

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Anežka Skrottová

Stanovení rozdělovacího koeficientu (K_{ow}) perfluorovaných kyselin v systému
oktan-1-ol/voda

Determination of n-octanol/water partition coefficient (K_{ow}) of perfluorinated
acids

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Marian Rucki, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Praha, 2013

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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 10. května 2013

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doktoru Marianu Ruckému, doktoru Radomíru Čabalovi, inženýrce Janě Pavlouškové a inženýru Adamu Vavroušovi za pomoc, čas a cenné rady při vypracování této diplomové práce. Velký dík také patří mé rodině za podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Perfluorované sloučeniny jsou organické sloučeniny, v nichž je každý atom vodíku v uhlíkovém řetězci nahrazen fluorem. Jde o vysoce stabilní, perzistentní a bioakumulativní látky čistě antropogenního původu. Jsou přítomny v živé i neživé přírodě. Rozdělovací koeficient mezi oktan-1-ol a vodu je významný toxikologický parametr látky. Díky jeho znalosti lze usuzovat na chování látky v životním prostředí i v živých systémech.

Pro měření K_{ow} devíti perfluorovaných kyselin bylo použito metody třepací lahve a metody RP-HPLC. Metodou třepací lahve byly, vlivem povrchové aktivity látek a disociace kyselin, naměřeny nesprávné výsledky. Z tohoto měření však lze odvodit chování těchto látek v přírodě. Metodou RP-HPLC, za použití octanového pufru, byly naměřeny přesné a správné výsledky. Byly zjištěny $\log K_{ow}$ perfluorkarboxylových kyselin o délce uhlíkového řetězce od 5-14 uhlíků. Výsledné hodnoty $\log K_{ow}$ se pohybují od 1,66 do 5,10. $\log K_{ow}$ kyseliny s 12 uhlíky byl odhadnut na základě lineární regrese závislosti $\log K_{ow}$ na počtu uhlíků kyseliny. Rozdíly v hodnotách vypočtených pomocí různých softwarů byly značné, tudíž nelze považovat výsledky za relevantní. Tyto softwary nejsou pro výpočet $\log K_{ow}$ perfluorovaných látek vhodné.

Klíčová slova: Perfluorované kyseliny, oktan-1-ol/voda, rozdělovací koeficient, třepací lahev, RP-HPLC.

Abstract

Perfluorinated compounds are organic compounds in which all hydrogen atoms in a carbon chain are substituted with fluorine atoms. These compounds are highly stable, persistent and bioaccumulative. They are purely anthropogenic compounds contained in biota and abiota. Partition coefficient between n-octanol and water is the essential toxicological parameter of a compound. This parameter helps us to assess behaviour of compound in the environment as well as in the living organisms.

The shake flask method and the RP-HPLC method were employed to measure the K_{ow} of nine perfluorinated acids. Using the shake flask method, the surface activity of compounds and the acid dissociation caused false results of the measurement. But behaviour of these compounds in the environment can be deduce. Accurate and precise results were measured by the RP-HPLC method using an acetate buffer. Log K_{ow} of perfluorocarboxylic acids, with the carbon chain length of 5-14, were found out, their final value ranging between 1.66 and 5.10. Log K_{ow} of acid with 12 carbons was estimated based on the linear regression of dependence of log K_{ow} on the number of carbons. There were significant differences in the results obtained by various software. Thus, the results cannot be considered relevant. These software are not suitable for the calculation of log K_{ow} of perfluorinated compounds.

Key words: Perfluorinated acids, n-octanol/water, partition coefficient, shake flask, RP-HPLC.

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Teoretická část.....	12
2.1	Rozdělovací koeficient.....	12
2.2	Vlastnosti perfluorovaných sloučenin	13
2.3	Použití PFC	15
2.4	Výroba PFC	16
2.5	Expozice perfluorovaným látkám	17
2.5.1	Potrava.....	18
2.5.2	Voda.....	23
2.5.3	Prach	25
2.5.4	Vzduch	26
2.6	Migrace PFC v životním prostředí	27
2.7	Časové trendy znečištění PFC.....	30
2.8	Toxikodynamika PFC.....	31
2.8.1	Ryby.....	33
2.8.2	Ptáci.....	34
2.8.3	Savci.....	35
2.8.4	Domácí zvířata	38
2.9	Toxikokinetika PFC.....	39
3	Experimentální část.....	42
3.1	Použité chemikálie	42
3.1.1	Analyzované látky.....	42
3.1.2	Ostatní chemikálie	42

3.2	Přístroje a vybavení	43
3.3	Metoda třepací lahve	44
3.3.1	Pracovní postup	45
3.4	Metoda RP-HPLC.....	51
3.4.1	Pracovní postup	53
4	Výsledky a diskuze	55
4.1	Metoda třepací lahve	55
4.2	Metoda RP-HPLC.....	62
4.3	Vypočtené hodnoty.....	68
4.4	Srovnání metod	70
5	Závěr.....	75
	Soupis bibliografických citací.....	77

Seznam zkratek a symbolů

°C	Jednotka teploty
μg/kg	Jednotka hmotnostního zlomku (jeho násobky: ng/kg, ng/g, pg/g)
μmol	Jednotka látkového množství
μS/cm	Jednotka konduktivity
ADME	Absorpce Distribuce Metabolismus Exkrece
ATP	Adenosintrifosfát
BMI	Index tělesné hmotnosti (body mass index)
CNS	Centrální nervová soustava
C _{oktanol}	Molární koncentrace látky v oktan-1-olu [mol/l]
C _{voda}	Molární koncentrace látky ve vodě [mol/l]
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EC ₅₀	Poloviční efektivní koncentrace [mol/l]
ER	Estrogenní receptory
eV	Jednotka kolizní energie
F _m	Objemový průtok mobilní fáze [ml/min]
FOSA	Perfluoralkylsulfonamid
FOSAA	Perfluoroktansulfonamidoctová kyselina
FOSE	Perfluoralkylsulfonamidoethanol
FTCA	Fluorotelomerní kyselina
FTOH	Fluorotelomerní alkohol
FTS	Fluorotelomerní sulfonát
g	Jednotka hmotnosti (její násobky: ng, kg)
HSI	Hepatosomatický index
k	Retenční faktor
K _{ow}	Rozdělovací koeficient
kPa	Jednotka tlaku
l/min	Jednotka průtoku (její násobky: ml/min)

L _{1,2}	Interval spolehlivosti
LOD	Mez detekce (Limit of detection)
LOQ	Mez stanovitelnosti (Limit of quantification)
mg/l	Jednotka hmotnostní koncentrace (násobky: ng/l, pg/l, ng/ml, ng/m ³ , pg/m ³)
min	Jednotka času
ml	Jednotka objemu (její násobky: µl, mm ³ , cm ³)
mm	Jednotka délky (její násobky: µm)
mM	Jednotka molární koncentrace (její násobek: µM)
mol/l	Jednotka molární koncentrace (její násobky: mmol/l, µmol/l, nmol/l)
M _r	Relativní molekulová hmotnost
MS	Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
n	Počet měření
PFC	Perfluorované sloučeniny (perfluorinated compounds)
PFCA	Perfluorkarboxylát
PFDA	Perfluordekanová kyselina
PFD _o DA	Perfluordodekanová kyselina
PFDS	Perfluordekansulfonát
PFHpA	Perfluorheptanová kyselina
PFHxA	Perfluorhexanová kyselina
PFHxS	Perfluorhexansulfonát
PFNA	Perfluornonanová kyselina
PFOA	Perfluoroktanová kyselina
PFOS	Perfluoroktansulfonát
PFOSA	Perfluoroktansulfonamid
PFPeA	Perfluorpentanová kyselina
PFSA	Perfluorsulfonát
PFTeDA	Perfluortetradekanová kyselina
PFTriDA	Perfluortridekanová kyselina

PFUnDA	Perfluorundekánová kyselina
POPs	Perzistentní organické polutanty
PPAR α	Receptory aktivované proliferátory peroxizomů alfa (peroxisome proliferator-activated receptor alpha)
ppm	Částic na jeden milion částic (parts per million)
ppt	Částic na jeden bilion částic (parts per trillion)
r	Poloměr kolony [mm]
R ²	Koeficient spolehlivosti
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
RPM	Otáčky za minutu (Revolutions per minute)
s _r	Relativní směrodatná odchylka [%]
t ₀	Mrtvý čas [min]
t _R	Retenční čas [min]
v	Délka kolony [mm]
V	Jednotka napětí
V _m	Objem mobilní fáze v koloně [ml]
\bar{x}	Průměrná hodnota
α	Hladina významnosti
ε	Porozita kolony

1 Úvod

Perfluorované látky jsou organické sloučeniny mající každý vodík na uhlíkatém řetězci nahrazen fluorem. Délka tohoto řetězce a funkční skupina sloučeniny může být různá. Látky měřené v této práci jsou plně fluorované karboxylové kyseliny o délce uhlíkového řetězce od 5 do 14 uhlíků.

Tyto látky mají unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti díky stabilitě vazby uhlík-fluor. Tato neobyčejná stabilita má však za následek perzistentnost a bioakumulaci těchto látek. Jde o látky čistě antropogenního původu, a proto neexistuje v přírodě mechanismus na jejich odstranění. Tyto látky jsou přítomny v živé i neživé přírodě a to i na místech značně vzdálených od možných zdrojů kontaminace.

Kvůli stabilitě vazby C-F byly tyto látky dlouho považovány za inertní a biologicky neaktivní. Výzkumy však ukazují, že tyto látky mají mnoho negativních účinků na živé organismy.

Díky znalosti rozdělovacího koeficientu látky lze usuzovat na její chování v životním prostředí a v živých organismech. Jde proto o stěžejní toxikologický parametr.

Cílem mé práce bylo určit rozdělovací koeficient mezi oktan-1-ol a vodu devíti perfluorovaných kyselin. Metod pro měření rozdělovacích koeficientů je několik. Použitými metodami byla metoda třepací lahve a metoda RP-HPLC. Výsledky obou metod byly srovnány a porovnány s hodnotami vypočtenými pomocí softwarů. Experimentálně získané hodnoty rozdělovacích koeficientů těchto látek nebyly dosud publikovány.

2 Teoretická část

2.1 Rozdělovací koeficient

Rozdělovací koeficient látky mezi n-oktanol a vodu popisuje lipofilitu látky. Většinou bývá udán v logaritmické formě jako $\log K_{ow}$. K_{ow} je poměr molární koncentrace látky v oktán-1-olu [mol/l] a koncentrace látky ve vodě [mol/l]:

$$K_{ow} = \frac{C_{oktanol}}{C_{voda}} \quad \text{rov. 2.1}$$

Tento koeficient je stěžejní pro určení fyzikálně chemických vlastností látky, které určují její vliv na organismus. Souvisí s absorpcí látky, distribucí, metabolismem a její exkrecí (ADME) [1]. Obecně se předpokládá, že perzistentní organické polutanty se hromadí v lipidech. Při znalosti rozdělovacího koeficientu lze odhadovat také osud látky v životním prostředí [2]. Jelikož rozdělovací koeficient souvisí i s přenosem molekul přes biologické membrány a obecně s farmakokinetikou látek, jde o důležitou fyzikální veličinu pesticidů, drog a dalších látek ovlivňujících zdraví lidí [3].

Existuje mnoho metod určování K_{ow} . Nejčastěji je využíváno vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC) a standardů o známých hodnotách rozdělovacího koeficientu. Při této metodě je využíváno lineární závislosti $\log K_{ow}$ na \log retenčního faktoru [1]. RP-HPLC není citlivá na nečistoty, má široký dynamický rozsah, detekce může probíhat on-line a stačí malé množství vzorku [4]. Oproti metodě třepací lahve a metodě pomalého míchání (slow-stirring method) je RP-HPLC rychlejší a levnější, jelikož není nutná žádná kvantifikace, měření je pouze retenční čas [1]. Metoda třepací lahve je velmi náročná na přesnost a je i časově náročná. Navíc vyžaduje použití měřených látek i rozpouštědel o nejvyšší možné čistotě. Potenciometrické měření je přesné, ale je vhodné jen pro silné kyseliny nebo

báze. Existují také softwary, které $\log K_{ow}$ určí výpočtem. Výsledky různých softwarů se však často velmi liší [4].

Hodnota $\log K_{ow}$ souvisí s velikostí povrchu molekuly a s jejím nábojem. Menší molekuly nevykazující dipólový moment, obsahující atomy bez náboje mají obecně vyšší hodnotu $\log K_{ow}$ [5].

2.2 Vlastnosti perfluorovaných sloučenin

Perfluorované sloučeniny (PFC) jsou antropogenně vyrobené organické látky, ve kterých jsou atomy vodíku zcela nahrazeny atomy fluoru. Délka uhlíkového řetězce může být různá [6]. Nejčastěji jde o délku mezi 4 a 14 uhlíky [7]. Liší se také funkční skupinou. Může jít o karboxylovou kyselinu, sulfonovou kyselinu, sulfonamid, fluorotelomerní alkohol, aj. [6]. PFC mají tzv. hydrofilní hlavu a hydrofobní ocas. Hydrofobní ocas tvoří fluorovaný uhlíkový řetězec, hydrofilní hlavu funkční skupina [8]. Dvěma nejčastěji zkoumanými látkami jsou osmiuhlíkaté sloučeniny: perfluoroktanová kyselina (PFOA) a perfluoroktansulfonát (PFOS) [7].

Díky vysokoenergetické vazbě uhlík-fluor, která je nejpevnější kovalentní vazbou vůbec, mají tyto látky unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti [9]. Síla vazby je dána vysokou elektronegativitou fluoru a jeho malým poloměrem [10]. Proto mají vysokou hustotu a malé intermolekulární interakce. Tyto vlastnosti zároveň způsobují jejich špatný vliv na životní prostředí [11].

PFC jsou velmi stabilní, a proto i perzistentní v životním prostředí. Nepodléhají hydrolýze, fotolýze, defluoraci [9], odolávají oxidačním i redukčním procesům, nereagují s kyselinami ani bázemi [12], jsou termostabilní a nehořlavé [13], odolávají rentgenovému i jadernému záření

[10], nepodléhají metabolismu obratlovců. Biodegradace je možná pouze na funkční skupině, kde není fluor přítomen. Při mikrobiální biodegradaci dochází k přeměně na více bioakumulativní a více toxické sloučeniny [9]. Reakce některých perfluorovaných sloučenin s ionty a elektrony v zemské mezosféře a nižší termosféře mohou být důležitým procesem k jejich odstranění. Těmito reakcemi s nabitými částicemi se mohou snížit poločasy života v atmosféře některých PFC [14]. Kvůli síle vazby uhlík-fluor byly PFC dlouho mylně považovány za metabolicky inertní a netoxické [15].

Jde o skupinu látek, která způsobuje globální oteplování, jelikož tyto látky značně absorbují infračervené záření a mají dlouhé poločasy života v atmosféře [14].

Fluor je nejčastěji se vyskytující halogen v zemské kůře a je 13. nejhojnější prvek vůbec. Některé fluorované látky jsou dokonce produkovány některými vyššími rostlinami, mikroorganismy či houbami. Přírodní látky však vždy obsahují pouze jeden atom fluoru, na rozdíl od těch průmyslově vyráběných, které jsou mnohé plně fluorované [10].

Tyto látky mají velkou povrchovou aktivitu a jsou amfifilní [11]. Perfluorované řetězce jsou oleofobní a hydrofobní. (Pokud je perfluoralkan smíchán se směsí uhlovodíku a vody, vytvoří se tři nemísitelné fáze.) Pokud má látka hydrofilní i hydrofobní část, vyskytuje se na rozhraní fází. Nabitá funkční skupina (např. kvartérní amoniová, karboxylová či sulfonová skupina) zvyšuje hydrofilitu sloučeniny. PFC se používají jako součást surfaktantů. Pokud je nalezen vhodný kompromis mezi hydro- a lipofilitou těchto surfaktantů, může být sníženo povrchové napětí vody až o jednu třetinu [10].

Fluorotelomerní alkoholy (FTOH) a perfluoroktansulfonamid (PFOSA) mohou být atmosférickou oxidací degradovány na stabilnější perfluor-sulfonáty (PFSA) a perfluorkarboxyláty (PFCA), které jsou potenciálně toxické a bioakumulativní. PFOS a PFCA s 9 - 11 uhlíky jsou nejvýznamnějšími

produkty degradace, lze je detekovat v tkáních, játrech a krvi lidí i zvířat a v životním prostředí, dokonce i na místech vzdálených od jejich produkce, např. v Arktidě. Po těchto zjištěních firma 3M v roce 2000 dobrovolně ukončila výrobu perfluorovaných látek. Ačkoliv firmy přislíbily omezení produkce PFOA, fluorotelomerní alkoholy, při jejichž výrobě PFOA vzniká, jsou stále vyráběny [8].

V roce 2009 byl PFOS a jeho soli Stockholmskou úmluvou přidán na seznam tzv. POPs – perzistentních organických polutantů [16].

PFC byly detekovány i v lidském krevním séru. U lidí profesně pracujících s PFC se hladina fluoru v krvi pohybovala mezi 1,0 a 71 ppm, u ostatních lidí mezi 0,0 a 0,13 ppm [10].

2.3 Použití PFC

Tyto látky jsou využívány již více než 50 let a v průmyslu mají široké uplatnění. Plastové, kožené, papírové, látkové a kovové výrobky pokryté vrstvou sloučenin s perfluorovaným uhlíkatým řetězcem jsou nesmáčivé vodou i olejem. Jsou tedy odolné vůči běžnému ušpinění. Používají se proto jako impregnace textilu, čalounění a koberců, ale také sáčků, krabic a obalů na potraviny. Slouží také jako lubrikanty a surfaktanty, jako přísady do leštidel, maziv, barev, lepidel, chladicích prostředků, jsou součástí insekticidů, herbicidů a některých farmak. Perfluoralkyl fosforitany jsou nově vyráběné látky, které se používají jako součást pesticidů. Využití PFC našly také v kosmetice, při vyvolávání fotek, při výrobě polovodičů, jako polymerační činidla, součást leteckých hydraulických kapalin či jako přísada do pokovovacích lázní. PFC jsou součástí hasicích směsí používaných při požárech rafinerií, petrochemických produktů a ropy. Tato hasiva patří

do skupiny AFFF - syntetických pěnidel tvořících vodní film [6], [8], [9], [10], [13], [17], [18], [19].

Pokud je v organické sloučenině vodík nahrazen fluorem, změní se některé její vlastnosti. Vzhledem k vysoké elektronegativitě fluoru se např. zlepší reaktivita molekuly. Trifluormethyl má stejné sterické vlastnosti jako methyl. Receptory přijímají trifluormethylové deriváty stejně jako přirozené substráty, ale jejich fyzikální a chemické vlastnosti jsou jiné. Mají větší odolnost vůči biodegradaci a vyšší reaktivitu s nukleofilními činidly. Proto mají látky s $-CF_3$ skupinou čím dál větší uplatnění ve farmacii a zemědělství [10].

Fluorované deriváty se používají také jako přenašeče kyslíku v krevních náhradách. Hlavní rozdíl mezi nimi a hemoglobinem je v tom, že v hemoglobinu je kyslík vázán koordinačně-kovalentní vazbou, ve fluorovaných derivátech je kyslík rozpuštěn. V krevních náhradách jsou fluorované deriváty ve formě vodné emulze [10].

Při hledání sloučenin, které by měly stejně dobré fyzikální vlastnosti jako PFC, ale měly kratší poločasy života v atmosféře, byly připraveny fluorované étery. Ty mohou být použity jako alternativní chladicí médium a čisticí přípravky [20].

2.4 Výroba PFC

PFC jsou vyráběny třemi možnými postupy - elektrofluorací, telomerizací nebo oligomerizací. Elektrofluorace je metoda nejstarší, používaná od 50. let 20. století [21], pomocí které jsou produkovány alifatické sloučeniny. Výchozí organická sloučenina je působením bezvodého fluorovodíku a elektrického proudu přeměněna na směs perfluoracylfluoridů

[10]. Při tomto procesu dochází k fragmentacím a přeskupování v uhlíkovém řetězci, takže vzniká směs látek o různé délce uhlíkového řetězce a lineární, rozvětvené a cyklické izomery těchto látek [13].

Telomerizace se používá od 70. let 20. století [21]. Dochází při ní k polyadici tetrafluorethylenu k trifluormethyljodidu. Reakce je iniciována tepelně nebo působením UV záření. Mohou vznikat lineární i rozvětvené molekuly [10].

Další metodou je oligomerizace perfluorolefinů. Reakce pokračuje iontovým mechanismem či reakcí volných radikálů. Reakce je iniciována tepelně, vznikají především rozvětvené molekuly. Používá se také oligomerizace perfluoralkyl oxidů, např. tetrafluorethylen oxidu. Tato reakce je iniciována ionizačním zářením, probíhá při nízkých teplotách a vznikají lineární polyethery [10].

V roce 2000, což je poslední rok, kdy nebyla výroba redukována, bylo vyrobeno 3550 tun perfluoroktansulfonylfluoridů. V roce 2001 to bylo již jen 175 tun [13]. Odhaduje se, že celosvětová produkce FTOH od roku 2000 do roku 2002 přesáhla 5000 tun/rok [22].

2.5 Expozice perfluorovaným látkám

Hlavním zdrojem PFC pro člověka je potrava. Kromě ní to jsou obaly potravin, pitná voda, domácí prach a ovzduší. Jako minoritní zdroje se zdají být výrobky používané jako impregnační spreje či prostředky na koberce [18].

Dřívější výroba PFC ve velkém množství a jejich široké využití způsobuje znečištění domácího i venkovního prostředí, a tím i kontaminaci potravy a pitné vody. Je pozorována zřejmá souvislost mezi odhadovaným příjmem PFOA, PFOS a PFUnDA (perfluorundekanová kyselina) potravou a

koncentrací v séru. V některých případech může být i kontaminovaná pitná voda značným či dokonce hlavním zdrojem PFC. Pro děti ve věku kolem dvou let je příjem PFC potravou zhruba stejný jako ze zkonsumovaného prachu [6].

67-84 % přijaté PFOA a dokonce 88-99 % přijatého PFOS pochází z potravy. Pro některé ženy však může domácí prostředí představovat až 50 % přijatých PFC. Prach a vzduch v domácnosti činí 40 % přijaté PFOA pro jednu čtvrtinu žen. Byla prokázána přímá úměra mezi koncentrací PFC v domácím prachu a koncentrací v séru. Největším zdrojem PFC pro kojence je mateřské mléko. Příjem PFC mateřským mlékem odpovídá příjmu potravou dospělým jedincem [6].

2.5.1 Potrava

2.5.1.1 Česká republika

V České republice byly testovány konzervované ryby a produkty z mořských plodů koupené v českých obchodech v roce 2009, např. tuňák, sardinky a tresčí játra. Detekován byl především PFOS, koncentrace se pohybovaly mezi 0,7 a 12,8 µg/kg. Koncentrace PFOA se pohybovaly mezi 1,2 a 5,1 µg/kg. Největší kontaminace PFOS byla u výrobků pocházejících z Baltského moře [23].

2.5.1.2 Polsko

V polské studii byly měřeny hodnoty 19 PFC v lidské krvi a v potravě pocházející z oblasti Gdaňského zálivu. Bylo zjištěno, že kromě PFOS a PFOA se v lidech bioakumuluje i dalších 8 PFC a že do lidí vstupují hlavně v potravě. Nejvyšší příjem těchto deseti PFC měly především ty osoby, které v dotazníku uvedly, že často konzumují ryby, a to především z Baltského moře [18].

2.5.1.3 Německo

Medián denních příjmů PFOS a PFOA byl 1,4 a 2,9 ng/kg/den. Z výsledků vyplývá, že dospělý Němec sice je exponován PFOS a PFOA, ale denní příjem nedosahuje doporučeného tolerovatelného denního příjmu [18].

Při měření koncentrace PFOA a PFOS v rybách chycených v Německu nebyla PFOA detekována v žádném vzorku. Nejvyšší koncentrace PFOS byly naměřeny v rybách chycených v okolí hustě zalidněných oblastí, kde jsou do vod vypouštěny čističky odpadních vod. Odhadovaný tolerovatelný denní příjem PFOS činí 150 ng/kg. Dospělý člověk vážící 60 kg může této hodnoty dosáhnout, pokud zkonzumuje denně 300 g ryby obsahující 30 µg/kg PFOS. 33 ze 112 měřených vzorků těchto koncentrací dosahovalo. Člověku často konzumujícímu tyto ryby může hrozit potenciální zdravotní riziko. Je však třeba říci, že pro tyto výsledky byl použit tzv. scénář nejhoršího případu, který je jen málo pravděpodobný [24].

2.5.1.4 Dánsko

Při měření hladiny PFOS v krevní plazmě těhotných žen byla zjištěna přímá úměra mezi touto hladinou a konzumací červeného masa, živočišných tuků, bramborových lupínků a popcornu. Opačná úměra byla pozorována u skupiny preferující zeleninu a drůbež. Rozdíl v koncentraci PFOS v plazmě žen, které uvedly konzumaci velkého množství červeného masa a malého množství zeleniny a ženami, které uvedly opak, činil 31 %. Stejná spojitost, ale menší rozdíl (18 %), byla pozorována i pro PFOA. Výsledky u červeného masa nejspíš souvisí se schopností PFOS vázat se na proteiny krevní plazmy. U popcornu a bramborových lupínků jde nejspíš o souvislost s obalem ošetřeným prostředky odpuzujícími mastnotu, které obsahují PFC [25].

2.5.1.5 Švédsko

Výsledky švédské studie ukázaly, že příjem PFOS jedincem souvisí s konzumací ryb a také s oblastí, odkud tyto ryby pocházejí. Hladina PFC v rybách chycených ve vodách v antropogenně znečištěných oblastech je obecně vyšší než koncentrace v rybách z otevřených oceánů. Sladkovodní ryby chycené ve znečištěných oblastech mohou být nezanedbatelným zdrojem PFOS pro švédské obyvatelstvo [26].

2.5.1.6 Norsko

Z měření vyplývá, že průměrný Nor zkonsumuje za den okolo 100 ng PFC, z čehož PFOA a PFOS činí okolo 50 %. PFOS má větší schopnost bioakumulace v živočiších než PFOA. Příjem PFC klesá s rostoucím věkem a je vyšší u mužů než u žen [27]. Koncentrace PFC v lidském séru je spojena s konzumací ryb, rybích jater, krevet a masa, ale také s věkem, místem, kde dotyčný žije a zda žena v minulosti kojila. Ryby a měkkýši jsou však hlavním zdrojem PFC. Mořské plody přispívaly k celkovému přijatému množství PFUnDA v potravě 93 %, PFOS 81 % a PFOA 38 % [28].

Při zpracování výsledků měření koncentrací PFC v krvi norských žen bylo použito vícerozměrné analýzy. Ta prokázala, že mladší ženy s tzv. „západním jídelníčkem“, sestávajícím z rýže, těstovin, vody, bílého a červeného masa, čokolády, křupek a pečiva, měly v krvi prokazatelně nižší koncentraci PFC než ženy s v Norsku tradičním jídelníčkem sestávajícím především z ryb [29].

2.5.1.7 Španělsko

Podle španělské studie přijme běžný 70 kg člověk s potravou mezi 62,5 a 74,2 ng PFOS za den. Hlavními zdroji PFOS jsou ryby, dále mléčné výrobky a masné produkty [30].

Při měření hladin 13 PFC v krvi lidí žijících v Katalánsku byla naměřena nejvyšší průměrná koncentrace PFOS (7,64 ng/ml), dále PFHxS (3,56 ng/ml) a PFOA (1,80 ng/ml). Hladiny PFHxS a PFOA byly vyšší u mužů než u žen. Hladiny PFHxS a PFOSA byly vyšší u mladších osob ve věku kolem dvaceti let [31].

2.5.1.8 Velká Británie

Britská Komise pro toxicitu látek (Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment) určila v roce 2006 hodnotu tolerovatelného denního příjmu PFOS na 300 ng/kg a PFOA na 3000 ng/kg [18].

V britské studii byl PFOS nalezen nad limitem detekce pouze ve 4 z 20 analyzovaných potravin, konkrétně v bramborách, vejcích, konzervované zelenině a zavařeninách. PFOA byla detekována pouze v bramborách. Bylo spočítáno, že průměrný dospělý přijme v potravě za den asi 10 ng/kg PFOS a 10 ng/kg PFOA. Studie došla k závěru, že je velmi nepravděpodobné, aby běžný Brit, dokonce ani extrémní konzument nejvíce kontaminovaných potravin, překročil tolerovatelný denní příjem, který činil v roce 2008 pro PFOS 150 ng/kg a pro PFOA 1500 ng/kg [18].

2.5.1.9 Kanada

Studie nazvaná Canadian Total Diet Study, sestávající ze 151 vzorků nasbíraných v letech 1992 až 2004, prokázala přítomnost perfluoroktansulfonamidů v jednotkách pg/g až ng/g ve všech skupinách potravin. Nejvyšší koncentrace celkových perfluoroktansulfonamidů (PFOSA) byla naměřena v potravinách z rychlého občerstvení. V průběhu měřeného období koncentrace PFOSA v těchto potravinách klesala. To samé se však nedá říct o koncentracích ve sladkovodních rybách, mořských rybách a mořských měkkýších. Je odhadováno, že průměrný Kanadčan starší dvanácti let přijme v potravě 73 ng PFOSA za den. Nejvyšší koncentrace PFOSA byly naměřeny

u potravin zabalených do papírových obalů (např. hranolky či pizza), často ošetřených PFC, aby odolávaly promaštění. Průměrný denní příjem celkových PFC potravou činí pro Kanadány asi 250 ng [32].

Průměrný denní příjem PFC z potravy Eskymáků se pohybuje mezi 210 a 610 ng na osobu, což činí 0,6 a 8,5 ng/kg tělesné hmotnosti, přičemž hodnoty byly značně vyšší pro muže ve věku 41 až 60 let. Výsledky se tedy příliš neliší od evropské či kanadské populace. Nejvyšší koncentrace PFC byly nalezeny v sobích a tuleních játrech a v mase ledního medvěda a běluhy [33].

2.5.1.10 USA

PFOS je nejvíce zastoupená PFC ve filetech sladkovodních ryb. V Minnesotě v USA, kde byl v minulosti zdroj PFC, jsou koncentrace PFOS ve filetech slunečnice velkoploutvé (*Lepomis macrochirus*) tak vysoké, že minnesotské ministerstvo zdravotnictví (Minnesota Department of Health) nedoporučuje jíst ryby z místních zdrojů častěji než jednou týdně a v některých částech dokonce ne častěji než jednou za měsíc. Slunečnice se zdá být citlivým biomarkerem znečištění perfluorovanými látkami a vzhledem k její časté konzumaci je i jedním ze zdrojů expozice PFC. Některé PFC mají v rybách biokoncentrační faktor vyšší než 4000 [34].

Celkový příjem PFOS všemi expozičními cestami se pohybuje v USA kolem 160 ng/den pro dospělého a kolem 50 ng/den pro dítě. [35].

2.5.1.11 Vliv přípravy jídla

Bylo zjištěno, že vařením, pečením a smažením potravin klesá koncentrace perfluorovaných kyselin v těchto potravinách, přičemž pečení bylo nejefektivnějším způsobem [36]. Nebylo jasné, zda vaření na teflonových výrobcích snižuje či zvyšuje expozici lidí perfluorovaným látkám. Nakonec se věc uzavřela s tím, že ačkoliv jisté procesy snižují a jisté zvyšují kontaminaci některými látkami, nezáleží tolik na způsobu tepelné přípravy jako spíše

na potravině, která je upravována. Obecně lze říci, že pokud při úpravě dochází k uvolňování tuku, koncentrace organických škodlivin v potravině klesá, to však nelze použít pro PFC. PFC se nechovají jako klasický POP (perzistentní organický polutant), nejsou totiž typicky uloženy v tucích [18].

Při výrobě produktů, které budou přicházet do kontaktu s jídlem, se používají relativně malá množství PFC. Nejdůležitějšími produkty, ve kterých je používáno PFC je teflonové nádobí a papírové obaly ošetřené proti umaštění a zvlhnutí. Analýza teflonového nádobí ukázala, že hodnoty zbytkové PFOA se pohybují v řádech jednotek $\mu\text{g}/\text{kg}$, zatímco hodnoty PFOA přítomné v papírovém obalu popcornu určeného do mikrovlnné trouby dosahují $300 \mu\text{g}/\text{kg}$. Teflonové nádobí tedy nepředstavuje důležitý zdroj PFC ve srovnání s papírovými obaly, ze kterých se PFC (především PFOA) přenášejí do jídla a následně jsou zkonsumovány [37].

2.5.2 Voda

Bylo zjištěno, že běžné čističky odpadních vod nejsou schopny PFC odstranit. Voda vypouštěná z čističek je tedy zdrojem znečištění vodního ekosystému [38].

PFOA a PFHxA byly nejvíce zastoupenými PFC v povrchové vodě, PFOS a jiné PFC byly detekovány méně často a v menších množstvích. Při měření PFC ve vodách byla naměřena nejvyšší koncentrace ve vodách z čističek odpadních vod, dále v odvodňovacích kanálech, městských kanálech, jezerech a nejméně v řekách, z čehož vyplývá, že právě voda z čističek odpadních vod je hlavním zdrojem PFC pro povrchovou vodu. Skladba jednotlivých PFC v povrchové vodě odpovídá vodě z vodovodu, ale neodpovídá skladbě v lidské krvi. PFC tedy nejsou odstraněny z povrchové vody a zůstávají i ve vodě pitné, ale pro člověka není voda důležitým expozičním zdrojem [38].

Stejně jako mnohé jiné kontaminanty se i PFC dostávají do moře a oceánů z nečištěných i čištěných odpadních vod a z řek. Sedimenty a vody v hloubkách oceánů jsou rezervoárem PFC. PFC byly častěji detekovány ve vodě z čističek odpadních vod a ve vodě v přístavu než na otevřeném moři. Nejčastěji detekovanými sloučeninami byl PFOS a PFOA. Vysoké koncentrace PFC jsou zaznamenány v mořích u velkoměst nad 1,5 milionu obyvatel, kde je intenzivní průmyslová činnost a provoz přístavu. Voda v přístavu je přímo ovlivněna loďařskými činnostmi a vypouštěním čištěných a nečištěných městských vod a průmyslových odtoků [39].

V Číně se během posledních let hodně rozmohla výroba produktů obsahujících PFC a stala se jejich největším výrobcem. Tyto továrny jsou často postaveny v blízkosti mnohamilionových měst. Při měření hladiny PFC v séru Číňanů měli hodnoty nejvyšší (průměrně 153 ng/ml) právě ti, kteří žili v blízkosti továren na produkty obsahující PFC [38].

Přestože byl PFOS označen jako perzistentní organický polutant, v některých speciálních průmyslových odvětvích je stále používán. Jedním z hlavních zdrojů znečištění přírodních vod PFOS jsou pokovovací a textilní továrny a továrny na polovodiče. Koncentrace PFOS v odpadní vodě z fotolitografických procesů ve výrobnách polovodičů je vyšší než 1650 mg/l. V taiwanské továrně na polovodiče je každý den vyprodukováno kolem 200 tun odpadní vody obsahující 12 566 mg/l PFOS. Vysoké koncentrace PFOS v odpadní vodě jsou produkovány také v pochromovacích závodech. Tyto odpadní vody navíc často obsahují silné kyseliny, takže se pH pohybuje kolem 3. Je tedy nutné najít efektivní techniku k odstranění PFOS z těchto odpadních vod produkovaných průmyslem. Jednou z mála efektivních technik se zdá být adsorpce, jelikož PFOS procesům jako je oxidace, redukce či biologická degradace nepodléhá [40].

Jako efektivní biosorbent odstraňující PFOS z vodných roztoků byl použit zesíťovaný chitosan ve formě kuliček. Sorpční kapacita chitosanu byla

více než 5,5 mmol PFOS/g, což je mnohem více než běžně používané adsorbenty. Sorpční kinetika ukázala, že sorpční rovnováhy bylo dosaženo rychleji při vyšším pH a nízké koncentraci PFOS. Mírně ovlivnila sorpční rychlost i velikost adsorbentu. Sorpce PFOS na chitosanové kuličky je difúzní proces založený na elektrostatických a hydrofobních interakcích. Aminokupiny v polymerním chitosanu mohou být při kyselém pH protonovány, díky čemuž může být adsorbován záporně nabitý PFOS. PFOS je přednostně akumulován v krevní plazmě a v játrech, na rozdíl od jiných perzistentních organických polutantů, které se hromadí v tuku. Příčinou jsou pravděpodobně právě proteiny obsahující velké množství aminokupin, které umožňují adsorpci. Bylo prokázáno, že sorpční kapacita klesá s rostoucím pH roztoku, ale s rostoucím pH klesá doba, která je nutná k dosažení sorpční rovnováhy [40].

2.5.3 Prach

V roce 2010 byla v Norsku prováděna analýza vzorků prachu a vzduchu v domácnostech a v kancelářích. PFOS, PFDS, PFHpA, PFOA, PFNA byly pozorovány v každém vzorku prachu z domácností, a to v rozmezí od 1 do 89 ng/g. Ve vzorcích vzduchu převládaly fluorotelomerní alkoholy. Jejich množství se pohybovalo od 4,7 do 17,9 ng/m³. Na odlišných místech (domácnost, kancelář, sklad) byly detekovány PFC v různých množstvích. Tyto odlišnosti jsou dány rozdíly v zařízení a vybavení (především koberce a čalounění), které souvisí s účelem příslušné místnosti [41].

Při měření koncentrací PFC v domácím prachu a vzduchu ve španělských domácnostech bylo naměřeno deset různých PFC v prachu, přičemž perfluordekanová a perfluornonanová kyselina měly nejvyšší průměrnou koncentraci. Ve vzduchu byly nejvíce FTOH, především 8:2 FTOH. Expozice domácímu prachu a vzduchu je zanedbatelná oproti potravě a pitné

vodě. Při použití tzv. scénáře nejhoršího případu činí příjem PFOA domácím prachem 4 % celkového příjmu pro dospělé a 20 % pro batolata [42].

Při různých studiích prováděných v různých zemích byla získána velmi odlišná data. Tyto odlišnosti nejspíš souvisejí s odlišným kulturním životem, geografickou polohou země, ale také s rozdíly ve způsobu vzorkování [41]. Prach jako zdroj PFC může být významný především v regionech, kde, vzhledem k charakteru počasí, tráví lidé více času v interiéru [18].

2.5.4 Vzduch

Při plavbě z Japonského moře do Severního ledového oceánu byly měřeny koncentrace PFC ve vzduchu. V plynné fázi byly nejvíce zastoupeny fluorotelomerní alkoholy, dále fluorotelomerní kyseliny, perfluoralkylsulfonamidoethanoly a sulfonamidy. Z FTOH byl nejvíce detekován 8:2 FTOH, před 10:2 FTOH a 6:2 FTOH. Průmyslové oblasti jsou potenciálním zdrojem FTOH. Obecně lze říci, že koncentrace PFC jsou vyšší v okolí měst [21].

Při plavbě v létě roku 2007 z Mexického zálivu k severovýchodnímu pobřeží USA byly sbírány vzorky vzduchu. Mezi fluorotelomerními alkoholy byl 8:2 FTOH nejvíce zastoupen ve všech vzorcích. Nejvyšší koncentrace celkových FTOH byla naměřena v přístavu v New Jersey, kde je mnoho potenciálních zdrojů znečištění. Hlavní zdroje znečištění životního prostředí FTOH jsou spojeny s jejich výrobou, používáním a likvidací. Emise 8:2 FTOH byly v roce 2004 v Severní Americe odhadovány na asi 50 tun/rok. Postupně však dochází k jejich poklesu. Např. emise společnosti DuPont, která vyrábí látky na bázi fluorotelomerních alkoholů, klesly z 20,2 tun/rok v roce 2004 na 0,6 tun/rok v roce 2007. Hlavní zdroje perfluoralkylsulfonamidů (FOSA) a perfluoralkylsulfonamidoethanolů (FOSE) jsou spojeny s produkcí látek na bázi perfluoroktylsulfonylu. Poté, co největší producent PFOS, firma 3M, ukončila jeho výrobu v roce 2002, přesunula se jeho výroba do jiných zemí,

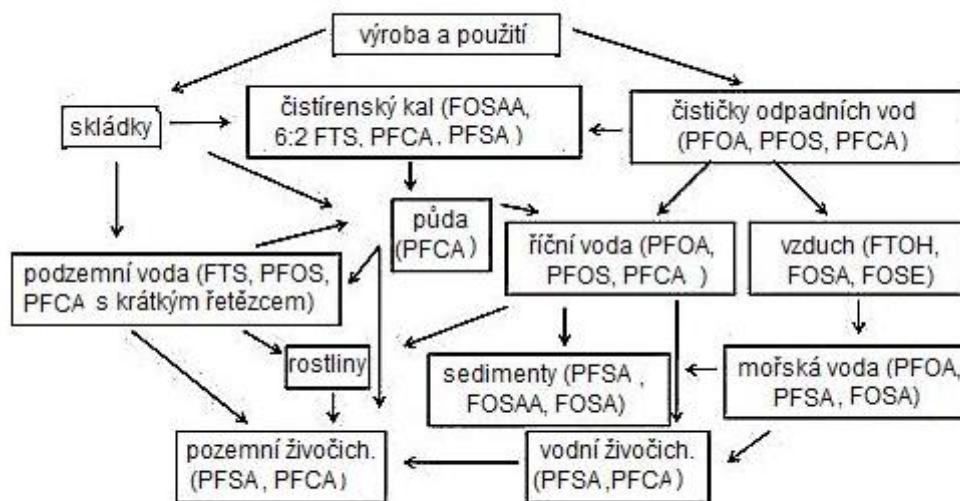
kde nejsou regulace tak přísné. Např. společnosti v Číně začaly v roce 2003 PFOS a jemu příbuzné sloučeniny vyrábět ve velkém měřítku. Vyprodukovaný objem látek v roce 2006 byl vyšší než 200 tun [16].

2.6 Migrace PFC v životním prostředí

Velká rozpustnost ve vodě a nízká Henryho konstanta činí z PFOS a PFOA látky účastníci se mokré depozice. Je tedy nepravděpodobné, že by byly transportovány atmosférou na dlouhé vzdálenosti [21]. Existují dvě hypotézy, jak se tyto látky dostávají do vzdálených oblastí. První z nich je přímý přenos, kdy jsou do vzdálených oblastí PFOA a PFOS přinášeny oceánskými proudy. Tuto hypotézu podporuje fakt, že PFOS a PFOA jsou detekovány v povrchové vodě, řekách a v oceánu [16]. Jelikož byly i kratší perfluorované kyseliny a sulfonáty naměřeny v ústích řek, předpokládá se, že mohou i tyto PFC přecházet do mořského ekosystému a oceánskými proudy být přenášeny na dlouhé vzdálenosti. Ředění a adsorpce na různé částice hmoty jsou zodpovědné za pokles koncentrace těchto látek v průběhu přenosu [43].

Druhou alternativou je hypotéza, která předpokládá, že jsou do vzdálených oblastí atmosférou přenášeny těkavější prekurzory těchto látek, např. fluorotelomerní alkoholy, perfluoralkylsulfonamidy a jiné. Perzistentní produkty degradace prekurzorů jsou poté deponovány. Fluorotelomerní alkoholy a perfluoralkylsulfonamidy pomalu reagují s hydroxylovými radikály, proto jsou jejich poločasy života v atmosféře 10 – 20 dnů a 20 – 50 dnů [44]. Jsou tedy schopny přenosu i na dlouhé vzdálenosti. Vzhledem k tomu, že byly PFOS a PFOA detekovány i ve vzorcích sněhu pocházejících ze vzdálených částí Arktidy, kde je kontaminace možná pouze z atmosféry, zdá se být nepřímý přenos prekurzorů atmosférou důležitým

transportním mechanismem [21]. Existuje také hypotéza, že PFOA je přenášena atmosférou ve formě mořského aerosolu [16].



Obr. 2.1 Cirkulace PFC v životním prostředí; přepracováno z [23] (FOSAA = perfluoroktansulfonamidoctová kyselina, 6:2 FTS = 6:2 fluorotelomerní sulfonát, PFCA = perfluorkarboxyláty, PFSA = perfluorované sulfonáty, PFOA = perfluoroktanová kyselina, PFOS = perfluoroktansulfonát, FTOH = fluorotelomerní alkoholy, FOSA = perfluorované sulfonamidy, FOSE = perfluorované sulfonamidoethanoly)

PFC jsou perzistentní a bioakumulativní v mnoha potravních řetězcích, přičemž predátoři akumulují hlavně karboxylové kyseliny s dlouhými uhlíkatými řetězci [45]. Nejvyšší akumulace PFC je v organismech na vrcholu potravního řetězce. Příkladem mohou být ryby [17].

FTOH patří do třídy látek majících potenciál ke znečištění životního prostředí látkami jako jsou PFOA a PFNA. FTOH se používají jako prekurzory ve výrobě fluorovaných polymerů [22].

Specifickou vlastností FTOH je jejich značná těkavost a snadný přenos atmosférou na dlouhé vzdálenosti. FTOH mohou kontaminovat povrchovou vodu tím, že se vysráží z ovzduší jako mokrá depozice nebo tím, že se rozloží polymerní látky, v nichž byly zabudovány fluorotelomerní alkoholy během výroby. Proto jsou považovány za environmentální kontaminanty [46].

FTOH jsou ve vysoké míře produkovány jako meziprodukty v syntéze jiných průmyslově využívaných látek, např. barev, polymerů a látek odpuzujících olej a vodu používaných na ochranu textilu, koberců a papírů. Celková světová produkce FTOH byla v roce 2004 odhadnuta na 11 - 14 milionů kilogramů za rok. Nejčastěji detekovanou látkou ve vzduchu byl 8:2 FTOH (medián 241 pg/m³). Koncentrace FTOH ve vzduchu je vyšší v Japonsku než v severozápadní Evropě a Severní Americe [47].

PFOS a PFOA jsou považovány za konečné produkty degradace. Jsou nejčastěji detekovány v životním prostředí a biologických vzorcích a často jsou přítomny v nejvyšších koncentracích [17].

Podle mnoha studií je největší množství perfluorkarboxylátů odplavováno do oceánu. Jako největší zdroj PFC pro vodní prostředí uvádějí některé studie čističky odpadních vod, jiné průmysl zpracující PFC či jiné továrny [48].

PFC mohou být celosvětově přenášeny pomocí termohalinního výměníku. Voda je hlavním médiem důležitým pro přenos těchto látek. Výskyt PFC v otevřeném oceánu se pohybuje mezi desítkami a stovkami pg/l. Řeky jsou důležitou cestou pro přenos znečišťujících látek z pevniny do oceánu. Hladina PFC v řekách je v řádech tisíců ng/l [38].

2.7 Časové trendy znečištění PFC

Sediment může sloužit jako prostředek pro zjištění časových trendů znečištění. Koncentrace PFOS v sedimentu odebraném v Tokijském zálivu postupně klesala od začátku 90. let, jeho prekurzory klesaly rapidně na konci 90. let, zatímco koncentrace PFOA v té době prudce stoupla. Tento trend je důsledkem přechodu od produkce perfluoroktylsulfonylfluoridů k telomerním látkám po té, co byly perfluoroktylsulfonylfluoridy stáhnuty z výroby v roce 2001 [49].

Firma 3M, největší producent perfluoroktylsulfonylfluoridů, které degradují na PFOS, ukončila výrobu těchto látek během let 2000 a 2002. Firma DuPont, producent PFOA, přislíbila do roku 2007 omezení emisí PFC o více než 85 % oproti roku 1999 [49].

Poločasy života PFOS a PFOSA jsou $16,9 \pm 2,5$ dne a $6,0 \pm 0,4$ dne. Pro PFOS byl stanoven biomagnifikační faktor na 0,08 pro PFOSA na 0,023 [8].

Testy vzorků lidských krevních sér v Japonsku ukázaly, že koncentrace PFOA během let 1983 a 1999 vzrostla 3,5 krát, zatímco koncentrace PFOS zůstala nezměněná. PFOS a PFOA byly měřeny v norských krevních vzorcích od roku 1977 do roku 2007. Z těchto měření vyplývá, že koncentrace obou látek rostly do poloviny 90. let a poté zřetelně klesaly [49].

Při měření koncentrací PFOS a PFOA ve vejcích alkouna úzkozobého (*Uria aalge*) v letech 1968 až 2003 byl pozorován vzrůst koncentrace PFOS padesátkrát od roku 1968 do roku 1998, poté koncentrace klesaly, zatímco koncentrace PFOA zůstala ve všech vzorcích vajec pod limitem detekce [49].

Koncentrace některých PFC byla vyšší během 50. a 60. let, což je nejspíš způsobeno vyšším obsahem organické složky v sedimentu. Rozdělovací koeficient mezi sediment a vodu roste s rostoucím obsahem organického uhlíku v sedimentu [49].

2.8 Toxikodynamika PFC

Mezi důležité toxické účinky perfluorovaných kyselin patří změny v metabolismu lipidů a snížení tělesné hmotnosti. Dále byl pozorován zvýšený výskyt buněk v sub-G0/G1 fázi a zároveň snížený výskyt buněk v S- a G2/M fázi. Perfluorodekanová kyselina (PFDA) tedy způsobuje buď „uvěznění“ buňky v G0/G1 fázi buněčného cyklu nebo indukuje smrt buněk především v S- a G2/M fázi [15].

Expozice buněk perfluorodekanové kyselině způsobuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), přičemž množství vzniklých ROS je úměrné délce expozice. Dále způsobuje otevírání mitochondriálních pórů, uvolňování cytochromu c, aktivaci kaspáz a spotřebovávání intracelulárního ATP, což vede k programované buněčné smrti - apoptóze. Z výsledků studie vyplývá, že mitochondrie hrají klíčovou roli v apoptóze vyvolané působením perfluorovaných látek, a to uvolňováním apoptotických signálů skrz póry v mitochondriální membráně [15].

Při stejném pokusu s dekanovou kyselinou nebylo pozorováno ani špatné fungování mitochondrií ani poruchy buněčného cyklu [15].

Perfluorované kyseliny způsobují zvýšenou proliferaci peroxizomů, což může vést k hepatomegalii a nadměrnému množení jaterních buněk (proliferaci hepatocytů). To, jak proliferace peroxizomů souvisí s karcinogenezí, není zcela jasné, ale předpokládá se, že proliferace peroxizomů vede k nadprodukcí peroxidu vodíku vlivem specifické indukce peroxizomální β -oxidace mastných kyselin, což může vést k oxidativnímu poškození DNA [15].

PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) patří do skupiny jaderných receptorů, které hrají důležitou roli ve změnách metabolismu během období se sníženým příjmem kalorií. PFC tyto receptory

aktivují, proto jsou označovány za proliferátory peroxizomů. PPAR α regulují mnoho částí energetického metabolismu, velký vliv mají na metabolismus lipidů, zvyšují expresi jaterních genů spojených s peroxizomální i mitochondriální β -oxidací [50].

Změny na plicích plodů exponovaných PFOS také souvisely s indukcí genů spojených s metabolismem mastných kyselin. Ovlivněna byla také biosyntéza cholesterolu, žlučových kyselin a metabolismus glukózy a glykogenu v játrech (zvýšena glukoneogeneze) [50].

Amfifilní charakter dává PFC schopnost měnit membránový potenciál buněk a/nebo způsobovat změny pH cytosolu. Tyto kyseliny mění propustnost plazmatické membrány pro protony. Změny pH cytosolu a potenciálu na plazmatické membráně jsou rozhodující v buněčné odpovědi na různé podněty, včetně těch, které rozhodují o tom, zda bude buňka dál žít nebo odumře. Změny v molekulární struktuře membrány a v pH cytosolu mohou ovlivňovat funkce buňky. Změny ve složení membrány a uspořádání jejích molekul jsou zásadní pro změnu fluidity membrány. Ta je pozorována u mnoha lidských onemocnění. Změny pH dále způsobují ionizaci aminokyselinových zbytků proteinů. I malá odchylka od fyziologického pH může změnit intracelulární enzym v neaktivní nebo zničit protein úplně [51].

Při pokusech na zvířatech byla zjištěna vývojová, reprodukční a systémová toxicita. Subchronická expozice vedla k poklesu tělesné hmotnosti a zvětšení jater doprovázeným hepatotoxicitou. PFC způsobují zvýšenou frekvenci některých reakcí řízených cytochromem P450, inhibují sekreci triglyceridů a cholesterolu z jater. Expozice samčích potkanů PFOS má negativní vliv na produkci spermatu a jejich dospívání. Expozice samičích ryb způsobila histopatologické léze především na vaječnicích. Byla pozorována pozměněná hladina androgenů i estrogenů u ryb exponovaných PFOS a PFOA [9].

PFOS, PFOA a některé další PFC mohou narušovat vazebnou afinitu a kapacitu jaterního proteinu vázajícího se na mastné kyseliny. PFOS má největší schopnost kompetitivně inhibovat vazbu endogenních mastných kyselin na tento protein. Hladina tohoto proteinu koreluje s rychlostí peroxizomální β -oxidace [52].

2.8.1 Ryby

FTOH vykazují estrogenní aktivitu. 6:2 FTOH zvyšuje hladinu estradiolu a testosteronu v plazmě u obou pohlaví. Poměr testosteronu ku estradiolu je zvýšen u samců, zatímco u samic je snížen. Tento poměr je využíván jako citlivý biomarker pohlavních abnormalit u ryb. Expozice ryby 6:2 FTOH v raném stádiu vývoje narušuje pohlavní diferenciaci, vývoj gonád, gametogenezi a reprodukci. Mechanismus, jakým 6:2 FTOH indukuje estradiol, však zůstává neznámý [46].

Testy na hepatocytech tilápie potvrdily estrogenní aktivitu FTOH, mechanismus může být zprostředkován estrogenními receptory (ER). Expozice sladkovodní ryby medaky japonské (*Oryzias latipes*) FTOH způsobila zvýšení transkripce vitellogeninu u obou pohlaví, zvýšení hladiny estradiolu, aktivaci jaterních estrogenních receptorů α u samic a zvýšení hladiny testosteronu u samců. Toto zvýšení souvisí se zvýšeným množstvím cytochromu P450 c17 α -hydroxylasy, 17, 20-lasy (CYP17) a sníženým množstvím cytochromu P450 aromatasy A ve varlatech [46].

Vazba látek s estrogenní aktivitou na ER způsobuje indukci exprese genu pro vitellogenin. Vitellogenin je citlivý a často používaný biomarker rozvratu hladin estrogenních hormonů. Jde o protein běžně produkovaný jenom samicemi, pokud je tedy zaznamenán u samců, ukazuje na přítomnost látek s endokrinním působením. FTOH tedy rozvrací hladinu pohlavních hormonů, mění normální transkripci genů v játrech a hypothalamo-

-hypofyzárním-pohlavním komplexu, což narušuje rozmnožování ryb [46].

Některé studie tvrdí, že estradiol a látky narušující hormonální rovnováhu mají neblahý vliv na vývoj varlat, produkci testosteronu a spermatogenezi. Dále vyvolávají pozitivní i negativní zpětnou vazbu na úroveň hypotalamu a hypofýzy a hrají klíčovou roli v neuroendokrinním řízení reprodukce a v pohlavním chování ryb [46].

Při expozici samců medaky japonské (*Oryzias latipes*) 6:2 a 8:2 FTOH byl prokázán vliv na ER α závisící na dávce, zatímco nebyl pozorován žádný vztah mezi ER α a dávkou PFOS, PFOA, PFNA, PFDA či PFUnDA [22].

Embrya sladkovodní ryby dánia pruhovaného (*Danio rerio*) exponované jednorázově PFOS měly vývojové vady jako je ohnutá páteř, nenafouknutý plovací měchýř, zpomalený tep srdce a narušenou schopnost pohybu. Stálá expozice PFOS způsobovala léze ve svalových vláknech [53].

6:2 a 8:2 FTOH mají větší vliv na indukci jaterního vitellogeninu v samcích medaky než Bisfenol A, který je známou estrogení sloučeninou. Studie na jelečcích velkohlavých (*Pimephales promelas*) a medace japonské prokázaly jejich sníženou plodnost. Dále bylo prokázáno, že nadměrná indukce vitellogeninu způsobuje patologické abnormality jako zvětšení jaterních buněk nebo zvýšený HSI (hepatosomatic index = hmotnost jater/celková tělesná hmotnost) [22].

2.8.2 Ptáci

Některé PFC byly naměřeny i ve vzorcích divokých ptáků, přičemž například PFOS vykazuje vysokou toxicitu pro ptáky. Způsobuje značnou redukci tělesné hmotnosti a zvýšený výskyt zmenšených varlat u samců některých druhů ptáků. Dalšími negativními účinky, pozorovanými po intravenózní aplikaci PFOS v množství blízkém nalezeným hodnotám ve vejcích divokých ptáků, jsou zvýšená úmrtnost, snížená úspěšnost líhnutí a

jaterní histopatologické změny. Čtyřtýdenní expozice kuřat PFOS a PFOA ovlivnila expresi genů v játrech související s transportem kyslíku a elektronů a s metabolismem tuků a mastných kyselin. Dále bylo zjištěno, že PFOA je rychleji eliminována než PFOS. Akumulace PFOS v játrech negativně ovlivňuje hladinu cholesterolu a triglyceridů v séru divokých ptáků [45].

2.8.3 Savci

Myší novorozenci exponovaní 8:2 FTOH vykazovali vývojovou toxicitu, lidské buňky z prsního karcinomu exponované 6:2 a 8:2 FTOH vykazovaly estrogení účinky [46].

PFC způsobují sníženou hladinu sérového cholesterolu u potkanů a opic. Je zaznamenán zvýšený výskyt jaterních, pankreatických a testikulárních nádorů. PFC se snadno vážou na bílkoviny a jsou akumulovány v krvi, játrech, ledvinách a žlučníku [54].

PFC způsobují poškození jater a mají neblahý vliv na vývoj, reprodukci, thyroïdní a pankreatické funkce a mohou způsobovat až smrt [55].

Subchronická expozice PFOS vede k značnému úbytku na váze doprovázenému hepatotoxicitou. Byly provedeny teratologické studie na potkaních, králíčích a myších samicích exponovaných PFOS. U jejich potomků byly pozorovány vývojové vady jako je nízká váha plodu, rozštěp patra, anasarka, zpožděná osifikace kostí a abnormality srdce (defekt mezikomorové přepážky a zvětšení pravé síně). Tyto poruchy byly pozorovány až při dávkách nad 10 mg/kg. Při těchto dávkách se rodila mláďata bledá, neaktivní a skomírající (moribundní). Do 60 minut všechna zemřela. Skupina narozená samicím exponovaným 5 mg/kg byla také skomírající, ale žila déle (8 - 12 hodin). 95 % těchto mláďat nepřežilo první den života. Jen několik se jich dožilo puberty. Přežití bylo úspěšnější u nižších expozičních koncentrací PFOS. Po přežití prvního týdne od narození byla

mortalita mláďat shodná s mortalitou kontrolní skupiny. Dále byla u exponovaných mláďat pozorována také hypothyroxinémie [13].

Patofyziologie úmrtí způsobených PFOS není dosud známa. Jednou z možností je, že orgánové soustavy vyvíjející se v pozdních fázích gravidity jsou terčem účinku PFOS. Jeho orgánová toxicita je neslučitelná s přežitím po porodu, vývojem plic a pulmonárními funkcemi. Dalšími možnostmi jsou narušení bioenergetiky mitochondrií, znemožnění mezibuněčné komunikace pomocí vodivého spoje (gap junction), interakce s proteiny vázajícími se na mastné kyseliny, hepatotoxicita či narušení hospodaření s thyroïdními hormony mezi matkou a plodem [13].

PFOS zvyšuje hladinu jaterních triglyceridů a cholesterolu, snižuje sérový cholesterol, způsobuje hypolipidémii a snižuje chuť k jídlu u makaka jávského (*Macaca fascicularis*). Dále vykazuje vývojovou toxicitu, hepatotoxicitu, imunotoxicitu a neurotoxicitu u savců (potkani, myši) a u ryb (dánia, jelečci). Tyto negativní vlivy souvisí s metabolismem a přenosem mastných kyselin, integritou buněčné membrány, funkcí mitochondrií, aktivitou jaterní glutathionperoxidázy a superoxiddizmutázy a se snížením hladiny thyroïdních hormonů [53].

Cytotoxicita perfluorovaných kyselin s délkou uhlíkového řetězce 7 až 10 uhlíků může být způsobena inhibicí mezibuněčné komunikace přes vodivé spoje. Tato komunikace je stěžejní pro správný růst a funkci buňky a pro udržování homeostáze. Velikost inhibičního účinku určuje délka řetězce, nikoliv funkční skupina. Dalším negativním účinkem těchto kyselin je inhibice acetylcholinesterázy. Dochází k ní však pouze při velmi vysokých dávkách. Nervový systém tedy není příliš citlivý na perfluorované kyseliny [9]. Byl prokázán statisticky významný vztah mezi expozicí PFOS a rakovinou močového měchýře [56].

Přípravky obsahující perfluorované kyseliny způsobují oxidační stres. Velký nárůst reaktivních forem kyslíku v buňce byl pozorován po expozici lidských jaterních buněk PFOA. Pozorován byl také nárůst antioxidantních enzymů jako je kataláza a superoxiddizmutáza. Následkem oxidačního stresu zvířat po expozici perfluorovaným kyselinám byla peroxidace lipidů a poškození DNA [9].

PFOA vykazuje vývojovou toxicitu u myší. Způsobuje potrat, zvýšenou úmrtnost novorozeňat, opožděné otevírání očí a abnormální růst prsních žláz zvířat exponovaných PFOA během jejich embryonálního vývoje. Při vyšších dávkách PFOA prenatálně a následně dlouhodobé expozici v dospělosti je pozorován zvýšený výskyt nádorů různých druhů – adenom Leydigových buněk, adenom pankreatu, fibroadenom prsu a jaterní tumory [57].

Ačkoli nebyly pozorovány změny v hmotnosti myších novorozenců exponovaných PFOA, expozice nízkým dávkám PFOA vedly k zvýšené průměrné hmotnosti a rychlosti nabývání na váze v dospívání a s tím spojenou zvýšenou hladinou leptinu a inzulinu v krevním séru. Existuje skupina látek tzv. environmentálních obezogenů (patří sem i PFOA), které při nízkých dávkách při vývinu způsobují obezitu v dospělosti, zatímco při vysokých dávkách způsobují úbytek na váze [57].

Je velmi obtížné u lidí posoudit, zda mají PFC vliv na váhu novorozence. Porodní váha je totiž ovlivněna velkým množstvím jiných faktorů jako jsou pohlaví dítěte, věk, národnost, socioekonomické postavení matky, BMI matky před těhotenstvím, vliv kouření a konzumace alkoholu před těhotenstvím, věk otce a vzdělání [58].

2.8.4 Domáci zvířata

Při analýzách krve a jaterní tkáně domácích zvířat v Japonsku byl PFOS nejvýznačnější kontaminant. Ve srovnání s ním byla koncentrace ostatních PFC řádově nižší. Nejvyšší průměrná koncentrace PFOS v séru u hospodářských zvířat byla detekována u kuřat (5,8 ng/ml), dále průměrné koncentrace klesaly v tomto pořadí: skot > koza > kůň. Nejnižší průměrná koncentrace byla naměřena u prasat (0,37 ng/ml). Při měření koncentrace v jaterní tkáni byla nejvyšší průměrná koncentrace opět u kuřat (67 ng/g), následovala prasata (54 ng/g) a hovězí dobytek (34 ng/g). Vysoké koncentrace PFOS v játrech plodu skotu ukazují na to, že PFOS prochází placentou a přechází do oběhu plodu [55].

Konzumace kuřat může být jednou z možných cest expozice PFOS pro lidi. V kuřatech je ve srovnání s prasaty vyšší bioakumulace i jiných organohalogenidů, jako jsou dioxiny, furany a polychlorované bifenyly. Konzumace hospodářských zvířat a výrobků z nich může být potenciální zdroj PFC pro lidi. Hospodářská zvířata jsou exponovaná PFC nejspíš skrze proteinové koncentráty, kterými jsou krmena. Tyto koncentráty jsou vyráběny z živočišných produktů jako je maso, kosti, ryby, ptáci. Hlavně v rybách má PFOS vysokou bioakumulační schopnost. Jeho schopnost bioakumulace je vyšší než některých chlorovaných aromatických uhlovodíků [55].

Úplně nejvyšší koncentrace PFOS v séru byla naměřena u psa - 57 ng/ml. Takto vysoká koncentrace je nejspíš způsobena konzumací potravy obsahující ryby. U psů žijících v bytech může být zvýšená koncentrace způsobena používáním různých čisticích prostředků na koberce a leštidel na podlahy [55].

2.9 Toxikokinetika PFC

Perfluorkarboxyláty a -sulfonáty s délkou uhlíkového řetězce větší než 6 vykazují rostoucí biokoncentrační faktor s rostoucí délkou uhlíkového řetězce [8].

Studie dokázaly, že fluorotelomerní alkoholy mohou být potkany a myši metabolizovány na perfluorkarboxyláty. Stejně výsledky byly pozorovány i u pstruha duhového. Dále bylo zjištěno, že mikrozomy pstruha duhového mění molekuly látek jako N-methyl- a N-ethylperfluoroktan-sulfonamidoetanol na PFOSA a nakonec na stabilní produkt PFOS. Neutrální prekurzory jsou tedy rybami rychle metabolizovány, ale produkty těchto reakcí jsou látky vysoce bioakumulativní [8].

Vztah mezi toxicitou a délkou perfluorovaného uhlíkového řetězce byl často zkoumán. Nejnižší toxicita byla naměřena pro perfluorhexanovou kyselinu a nejvyšší pro kyselinu perfluordekanovou. Perfluorované kyseliny s kratším uhlíkovým řetězcem jsou navíc rychleji vylučovány močí, tudíž je jejich koncentrace v séru a játrech nižší. Kyseliny s delšími uhlíkovými řetězci jsou tedy nejen pomaleji vylučovány, ale jsou také toxičtější [59].

Každý perfluormethylen v alkylovém řetězci navíc zvyšuje toxicitu na dvojnásobek. Log EC₅₀ koreluje s počtem uhlíkových atomů v perfluralkylovém řetězci a s rozdělovacím koeficientem. Log EC₅₀ je nepřímo úměrný lipofilitě, která může být popsána délkou řetězce nebo rozdělovacím koeficientem. Rychlost eliminace perfluorovaných kyselin závisí na délce alkylového řetězce. Rychleji jsou eliminovány kyseliny s kratším řetězcem. Perfluorsulfonáty a amoniové soli perfluorovaných kyselin jsou méně toxické než kyseliny samotné [11].

PFOA je snadno absorbována při orálním a inhalačním podání a obtížně vstřebána při podání dermálním. Po absorpci je PFOA distribuována

do plazmy a jater. Fluorované organické látky jsou z lidského těla velmi pomalu eliminovány. Průměrný biologický poločas PFOA v lidském séru je mezi 1,5 a 13 lety. Tato pomalá eliminace je nejspíš způsobena vazbou na jaterní a sérové proteiny [9].

Prvním krokem metabolismu FTOH u savců je konjugace (O-glukuronidace či O-sulfatace), po které následuje oxidace. Produktem jsou polyfluorované kyseliny, aldehydy a jejich analoga proměnlivé nasycenosti a konjugáty s nimi. Následuje konjugace s glutathionem [60]. Při testech na potkanech a myších byla zjištěna rychlá eliminace 8:2 FTOH po orálním podání. Koncentrace 8:2 FTOH v plazmě byla velmi nestálá, okamžitě po podání začala klesat. Jako přechodný metabolit se vyskytovala 8:2 fluorotelomerní kyselina. Biologický poločas této kyseliny byl u obou pohlaví méně než 1 hodina. Metabolity byly stejné při podání inhalačním i orálním. Perfluorkarboxyláty (např. PFOA) byly minoritní metabolity 8:2 FTOH. Při orálním i při inhalačním podání byly absorpce a clearance stejně rychlé. Potenciál 8:2 FTOH způsobit toxické účinky při inhalační expozici okolnímu vzduchu je malý [61].

Měřením do moči vyloučené části dávky PFOA a PFNA, podané potkanům intraperitoneálně, bylo zjištěno, že samice za 120 hodin vyloučily 80 % PFOA a 51 % PFNA, na rozdíl od samců, kteří vyloučili mnohem menší část. Perfluorované kyseliny s delším uhlíkovým řetězcem byly u obou pohlaví pomaleji eliminovány do moči. Po kastraci potkaních samců byly rozdíly v různě rychlé eliminaci mezi pohlavími setřeny. Naopak, když byla podána PFOA s testosteronem, jak u kastrováných samců, tak u samic, byla eliminace PFOA do moči zpomalena. Perfluorkarboxyláty jsou tedy různě vylučovány podle délky jejich uhlíkového řetězce renálním exkretčním systémem, který je regulován testosteronem [59]. Bylo prokázáno, že kastrace samců potkanů způsobuje zřetelný vzrůst rychlosti clearance PFOA oproti nekastrovaným jedincům. Stejnou roli kastrace můžeme očekávat i u dobytka [55].

Nebyly nalezeny rozdíly v eliminaci výkaly mezi pohlavími. Jen 2-5 % dávky PFCA bylo vyloučeno během 120 hodin výkaly. Výkaly byly vylučovány spíše PFCA s delším řetězcem [59].

PFOS a PFOA byly pozorovány v krvi zaměstnanců ve výslužbě ve fluorochemickém průmyslu, přičemž poločas eliminace byl několik let. PFOS je snadno absorbován a distribuován do séra a jater (nejčastěji přes enterohepatální cyklus), ale je obtížně vylučován. Biologický poločas PFOS u potkaních samců byl větší než 90 dní a u makaka jávského (*Macaca fascicularis*) byl asi 150 dní. PFOA je také snadno absorbována, u vylučování jsou zaznamenány značné mezidruhové rozdíly. Největší rozdíl v biologických poločasech PFOA mezi pohlavími byl zaznamenán u potkanů. 1,9 - 24 hod u samic a 4,4 - 9 dní u samců. Tyto rozdíly jsou nejspíš způsobeny řízením steroidními hormony. Hormonální změny během těhotenství však rychlost vylučování PFOA nemění. Žádné významné rozdíly v eliminaci mezi pohlavími nebyly pozorovány u primátů ani u lidí [13].

PFC jsou přítomny v lidské krvi běžné populace v hodnotách ppb, u lidí pracujících s těmito látkami nebo jinak vysoce exponovaných lidí jsou hodnoty v řádech ppm [62].

Některé studie uvádějí, že neexistuje vztah mezi koncentrací PFC v lidském séru a věkem, jiné uvádějí, že koncentrace PFC je u starších lidí vyšší než u mladších. Stejně tak se neshodují různé studie v tom, jestli má na koncentraci PFC v krvi vliv pohlaví. Některé studie uvádějí, že vyšší hladinu PFC mají muži než ženy [54].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Analyzované látky

Perfluorpentanová kyselina, $C_5HF_9O_2$, PFPeA, M_r 264,05, čistota 97 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 2706-90-3

Perfluorhexanová kyselina, $C_6HF_{11}O_2$, PFHxA, M_r 314,06, čistota >97 %, výrobce Fluka, CAS 307-24-4

Perfluorheptanová kyselina, $C_7HF_{13}O_2$, PFHpA, M_r 364,06, čistota 99 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 375-85-9

Perfluoroktanová kyselina, $C_8HF_{15}O_2$, PFOA, M_r 414,06, čistota 96 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 335-67-1

Perfluornonanová kyselina, $C_9HF_{17}O_2$, PFNA, M_r 464,08, čistota 97 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 375-95-1

Perfluordekanová kyselina, $C_{10}HF_{19}O_2$, PFDA, M_r 514,08, čistota 98 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 335-76-2

Perfluorundekanová kyselina, $C_{11}HF_{21}O_2$, PFUnDA, M_r 564,10, čistota 95 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 2058-94-8

Perfluortridekanová kyselina, $C_{13}HF_{25}O_2$, PFTriDA, M_r 664,11, čistota 97 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 72629-94-8

Perfluortetradekanová kyselina, $C_{14}HF_{27}O_2$, PFTeDA, M_r 714,12, čistota 97 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 376-06-7

3.1.2 Ostatní chemikálie

Oktan-1-ol, $C_8H_{18}O$, M_r 130,23, čistota $\geq 99,5$ %, výrobce Fluka, CAS 111-87-5

Methanol, CH_4O , M_r 32,04, čistota $\geq 99,9$ %, výrobce Sigma-Aldrich, čistota $\geq 99,8\%$ - výrobce Merck, CAS 67-56-1

Deionizovaná voda, ČL 1997 ČSN ISO 3696 typ 2, odběr s mikrofiltrem 0,2 μm , vodivost $\leq 0,1 \mu S/cm$, GORO

Propan-2-ol, C_3H_8O , M_r 60,1, čistota $\geq 99,9$ %, výrobce Merck, CAS 67-63-0
Octan amonný, $C_2H_7NO_2$, M_r 77,08, čistota 99,999 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 631-61-8
Kyselina octová, $C_2H_4O_2$, M_r 60,05, čistota $\geq 99,99$ %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 64-19-7
Anilín, $C_6H_5NH_2$, M_r 93,13, čistota 99 %, výrobce Lancaster, CAS 62-53-3
3-nitroanilín, $C_6H_6N_2O_2$, M_r 138,14, čistota 98 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 99-09-2
2-nitroanisol, $C_7H_7NO_3$, M_r 153,14, čistota >99 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 91-23-6
2-chlorfenol, C_6H_5ClO , M_r 128,56, čistota 98 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 95-57-8
2,3-dichlorfenol, $C_6H_4Cl_2O$, M_r 163,00, čistota 99,9 %, výrobce Riedel-de Haën, CAS 576-24-9
2,4,6-trichlorfenol, $C_6H_3Cl_3O$, M_r 197,45, čistota 98 %, výrobce Sigma-Aldrich, CAS 88-06-2
Chlorpyrifos, $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, M_r 350,59, čistota 99,8 %, výrobce Riedel-de Haën, CAS 2921-88-2

3.2 Přístroje a vybavení

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf, detektor - hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem, HPLC-MS/MS, G6490A, Agilent Technologies, USA
Monolitická HPLC kolona, Chromolith Performance RP-18e 100-2 mm, Merck, Německo

Monolitická předkolona, Chromolith RP-18e 5-2 mm, Merck, Německo

Zkušební kolona, Zorbax SB C 18 3x50 mm, Agilent Technologies, USA

Centrifuga, EBA 21, Hettich, Německo

Vortex, TK3S, Kartell, Austrálie

Třepačka, Vortex Genius 3, IKA, Německo

Vývěva, N86KT.18, KNF Neuberger, Německo

Analytické váhy, AB265-S/Fact, Mettler-Toledo, Německo

Mikrostríkačka, 500 μ l, Agilent Technologies, Austrálie

Pipety: Nichipet EX (5000 – 1000 μ l), Nichiryo, Japonsko

Model 5000 (1000 – 100 μ l), Nichiryo, Japonsko

Model 5000 (200 – 40 μ l), Nichiryo, Japonsko

Pipetman (100 – 10 μ l), Gilson, Francie

Nichipet EX (20 – 2 μ l), Nichiryo, Japonsko

3.3 Metoda třepací lahve

Tato metoda je založena na Nernstově rozdělovacím zákoně, kdy se čistá látka rozpouští mezi dvě nemísitelná rozpouštědla. Všechny látky i rozpouštědla musí být použity v nejvyšší možné čistotě, aby případné nečistoty neovlivnily rozdělovací poměr látky. Koncentrace měřené látky nesmí přesáhnout 0,01 mol/l v žádné z fází. Metoda je používána pro měření látek, jejichž hodnoty dekadického logaritmu rozdělovacích koeficientů se předpokládají v rozmezí od -2 do 4. Před samotným měřením by tedy měla být určena předpokládaná hodnota výpočtem pomocí softwaru. Tato metoda není vhodná pro povrchově aktivní látky. Pokud jsou měřenými látkami slabé kyseliny nebo báze, musí být měřeny v jejich neionizované formě, čehož by mělo být dosaženo použitím vhodného pufru [63]. V případě měření látek ovlivňujících životní prostředí je vhodnější použít metodu, při které pH odpovídá právě tomu v přírodě [64].

3.3.1 Pracovní postup

3.3.1.1 Příprava látek

Před měřením samotných perfluorovaných kyselin byly měřeny rozdělovací koeficienty anilínu, 3- a 4-chloranilínů. Použita byla metoda třepací lahve. Koncentrace v jednotlivých fázích byla měřena pomocí HPLC s UV detekcí. Kolona byla stejná jako při měření perfluorovaných kyselin a mobilní fázi byl 50% roztok methanolu ve vodě. Výsledné hodnoty se mírně odlišovaly od publikovaných, což bylo nejspíše způsobeno malým počtem opakování, chybami v manuální integraci naměřených píků či chybami při přípravě roztoků. Rozdíly však nejsou příliš velké, a proto lze předpokládat, že zvolený postup měření je správný.

Tab. 3.1 Hodnoty log rozdělovacích koeficientů naměřených metodou třepací lahve a hodnoty považované za nejbližší skutečné hodnotě [65].

Látka	Naměřený log K_{ow}	Správná hodnota log K_{ow}
Anilín	0,75	0,90
3-chloranilín	2,04	1,88
4-chloranilín	1,91	1,83

Nejprve byly odměřením příslušných objemů PFPeA a PFHxA a navážením příslušných množství PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFTriDA a PFTeDA připraveny roztoky jednotlivých látek o koncentraci 8 mmol/l. Jako rozpouštědlo byl použit oktanol. Takto připravené roztoky byly zředěny na koncentraci 3 mmol/l oktanolem. Z každého roztoku o koncentraci 3 mmol/l bylo odebráno 14 μ l roztoku a doplněno do 10 ml

methanolem. Tak byly připraveny roztoky o koncentraci 4,2 $\mu\text{mol/l}$. Stejným způsobem byl připraven i směsný roztok všech devíti kyselin. Tento směsný roztok byl následně zředěn methanolem, čímž byl připraven 0,084 μM roztok. Tyto roztoky byly použity pro detekci látek hmotnostním spektrometrem, nalezení molekulárních iontů, iontových přechodů, optimálních kolizních energií a pro optimalizaci metody.

Dále byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 4,20; 3,15; 2,10; 1,68; 1,05; 0,42; 0,21; 0,11; 0,063; 0,021; 0,0084 $\mu\text{mol/l}$. Všechny kalibrační roztoky byly ředěny methanolem.

Byly připraveny vzorky jednotlivých kyselin. Vzorky PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA a PFNA byly připraveny z 0,005M vodných roztoků smícháním 2 ml tohoto vodného roztoku s 2 ml oktanolu. Vzorky PFDA, PFUnDA, PFTriDA a PFTeDA byly připraveny z 0,001M oktanolových roztoků. Ke 2 ml těchto roztoků bylo přidáno po 2 ml vody. Takto připravenými směsmi bylo několik hodin intenzivně třepáno. Před odebráním jednotlivých fází byly tyto vzorky odstředovány při 4000 RPM po dobu 10 minut.

Horní oktanolová i spodní vodná fáze byly odebrány injekční stříkačkou, přičemž, aby nedošlo ke kontaminaci vodné fáze oktanolovou, před ponořením jehly do roztoku bylo nabráno malé množství vzduchu, který byl při průchodu oktanolovou fází pozvolna vypouštěn. Vzorky oktanolových fází všech kyselin byly zředěny 2400krát methanolem.

Vzorek vodné fáze PFPeA byl zředěn methanolem 2000krát, PFHxA, PFHpA, PFOA a PFNA 1000krát, PFDA, PFUnDA 100krát a vzorky PFTriDA a PFTeDA ředěny nebyly.

Byly připraveny roztoky pro určení meze detekce a stanovitelnosti o koncentracích 4,2; 2,1; 1,1; 0,21; 0,11; 0,021 a 0,011 nmol/l .

Dále byly připraveny mobilní fáze. 2mM roztok octanu amonného, 2mM roztok octanu amonného okyselený kyselinou octovou na 1% roztok, isopropanol, 1% roztok kyseliny octové v isopropanolu, methanol a voda.

Každý roztok byl před použitím zfiltrován za pomoci vývěvy. Velikost pórů filtru byla 0,45 μm .

3.3.1.2 *Postup měření*

Na zkušební náplňové koloně probíhala optimalizace měření. Podle článku [66] byl jako mobilní fáze zvolen 2mM vodný roztok octanu amonného a methanol. Poměr methanolu a 2mM octanu amonného byl 70:30. Methanolvé roztoky jednotlivých látek o koncentraci 4,2 $\mu\text{mol/l}$ byly měřeny ve skenovacím módu jako Full Scan MS2, aby byly zjištěny molekulární ionty a jestli bude měření probíhat jako ESI+ nebo ESI-. Další měření již probíhala se směsným roztokem všech devíti kyselin o koncentraci 0,084 $\mu\text{mol/l}$. Byl proveden scan výsledných iontů (Product Ion Scan), čímž byly zjištěny iontové přechody jednotlivých látek. Při měření MRM (Multiple Reaction Monitoring) byly zjištěny ideální kolizní energie pro jednotlivé přechody.

Další měření již probíhala na měřicí monolitické koloně. Byl měřen směsný methanolvý roztok všech měřených kyselin o koncentraci 0,084 $\mu\text{mol/l}$, aby bylo optimalizováno složení mobilní fáze, dávkovaný objem a teplota sušícího plynu. Postupně bylo vyzkoušeno 7 různě modifikovaných gradientů mobilní fáze a průtoku.

Tab. 3.2 Optimalizace podmínek měření u metody třepací lahve. Použité modifikace gradientu mobilní fáze a průtoku.

Tab. 3.2a

Gradient 1		Gradient 2		Gradient 3	
Čas [min]	Organ. složka [%]	Čas [min]	Organ. složka [%]	Čas [min]	Organ. složka [%]
0	30	0	30	0	50
2	30	1	30	6	100
5	100	3	60	9	100
12	100	9	100	9,01	50
12,01	30	12	100	12	50
15	30	12,01	30		
		15	30		

Tab. 3.2b

Gradient 4		Gradient 5	
Čas [min]	Organ. složka [%]	Čas [min]	Organ. složka [%]
0	30	0	30
6	100	2	60
9	100	6	100
9,01	30	10	100
12	30	10,01	30
		13	30

Tab 3.2c

Gradient 6		Gradient 7		
čas [min]	organ. složka[%]	čas [min]	organ. složka[%]	průtok [ml/min]
0	30	0	30	0,2
0,5	30	2	60	0,2
2,5	60	6	100	0,2
8,5	100	8,5	100	0,2
11	100	8,51	100	0,5
11,01	30	10	100	0,5
13,5	30	10,01	30	0,2
		13	30	0,2

U Gradientu 1 byl objem injikovaného vzorku na kolonu 20 μl . Výsledné píky byly značně frontující, což značí přehlcenou kolonu. Pro další měření byl tudíž objem vzorku snížen na 5 μl . Většina měřených látek měla retenční čas v šesté minutě, aby došlo k lepší separaci, bylo v Gradientu 2 změněno složení mobilní fáze. K rozdělení látek skutečně došlo. Gradient 3 byl zvolen tak, aby byla analýza zkrácena. Výsledné píky byly ale široké a nesymetrické. U následujících gradientů měly změřené píky vždy menší plochu než u Gradientu 2. U Gradientu 7 bylo zároveň použito i gradientu průtoku, píky ve výsledném chromatogramu však nebyly symetrické. Jako nejvhodnější se tudíž jevil Gradient 2. U všech předchozích gradientů byla teplota sušícího plynu 120 °C. Byla znovu provedena analýza za použití Gradientu 2, jen teplota sušícího plynu byla zvýšena na 200 °C. Výsledné

plochy píků byly ale opět menší, než u poprvé měřeného Gradientu 2. Bylo tedy pojata podezření, že po přehlčení kolony z prvního měření nebyly látky zcela vyeluovány, a následné měření bylo zkresleno. Byl proto změřen slepý vzorek, který potvrdil, že měřené látky jsou přítomny. Látky se tedy zadržují na koloně, proto byla kolona promývána isopropanolem, dokud nebylo množství přítomných perfluorovaných kyselin zanedbatelné. Opětovným měřením za podmínek Gradientu 2 a srovnáním ploch píků u ostatních gradientů byl Gradient 5 vyhodnocen jako nejvhodnější. Po zjištění, jak obtížně jsou perfluorované kyseliny z kolony eluovány methanolem, byl jako organická složka mobilní fáze použit isopropanol. Vodný roztok 2mM octanu amonného zůstal totožný. Nastavení HPLC je zapsáno v následující tabulce.

Tab. 3.3 Nastavení HPLC-MS/MS u metody třepací lahve. Nastavení bylo stejné i v metodě RP-HPLC.

Teplota sušícího plynu	120 °C
Průtok sušícího plynu	14 l/min
Zmlžovací tlak	138 kPa
Teplota usměrňovacího plynu	400 °C
Průtok usměrňovacího plynu	11 l/min
Teplota kolony	40 °C
Napětí na kapiláře pozitivní	+3000 V
Napětí na kapiláře negativní	-3000 V
Napětí na trysce pozitivní	+1500 V
Napětí na trysce negativní	-1500 V

Při zvolené optimální metodě byly zjišťovány meze detekce a stanovitelnosti jednotlivých kyselin měřením roztoků o koncentracích 4,2; 2,1; 1,1; 0,21; 0,11; 0,021 a 0,011 nmol/l.

Za těchto podmínek byly měřeny i kalibrační roztoky a vzorky. Kalibrační roztoky byly měřeny jako směsné roztoky všech devíti kyselin. Každý roztok byl měřen dvakrát. Vodné i oktanolové fáze jednotlivých kyselin byly měřeny samostatně a třikrát.

3.4 Metoda RP-HPLC

Tato metoda je používána pro látky s hodnotou $\log K_{ow}$ v rozmezí od 0 do 6. Je žádoucí předem odhadnout $\log K_{ow}$ výpočtem, aby byly vhodně zvoleny referenční standardy.

Kolona s obrácenými fázemi je pokryta dlouhými uhlovodíkovými řetězci (C8, C18) navázanými na oxid křemičitý. Látka se při průchodu takovou kolonou rozděluje mezi mobilní fázi a uhlovodíkovou stacionární fázi. Látka je zadržována úměrně ke svému rozdělovacímu koeficientu. Hydrofilní látky jsou eluovány rychle, lipofilní pomalu. Retenční čas je popsán retenčním faktorem k :

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{rov. 3.1}$$

kde t_R je retenční čas měřené látky [min] a t_0 je mrtvý čas [min], tedy čas, který je nutný pro průchod nezadržující se látky kolonou. Není tedy nutná žádná kvantifikace, měřen je pouze retenční čas. Výsledný rozdělovací koeficient je poté vypočten ze vztahu:

$$\log K_{ow} = a + b * \log k, \quad \text{rov. 3.2}$$

kde a , b jsou parametry rovnice přímky, kterou lze získat vynesáním $\log K_{ow}$ referenčních látek, jejichž rozdělovací koeficient je znám, proti \log jejich retenčních faktorů.

Tato metoda není vhodná pro silné kyseliny a báze, komplexy kovů, látky reagující s eluentem nebo povrchově aktivní látky. Měření může probíhat pro ionizovatelné látky, pokud jsou ve své neionizované formě. Je tudíž nutné použít vhodný pufr.

K zjištění závislosti $\log K_{ow}$ na \log retenčního faktoru je třeba sestavit přímku sestávající alespoň ze šesti bodů. Rozsah hodnot $\log K_{ow}$ referenčních látek musí zahrnovat $\log K_{ow}$ měřené látky. Hodnoty rozdělovacích koeficientů referenčních látek musí pocházet ze spolehlivých zdrojů.

Typickou mobilní fází bývá směs methanolu a vody v poměru 3:1. Pokud však není methanol vhodný, je možné použít i jiné organické rozpouštědlo – v tomto případě isopropanol. Dále je doporučeno, aby byly měřené i referenční látky rozpuštěny v mobilní fázi. Podmínkou měření je provedení analýzy isokraticky [64].

3.4.1 Pracovní postup

3.4.1.1 Příprava látek

Byly připraveny roztoky látek o známé hodnotě rozdělovacího koeficientu.

Tab. 3.4 Hodnoty dekadických logaritmů rozdělovacích koeficientů standardních látek [65].

Látka	log K_{ow}
Anilín	0,90
3-nitroanilín	1,43
2-nitroanisol	1,73
2-chlorfenol	2,15
2,3-dichlorfenol	2,79
2,4,6-trichlorfenol	3,69
chlorpyrifos	4,96

Roztoky těchto látek měly koncentraci 1 mmol/l a byly rozpuštěny v methanolu. Z nich byl dalším ředěním methanolem připraven směsný roztok standardů o koncentraci 40 μ mol/l. Tyto roztoky byly použity k ladění hmotnostního spektrometru na tyto sloučeniny.

Poté byl připraven směsný roztok standardních látek a měřených kyselin. Vzhledem k různé schopnosti látek ionizovat musela být koncentrace standardů a perfluorovaných kyselin ve směsném roztoku optimalizována tak, aby byly změřené signály srovnatelné. Jako optimální byl zvolen roztok, ve kterém byla koncentrace všech perfluorovaných kyselin 0,09 mmol/l, anilínu a chlorpyrifosu 0,04 mmol/l a ostatních standardů 0,10 mmol/l. Roztoky byly zředěny mobilní fází.

Byly připraveny mobilní fáze. 2mM vodný roztok octanu amonného, isopropanol, 2mM vodný roztok octanu amonného okyselený kyselinou octovou na 1% roztok a 1% roztok kyseliny octové v isopropanolu. Všechny roztoky byly před měření zfiltrvány za pomoci vývěvy přes filtr s 0,45 μm póry.

3.4.1.2 Postup měření

Jednotlivé roztoky standardních látek byly měřeny na zkušební koloně pro jejich detekci, nalezení molekulárních iontů, iontových přechodů, optimálních kolizních energií a pro určení, jestli bude měření probíhat v ESI+ nebo ESI-.

Další měření již probíhala na monolitické koloně. Většina parametrů zůstala nastavena shodně jako při metodě třepací lahve (viz tab. 3.3). Hlavním rozdílem bylo, že měření probíhalo isokraticky. Poměr organické a vodné složky při měření byl 40:60 (isopropanol:2mM octan amonný). Při prvním měření směsi všech standardních látek i kyselin bylo zjištěno, že PFPeA má kratší retenční čas než první standardní látka - anilín. Předpokládaný log rozdělovacího koeficientu PFPeA byl ale vyšší než 0,90, který odpovídá anilínu. Nízký K_{ow} byl pravděpodobně způsoben disociací části kyselin. Proto byly obě mobilní fáze okyseleny tak, aby vznikly 1% roztoky kyseliny octové. Tím byla potlačena disociace slabých perfluorovaných kyselin. Následující měření již probíhala s okyselenými mobilními fázemi. Připravený směsný roztok perfluorovaných kyselin a standardních látek rozpuštěných v mobilní fázi byl měřen při průtoku 0,25 ml/min po dobu 13 minut za výše uvedených podmínek. Dávkovaný objem vzorku byl 5 μl . Měření bylo provedeno v tři různé dny v sadě po třech měřeních.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Metoda třepací lahve

Před samotným měřením koncentrací musely být zjištěny parametry nutné pro správnou identifikaci látek.

Tab. 4.1 Parametry perfluorovaných kyselin pro detekci hmot. spektrometrem.

Látka	M_r	Ionizace	Mateřský ion	Dceřiný ion	Kolizní energie [eV]
PFPeA	264,05	Záporná	262,8	218,8	4
		Záporná	219,0	69,0	36
PFHxA	314,06	Záporná	312,9	268,9	4
		Záporná	269,0	119,0	18
PFHpA	364,06	Záporná	363,0	318,9	6
		Záporná	319,0	118,9	16
PFOA	414,06	Záporná	412,9	368,9	6
		Záporná	368,9	169,0	16
PFNA	464,08	Záporná	463,0	419,0	6
		Záporná	419,0	219,0	14
		Záporná	419,0	169,0	16
PFDA	514,08	Záporná	512,8	468,9	8
		Záporná	468,9	218,9	16
PFUnDA	564,10	Záporná	562,9	518,9	8
		Záporná	518,9	268,9	16
PFTriDA	664,11	Záporná	662,8	618,9	10
		Záporná	618,9	218,9	22
PFTeDA	714,12	Záporná	712,8	668,8	10
		Záporná	668,8	368,9	20

Z výsledků měření kalibračních roztoků byly sestrojeny kalibrační přímky. U každé látky bylo pro sestrojení kalibrační přímky použito jen bodů odpovídajících koncentraci blízké koncentraci měřené. Kalibrační přímky nebyly lineární v celém rozsahu, tudíž by použití všech bodů výsledky značně zkreslovalo.

Pomocí těchto přímek byly určeny koncentrace látek v obou fázích vzorku a následně vypočteny rozdělovací koeficienty.

Tab. 4.2 Výsledné koncentrace perfluorovaných kyselin v jednotlivých fázích, vypočtené rozdělovací koeficienty a jejich logaritmy

Látka	Konc. měřeného roz.- oktanol [μmol/l]	Konc. neředěného roz.- oktanol [μmol/l]	Konc. měřeného roz.- voda [μmol/l]	Konc. neředěného roz.-voda [μmol/l]	K _{ow}	log K _{ow}
PFPeA	0,866	2080	0,732	1460	1,42	0,154
	0,862	2070	0,692	1380	1,50	0,176
	0,829	1990	0,696	1390	1,43	0,156
PFHxA	1,022	2452	0,734	734	3,34	0,524
	1,007	2416	0,788	788	3,07	0,487
	1,025	2459	0,731	731	3,37	0,527
PFHpA	1,019	2446	0,480	480	5,09	0,707
	1,067	2560	0,508	508	5,04	0,703
	1,057	2536	0,467	467	5,43	0,735
PFOA	1,280	3071	0,238	238	12,9	1,111
	1,276	3062	0,238	238	12,8	1,109
	1,250	2999	0,227	227	13,2	1,120
PFNA	0,895	2150	0,137	137	15,7	1,196
	0,841	2020	0,132	132	15,3	1,183
	0,859	2060	0,127	127	16,2	1,210
PFDA	0,296	710	0,853	85,3	8,33	0,921
	0,304	729	0,846	84,6	8,62	0,936
	0,307	736	0,873	87,3	8,43	0,926
PFUnDA	0,204	489	0,258	25,8	18,9	1,278
	0,202	485	0,256	25,6	18,9	1,277
	0,199	478	0,244	24,4	19,6	1,292
PFTriDA	0,354	849	0,190	0,190	4470	3,650
	0,352	845	0,194	0,194	4360	3,639
	0,349	837	0,185	0,185	4530	3,656
PFTeDA	0,371	891	0,0282	0,0282	31600	4,500
	0,351	842	0,0214	0,0214	39300	4,594
	0,359	863	0,0166	0,0166	52100	4,717

Použitím Deanova-Dixonova testu odlehlosti bylo zjištěno, že žádný z výsledků není odlehlý. Pro následující statistické zpracování tedy byly použity všechny výsledky. Výsledky byly pro každou látku tři, jako střední hodnota byl proto zvolen medián. Hladina významnosti $\alpha=0,05$.

Tab. 4.3 Statistické zpracování výsledných $\log K_{ow}$ získaných metodou třepací lahve.

Látka	Střední hodnota $\log K_{ow}$	Rozpětí	Odhadnutá směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka [%]	Interval spolehlivosti ($\alpha=0,05$)
PFPeA	0,16	0,02	0,01	8,48	0,03
PFHxA	0,52	0,04	0,02	4,53	0,05
PFHpA	0,71	0,03	0,02	2,71	0,04
PFOA	1,11	0,01	0,01	0,60	0,01
PFNA	1,20	0,03	0,02	1,33	0,03
PFDA	0,93	0,01	0,01	0,95	0,02
PFUnDA	1,28	0,01	0,01	0,68	0,02
PFTriDA	3,65	0,02	0,01	0,27	0,02
PFTeDA	4,59	0,22	0,13	2,79	0,28

Z mediánů koncentrací byla vypočtena látková množství kyselin v jednotlivých fázích a byla porovnána s množstvím, které by teoreticky v systému mělo být přítomno.

Tab. 4.4 Mediány koncentrací perfluorovaných kyselin v jednotlivých fázích

Látka	Koncentrace měřeného roztoku - oktanol [$\mu\text{mol/l}$]	Koncentrace neředěného roztoku - oktanol [$\mu\text{mol/l}$]	Koncentrace měřeného roztoku - voda [$\mu\text{mol/l}$]	Koncentrace neředěného roztoku - voda [$\mu\text{mol/l}$]
PFPeA	0,862	2070	0,696	1390
PFHxA	1,022	2452	0,735	735
PFHpA	1,057	2536	0,480	480
PFOA	1,276	3062	0,238	238
PFNA	0,859	2061	0,132	132
PFDA	0,304	729	0,853	85,3
PFUnDA	0,202	485	0,256	25,6
PFTriDA	0,352	845	0,190	0,190
PFTeDA	0,359	863	0,0214	0,0214

Tab. 4.5 Látková množství perfluorovaných kyselin v jednotlivých fázích vypočtená z mediánů koncentrací těchto látek a srovnání s teoretickým množstvím.

Látka	Látkové množství - oktanol [μmol]	Látkové množství - voda [μmol]	Látkové množství - celkem [μmol]	Látkové množství - teoreticky [μmol]	Výtěžnost [%]
PFPeA	4,14	2,78	6,92	10	69,20
PFHxA	4,90	1,47	6,37	10	63,73
PFHpA	5,07	0,961	6,03	10	60,33
PFOA	6,12	0,476	6,60	10	66,00
PFNA	4,12	0,265	4,39	10	43,86
PFDA	1,46	0,171	1,63	2	81,47
PFUnDA	0,97	0,0513	1,02	2	51,09
PFTriDA	1,69	0,000380	1,69	2	84,52
PFTeDA	1,73	0,0000429	1,73	2	86,27

Z výsledků je patrné, že celkové látkové množství v měřených vzorcích je oproti teoretickému látkovému množství velmi nízké. Nelze tedy předpokládat, že by šlo pouze o chyby v měřeních nebo v přípravě roztoků. Příčinou malého množství látek je nejspíš amfipatická povaha těchto sloučenin. Ta nejspíš způsobuje, že látky zůstávají na rozhraní fází a nepřecházejí ani do jedné z fází.

Dalšími měřenými parametry byly meze detekce a meze stanovitelnosti všech měřených kyselin. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab. 4.6 Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) jednotlivých kyselin udané jako molární koncentrace [nmol/l] i jako hmotnostní zlomek [ppt].

Látka	LOD [nmol/l]	LOQ [nmol/l]	LOD [ppt]	LOQ [ppt]
PFPeA	2,1	4,2	560	1100
PFHxA	0,21	1,1	66	350
PFHpA	0,11	1,1	40	400
PFOA	0,011	0,21	4,6	87
PFNA	0,011	0,021	5,1	9,7
PFDA	<0,011	0,011	5,7	5,7
PFUnDA	<0,011	0,011	6,2	6,2
PFTriDA	<0,011	0,021	7,3	14
PFTeDA	<0,011	0,021	7,9	15

Limit detekce PFDA, PFUnDA, PFTriDA a PFTeDA byl pod hodnotou 0,011 nmol/l, což byl měřený roztok s nejnižší koncentrací. Následující hodnoty jsou tudíž jen odhad: PFDA - 0,0021 nmol/l (1,1 ppt), PFUnDA - 0,0021 nmol/l (1,2 ppt), PFTriDA - 0,0063 nmol/l (4,2 ppt) a PFTeDA - 0,0042 nmol/l (3,0 ppt).

4.2 Metoda RP-HPLC

Parametry perfluorovaných kyselin zůstaly nastaveny stejně jako pro metodu třepací lahve a jsou uvedeny v tab. 4.1, parametry standardů pro detekci hmotnostním spektrometrem jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 4.7 Zjištěné hodnoty parametrů standardních látek pro detekci hmotnostním spektrometrem

Látka	Mr	Ionizace	Mateřský ion	Dceřiný ion	Kolizní energie [eV]
Anilín	93,13	kladná	94,0	77,0	22
		kladná	94,0	51,1	36
3-nitroanilín	138,14	kladná	139,0	93,0	14
		kladná	139,0	50,1	62
2-nitroanisol	153,14	kladná	154,0	76,9	36
		kladná	154,0	51,1	56
2-chlorfenol	128,56	záporná	127,0	34,8	18
2,3-dichlorfenol	163,00	záporná	160,9	124,7	12
		záporná	160,9	34,8	20
2,4,6-trichlorfenol	197,45	záporná	196,9	36,8	28
		záporná	196,9	34,8	24
Chlorpyriphos	350,59	kladná	351,9	199,9	20
		kladná	351,9	96,9	38

Měření probíhala ve třech dnech. Každý den byl směsný roztok perfluorovaných kyselin a standardů měřen třikrát. Pro každý den měření byla sestrojena kalibrační křivka z mediánů dekadických logaritmů retenčních faktorů a dekadických logaritmů rozdělovacích koeficientů standardních látek.

Pro výpočet retenčních faktorů je nutné znát mrtvý čas kolony. Ten byl vypočten podle následujících rovnic:

$$V_m = \pi \cdot r^2 \cdot v \cdot \varepsilon = 3,14 \cdot 1^2 \cdot 100 \cdot 0,81 = 250 \text{ mm}^3 = 0,25 \text{ cm}^3 = 0,25 \text{ ml} \quad \text{rov. 4.1}$$

$$t_0 = V_m \cdot F_m = 0,25 \text{ ml} / 0,25 \text{ ml/min} = 1,0 \text{ min} , \quad \text{rov. 4.2}$$

kde V_m je objem mobilní fáze v koloně [ml], r je poloměr kolony [mm], v je její délka [mm], ε je porozita kolony, t_0 je mrtvý čas kolony [min] a F_m je objemový průtok mobilní fáze [ml/min].

Rovnice kalibrační přímky s jejich korelačními koeficienty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 4.8 Parametry kalibračních přímek sestrojených pro metodu RP-HPLC

Den	Směrnice přímky	Posun přímky	Korelační koeficient
1	2,9468	2,2119	0,9916
2	3,0091	2,0838	0,9906
3	2,9116	2,2911	0,9929

U každé látky byly měřeny retenční časy pro dva iontové přechody, u PFNA byly měřeny přechody tři. Po přepočtení retenčních časů na retenční faktory byly podle kalibračních přímek určeny hodnoty dekadických logaritmů rozdělovacích koeficientů jednotlivých látek. Výsledných hodnot $\log K_{ow}$ bylo pro každou látku 18, pro PFNA 27. V následující tabulce jsou tyto hodnoty uvedeny.

Tab. 4.9 Výsledné log K_{ow} všech měřených kyselin získané měřením v průběhu tří dnů

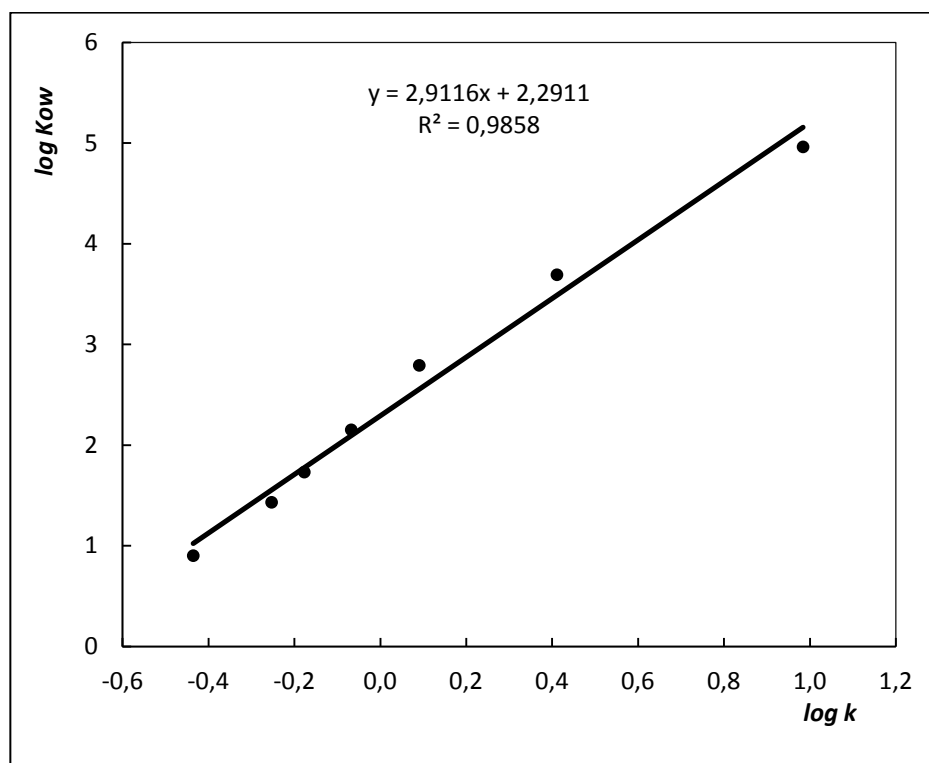
PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA		PFDA	PFUnDA	PFTriDA	PFTeDA
1,62	1,92	2,23	2,55	2,90	3,03	3,27	3,68	4,57	5,02
1,67	1,94	2,23	2,56	2,89	3,01	3,28	3,69	4,56	5,02
1,62	1,92	2,22	2,58	2,90	3,01	3,29	3,71	4,61	5,06
1,59	1,90	2,22	2,58	2,92	3,01	3,29	3,72	4,59	5,06
1,59	1,92	2,25	2,60	2,91	3,01	3,33	3,75	4,64	5,10
1,62	1,94	2,25	2,59	2,93	3,00	3,33	3,75	4,63	5,10
1,64	1,94	2,24	2,57	2,95	3,04	3,27	3,68	4,57	5,04
1,73	1,94	2,25	2,56	2,95	3,03	3,25	3,67	4,57	5,04
1,62	1,94	2,26	2,57	2,95	3,04	3,29	3,71	4,62	5,10
1,64	1,92	2,26	2,58	2,89		3,29	3,72	4,63	5,10
1,69	1,96	2,28	2,63	2,89		3,38	3,80	4,70	5,17
1,67	1,96	2,32	2,61	2,89		3,38	3,80	4,70	5,17
1,69	1,99	2,32	2,66	2,91		3,40	3,80	4,68	5,12
1,66	1,99	2,32	2,65	2,91		3,41	3,80	4,68	5,13
1,66	1,99	2,30	2,65	2,91		3,40	3,82	4,68	5,13
1,69	1,99	2,30	2,65	2,98		3,40	3,81	4,67	5,13
1,69	1,99	2,32	2,66	2,98		3,41	3,83	4,71	5,15
1,69	1,99	2,32	2,66	2,98		3,42	3,83	4,70	5,15

Výsledky byly statisticky zpracovány. Vzhledem k tomu, že výsledných hodnot $\log K_{ow}$ bylo nejméně 18, byl jako střední hodnota zvolen průměr. Na základě Deanova-Dixonova testu nebyla žádná hodnota vyloučena pro odlehlost. Pro následující statistické zpracování tedy byly použity všechny výsledky. Hladina významnosti $\alpha=0,05$.

Tab. 4.10 Statisticky zpracované $\log K_{ow}$ získané pomocí metody RP-HPLC

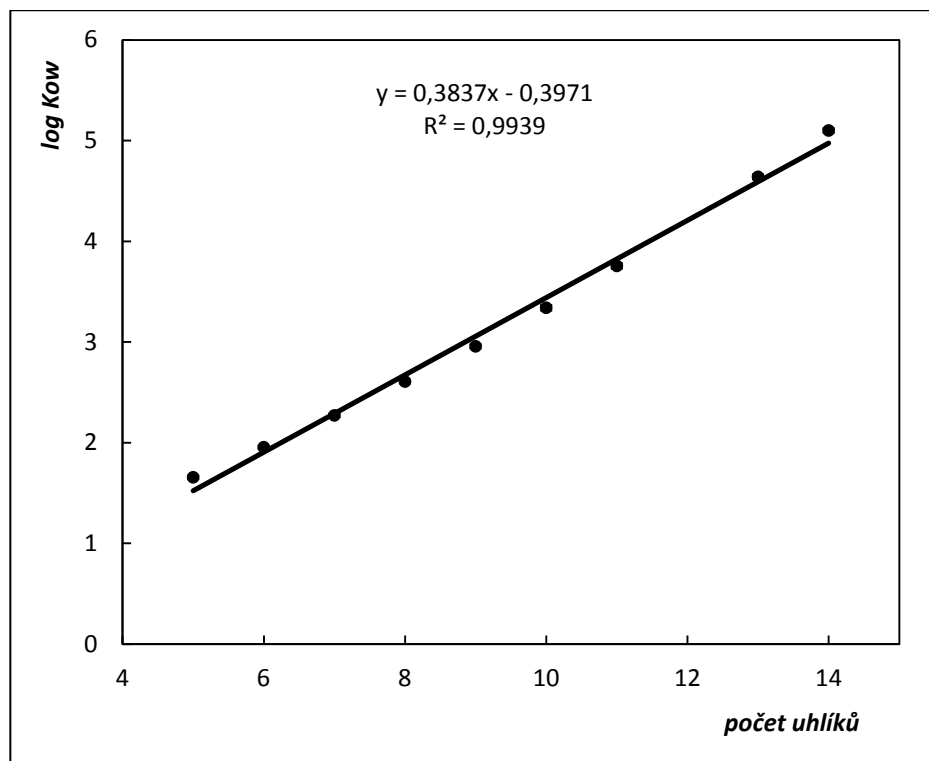
Látka	Střední hodnota $\log K_{ow}$	Odhadnutá směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka [%]	Interval spolehlivosti ($\alpha=0,05$)
PFPeA	1,66	0,04	2,32	0,02
PFHxA	1,95	0,03	1,63	0,01
PFHpA	2,27	0,04	1,67	0,02
PFOA	2,61	0,04	1,58	0,02
PFNA	2,96	0,05	1,81	0,02
PFDA	3,34	0,06	1,79	0,03
PFUnDA	3,75	0,06	1,54	0,03
PFTriDA	4,64	0,05	1,13	0,02
PFTeDA	5,10	0,05	0,97	0,02

Závislost známých hodnot $\log K_{ow}$ standardních látek na jejich retenčních faktorech je graficky znázorněna v následujícím obrázku.



Obr. 4.1 Graf znázorňuje závislost \log rozdělovacího koeficientu na \log retenčního faktoru standardních látek. Jde o jednu z kalibračních přímek. Měření proběhlo metodou RP-HPLC za podmínek uvedených v kapitole (3.4.1.2) Postup měření. Zobrazena je i rovnice přímky proložené těmito body a koeficient spolehlivosti.

Závislost $\log K_{ow}$ na délce uhlíkového řetězce měřených perfluorovaných kyselin je znázorněna v následujícím obrázku.



Obr. 4.2 Graf znázorňuje závislost log rozdělovacího koeficientu na počtu uhlíků měřené perfluorované kyseliny. Metoda použitá při měření je RP-HPLC, podmínky měření jsou uvedeny v kapitole (3.4.1.2) Postup měření. Zobrazena je i rovnice přímky, která byla proložena změřenými hodnotami, koeficient spolehlivosti a chybové úsečky znázorňující intervaly spolehlivosti.

Dosažením do rovnice přímky proložené naměřenými hodnotami

$$y = 0,3837x - 0,3971, \quad \text{rov. 4.3}$$

lze snadno vypočítat předpokládaný $\log K_{ow}$ perfluorododekanové kyseliny, která nebyla měřena. Je-li $x = 12$, pak $y = 4,21$, což je hledaný $\log K_{ow}$ PFDoDA

$$0,3837 \cdot 12 - 0,3971 = 4,21. \quad \text{rov. 4.4}$$

4.3 Vypočtené hodnoty

Vypočtené hodnoty log K_{ow} perfluorovaných kyselin byly získány pomocí programu ALOGPS 2.1. Nejprve byly pomocí editoru molekul JME Editor of Peter Ertl, který je appletem programu ALOGPS 2.1, nakresleny molekuly perfluorovaných kyselin. Po získání tzv. SMILES byly pomocí různých softwarů vypočítány hledané log K_{ow} . Seznam softwarů i výsledků pomocí nich získaných je uveden v následující tabulce.

Tab. 4.11 Softwary vypočtené hodnoty log K_{ow} pro jednotlivé kyseliny [67]

Software	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFTriDA	PFTeDA
logP (exp.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALOGPs	2,93	3,37	3,93	4,29	4,55	4,85	5,24	5,80	5,95
AC logP	2,37	2,99	3,61	4,23	4,85	5,47	6,10	7,34	7,96
AB/LogP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
miLogP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALOGP	2,33	2,83	3,32	3,81	4,30	4,79	5,28	6,27	6,76
MLOGP	2,53	3,11	3,66	4,17	4,66	5,12	5,57	6,41	6,82
KOWWIN	3,40	4,37	5,33	6,30	7,27	8,23	9,20	11,13	12,10
XLOGP2	2,44	3,18	3,93	4,67	5,42	6,16	6,90	8,39	9,14
XLOGP3	2,92	3,59	4,26	4,93	5,60	6,28	6,95	8,29	8,96

Hodnot vypočtených softwary je sedm, jsou tedy možné oba přístupy ke statistickému zpracování – pomocí mediánů i průměrů. Výsledné hodnoty se podle zvoleného přístupu liší a jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab. 4.12 Výsledky obou statistických přístupů ke zhodnocení hodnot $\log K_{ow}$ získaných výpočty pomocí softwarů.

	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFTriDA	PFTeDA
Medián	2,53	3,18	3,93	4,29	4,85	5,47	6,10	7,34	7,96
Rozpětí	1,07	1,54	2,01	2,49	2,97	3,44	3,96	5,33	6,15
Směr. odch.	0,40	0,57	0,74	0,92	1,10	1,27	1,46	1,97	2,27
Int. spolehl.	0,35	0,51	0,66	0,82	0,98	1,14	1,31	1,76	2,03
Rel. sm. odch. [%]	15,64	17,91	18,91	21,46	22,65	23,26	24,01	26,85	28,57
Průměr	2,70	3,35	4,01	4,63	5,24	5,84	6,46	7,66	8,24
Směr. odch.	0,39	0,51	0,66	0,82	1,01	1,21	1,40	1,83	2,07
Int. spolehl.	0,29	0,38	0,49	0,61	0,75	0,89	1,04	1,35	1,53
Rel. sm. odch. [%]	14,59	15,35	16,36	17,73	19,31	20,66	21,65	23,85	25,14

Vypočtené hodnoty jednotlivými softwary se navzájem výrazně liší. Je zřejmé, že pro tyto softwary jsou rozdělovací koeficienty perfluorovaných látek obtížně vypočitatelné. Některé programy nespočítaly $\log K_{ow}$ vůbec. Výsledky experimentálního měření nebyly dosud publikovány.

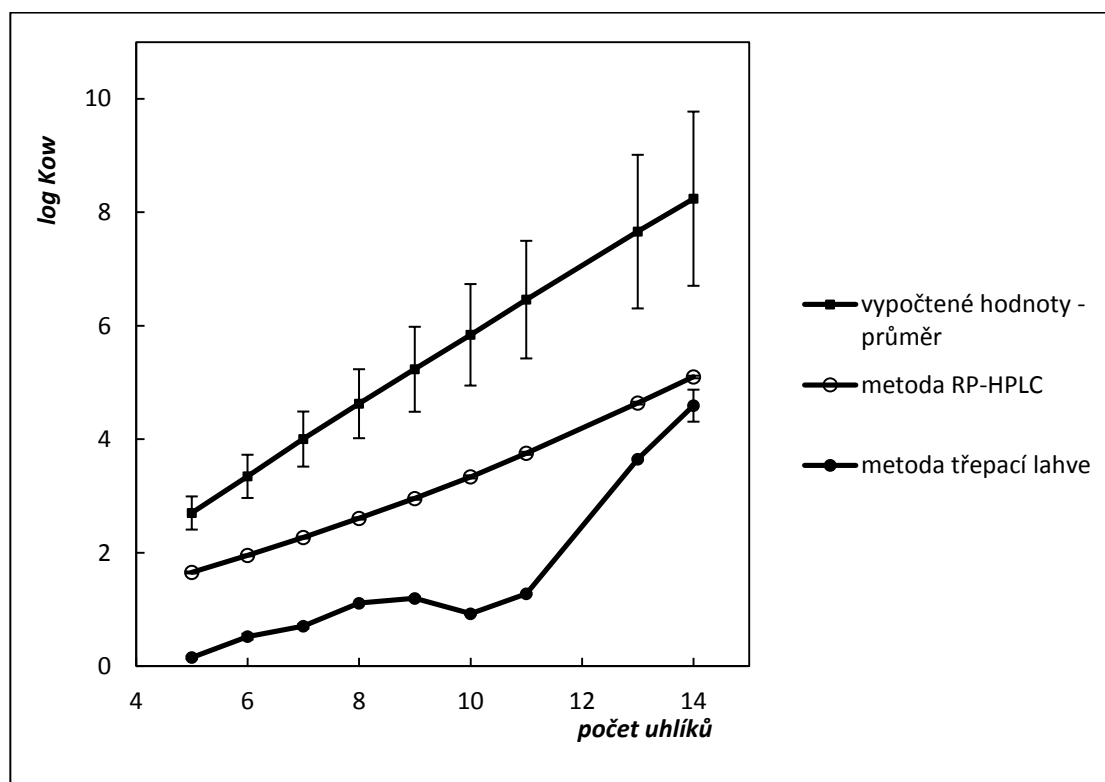
4.4 Srovnání metod

Výsledné log K_{ow} s intervalem spolehlivosti získané pomocí různých metod jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 4.13 Shrnutí výsledků získaných různými metodami. Výsledné log K_{ow} jsou opatřeny intervaly spolehlivosti. Hladina významnosti $\alpha=0,05$.

Látka	Metoda třepací lahve (\pm interval spolehlivosti)	Metoda RP-HPLC (\pm interval spolehlivosti)	Vypočtené hodnoty - průměr (\pm interval spolehlivosti)	Vypočtené hodnoty - medián (\pm interval spolehlivosti)
PFPeA	0,16 ($\pm 0,03$)	1,66 ($\pm 0,02$)	2,70 ($\pm 0,29$)	2,53 ($\pm 0,35$)
PFHxA	0,52 ($\pm 0,05$)	1,95 ($\pm 0,01$)	3,35 ($\pm 0,38$)	3,18 ($\pm 0,51$)
PFHpA	0,71 ($\pm 0,04$)	2,27 ($\pm 0,02$)	4,00 ($\pm 0,49$)	3,93 ($\pm 0,66$)
PFOA	1,11 ($\pm 0,01$)	2,61 ($\pm 0,02$)	4,63 ($\pm 0,61$)	4,29 ($\pm 0,82$)
PFNA	1,20 ($\pm 0,03$)	2,96 ($\pm 0,02$)	5,24 ($\pm 0,75$)	4,85 ($\pm 0,98$)
PFDA	0,93 ($\pm 0,02$)	3,34 ($\pm 0,03$)	5,84 ($\pm 0,89$)	5,47 ($\pm 1,14$)
PFUnDA	1,28 ($\pm 0,02$)	3,75 ($\pm 0,03$)	6,46 ($\pm 1,04$)	6,10 ($\pm 1,31$)
PFTriDA	3,65 ($\pm 0,02$)	4,64 ($\pm 0,02$)	7,66 ($\pm 1,35$)	7,34 ($\pm 1,76$)
PFTeDA	4,59 ($\pm 0,28$)	5,10 ($\pm 0,02$)	8,24 ($\pm 1,53$)	7,96 ($\pm 2,03$)

Následně jsou výsledky porovnány i graficky.



Obr. 4.3 V grafu jsou znázorněny závislosti log rozdělovacích koeficientů na počtu uhlíků perfluorované kyseliny. Výsledky pro jednotlivé kyseliny jsou opatřeny chybovými úsečkami (interval spolehlivosti, přičemž $\alpha=0,05$). Podmínky měření jsou uvedeny v Experimentální části u jednotlivých metod. Vypočtené hodnoty jsou průměrné hodnoty vypočtených log K_{ow} softwary.

Hodnoty vypočtené softwary jsou značně vyšší než ty experimentálně naměřené. Vzhledem k obrovským rozdílům mezi jednotlivými vypočtenými hodnotami (každý software používá k výpočtům jiných algoritmů) nelze předpokládat správnost těchto výpočtů.

Výsledné hodnoty získané metodou třepací lahve jsou příliš nízké, což je mimo jiné způsobeno disociací části kyselin. Disociací dochází k zvýšení polaritě, tedy i hydrofilitě, tudíž i snížení log K_{ow} . Jak je zmíněno výše, celkové látkové množství naměřené ve vzorcích bylo nízké oproti látkovému

množství, které by mělo ve vzorcích být, což pravděpodobně výsledný $\log K_{ow}$ také ovlivňuje. Látky tedy nejspíš zůstávají na rozhraní fází. Tuto domněnku podporuje i článek [10], ve kterém se píše, že pokud má látka hydrofobní i hydrofilní část (což perfluorované kyseliny mají - perfluorované řetězce jsou lipofobní a hydrofobní, karboxylová skupina je hydrofilní), nachází se na rozhraní fází.

U této metody není ani pozorován trend, který je očekáván - že by měl $\log K_{ow}$ růst s rostoucí délkou uhlíkového řetězce.

Výsledné rozdělovací koeficienty jsou sice přesné, ale nejsou zřejmě správné. Měřením však bylo zjištěno, jaký mají tyto látky charakter, z čehož lze usuzovat na chování těchto látek v životním prostředí i v živých organismech. Lze předpokládat, že ve vodním prostředí nejsou látky rozpuštěny ve vodě ani usazené v sedimentu, ale jsou na rozhraní těchto fází. V těle nejsou tyto látky ukládány do tuku, ale ani nejsou rozpuštěny v krvi. Nejčastěji jsou přítomny v játrech a navázané na bílkoviny krevní plazmy (albumin) [54]. Perfluorované kyseliny jsou pravděpodobně přítomny v buněčných membránách. Vlivem svého amfifilního charakteru mění membránový potenciál a mohou způsobovat změny pH cytosolu, což ovlivňuje buněčné funkce [51]. Více o ovlivnění organismu perfluorovanými látkami je uvedeno v kapitole (2.8) Toxikodynamika PFC.

Metoda třepací lahve tedy vystihuje chování perfluorovaných kyselin v životním prostředí, avšak rozdělovací koeficient těchto látek nelze touto metodou správně určit. Použitím pufru by se zabránilo disociaci části kyselin a tím by se zřejmě změnil i výsledný $\log K_{ow}$, podle OECD však není v případech, kdy jsou měřeny látky důležité pro výskyt v životním prostředí, doporučováno použití pufru, jelikož takový systém nereflkuje environmentální prostředí, které je pro studium těchto látek stěžejní [64].

Výsledky získané pomocí metody RP-HPLC se zdají být správnější a jsou i přesné. U této metody bylo při měření použito pufru, tudíž látky byly v neionizované formě.

U halogenovaných kyselin dochází k větší disociaci než u běžných karboxylových kyselin vlivem záporného indukčního efektu halogenu (z halogenů vykazuje fluor nejsilnější I- efekt). Disociace tedy může být značná. Čím je délka uhlíkové řetězce kyseliny větší, tím méně disociuje. I u této metody může dojít ke zkreslení vlivem povrchové aktivity látek. Použitím pufru a převedením látek na neionizovanou formu však pravděpodobně klesla i povrchová aktivita.

Metodou RP-HPLC za použití pufru je změřen správně rozdělovací koeficient, avšak v přírodě nelze předpokládat přítomnost pufru.

Žádná z metod není určena pro povrchově aktivní látky. Nejde však o typicky povrchově aktivní látky. Nemají hydrofilní a lipofilní část. Fluorouhlíkaté řetězce jsou na rozdíl od uhlovodíkových lipofobní, karboxylová skupina je hydrofilní. Je tedy otázkou, do jaké míry mohlo být měření touto vlastností ovlivněno. Měření rozdělovacích koeficientů povrchově aktivních látek by mělo probíhat v oddělených fázích, kdy je měřena pouze rozpustnost v samotných rozpouštědlech [63]. Tato metoda však také nemůže být zcela správná a šlo by pouze o odhad. Výsledná hodnota $\log K_{ow}$ je totiž ovlivněna i malým množstvím rozpouštědla, které se rozpustí do rozpouštědla druhého, což nenastane, pokud měření probíhá v oddělených fázích.

Výpočetní metody pomocí softwarů nejsou pro PFC vůbec vhodné, jsou vhodné spíše pro klasické organické sloučeniny.

Jakákoliv práce s perfluorovanými látkami je obtížná, jelikož se snadno adsorbují na různé povrchy [10]. Při manipulaci s nimi tedy může docházet k jejich ztrátám.

Dalším problémem je, že se jedná o povrchově aktivní látky, jejichž rozdělovací koeficient je obtížné stanovit. Navíc dochází k tomu, že látky zůstávají na rozhraní fází.

Komplikací je i skutečnost, že jde o slabé kyseliny, tudíž dochází k jejich disociaci. Vystává proto otázka, jestli použít pufr k jejímu potlačení nebo simulovat přírodní podmínky bez použití pufru.

Pro zpracování výsledků bylo použito programu Microsoft Excel.

5 Závěr

Rozdělovací koeficient devíti perfluorovaných kyselin byl správně určen metodou RP-HPLC, kdy bylo použito standardních látek se známými rozdělovacími koeficienty k sestavení závislosti $\log K_{ow}$ na \log retenčního faktoru. Z této závislosti byly určeny neznámé $\log K_{ow}$ perfluorovaných kyselin. Při této metodě bylo použito octanového pufru k potlačení disociace měřených kyselin. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 5.1 Výsledné hodnoty $\log K_{ow}$ devíti měřených perfluorovaných kyselin změřené pomocí metody RP-HPLC. Výsledky jsou uvedeny jako průměr $\log K_{ow} \pm$ interval spolehlivosti (relativní směrodatná odchylka, počet měření). Hladina významnosti α je 0,05.

Látka	$\bar{x} \pm L_{1,2} (s_r, n)$
PFPeA	$1,66 \pm 0,02 (s_r = 2,32 \%, n = 18)$
PFHxA	$1,95 \pm 0,01 (s_r = 1,63 \%, n = 18)$
PFHpA	$2,27 \pm 0,02 (s_r = 1,67 \%, n = 18)$
PFOA	$2,61 \pm 0,02 (s_r = 1,58 \%, n = 18)$
PFNA	$2,96 \pm 0,02 (s_r = 1,81 \%, n = 27)$
PFDA	$3,34 \pm 0,03 (s_r = 1,79 \%, n = 18)$
PFUnDA	$3,75 \pm 0,03 (s_r = 1,54 \%, n = 18)$
PFTriDA	$4,64 \pm 0,02 (s_r = 1,13 \%, n = 18)$
PFTeDA	$5,10 \pm 0,02 (s_r = 0,97 \%, n = 18)$

Pomocí rovnice přímky získané proložením závislosti změřených $\log K_{ow}$ na počtu uhlíků kyseliny byl odhadnut i $\log K_{ow}$ perfluordodekanové kyseliny, která nebyla měřena. Výsledný $\log K_{ow}$ PFDoDA je 4,21.

Metodou třepací lahve byly naměřeny nesprávné výsledky. Problém při této metodě činila povrchová aktivita kyselin a jejich výskyt na rozhraní fází. Dalším problémem byla disociace části kyselin a ovlivnění výsledného $\log K_{ow}$.

Výpočetními metodami byly získány značně nepřesné hodnoty, tudíž nemohou být považovány za relevantní.

Problémů s měřením rozdělovacích koeficientů perfluorovaných kyselin bylo mnoho, avšak optimalizací měření byly nakonec naměřeny správné hodnoty. Bylo provedeno srovnání měřicích metod mezi sebou a také srovnání měřicích metod s hodnotami vypočtenými. Cíl práce byl tedy splněn.

Soupis bibliografických citací

- [1] Han, S.; Qiao, J.; Zhang, Y.; Lian, H.; Ge, X.: Determination of n-octanol/water partition coefficients of weak ionizable solutes by RP-HPLC with neutral model compounds. *Talanta* **97**, 355–61 (2012).
- [2] Han, S.; Liang, C.; Qiao, J.; Lian, H.; Ge, X.; Chen, H.: A novel evaluation method for extrapolated retention factor in determination of n-octanol/water partition coefficient of halogenated organic pollutants by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Analytica chimica acta* **713**, 130–5 (2012).
- [3] Ming, X.; Han, S.; Qi, Z.; Sheng, D.; Lian, H.: Chromatographic retention prediction and octanol-water partition coefficient determination of monobasic weak acidic compounds in ion-suppression reversed-phase liquid chromatography using acids as ion-suppressors. *Talanta* **79**, 752–61 (2009).
- [4] Pallicer, J. M.; Pous-Torres, S.; Sales, J.; Rosés, M.; Ràfols, C.; Bosch, E.: Determination of the hydrophobicity of organic compounds measured as logP(o/w) through a new chromatographic method. *Journal of chromatography* **1217**, 3026–37 (2010).
- [5] Holder, A. J.; Ye, L.; Yourtee, D. M.; Agarwal, A.; Eick, J. D.; Chappelow, C. C.: An application of the QM-QSAR method to predict and rationalize lipophilicity of simple monomers. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials* **21**, 591–8 (2005).
- [6] Haug, L. S.; Huber, S.; Becher, G.; Thomsen, C.: Characterisation of human exposure pathways to perfluorinated compounds--comparing exposure estimates with biomarkers of exposure. *Environment international* **37**, 687–93 (2011).
- [7] Lau, C.: Perfluoroalkyl acids: recent activities and research progress. *Reproductive toxicology* **27**, 209–11 (2009).
- [8] Brandsma, S. H.; Smithwick, M.; Solomon, K.; Small, J.; De Boer, J.; Muir, D. C. G.: Dietary exposure of rainbow trout to 8:2 and 10:2 fluorotelomer alcohols and perfluorooctanesulfonamide: Uptake, transformation and elimination. *Chemosphere* **82**, 253–8 (2011).

- [9] Mulkiwicz, E.; Jastorff, B.; Składanowski, A. C.; Kleszczyński, K.; Stepnowski, P.: Evaluation of the acute toxicity of perfluorinated carboxylic acids using eukaryotic cell lines, bacteria and enzymatic assays. *Environmental toxicology and pharmacology* **23**, 279–85 (2007).
- [10] Lewandowski, G.; Meissner, E.; Milchert, E.: Special applications of fluorinated organic compounds. *Journal of hazardous materials* **136**, 385–91 (2006).
- [11] Latała, A.; Nędzi, M.; Stepnowski, P.: Acute toxicity assessment of perfluorinated carboxylic acids towards the Baltic microalgae. *Environmental toxicology and pharmacology* **28**, 167–71 (2009).
- [12] 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**, 239–70 (2009).
- [13] Lau, C.; Butenhoff, J. L.; Rogers, J. M.: The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Toxicology and applied pharmacology* **198**, 231–41 (2004).
- [14] Morris, R. a; Viggiano, a. a.; Arnold, S. T.; Paulson, J. F.: Chemistry of atmospheric ions reacting with fully fluorinated compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **149-150**, 287–298 (1995).
- [15] Kleszczyński, K.; Stepnowski, P.; Składanowski, A. C.: Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids II. Disruption of mitochondrial bioenergetics. *Toxicology and applied pharmacology* **235**, 182–90 (2009).
- [16] Shoeib, M.; Vlahos, P.; Harner, T.; Peters, A.; Graustein, M.; Narayan, J.: Survey of polyfluorinated chemicals (PFCs) in the atmosphere over the northeast Atlantic Ocean. *Atmospheric Environment* **44**, 2887–2893 (2010).
- [17] Wang, T.; Lu, Y.; Chen, C.; Naile, J. E.; Khim, J. S.; Park, J.; Luo, W.; Jiao, W.; Hu, W.; Giesy, J. P.: Perfluorinated compounds in estuarine and coastal areas of north Bohai Sea, China. *Marine pollution bulletin* **62**, 1905–14 (2011).

- [18] Domingo, J. L.: Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds. *Environment international* **40**, 187–95 (2012).
- [19] Lau, C.: Perfluoroalkyl acids: recent research highlights. *Reproductive toxicology* **33**, 405–9 (2012).
- [20] Sekiya, A.; Misaki, S.: The potential of hydrofluoroethers to replace CFCs, HCFCs and PFCs. *Journal of Fluorine Chemistry* **101**, 0–6 (2000).
- [21] Cai, M.; Xie, Z.; Möller, A.; Yin, Z.; Huang, P.; Cai, M.; Yang, H.; Sturm, R.; He, J.; Ebinghaus, R.: Polyfluorinated compounds in the atmosphere along a cruise pathway from the Japan Sea to the Arctic Ocean. *Chemosphere* **87**, 989–97 (2012).
- [22] Ishibashi, H.; Yamauchi, R.; Matsuoka, M.; Kim, J.-W.; Hirano, M.; Yamaguchi, A.; Tominaga, N.; Arizono, K.: Fluorotelomer alcohols induce hepatic vitellogenin through activation of the estrogen receptor in male medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* **71**, 1853–9 (2008).
- [23] 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).
- [24] Schuetze, A.; Heberer, T.; Effkemann, S.; Juergensen, S.: Occurrence and assessment of perfluorinated chemicals in wild fish from Northern Germany. *Chemosphere* **78**, 647–52 (2010).
- [25] 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).
- [26] Berger, U.; Glynn, A.; Holmström, K. E.; Berglund, M.; Ankarberg, E. H.; Törnkvist, A.: Fish consumption as a source of human exposure to perfluorinated alkyl substances in Sweden - analysis of edible fish from Lake Vättern and the Baltic Sea. *Chemosphere* **76**, 799–804 (2009).

- [27] Haug, L. S.; Salihovic, S.; Jogsten, I. E.; Thomsen, C.; Van Bavel, B.; Lindström, G.; Becher, G.: Levels in food and beverages and daily intake of perfluorinated compounds in Norway. *Chemosphere* **80**, 1137–43 (2010).
- [28] 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**, 772–8 (2010).
- [29] Rylander, C.; Sandanger, T. M.; Frøyland, L.; Lund, E.: Dietary patterns and plasma concentrations of perfluorinated compounds in 315 Norwegian women: the NOWAC Postgenome Study. *Environmental science & technology* **44**, 5225–32 (2010).
- [30] Ericson, I.; Martí-Cid, R.; Nadal, M.; Van Bavel, B.; Lindström, G.; Domingo, J. L.: 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**, 1787–94 (2008).
- [31] Ericson, I.; Gómez, M.; Nadal, M.; Van Bavel, B.; Lindström, G.; Domingo, J. L.: Perfluorinated chemicals in blood of residents in Catalonia (Spain) in relation to age and gender: a pilot study. *Environment international* **33**, 616–23 (2007).
- [32] Tittlemier, S. a; Pepper, K.; Edwards, L.: Concentrations of perfluorooctanesulfonamides in Canadian total diet study composite food samples collected between 1992 and 2004. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 8385–9 (2006).
- [33] Ostertag, S. K.; Tague, B. a; Humphries, M. M.; Tittlemier, S. a; Chan, H. M.: Estimated dietary exposure to fluorinated compounds from traditional foods among Inuit in Nunavut, Canada. *Chemosphere* **75**, 1165–72 (2009).
- [34] Delinsky, A. D.; Strynar, M. J.; Nakayama, S. F.; Varns, J. L.; Ye, X.; McCann, P. J.; Lindstrom, A. B.: Determination of ten perfluorinated compounds in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) filets. *Environmental research* **109**, 975–84 (2009).

- [35] Egeghy, P. P.; Lorber, M.: An assessment of the exposure of Americans to perfluorooctane sulfonate: A comparison of estimated intake with values inferred from NHANES data. *J Expos Sci Environ Epidemiol* **21**, 150–168 (2011).
- [36] Del Gobbo, L.; Tittlemier, S.; Diamond, M.; Pepper, K.; Tague, B.; Yeudall, F.; Vanderlinden, L.: Cooking decreases observed perfluorinated compound concentrations in fish. *Journal of agricultural and food chemistry* **56**, 7551–9 (2008).
- [37] Begley, T. H.; White, K.; Honigfort, P.; Twaroski, M. L.; Neches, R.; Walker, R. a: Perfluorochemicals: potential sources of and migration from food packaging. *Food additives and contaminants* **22**, 1023–31 (2005).
- [38] Sun, H.; Li, F.; Zhang, T.; Zhang, X.; He, N.; Song, Q.; Zhao, L.; Sun, L.; Sun, T.: Perfluorinated compounds in surface waters and WWTPs in Shenyang, China: mass flows and source analysis. *Water research* **45**, 4483–90 (2011).
- [39] Gómez, C.; Vicente, J.; Echavarri-Erasun, B.; Porte, C.; Lacorte, S.: Occurrence of perfluorinated compounds in water, sediment and mussels from the Cantabrian Sea (North Spain). *Marine pollution bulletin* **62**, 948–55 (2011).
- [40] Zhang, Q.; Deng, S.; Yu, G.; Huang, J.: Removal of perfluorooctane sulfonate from aqueous solution by crosslinked chitosan beads: sorption kinetics and uptake mechanism. *Bioresource technology* **102**, 2265–71 (2011).
- [41] Huber, S.; Haug, L. S.; Schlabach, M.: Per- and polyfluorinated compounds in house dust and indoor air from northern Norway - a pilot study. *Chemosphere* **84**, 1686–93 (2011).
- [42] Ericson Jogsten, I.; Nadal, M.; Van Bavel, B.; Lindström, G.; Domingo, J. L.: Per- and polyfluorinated compounds (PFCs) in house dust and indoor air in Catalonia, Spain: implications for human exposure. *Environment international* **39**, 172–80 (2012).

- [43] Ahrens, L.; Felizeter, S.; Ebinghaus, R.: Spatial distribution of polyfluoroalkyl compounds in seawater of the German Bight. *Chemosphere* **76**, 179–84 (2009).
- [44] Dreyer, A.; Ebinghaus, R.: Polyfluorinated compounds in ambient air from ship- and land-based measurements in northern Germany. *Atmospheric Environment* **43**, 1527–1535 (2009).
- [45] Guruge, K. S.; Yeung, L. W. Y.; Li, P.; Taniyasu, S.; Yamashita, N.; Nakamura, M.: Fluorinated alkyl compounds including long chain carboxylic acids in wild bird livers from Japan. *Chemosphere* **83**, 379–84 (2011).
- [46] 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**, 131–7 (2009).
- [47] Oono, S.; Harada, K. H.; Mahmoud, M. a M.; Inoue, K.; Koizumi, A.: Current levels of airborne polyfluorinated telomers in Japan. *Chemosphere* **73**, 932–7 (2008).
- [48] Zushi, Y.; Takeda, T.; Masunaga, S.: Existence of nonpoint source of perfluorinated compounds and their loads in the Tsurumi River basin, Japan. *Chemosphere* **71**, 1566–73 (2008).
- [49] Zushi, Y.; Tamada, M.; Kanai, Y.; Masunaga, S.: Time trends of perfluorinated compounds from the sediment core of Tokyo Bay, Japan (1950s-2004). *Environmental pollution* **158**, 756–63 (2010).
- [50] Rosen, M. B.; Schmid, J. E.; Das, K. P.; Wood, C. R.; Zehr, R. D.; Lau, C.: Gene expression profiling in the liver and lung of perfluorooctane sulfonate-exposed mouse fetuses: comparison to changes induced by exposure to perfluorooctanoic acid. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* **27**, 278–88 (2009).
- [51] Kleszczyński, K.; Składanowski, A. C.: Mechanism of cytotoxic action of perfluorinated acids. I. alteration in plasma membrane potential and intracellular pH level. *Toxicology and applied pharmacology* **234**, 300–5 (2009).

- [52] Luebker, D. J.; Hansen, K. J.; Bass, N. M.; Butenhoff, J. L.; Seacat, A. M.: Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology* **176**, 175–85 (2002).
- [53] Huang, H.; Huang, C.; Wang, L.; Ye, X.; Bai, C.; Simonich, M. T.; Tanguay, R. L.; Dong, Q.: Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonic acid (PFOS). *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* **98**, 139–47 (2010).
- [54] Guo, F.; Zhong, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Zhang, J.; Liu, J.; Zhao, Y.; Wu, Y.: Perfluorinated compounds in human blood around Bohai Sea, China. *Chemosphere* **85**, 156–62 (2011).
- [55] Guruge, K. S.; Manage, P. M.; Yamanaka, N.; Miyazaki, S.; Taniyasu, S.; Yamashita, N.: Species-specific concentrations of perfluoroalkyl contaminants in farm and pet animals in Japan. *Chemosphere* **73**, S210–5 (2008).
- [56] Clara, M.; Gans, O.; Weiss, S.; Sanz-Escribano, D.; Scharf, S.; Scheffknecht, C.: Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: an Austrian case study. *Water research* **43**, 4760–8 (2009).
- [57] Hines, E. P.; White, S. S.; Stanko, J. P.; Gibbs-Flournoy, E. a.; Lau, C.; Fenton, S. E.: Phenotypic dichotomy following developmental exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) in female CD-1 mice: Low doses induce elevated serum leptin and insulin, and overweight in mid-life. *Molecular and cellular endocrinology* **304**, 97–105 (2009).
- [58] Olsen, G. W.; Butenhoff, J. L.; Zobel, L. R.: Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: an epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reproductive toxicology* **27**, 212–30 (2009).
- [59] Kudo, N.; Suzuki, E.; Katakura, M.; Ohmori, K.; Noshiro, R.; Kawashima, Y.: Comparison of the elimination between perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in rats. *Chemico-biological interactions* **134**, 203–16 (2001).

- [60] 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**, 165–80 (2005).
- [61] Himmelstein, M. W.; Serex, T. L.; Buck, R. C.; Weinberg, J. T.; Mawn, M. P.; Russell, M. H.: 8:2 fluorotelomer alcohol: a one-day nose-only inhalation toxicokinetic study in the Sprague-Dawley rat with application to risk assessment. *Toxicology* **291**, 122–32 (2012).
- [62] Loccisano, A. E.; Campbell, J. L.; Andersen, M. E.; Clewell, H. J.: Evaluation and prediction of pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the monkey and human using a PBPK model. *Regulatory toxicology and pharmacology* **59**, 157–75 (2011).
- [63] OECD 107: 1995 OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.
- [64] OECD 117: 2004 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method.
- [65] Sangster, J.: *Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds*, 1989. Dostupné: <<http://logkow.cisti.nrc.ca/logkow/search.html>> [cit. 22.4.2013].
- [66] 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).
- [67] VCCLAB, *Virtual Computational Chemistry Laboratory*, 2005. dostupné z URL: <<http://www.vcclab.org>> [cit. 30.3.2013]