobního roztoku bylo pipetováno 96 µl na přípravu roztoku o koncentraci 20 µg/ml, 72 µl na 15 µg/ml, 48 µl na 10 µg/ml a 24 µl na 5 µg/ml. Roztok o koncentraci 1 µg/ml byl přichystán z 20 µg/ml pipetováním 250 µl.

4.3.4 Příprava roztoků referenční látky pro měření EC₅₀

Základní roztok byl přichystán tak, že bylo naváženo asi 7,2 g přesně MnCl₂·2H₂O, kvantitativně převedeno do odměrné baňky a doplněno do 100 ml destilovanou vodou. Dále byly roztoky připraveny ředící řadou, kdy ke 2,1 ml destilované vody bylo pipetováno 8 ml základního roztoku, připravený roztok byl zamíchán a ke 2,1 ml

destilované vody v následující kádince bylo přidáno 8 ml z 1. zředěného roztoku. Tímto způsobem bylo pokračováno až k 7. zředěnému roztoku.

4.4 Extrakce nasyceného roztoku FTOH etherem

Aby bylo možné připravené roztoky dávkovat do GC, bylo potřeba FTOH vyextrahovat do terc-butyl methyl etheru. K 10 ml roztoku bylo přidáno 10 ml etheru a směs byla třepána na třepáče 20 minut. Poté byla pipetou odebrána horní etherová fáze. Ke zbylé vodné fázi bylo pipetováno dalších 10 ml etheru a extrakce byla opakována. Vzniklá etherová fáze byla přidána k té z první extrakce a objem byl snížen proudem dusíku na 10 ml. Od každého roztoku byly připraveny dva vzorky.

4.5 Analýza GC-MS

Koncentrace FTOH byly měřeny na GCMS-QP5050A. Pro všechny analýzy byly nastaveny tyto podmínky: teplota injektoru 250 °C, teplota MS interface 255 °C, lineární průtoková rychlost helia 40 cm/s, 1 minuta splitless. Při prvních měření byl použit SCAN mód, který proměřil hodnoty m/z od 29 do 500 rychlostí 1000 m/z s⁻¹. Bylo stanoveno, že v hmotnostním spektru 6-2 FTOH jsou nejvíce intenzivní ionty o hodnotě m/z 69, 95, 127 a 344. U 8-2 FTOH to byly ionty o hodnotě m/z 31, 69, 95, 127 a 169, a proto byly oba alkoholy dále měřeny v SIM módu při hodnotách m/z 31, 69, 95, 127, 169 a 344. Teplotní program byl nastaven od 40 °C (4 minuty izotermicky) do 150 °C s teplotní rampou po 20 °C/min.

4.6 Postup měření ET₅₀ na nitěnkách

ET₅₀ je účinný čas, při kterém reaguje 50 % exponovaných nitěnek. Počet nehybných jedinců byl zaznamenán ve 3., 15., 30. minutě a dále vždy po 30 minutách až do 5. hodiny, a tak bylo pro jeden FTOH připraveno 12 Petriho misek o průměru 40 mm. Do každé z nich byl pipetován 1 ml nasyceného roztoku FTOH a z připravené kolonie nitěnek bylo vybráno 6 jedinců, kteří byli rychle osušeni na filtračním papíře a vloženi do Petriho misky.

U nasycených roztoků v destilované vodě byl zaznamenán počet nehybných nitěnek i po 24 hodinách. Pro kontrolu, že vliv 5 % DMSO na nitěnky je zanedbatelný, bylo měřeno ET_{50} samotného rozpouštědla bez FTOH. Každé měření ET_{50} bylo prováděno třikrát.

4.7 Postup při měření EC_{50} dimethylsulfoxidu

Pro zjištění, jak moc ovlivňuje DMSO měření ET_{50} FTOH, bylo stanoveno jeho EC_{50} . Postup přípravy roztoků a měření byl shodný s EC_{50} referenční látky kromě toho, že základní roztok byl 5 % a počet nehybných nitěnek byl zaznamenán po 2,5 hodinách expozice.

4.8 Postup měření EC_{50} referenční látky

Pro vnitřní kontrolu správnosti měření s nitěnkami bylo stanoveno EC_{50} referenční látky $MnCl_2 \cdot 2H_2O$. EC_{50} je účinná koncentrace, při které reaguje 50 % exponovaných nitěnek. Postup měření je shodný s ET_{50} , pouze počet nehybných jedinců byl zaznamenán ve 3. minutě. Z počtu nehybných nitěnek lze vypočítat EC_{50} podle metody Weilové ze vzorce:

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

D_a – nejnižší koncentrace potřebná k výpočtu, R – poměr mezi dvěma následujícími koncentracemi (vyšší koncentrace/nížší koncentrace), f – tabelovaná konstanta

Interval spolehlivosti pro 95% pravděpodobnost byl vypočítán pomocí vztahu:

$$L_{1,2} = \log (EC_{50}) \pm 2 \sigma_f \log R$$

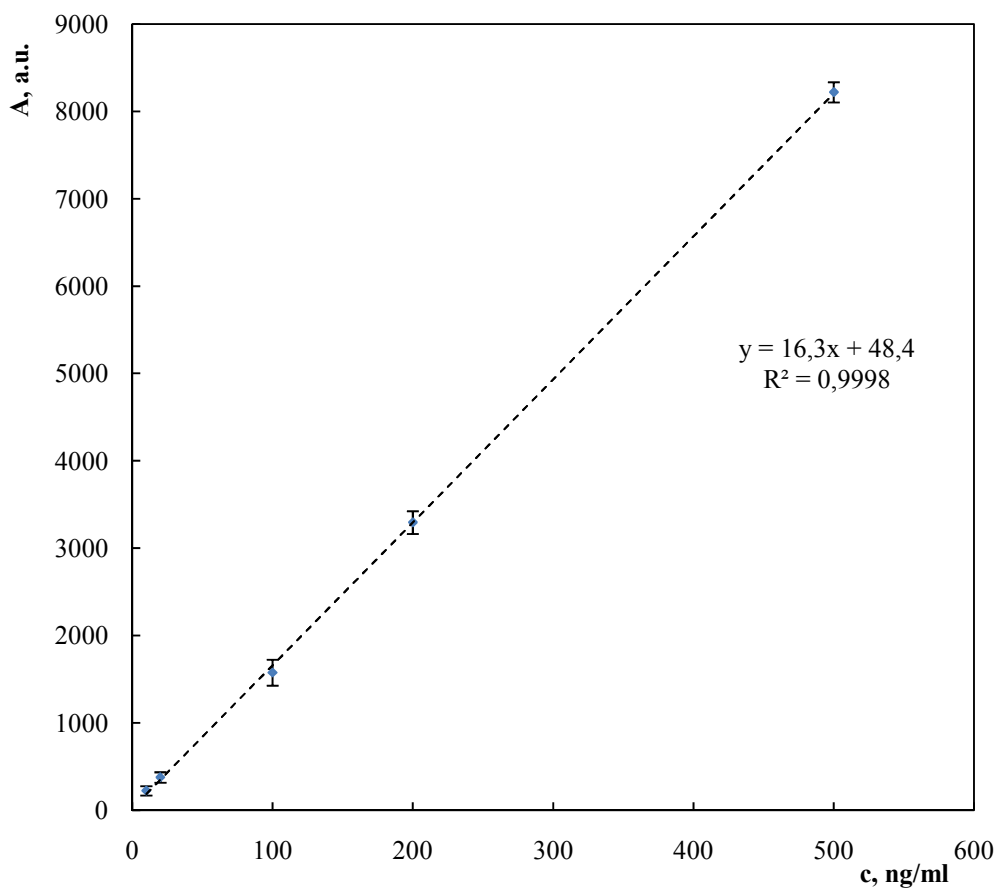
kde σ_f je tabelovaná konstanta.

Všechny tabelované konstanty potřebné pro výpočet jsou uvedeny v článku [39].

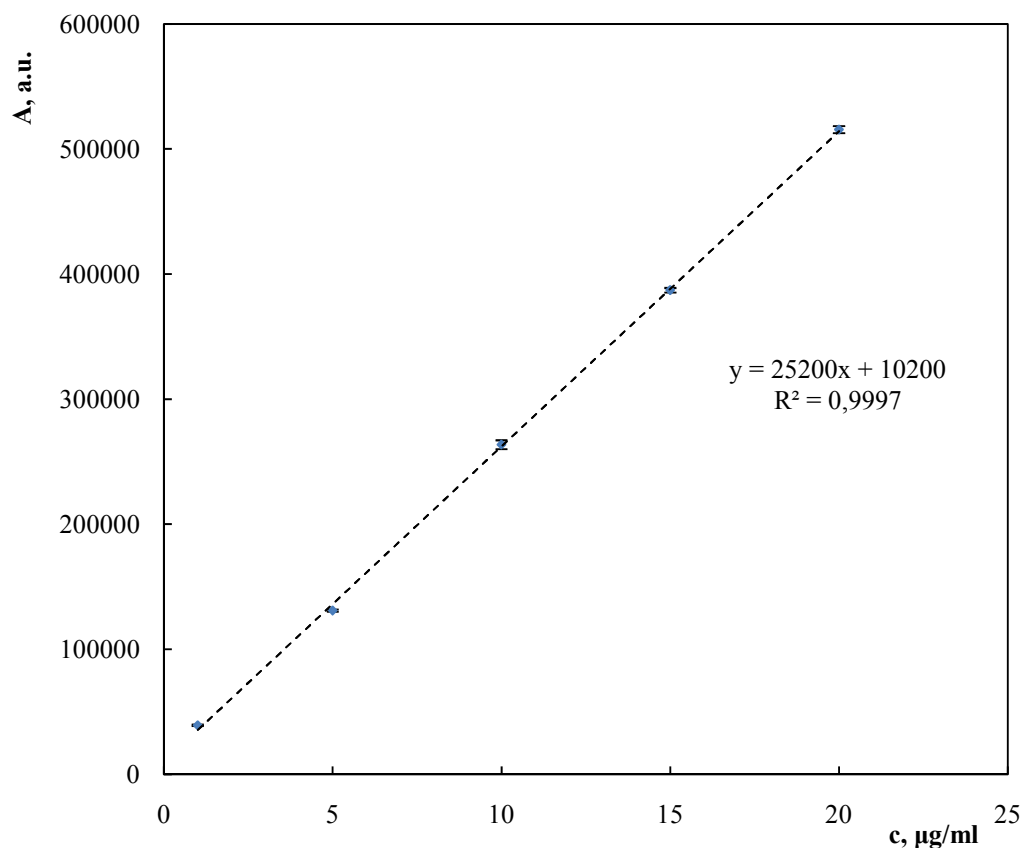
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Měření koncentrace FTOH v nasyceném roztoku

Pro stanovení koncentrace FTOH v nasyceném roztoku byla zvolena metoda absolutní kalibrace. Nejprve byly na GC-MS změřeny kalibrační roztoky o známé koncentraci. Každý roztok byl proměřen třikrát a z naměřených hodnot ploch píku byl sestaven kalibrační graf. Kalibrační roztoky 8-2 FTOH byly o koncentraci 10, 20, 100, 200 a 500 ng/ml (Obr. 3) a na kalibraci 6-2 FTOH byly připraveny roztoky o koncentraci 1, 5, 10, 15 a 20 µg/ml (Obr. 4).



Obrázek č. 3: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci 8-2 FTOH s chybovými úsečkami (směrodatná odchylka)



Obrázek č. 4: Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci 6-2 FTOH s chybovými úsečkami (směrodatná odchylka)

Každý z nasycených roztoků byl dvakrát extrahován do etheru a oba připravené vzorky byly třikrát proměřeny na GC-MS za stejných podmínek, jako byly měřeny kalibrační roztoky.

Při měření koncentrace nasyceného roztoku 8-2 FTOH v destilované vodě byly hodnoty mimo rozsah kalibrace, a proto byly vzorky 500x zředěny ($c_{zř}$). Průměrná koncentrace nasyceného roztoku 8-2 FTOH v destilované vodě byla $89 \pm 8 \mu\text{g/ml}$ (Tab. 2).

Tabulka č. 2: Změřené plochy píku a vypočtené koncentrace 8-2 FTOH v destilované vodě

vzorek	A, a.u.	$c_{zř}$, ng/ml	c, ng/ml
1a	3234	196	97760
1b	2962	179	89410
1c	2627	158	79130
2a	3146	190	95060
2b	3106	188	93830
2c	2616	158	78795

Naměřené hodnoty koncentrace nasycených roztoků 8-2 FTOH v 5 % DMSO byly opět mimo rozsah kalibrace, a tak bylo potřeba roztoky 100x zředit ($c_{zř}$). Průměrná koncentrace nasyceného roztoku 8-2 FTOH v 5 % DMSO byla $42 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ (Tab. 3).

Tabulka č. 3: Změřené plochy píku a vypočtené koncentrace 8-2 FTOH v 5 % DMSO

vzorek	A, a.u.	$c_{zř}$, ng/ml	c, ng/ml
1a	6912	421	42100
1b	6633	404	40395
1c	6940	423	42271
2a	7028	428	42813
2b	7161	436	43625
2c	7066	430	43042

Při měření koncentrace 6-2 FTOH v destilované vodě byly hodnoty v rozsahu kalibrace, a proto nebyly vzorky dále ředěny a průměrná koncentrace nasyceného roztoku 6-2 FTOH v destilované vodě byla $19 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ (Tab. 4).

Tabulka č. 4: Změřené plochy píku a vypočtené koncentrace 6-2 FTOH v destilované vodě

vzorek	A, a.u.	c, µg/ml
1a	536911	20,9
1b	553335	21,6
1c	541633	21,1
2a	447487	17,4
2b	445275	17,3
2c	443036	17,2

Aby byly změřené koncentrace nasycených roztoků 6-2 FTOH v 5 % DMSO v rozsahu kalibrace, bylo potřeba roztoky 5x zředit ($c_{zř}$). Průměrná koncentrace nasyceného roztoku 6-2 FTOH v 5 % DMSO byla 56 ± 2 µg/ml (Tab 5).

Tabulka č. 5: Změřené plochy píku a vypočtené koncentrace 6-2 FTOH v 5 % DMSO

vzorek	A, a.u.	$c_{zř}$, µg/ml	c, µg/ml
1a	306276	11,8	58,8
1b	306099	11,7	58,7
1c	306283	11,8	58,8
2a	283488	10,9	54,2
2b	278377	10,6	53,2
2c	280220	10,7	53,6

Nalezené koncentrace FTOH, které byly uvedeny v publikovaném článku, byly nižší než koncentrace, které byly připraveny. Rozsah kalibrace byl zvolen podle publikovaných koncentrací, a tak bylo potřeba, kromě nasyceného roztoku 6-2 FTOH v destilované vodě, roztoky ředit před měřením na GC-MS.

5 % DMSO byl použit pro zvýšení rozpustnosti, aby byla koncentrace připravených roztoků FTOH vyšší a nitěnky na ně mohly reagovat. Koncentrace ale vzrostla pouze u 6-2 FTOH, a to z 19 ± 2 µg/ml na 56 ± 2 µg/ml. Naopak koncentrace 8-2 FTOH klesla

z hodnoty $89 \pm 8 \mu\text{g/ml}$ na $42 \pm 1 \mu\text{g/ml}$. Důvod, proč koncentrace 8-2 FTOH v 5 % DMSO klesla a nezrostla jako u 6-2 FTOH, není známý.

5.2 Měření ET_{50}

Při měření ET_{50} nasycených roztoků FTOH v destilované vodě nebyla pozorována zástava pohybu nitěnek, a tak byl čas expozice prodloužen na 24 hodin. I po této době však nitěnky nereagovaly na FTOH zástavou pohybu. V několika Petriho miskách byly objeveny úlomky těl z nitěnek, které neměly na sledovaný pohyb žádný vliv. Pomocí testu na nitěnkách bylo určeno, že 6-2 FTOH a 8-2 FTOH nejsou akutně toxické.

Omezení tohoto testu vychází z rozpustnosti stanovovaných látek ve vodě. FTOH jsou málo rozpustné ve vodě, a tedy i když byly připraveny nasycené roztoky, jejich koncentrace byly velice nízké. Nabízí se otázka, jestli se nitěnky pohybovaly proto, že FTOH nejsou akutně toxické nebo to byla pro ně příliš nízká koncentrace, na kterou nemohly reagovat. Pokud však byly připraveny nasycené roztoky, nelze předpokládat, že by byly FTOH v hydrosféře rozpuštěny ve vyšších koncentracích, než které byly připraveny, a proto i tam by měly být pro nižší organismy netoxické. Pokud však jsou FTOH ve vyšších organismech metabolizovány na PFOA a jiné PFCA, které se akumulují v organismech, mohou být FTOH toxické. Z tohoto důvodu je potřeba jejich toxicitu změřit jinou metodou například pomocí klasických testů.

V roce 2008 byla vypracována bakalářská práce na téma Určení toxicity solí perfluorovaných organických kyselin. Toxicita byla také určena na nitěnkách, ale rozpustnost solí v destilované vodě byla mnohem větší, a proto byl připraven roztok soli kyseliny perfluorooktanové o koncentraci $0,579 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ a roztok soli kyseliny perfluorodekanové o koncentraci $0,528 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ [42]. V porovnání s roztokem soli perfluorované kyseliny o stejném počtu uhlíků byl připraven roztok 6-2 FTOH, který byl 10x méně koncentrovaný, a roztok 8-2 FTOH, který byl 3x méně koncentrovaný. Je otázka, jestli by nitěnky reagovaly na roztoky FTOH o stejné koncentraci, jako byly v případě solí perfluorovaných kyselin a jestli by také platilo, že akutní toxicita je vyšší u látky s delším řetězcem.

Měření ET_{50} nasycených roztoků FTOH v 5 % DMSO nebylo možné díky vlivu DMSO na nitěnky, což je popsáno v kapitole 5.3.

5.3 Měření EC₅₀ dimethylsulfoxidu

5 % DMSO byl zvolen jako rozpouštědlo, protože už byl dříve používán na SZÚ při testech na nitěnkách, kdy bylo potřeba zvýšit rozpustnost chemické látky, a protože ostatní organická rozpouštědla jsou pro nitěnky toxická. Při měření vlivu 5 % DMSO na nitěnky byla však pozorována zástava pohybu, a proto bylo změřeno jeho EC₅₀.

Ředící řadou byly připraveny 5 %, 3,97 %, 3,13 %, 2,47 %, 1,96 %, 1,55 % a 1,22 % roztoky DMSO ve vodě. Po 2,5 hodinách nebyla zaznamenána zástava pohybu nitěnek od nejméně koncentrovaného roztoku až k 3,13 %. V 3,97 % roztoku byla pozorována zástava pohybu u čtyř nitěnek a v 5 % roztoku u pěti nitěnek. S delší dobou expozice začalo docházet ke krvácení, deformaci těla a byly objeveny i úlomky částí těla nitěnek. Při výpočtu log (EC₅₀) byly do vzorce dosazeny tyto hodnoty: $D_a = 2,47$, $R = 1,26$, $f = 1$ a $\sigma_f = 0,26833$. Tabelované hodnoty f a σ_f byly použity z publikovaného článku [39]. Výsledek je, že $\log (EC_{50}) = 0,593 \pm 0,054$ [log (%)]. Účinná koncentrace, kdy byla pozorována zástava pohybu 50 % exponovaných nitěnek, je 3,92 %. Tudiž je 5 % DMSO nevhodné rozpouštědlo pro látky, u kterých je potřeba zjistit ET₅₀ pomocí testu na nitěnkách. Jeho vliv není zanedbatelný a ruší měření toxicity FTOH. Jeho použití by bylo možné pro stanovení EC₅₀ při expozici do 15 minut, protože během této doby nitěnky na 5 % DMSO nereagovaly.

5.4 Měření EC₅₀ referenční látky

Každý den, kdy bylo měřeno ET₅₀, bylo pro kontrolu správnosti měření stanoveno i EC₅₀ MnCl₂.2H₂O, protože měření toxicity na nitěnkách může být ovlivněno subjektivním sledováním zástavy pohybu nitěnek nebo i samotnými nitěnkami, u kterých záleží, z jaké lokality byly přivezeny a jak jsou čerstvé.

Tabulka č. 4: Počet nehybných nitěnek při měření EC_{50} referenční látky, $MnCl_2 \cdot 2H_2O$

vzorek	c, mol/l	počet nehybných nitěnek při jednotlivých měření					
		1.	2.	3.	4.	5.	6.
základní roztok	0,445	6	6	6	6	6	6
1. ředění	0,352	6	6	6	6	6	6
2. ředění	0,279	6	6	6	6	6	6
3. ředění	0,221	6	6	6	6	6	6
4. ředění	0,175	6	6	6	5	6	6
5. ředění	0,139	4	3	4	2	3	4
6. ředění	0,110	0	0	0	0	0	0
7. ředění	0,087	0	0	0	0	0	0

Pro všechny výpočty EC_{50} je shodná hodnota $R = 1,26$. Tabelaované hodnoty f a σ_f byly použity z publikovaného článku [39].

Při prvním, třetím a šestém měření je $D_a = 0,087$ mol/l, $f = 0,83333$ a $\sigma_f = 0,21082$, a proto je hodnota $\log(EC_{50}) = -0,876 \pm 0,042$ [log (mmol/l)].

Při druhém a pátém měření je $D_a = 0,110$ mol/l, $f = 0$ a $\sigma_f = 0,22361$, z toho bylo vypočítáno, že $\log(EC_{50}) = -0,858 \pm 0,045$ [log (mmol/l)].

Při čtvrtém měření je $D_a = 0,110$ mol/l, $f = 0,33333$ a $\sigma_f = 0,26874$, z toho bylo vypočítáno, že $\log(EC_{50}) = -0,825 \pm 0,054$ [log (mmol/l)].

Index akutní toxicity, který byl stanoven dlouhodobým pozorováním, je $\log(EC_{50}) = -0,845 \pm 0,033$ [log (mmol/l)]. Žádná z naměřených EC_{50} se významně neodchýlila od daného indexu, a proto bylo měření správné.

6 ZÁVĚR

Byly připraveny nasycené roztoky FTOH v destilované vodě a v 5 % DMSO, jejichž koncentrace byly změřeny na GC-MS metodou absolutní kalibrace. Oproti publikovaným hodnotám rozpustnosti ve vodě byly připraveny roztoky o vyšší koncentraci, a to $19 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ u 6-2 FTOH a roztok 8-2 FTOH byl o koncentraci $89 \pm 8 \mu\text{g/ml}$. Použitím 5 % DMSO jako rozpouštědla byla zvýšena koncentrace u 6-2 FTOH na hodnotu $56 \pm 2 \mu\text{g/ml}$, naopak koncentrace 8-2 FTOH klesla na $42 \pm 1 \mu\text{g/ml}$. Ani po 24 hodinách expozice nasycenými roztoky FTOH v destilované vodě nebyla pozorována zástava pohybu nitěnek, a proto bylo určeno, že 6-2 FTOH a 8-2 FTOH nejsou akutně toxické.

Vliv 5 % DMSO nebyl zanedbatelný, a tak je jeho využití pro stanovení ET_{50} nevhodné. Lze ho použít pouze při expozici do 15 minut, protože do této doby nitěnky na rozpouštědlo nereagovaly. Po 2,5 hodinách expozice bylo změřeno, že EC_{50} roztoku DMSO ve vodě je 3,92 %. Správnost měření s nitěnkami byla ověřena stanovením EC_{50} $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Nitěnky potřebné na čtyři měření ET_{50} stály 5 Kč, což potvrzuje, že test na nitěnkách *Tubifex tubifex* je levný oproti klasickým testům na zvířatech.

Díky nízké rozpustnosti FTOH ve vodě je potřeba změřit toxicitu pomocí jiné metody pro ověření, že nejsou akutně toxické. To už je však téma pro další práci.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] de Voogt P.; Sáez M.: Analytical chemistry of perfluoralkylated substance. *Trends in Analytical Chemistry*, **25**, 326-342 (2006)
- [2] Tseng C. L.; Liu L. L.; Chen C. M.; Ding W. H.: Analysis of Perfluorooctansulfonate and Related Fluorochemicals in Water and Biological Tissue Samples by Liquid Chromatography-ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1105**, 119-126 (2006)
- [3] Hekster F. M.; Laane R. W. P. M.; de Voogt P.: Environmental and toxicity effects of perfluoroalkylated substance. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **179**, 99-121 (2003)
- [4] Taniyasu S.; Kannan K.; So M. K.; Gulkowska A.; Sinclair E.; Okazawa T.; Yamashita N.: Analysis of fluorotelomer alcohols, fluorotelomer acids, and short- and long-chain perfluorinated acids in water and biota. *Journal of Chromatography A* **1093**, 89-97 (2005)
- [5] Walters A.; Santillo D.: Uses of Perfluorinated substances. *Greenpeace Research Laboratories Technical Note* **6** (2006)
- [6] Jahnke A.; Ahrens L.; Ebinghaus R.; Berger U.; Barber J. L.; Temme C.: An improved method for the analysis of volatile polyfluorinated alkyl substances in environmental air samples. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **387**, 965-975 (2007)
- [7] Ellis D. A.; Martin J. W.; Mabury S. A.: Atmospheric lifetime of fluorotelomer alcohols. *Environmental Science & Technology* **37**, 3816-3820 (2003)
- [8] Powley C. R.; George S. W.; Russell M. H.; Hoke R. A.; Buck R. C.: Polyfluorinated chemicals in a spatially and temporally integrated food web in the Western Arctic. *Chemosphere* **70**, 664-672 (2008)
- [9] Fromme H.; Tittlemier S. A.; Völkel W.; Wilhelm M.; Twardella D.: Perfluorinated compounds – Exposure assessment for the general population in western countries. *International Journal of Hygiene and Environmental health* **212**, 239-270 (2009)

- [10] Haug L. S.; Thomsen C.; Brantsaeter A. L.; Kvalem H. E.; Haugen M.; Becher G.; Alexander J.; Meltzer H. M.; Knutsen H. K.: Diet and particularly seafood are major sources of perfluorinated compounds in humans. *Environment International* **36**, 772-778 (2010)
- [11] Harada K.; Nakasanishi S.; Sasaki K.; Furuyama K.; Nakayama S.; Saito N.; Yamakawa K.; Koizumi A.: Particle size distribution and respiratory deposition estimates of airborne perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate in Kyoto area, Japan. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **76**, 306-310 (2006)
- [12] Tittlemier S.; Pepper K.; Seymour C.; Moisey J.; Bronson R.; Cao X. L.; Dabeka R. W.: Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast food, and food items prepared in their packing. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 3203-3210 (2007)
- [13] Strynar M. J.; Lindstrom A. B.: Perfluorinated compounds in house dust from Ohio and North Carolina, USA. *Environmental Science & Technology* **42**, 3751-3756 (2008)
- [14] McKiney M. A.; DeGuise S.; Martineau D.; Béland P.; Arukwe A.; Letcher R. J.; Dallaire A.; Lair S.; Lebeuf M.: Characterization and profiling of hepatic cytochromes P450 and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in beluga whales (*Dephinapterus leucas*) from the St. Lawrence river estuary and the canadian Artic. *Aquatic Toxicology* **77**, 87-97 (2006)
- [15] Fasano W. J.; Carpenter S. C.; Gannon S. A.; Snow T. A.; Stadler J. C.; Kennedy G. L.; Buck R. C.; Korzeniowski S. H.; Hinderliter P. M.; Kemper R. A.: Absorption, distribution, metabolism and elimination of 8-2 fluorotelomer alcohol in the rat. *Toxicological science* **91**, 341-355 (2006)
- [16] Martin J. W.; Mabury S. A.; O'Brien P. J.: Metabolic products and pathways of fluorotelomer alcohols in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* **155**, 165-180 (2005)

- [17] Wang N.; Szostek B.; Buck R. C.; Folsom P. W.; Sulecki L. M.; Gannon J. T.: 8-2 Fluorotelomer alcohol aerobic soil biodegradation: Pathways, metabolites, and metabolite yields. *Chemosphere* **75**, 1089-1096 (2009)
- [18] Liu J.; Wang N.; Szostek B.; Buck R. C.; Panciroli P. K.; Folsom P. W.: 6-2 Fluorotelomer alcohol aerobic biodegradation in soil and mixed bacterial culture. *Chemosphere* **78**, 437-444 (2010)
- [19] Nabb D. L.; Szostek B.; Himmelstein M. W.; Mawn M. P.; Gargas M. L.; Sweeney L. M.; Stadler J. C.; Buck R. C.; Fasano W. J.: In vitro metabolism of 8-2 fluorotelomer alcohol: Interspecies comparisons and metabolic pathway refinement. *Toxicological sciences* **100**, 333-344 (2007)
- [20] Olsen G. W.; Burris J. M.; Ehresman D. J.; Froehlich J. W.; Seacat A. M.; butenhoff J. L.; Zobel I. R.: Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environmental health perspectives* **115**, 1298-1305 (2007)
- [21] Kemper R. A.: Perfluorooctanoic acid: Toxicokinetics in the rat. DuPont Haskell Laboratories, Project No. DuPont-7473. US EPA Administrative Record, AR-226-1499 (2003)
- [22] Wallington T. J.; Hurley M. D.; Xia J.; Wuebbles D. J.; Sillman S.; Ito A.; Penner J. E.; Ellis D. A.; Martin J.; Mabury S. A.; Nielsen O. J.; Andersen M. P. S.: Formation of C₇F₁₅COOH (PFOA) and other perfluorocarboxylic Acids during the atmospheric oxidation of 8:2 fluorotelomer alcohol. *Environmental Science & Technology* **40**, 924-930 (2006)
- [23] Jahnke A.; Berger U.; Ebinghaus R.; Temme C.: Latitudinal gradient of airborne polyfluorinated alkyl substances in the marine atmosphere between Germany and South Africa (53° N-33° S) *Environmental Science & Technology* **41**, 305-3061 (2007)

- [24] Young C. L.; Furdui V. I.; Franklin J.; Koerner R. M.; Muir D. C. G.; Mabury S. A.: Perfluorinated acids in Arctic snow: new evidence for atmospheric formation. *Environmental Science & Technology* **41**, 3455-3461 (2007)
- [25] Nash S. B.; Rintoul S. R.; Kawaguchi S.; Staniland I.; van de Hoff J.; Tierney M.; Bossi R.: Perfluorinated compounds in the Antarctic region: Ocean circulation provides prolonged protection from distant sources. *Environmental Pollution* **158**, 2985-2991 (2010)
- [26] Fasano W. J.; Sweeney L. M.; Mawn M. P.; Nabb D. L.; Szotek B.; Buck R. C.; Gargas M. L.: Kinetics of 8-2 fluorotelomer alcohol and its metabolites, and liver glutathione status following daily oral 45 days in male and female rats. *Chemico-Biological Interactions* **180**, 281-295 (2009)
- [27] Kudo N.; Iwase Y.; Okayachi H.; Yamakawa Y.; Kawashima Y.: Induction of hepatic peroxisome proliferation by 8-2 telomer alcohol feeding in mice: formation of perfluorooctanoic acid in the liver. *Toxicological science* **86**, 231-238 (2005)
- [28] Corsini E.; Avogadro A.; Galbiati V.; dell'Agli M.; Marinovich M.; Galli C. L.; Germolec D. R.: In vitro evaluation of the immunotoxic potential of perfluorinated compounds (PFCs). *Toxicology and Applied Pharmacology* **250**, 108-116 (2011)
- [29] Liu C.; Deng J.; Yu L.; Ramesh M.; Zhou B.: Endocrine disruption and reproductive impairment in zebrafish by exposure to 8:2 fluorotelomer alcohol. *Aquatic Toxicology* **96**, 70-76 (2010)
- [30] Liu C.; Zhang X.; Chang H.; Jones P.; Wiseman S.; Naile .; Hecker M.; Giesy J. P.; Zhou B.: Effects of fluorotelomer alcohol 8:2 FTOH on steroidogenesis in H295R cells: Targeting the cAMP signalling cascade. *Toxicology and Applied pharmacology* **247**, 222-228 (2010)
- [31] Liu C.; Yu L.; Deng J.; Lam P. K. S.; Wu R. S. S.; Zhou B.: Waterborne exposure to fluorotelomer alcohol 6:2 FTOH alters plasma sex hormone and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis of zebrafish. *Aquatic Toxicology* **93**, 131-137 (2009)

- [32] Hinderliter P. M.; Mylchreest E.; Gannon A. S.; Butenhoff J. L.; Kennedy G. L.: Perfluorooctanoate: Placental and lactational transport pharmacokinetics in rats. *Toxicology* **211**, 139-148 (2005)
- [33] Tichý M.: Poznáme toxicitu chemických sloučenin bez zvířat?. *Chemické listy* **102**, 545-575 (2008)
- [34] Tichý M.; Roth Z.; Bláha K.; Worth A. P.: Alternativní metody testování toxicity chemických látek in silico. *Chemické listy* **99**, 675-681 (2005)
- [35] Tichý M.; Rucki M.; Hanzlíková I.; Čihák R.; Dynterová A.; Feltl L.; Roth Z.: Validace alternativní metody pro určení nebezpečnosti chemických látek a jejich směsí. *České pracovní lékařství* **3**, 137-146 (2005)
- [36] Hájek J.; Koutecký P.: Biologická olympiáda, Seznam přírodnin na poznávačku kategorie A, B. Dostupné z URL:
<<http://www.biologickaolympiada.cz/files/aktualne/Seznam%20organism%C5%A F%20BiO%20kategorie%20AB.pdf>> [cit. 20.4.2011]
- [37] Hrabě S.: *Vodní máloštětinatci (Oligochaeta) Československa*. Praha, Karlova Univerzita 1981
- [38] Hudec K.; Kolibáč J.; Laštůvka Z.; Peňáz M. a kol.: *Příroda České republiky Průvodce faunou*. Praha, Academia 2007
- [39] Tichý M.; Rucki M.: Alternativní metoda stanovení akutní toxicity chemikálií: zástava pohybu červů *Tubifex tubifex*. *Pracovní lékařství* **48**, 225-230 (1996)
- [40] Sedlák E.: *Zoologie bezobratlí*. Brno, Masarykova universita Přírodovědecká fakulta 2006
- [41] Hanzák J.; Halík L.; Mikulová M.: *Světlem zvířat V.díl (1.část), Bezobratlí*. Praha, Albatros 1973
- [42] Valigurová R.: Určení toxicity solí perfluorovaných organických kyselin. *Bakalářská práce*, Katedra analytické chemie (2008)