

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studijní obor Analytická chemie

**Stanovení perfluorovaných polutantů metodou  
GC a GC-MS**

*Diplomová práce*

Praha 2007

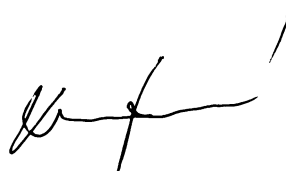
Veronika Dufková

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Radomíra Čabaly, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 1.5.2007

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive script that is difficult to decipher but appears to be a personal name.

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za jeho pomoc při shromažďování odborné literatury, za trpělivost a rady poskytnuté během měření a vypracovávání této práce. Velký dík také patří celé mé rodině a především mé mamince, která mě po celou dobu studia podporovala. Dále bych chtěla poděkovat Josefovi za psychickou a softwarovou podporu.

Tato práce byla finančně podporována z výzkumného záměru MŠMT ČR, VZ MSM 0021620857.

**Klíčová slova:** perfluorované organické sloučeniny, vodné a biologické matrice, derivatizace, isobutylestery, chlormravenčany

**Předmětová hesla:** plynová chromatografie, iontově-párová extrakce, Soxhletova extrakce

## Obsah:

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část.....	8
2.1 Perfluorované sloučeniny.....	8
2.2 Derivatizace, extrakce a stanovení perfluorovaných látek.....	12
2.3 Plynová chromatografie .....	19
3. Experimentální část.....	25
3.1 Standardy a chemikálie .....	25
3.2 Přístrojové vybavení.....	25
3.3 Odběr reálných vzorků.....	26
3.4 Příprava zásobních roztoků.....	27
3.4.1 Zásobní roztok methylesteru kyseliny myristové v hexanu.....	27
3.4.2 Zásobní roztok kyseliny myristové v acetonu.....	27
3.4.3 Zásobní roztoky perfluorovaných kyselin v acetonitrilu.....	27
3.5 Derivatizace.....	27
3.5.1 Derivatizace kyseliny myristové na methylester a isobutylester .....	27
3.5.2 Derivatizace perfluorovaných kyselin na isobutylester .....	28
3.6 GC analýza .....	28
3.6.1 GC-FID.....	28
3.6.2 GC-ECD.....	28
3.6.3 GC-MS .....	29
3.7 Extrakce.....	29
3.7.1 Extrakce vodné fáze organickým rozpouštědlem.....	29
3.7.2 Iontově-párová extrakce.....	29
3.7.3 Soxhletova extrakce .....	30
4. Výsledky a diskuse.....	31
4.1 Analýza esterů kyseliny myristové .....	31
4.1.1 Analýza roztoku standardu methylesteru kyseliny myristové.....	31
4.1.2 Analýza esterů kyseliny myristové připravených derivatizací.....	32
4.2 Analýza esterů perfluorovaných kyselin.....	33

4.2.1	Analýza perfluorovaných kyselin a jejich isobutylesterů pomocí GC-ECD.....	33
4.2.2	Analýza perfluorovaných kyselin a jejich isobutylesterů pomocí GC-MS.....	35
4.3	Separace isobutylesterů perfluorovaných kyselin na různých stacionárních fázích.....	39
4.4	Van Deemterova závislost kolony SPB-5 u GC-ECD .....	41
4.5	Optimalizace derivatizační reakce .....	43
4.5.1	Optimalizace doby reakce .....	43
4.5.2	Optimalizace množství pomocných látek v reakčním médiu.....	45
4.5.3	Optimalizace teploty reakce .....	46
4.5.4	Optimalizace teploty injektoru .....	47
4.5.5	Optimalizace složení extrakčního rozpouštědla.....	48
4.6	Kalibrační závislosti.....	52
4.7	Převedení reakce do vodného prostředí .....	54
4.8	Extrakce.....	54
4.8.1	Extrakce vodné fáze organickým rozpouštědlem.....	54
4.8.2	Iontově-párová extrakce.....	55
4.8.3	Reálné vzorky vody.....	55
4.8.4	Soxhletova extrakce .....	58
5.	Závěr.....	60
6.	Seznam zkratk .....	61
7.	Použitá literatura .....	63
8.	Přílohy .....	69

# 1. Úvod

Tématem této práce je vypracování a optimalizace metody stanovení perfluorovaných organických sloučenin, konkrétně kyseliny perfluorheptanové, perfluoroktanové, perfluornonanové a perfluordekanové metodou plynové chromatografie. Tyto látky patří do široké skupiny tzv. perfluorovaných sloučenin (PFC). Ty byly v předchozích desetiletích hojně průmyslově využívány a v poslední době bylo zjištěno, že PFC patří mezi polutanty nacházející se ve všech složkách životního prostředí. Je to dáno odolností vůči odbourávacím procesům a bioakumulativním charakterem těchto látek. Stále proto přibývá vědců z celého světa zabývajících se touto problematikou a každým rokem narůstá počet publikací v odborné literatuře o stanovení PFC různými analytickými metodami, jak bude zmíněno v další kapitole. V České Republice toto téma ale zatím není dostatečně zpracováno a proto se stalo předmětem našich studií.

Cílem této práce je optimalizace a stanovení již zmíněných perfluorovaných kyselin ve vybraných složkách životního prostředí metodou plynové chromatografie.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Perfluorované látky

Perfluorované sloučeniny (PFC) jsou perzistentní organické látky, u kterých jsou všechny vodíky v alkylovém řetězci nahrazeny atomy fluoru. Jsou to bioakumulativní a potenciálně škodlivé syntetické chemikálie, přirozeně se nevyskytující v životním prostředí. Mezi nejznámější PFC můžeme zařadit perfluorhexanovou kyselinu (PFH<sub>x</sub>A), perfluorheptanovou kyselinu (PFHpA), perfluoroktanovou kyselinu (PFOA), dále pak perfluoroktansulfonát (PFOS) a perfluoroktansulfonamid (PFOSA) (viz. tabulka 2.1).

Tabulka 2.1 - Fyzikální a chemické vlastnosti vybraných perfluorovaných sloučenin

Zkratka	Název sloučeniny	Molekulový vzorec	Molární hmotnost	Bod varu (°C)	Bod tání (°C)	Hustota (g/cm <sup>3</sup> )	pK <sub>a</sub>
PFH <sub>x</sub> A	perfluorhexanová kyselina	C <sub>5</sub> F <sub>11</sub> COOH	314,1	157	-	1,762	0,23
PFHpA	perfluorheptanová kyselina	C <sub>6</sub> F <sub>13</sub> COOH	364,1	175	30	1,792	0,31
PFOA	perfluoroktanová kyselina	C <sub>7</sub> F <sub>15</sub> COOH	414,1	189	55-56	1,700	0,35
PFNA	perfluornonanová kyselina	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> COOH	464,1	218	59	-	0,36
PFDA	perfluordekanová kyselina	C <sub>9</sub> F <sub>19</sub> COOH	514,1	218	77	-	0,37
PFDoA	perfluordodekanová kyselina	C <sub>11</sub> F <sub>23</sub> COOH	614,1	245	105	-	-
PFOS	perfluoroktansulfonát	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	499,1	-	-	-	-
PFOSA	perfluoroktansulfonamid	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	499,2	-	-	-	-

Typická struktura PFC má lineární řetězec se 4 až 14 atomy uhlíku:

$F - (CF_2)_n - X$ , kde  $n = 3 - 13$  a  $X = -OH, -COOH, -SO_3H, -SO_2NH_2$  [1].

U fluorovaných organických sloučenin jsou pozorovány jedinečné fyzikální, chemické a biologické vlastnosti, které jsou způsobeny velkou elektronegativitou



fluoru, stejně tak jako překryvem 2s a 2p orbitalů fluoru s odpovídajícími orbitály uhlíku. Vysoce polarizovaná vazba mezi uhlíkem a fluorem je nejsilnější kovalentní vazbou (střední energie vazby C-F při 25 °C je 441 kJ/mol). Perfluorované sloučeniny jsou mnohem víc teplotně stálé než jejich analogické uhlovodíky. Konkrétně perfluorkarboxylové a perfluoralkansulfonové kyseliny jsou z PFC považovány za teplotně nejstabilnější. Téměř všechny z organických fluorovaných sloučenin jsou odolné vůči hydrolyze, fotolýze, biodegradaci a procesům v metabolismu [2, 3]. PFC jsou využívány k výrobě spotřebních produktů (viz dále) a důsledkem toho se dostávají do odpadních vod, kde se mohou sorbovat na splaškový kal. Jeho dalším využíváním při hnojení zemědělských ploch dochází k ukládání těchto látek do půd a díky jejich polaritě a pohyblivosti se opět mohou vyplavovat do podzemních vod v téměř nezměněné podobě [4,5].

Akumulace a osud neutrálních organohalogenovaných sloučenin v životním prostředí lze předpovědět z některých fyzikálně-chemických konstant, a to především z rozdělovacího koeficientu mezi oktanolem a vodou ( $K_{ow}$ ). Díky tomu, že perfluoralkylové řetězce jsou jak lipofobní, tak hydrofobní, modely vycházející z konstanty  $K_{ow}$  nejsou příliš vhodné pro vyhodnocení akumulace a osudu PFC v životním prostředí. Běžné je také to, že pokud jsou fyzikálně-chemická data známá, často nekorespondují s náměřenými výsledky získanými různými laboratořemi a různými metodami. Příkladem může být výsledek studie provedené Gossovou a kol. [6]. V této studii vědci přišli na to, že uhlovodíky s fluorovaným řetězcem mnohem více přecházejí do organické fáze a mají velmi nízkou tendenci zůstat ve vodné fázi, než by se očekávalo podle dostupných dat. Tyto problémy podtrhují důležitost biomonitoringu pro pochopení chování a osudu perfluorovaných látek v životním prostředí. Pokud budou výsledky pečlivě a přesně interpretovány, analýzy vzorků životního prostředí mohou poskytnout cenné informace o zdrojích, působení, transportních mechanismech, bioakumulačním potenciálu a globální distribuci těchto chemikálií [7].

Perfluorované kyseliny jsou velmi silné, což souvisí s elektronovým indukčním efektem fluoru. Například nahrazením atomů vodíku u kyseliny oktánové za atomy fluoru na kyselinu perfluoroktanovou se sníží  $pK_a$  z 4,89 na 0,35. Nahrazení atomů fluoru v uhlovodíkovém řetězci vede také ke snížení povrchového napětí vodných

roztoků a k tvorbě micel při nižších koncentracích (CMC – kritická micelární koncentrace pro PFOA se pohybuje mezi 8,7 a 9,0 mmol/l). Hodnoty CMC pro  $C_7$  a  $C_8$  perfluorované karboxylové a alkansulfonové kyseliny jsou zhruba ekvivalentní  $C_{11}$  a  $C_{12}$  uhlovodíkovým surfaktantům [2, 8].

Nejběžnější perfluorované látky, jako např. PFOA, PFOS a další jsou využívány v mnoha průmyslových oblastech. Soli těchto kyselin jsou využívány k výrobě nepřilnavého teflonového nádobí [9]. PFC se používají jako změkčovadla v mazacích a hydraulických olejích, v nátěrových hmotách a leštidlech. Ve fotografickém průmyslu se využívají tyto látky k pokovování a dále se uplatňují při výrobě polovodičů [10]. Jsou to povrchově aktivní látky, odpuzují jak vlhkost, tak i mastnotu a někdy jsou pro tuto vlastnost nazývány též „supersurfactants”. Proto jsou hojně průmyslově využívány k povrchové úpravě čalouněných materiálů, textilií, koberců a papíru [11, 12].

Amonná sůl perfluoroktanové kyseliny (APFOA) se používá jako emulgátor při produkci fluoropolymerů a fluoroelastomerů, jako je např. polytetrafluorethylen (PTFE) a polyvinylidenfluorid (PVDF). Tyto materiály jsou potřebné v automobilovém, leteckém a elektronickém průmyslu [14-17]. PTFE je také součástí různých laboratorních pomůcek, jako jsou např. SPE kolony, těsnění a hadičky. PFOA pak může být přítomna ve stopových množstvích v těchto produktech a lze ji detegovat např. v běžných rozpouštědlech užívaných v HPLC [18].

V zemědělství se využívá *N*-ethylperfluoroktansulfonamid, který patří mezi specifické insekticidy používané proti mravencům a termitům. Jeho metabolitem je bioakumulativní perfluoroktansulfonamid (PFOSA) [19].

PFC jsou také odolné vůči vysokým teplotám a ohni a mají vlastnosti ihibitoru koroze [13]. Proto speciální hasící pěny obsahují některé perfluorované látky (konkrétně soli perfluoralkansulfonových kyselin), které podporují tvorbu vodní pěny (aqueous film forming foam, AFFF). Používání těchto pěn začalo již v polovině 60. let v USA brzy po jejich objevení. Společnost 3M byla až do roku 2001 největším dodavatelem tohoto produktu především pro americkou armádu. AFFF jsou vhodné k hašení hořlavých kapalin (např. benzínu), a proto ke kontaminaci životního prostředí (zejména povrchové a podzemní vody) perfluorovanými látkami dochází nejčastěji na armádních základnách, letištích a v tréninkových táborech hasičských sborů [2, 20, 21]. Perfluorované látky se průmyslově vyrábějí dvěma různými způsoby. Prvním z nich je

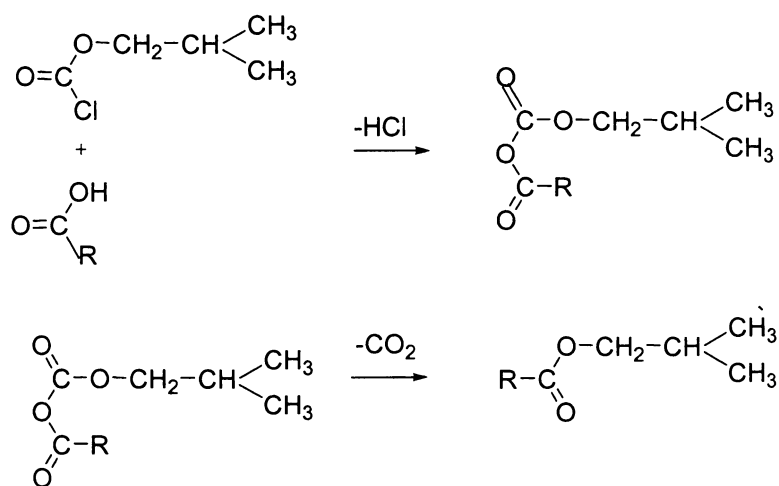
proces elektrochemické fluorizace, při němž dochází k nahrazení všech atomů vodíku v uhlovodíkovém řetězci atomy fluoru účinkem elektrického proudu. Je to celkem levná metoda, kterou lze získat směs převážně lineárních isomerů, rozvětvených isomerů (15 až 30 %), ale také isomerů s kratším řetězcem. Tato elektrochemická metoda byla používána k výrobě perfluoroktansulfonylfluoridu (PFOSF). Společnost 3M začala s produkcí této látky již roku 1949 [22, 23]. PFOSF je základní chemikálií, ze které se dále produkovaly perfluoralkylsulfonamidalkoholy, jako např. *N*-ethylperfluoroktansulfonamidethanol (*N*-EtFOSE). Tyto produkty byly v roce 2001 stáhnuty z výroby a nahrazeny analogickými látkami s butylovým základem. Perfluoralkylsulfonamidalkoholy degradují biotickou oxidací a biotransformačními procesy na perfluoralkylsulfonáty. Konkrétně třeba PFOS se v přírodě uvolňuje z perfluoralkylsulfonamidalkoholů, jako je již zmiňovaný *N*-EtFOSE. Druhým důležitým výrobním procesem PFC je telomerizace, která vychází z reakce pentafluorjodethanu s tetrafluorethylenovými oligomery za vzniku směsi perfluoralkylderivátů. Tyto fluortelomerní deriváty byly používány k výrobě různých telomerních produktů, převážně fluortelomerních alkoholů (FTOH). To jsou lineární, polyfluorované alkoholy s dlouhým řetězcem (obecně  $C_xF_{2x+1}CH_2CH_2OH$ ), které slouží jako meziproducty při výrobě inkoustů, vosků, nátěrových hmot, barviv, lepidel, leštidel, těsnění a plastů. FTOH jsou transformovány v atmosféře a metabolizovány v organismech a mikroorganismech na fluortelomerní karboxylové kyseliny (FTCA) a perfluorkarboxylové kyseliny (PFCA) [7, 24, 25].

V roce 2000 byla roční produkce PFOS ve Spojených Státech odhadována na téměř 3000 tun. V květnu téhož roku ohlásila společnost 3M zastavení výroby PFOA a PFOS (složky v přípravku Scotchgard, který zvyšoval odolnost povrchů vůči barevným skvrnám), kvůli jejich stálosti v životním prostředí. Rozhodnutí snížit produkci těchto sloučenin bylo částečně podmíněno zjištěním přítomnosti PFOS ve vzorcích krve obyvatel Spojených Států, Japonska, Evropy a Číny. Stanovené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 10 – 100  $\mu\text{g/l}$ . Koncentrace PFOS byla dále stanovena ve vodných maticích (mořská, povrchová, podzemní a odpadní voda), v biologických maticích, půdě, mořských sedimentech a v atmosféře [26, 27]. Výskyt těchto polutantů byl dokonce potvrzen i v těch nejvzdálenějších oblastech od průmyslových zdrojů, konkrétně v arktických oblastech. PFOS byl stanoven i v krvi polárních medvědů [28].

Perfluorované sloučeniny se ve velké míře používaly více než 40 let. V roce 2002 zahájila americká agentura životního prostředí (EPA) studii zaměřenou na stanovení PFOA a jí podobných sloučenin. Bylo prokázáno, že tyto látky jsou velice stálé, vyskytují se v životním prostředí a jsou bioakumulativní. EPA zjistila, že expozice PFOA může u hlodavců a primátů způsobit poškození jater, má vliv na endokrinní a reprodukční funkce a může vyvolat rakovinu [29-32]. O účincích na člověka se toho ví zatím velice málo [33].

## 2.2 Derivatizace, extrakce a stanovení perfluorovaných látek

Převedení netěkavých perfluorovaných kyselin na jejich těkavější deriváty je nutné pro analýzu těchto látek metodou plynové chromatografie. Derivatizace perfluorovaných kyselin na estery lze provádět např. reakcí s chlormravenčany. Takto je možno derivatizovat různé druhy kyselin (např. mastné kyseliny, oxokyseliny, aminokyseliny) na methylestery, ethylestery, butylestery atd. podle druhu činidla – chlormravenčanu. Jeho uhlovodíkový zbytek se váže na kyselinu za vzniku daného esteru. Do reakce dále vstupuje pyridin jako katalyzátor a příslušný alkohol, který slouží jako pomocná látka. Reakce probíhá v případě chlormravenčanu isobutylnatého následovně:



kde R je perfluorovaný řetězec dané kyseliny a činidlem je v tomto případě chlormravenčan isobutylnatý, vzniklé estery jsou tudíž isobutylestery [34-36].

Publikované jsou i další derivatizace na estery. Převedení perfluorovaných kyselin na methylestery účinkem diazomethanu jako činidla a následné stanovení v krvi, moči a játrech pomocí GC-ECD publikoval Belisle a Hagen [37].

Další využívanou metodou je reakce s methyljodidem, při které také dochází ke vzniku methylesterů. Tento derivatizační krok využila Moody [38] pro stanovení perfluorovaných látek ve vzorcích podzemní vody pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí s elektronovou ionizací (GC-EI-MS).

Reakční iontově-párová mikroextrakce na tuhé fázi (SPME) s využitím tetraalkylamoniových solí slouží k převedení mastných kyselin na jejich těkavé estery [39]. Jednoduchá reakce tetrabutylamoniové soli s lineárními alkylbenzensulfonáty na vlákně za vzniku butylesterů byla použita pro jejich kvantitativní stanovení [40-42] a lze ji využít současně jako prekoncentrační a derivatizační krok pro stanovení těchto látek ve vodných matricích [43].

Stanovením perfluorovaných látek ve vodě a sedimentu pomocí SPME následovanou derivatizací v nástřikovém prostoru plynového chromatografu s hmotnostní detekcí s negativní chemickou ionizací (GC-NCI-MS) se zabýval Alzaga a Bayona [44]. PFCA byly zkoumány v různých matricích, jako jsou povrchová voda, podzemní voda, biologický materiál a derivatizovány na příslušné metyl- a butylestery. Vysoká selektivita a účinnost této analytické metody byla zjištěna u butylesteru kyseliny perfluorhexanové (PFH<sub>x</sub>A-Bu). PFCA, které mají méně než 6 uhlíků, jako je například methylester kyseliny perfluorpentanové (PFPeA-Me), nebyly detegovány, protože během extrakce téměř vůbec nedošlo k jejich zadržení na pevné fázi. PFHpA byla objevena pouze v jednom vzorku, přesto ale kvantifikace nebyla možná, protože koncentrace byla velmi blízko meze stanovitelnosti. PFOA a PFDA byly detegovány ve vzorcích odpadní vody a jejich koncentrace se pohybovala v rozmezí od 0,34 do 4,32 µg/l pro PFOA a od 0,5 do 8,2 µg/l pro PFDA. Použitá metoda byla označena za spolehlivou, citlivou a selektivní techniku pro stanovení PFCA ve vzorcích vodného prostředí.

Nejnovější studie Alzagy a kol. [45] byla zaměřena na vývoj analytické metody stanovení perfluorovaných kyselin v mořských sedimentech po tlakové fluidní extrakci a následném převedení perfluorovaných kyselin (C<sub>7</sub> – C<sub>10</sub>) na methylestery účinkem methanolu a BF<sub>3</sub> s využitím headspace SPME. Ke stanovení byla opět použita

GC-NCI-MS. Vzorky povrchového sedimentu byly sbírány během roku 2002 a 2003 na rozdílných místech přístavu v Barceloně. Koncentrace PFOA a PFDA se pohybovaly od hodnot pod mezí detekce do průměrné koncentrace 12 ng/g. Detekce s NCI-MS je vhodnou metodou pro stanovení PFCA v mořských sedimentech s detekčními limity v jednotkách ng/g.

Scott a kol. [46, 47] se zabývali převedením perfluorovaných kyselin ( $C_2 - C_9$ ) na 2,4-difluoranilidy, které následně analyzovali využitím GC-MS. Vzorky byly odebrány z různých částí a hloubek kanadského jezera Ontario v roce 2000 a 2001. Derivatizace na 2,4-difluoranilidy byla provedena reakcí s 2,4-difluoranilinem a *N,N*-dicyklohexylkarbodiimidem. Nejvyšší koncentrace byly nalezeny pro trifluoroctovou (100 ng/l) a perfluorbutanovou kyselinu (> 5 ng/l). Pro perfluoroktanovou kyselinu byla koncentrace stanovena na 2,5 ng/l. Dále se v této práci autoři zabývají srovnáním metod GC-MS a LC-MS/MS pro analýzu PFOA v kalu torontské čističky odpadních vod. Koncentrace stanovené oběma metodami jsou téměř identické (GC-MS  $30,9 \pm 1,88$  ng/l a LC-MS/MS  $34,7 \pm 3,05$  ng/l).

Stanovení perfluorovaných látek pomocí HPLC s využitím hmotnostního detektoru nebo tandemové hmotnostní spektrometrie se provádí většinou přímo, bez derivatizačního kroku. Jako prekoncentrační krok je velmi často užívána extrakce na tuhé fázi. Weremiuk a kol. [10] se zabývali kvantitativním stanovením perfluorovaných surfaktantů (PFOA, PFOS) ve vodných vzorcích pomocí HPLC-ESI-MS/MS s použitím SPE. Vzorky byly odebrány na čtyřech různých místech řeky Roter Main, která protéká Bayreuthem v Německu. Dvě z vybraných míst odběru vzorků se nacházely nad čističkou odpadních vod a dvě po proudu řeky v různých vzdálenostech pod čističkou. Nejvyšší koncentrace obou stanovovaných chemikálií byly zaznamenány 100 m pod čističkou (14 ng/l PFOA a 26 ng/l PFOS). Dále po proudu řeky 1 km od čističky se již koncentrace snížily na 12 ng/l a 14,5 ng/l. Nad čističkou odpadních vod se stanovené koncentrace pohybovaly v rozmezí 2,2 – 2,6 ng/l pro PFOA a 3,2 – 3,4 ng/l pro PFOS, tedy mnohem nižší koncentrace než pod čističkou. Znamená to tedy, že velký podíl na kontaminaci řek perfluorovanými polutanty má městská odpadní voda.

Stanovení perfluoralkylsulfonátů, fluortelomerních sulfonátů, perfluorovaných karboxylových kyselin a některých fluorovaných alkylsulfonamidů bylo předmětem

studie Schulzové a kol. [48]. Jejich cílem bylo vyvinout jednoduchou a citlivou analytickou metodu pro stanovení fluorovaných chemikálií v odpadní vodě. Ke stanovení zmíněných sloučenin byla použita HPLC-ESI-MS/MS s velkým objemovým nástřikem (large volume injection), tedy bez použití SPE. Vzorby byly odebírány každý den po dobu 3 měsíců během roku 2004 v 10 různých městských čističkách odpadních vod v USA. Perfluoralkylsulfonáty (PFBuS, PFHxS, PFOS a PFDS) byly naměřeny v odpadní vodě všech čističek, přičemž nejčastěji byl detegován PFOS, který také často vykazoval nejvyšší koncentrace ze všech stanovovaných chemikálií (až 400 ng/l). Z fluortelomerních sulfonátů byl jako jediný detegován 1H,1H,2H,2H-perfluoroktansulfonát (6:2 FtS) s nejvyšší naměřenou koncentrací 370 ng/l. PFHxA, PFHpA, PFOA byly detegovány ve všech deseti čističkách, na rozdíl od PFNA a PFDA, které byly detegovány pouze v některých. Přítomnost perfluoroktansulfonamidu (PFOSA) na výstupu z čističek je důkazem toho, že PFOSA vzniká biodegradací fluorovaných prekurzorů vstupujících do čističek odpadních vod.

Stanovením perfluorovaných sloučenin, jako je PFOA, PFNA, PFOS, perfluorundekanová kyselina (PFUnA), perfluordodekanová kyselina (PFDoA), perfluortetradekanová kyselina (PFTA) a perfluordekansulfonát amonný (PFDS) se zabýval Higgins a kol. [49]. Jako vhodnou analytickou metodu pro jejich detekci a přesnou kvantifikaci v sedimentech a odpadní vodě si vybral HPLC-MS/MS s prekoncentračním krokem SPE. V březnu 2004 byly shromážděny vzorky sedimentů, odebrané 1 až 5 cm pod povrchem, z ústí řek a zálivů v okolí San Francisca. Další sedimenty z Palo Alto Medflats, Haywardu, Baltimoru a Corvallis byly odebrány od dubna 2002 do června 2004. Vzorby kalu z osmi čističek odpadních vod a usazené pevné látky z dalších tří čističek byly shromážděny od února 1998 do června 2004. Celková koncentrace perfluorkarboxylových sloučenin (PFCA) v odpadní vodě se pohybovala v rozmezí 73 – 3390 ng/g. Koncentrace v sedimentech byly na rozdíl od odpadní vody nižší, a to v rozmezí 0,14 – 16,0 ng/g.

V červnu 2000 došlo na torontském letišti L. B. Pearson k nehodě a následnému požáru, přičemž při hašení uniklo asi 22000 litrů hasící pěny, která obsahovala velké množství perfluorovaných sloučenin. Tyto látky se dostaly do říčky Etobicoke, ústící do jezera Ontario. Stanovením koncentrací PFOS a PFOA ve vzorcích povrchové vody odebrané z této říčky se zabývala Moody a kol. [26]. Byly použity dvě nezávislé

analytické metody, a to HPLC-MS/MS s předchozí prekoncentrací pomocí SPE a  $^{19}\text{F}$  NMR. První metodou byla zjištěna celková koncentrace perfluorovaných látek (součet koncentrací PFOS, PFHxS a PFOA) v rozmezí 0,011 – 2270  $\mu\text{g/l}$ , kde PFOS byl převládající detegovaná sloučeninou (90 % celkové koncentrace). Koncentrace PFOA se pohybovala mezi 0,011 a 11,3  $\mu\text{g/l}$  a zajímavým zjištěním byla přítomnost této látky i ve vzorcích odebíraných nad místem nehody. Nevýhodou této metody je její použitelnost pouze na vzorky, ve kterých se vyskytují perfluorované sloučeniny s 6 – 10 uhlíky. Druhá technika  $^{19}\text{F}$  NMR byla použita pro stanovení celkové koncentrace perfluorovaných sloučenin. Ta se pohybovala v rozmezí od 10  $\mu\text{g/l}$  (LOD) do 17000  $\mu\text{g/l}$ . Výhodou této metody je, že může poskytnout cenné informace v krátké době těsně po úniku do životního prostředí. Oproti kapalinové chromatografii je ale méně citlivá. Obě metody dovolují úplné vyhodnocení přítomnosti PFC ve vodných vzorcích a jsou použitelné i pro matrice jiných vzorků.

V další studii se Moody a kol. [20] zabývali dalším stanovením koncentrace perfluorovaných sloučenin v okolí Etobicoke Creek. Měření bylo zahájeno den po výše zmíněné havárii. Perzistence a toxicita perfluorovaných sloučenin byly zkoumány ve vzorcích povrchové vody a v játrech ryb (*Notropus cornutus*), kde se perfluorované látky nejvíce akumulují. Opět byly využity stejné metody, jako v předchozí práci. Celková koncentrace perfluoralkansulfonátů ( $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_6$  a  $\text{C}_8$ ) stanovená HPLC-MS/MS v játrech ryb se pohybovala od 2,00 do 72,9  $\mu\text{g/g}$  a totální koncentrace perfluorovaných kyselin ( $\text{C}_5$  –  $\text{C}_{14}$ ) se pohybovala mezi 0,07 a 1,02  $\mu\text{g/g}$ . Vzorky povrchové vody byly odebrány po dobu 153 dní. Celková koncentrace PFOS a PFHxS ve vodných vzorcích se pohybovala v rozmezí 0,017  $\mu\text{g/l}$  (LOD) do 2260  $\mu\text{g/l}$  a pro PFOA byla koncentrace stanovena 0,009  $\mu\text{g/l}$  (LOD) – 11,3  $\mu\text{g/l}$ . Bioakumulační faktor v rozmezí 6300 až 125000 byl vypočten pro PFOS ze zjištěných koncentrací ve vzorcích povrchové vody a jater ryb a naznačuje, že tato látka je velmi perzistentní a vysoce bioakumulativní v životním prostředí.

Stanovením koncentrace PFHxS, PFOS, PFOA v játrech ptáků se zabýval Kannan a kol. [19]. Pro měření byla využita metoda HPLC-ESI-MS/MS, kde jako prekoncentrační krok byla provedena iontově-párová extrakce za pomoci tetrabutylamoniumhydrogensulfátu. Ptáci byli odchyceni z průmyslových oblastí kolem velkých měst Tokya a Yokohamy a z chovné stanice Gytoku (Japonsko) a dále



v blízkosti řeky Sagami (Jap.) a Nakdong (Jižní Korea), které se nacházejí v blízkosti továren a rafinerií (celkem 83 ptáků šesti různých druhů). PFOS byl nalezen v játrech 95 % všech ptáků a jeho koncentrace se pohybovala nad mezí stanovitelnosti, která odpovídá 19 ng/g čerstvé tkáně. Nejvyšší naměřená koncentrace 650 ng/g PFOS byla zaznamenána u kormorána obecného (*Phalacrocorax carbo*), který žil u řeky Sagami. U ptáků z Japonska byly nalezené koncentrace obecně vyšší, než u korejských ptáků. PFOA a PFHxS byly nalezeny u 5 až 10 % vzorků, nejvyšší koncentrace odpovídaly 21 ng/g resp. 34 ng/g. Výsledky této studie poukazují na velmi rozšířený výskyt především PFOS v životním prostředí a jsou řádově srovnatelné s podobnými studiemi provedenými v Evropě a Spojených Státech.

Kannan a kol. [50] se také zabývali stanovením PFOS v lidské krvi s využitím stejné metody jako u vzorků ptačích jater. V této studii sledovali koncentrace PFOS a některých dalších perfluorovaných sloučenin ve 473 vzorcích lidské krve, plazmy a séra. Vzorky byly odebrány od dárců ze Spojených Států, Kolumbie, Brazílie, Belgie, Itálie, Polska, Indie, Malajsie a Koreje. Koncentrace PFOS byly nejvyšší ve vzorcích séra ze Spojených Států a Polska (> 30 ng/ml). U vzorků od dárců z Koreje, Belgie, Malajsie a Brazílie se koncentrace pohybovala v rozmezí 10 – 25 ng/ml. Koncentrace PFOS ve vzorcích séra a plazmy dárců z Itálie a Kolumbie se pohybovala od 4 do 10 ng/g. Nejnižší koncentrace PFOS byla naměřena ve vzorcích z Indie (< 3 ng/ml). Byly také stanoveny i další perfluorované látky, a to PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFDS, PFDoA a PFUnA. Jejich koncentrace byly ale 5× až 10× nižší než koncentrace PFOS.

Stanovení koncentrace PFHxS, PFOS, PFOA a PFOSA v lidské krvi bylo cílem i další studie, kterou zpracoval Hansen a kol. [51]. Provedl kvantitativní analýzu 65 vzorků lidského séra odebraného od dárců ve Spojených Státech, kteří nebyli vystaveni přímé expozici z průmyslové výroby. Pro měření byla využita již zmíněná metoda HPLC-ESI-MS/MS a jako prekoncentrační krok byla provedena iontově-párová extrakce účinkem tetrabutylamoniové soli. PFOS se vyskytl v nejvyšší koncentraci, která odpovídala 28,4 µg/l (tj. 18,4 µg/l organického fluoru). Ostatní stanovované látky byly nalezeny v mnohem nižších koncentracích. Celkové množství organického fluoru bylo stanoveno na 27 µg/l krevního séra.

Kärrmanová a kol. [29] ukázali, že SPE následovaná hmotnostní detekcí (HPLC-ESI-MS) může být použita pro stanovení perfluorovaných látek v lidské krvi. Tato metoda byla použita pro 20 vzorků krve švédské populace (věk 24 – 72 let) odebrané v letech 1997 - 2000. V porovnání s ostatními publikovanými analytickými metodami pro stanovení perfluorovaných chemikálií v lidských tkáních jde o první publikaci s použitím metody SPE na C<sub>18</sub> fázi pro stanovení vzorků krve následovanou HPLC-MS s negativní elektrosprejovou ionizací a jednoduchým kvadrupólem. Velkou výhodou metody je možnost průběžného sledování složení vzorku krve. Tato jednoduchá a validovaná metoda je rychlá a přesná s nízkými limity detekce (0,1 – 0,5 µg/l). Validace byla provedena v rozmezí 0,3 – 194 µg/l. Z 12 stanovovaných perfluorovaných chemikálií bylo detegováno 11 PFC a čtyři z nich byly kvantifikovány ve všech zkoumaných vzorcích. Těmi jsou PFOS (5 – 37 µg/l), PFHxS (0,4 – 28 µg/l), dále pak PFOA (0,8 – 12 µg/l) a PFNA (0,1 – 1,9 µg/l).

Popis jednoduché a automatizovatelné analytické techniky pro stanovení PFOA a její amonné soli (APFOA) v různých biologických matricích byl předmětem práce Flahertyho a kol. [18]. Měření těchto sloučenin bylo provedeno v lidském séru a plazmě metodou standardního přidavku. Jako interní standard byla použita izotopicky značená <sup>13</sup>C-PFOA. Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS) má oproti plynové chromatografii pro stanovení stopových množství v biologických matricích výhodu jednodušší přípravy vzorku a snadnější automatizaci. Limit stanovitelnosti těchto sloučenin byl 0,5 µg/l.

Cílem studie Olsena a kol. [52] bylo sledování změn koncentrací PFOS, PFOA, *N*-metylperfluoroktansulfonamidacetátu (M 570) a dalších fluorovaných sloučenin v lidské krvi. Vzorky krve byly odebrány dobrovolníkům ve Washington County v Marylandu, Pensylvánii a Virginii v roce 1974 a 1989 (celkem 356 vzorků). Hlavním úkolem studie bylo zjistit, jak se během těchto let změnila koncentrace perfluorovaných sloučenin v lidské krvi. Vzorky byly analyzovány HPLC-MS/MS.

Tabulka 2.2 – Porovnání naměřených koncentrací perfluorovaných látek v krvi v roce 1974 a 1989

	<i>Koncentrace (<math>\mu\text{g/l}</math>)</i>	
	<i>Rok 1974</i>	<i>Rok 1989</i>
PFOS	29,5	34,7
PFOA	2,3	5,6
M 570	1,0	1,0

Podle této studie můžeme říct, že koncentrace PFOS a PFOA během let 1974 a 1989 významně vzrostla narozdíl od koncentrace M 570, která se pohybovala kolem meze stanovitelnosti (LOQ = 1,0  $\mu\text{g/l}$ ). Data z roku 1989 byla dále porovnána s koncentracemi perfluorovaných sloučenin, stanovených ze vzorků krve od 108 dárců ze stejných oblastí v roce 2001. Kromě M 570 nebyl zaznamenán žádný podstatný rozdíl mezi koncentracemi PFOS a PFOA ve vzorcích z roku 1989 a 2001.

Polští vědci se zabývali stanovením  $\text{C}_6$  až  $\text{C}_{12}$  aniontů perfluorovaných kyselin pomocí CZE s nepřímou UV detekcí ve vodných vzorcích [53]. Nosným elektrolytem byl tris(hydroxymethyl)aminomethan o koncentraci 50 mmol/l a 50%-ní methanol a jako chromofor byla použita 2,4-dinitrobenzoová kyselina. Detekční limit pro stanovované látky se pohyboval mezi 0,6 a 2,4 mg/l. Jak je patrné, tato metoda zatím nedosahuje takové citlivosti, jako již prověřené GC a HPLC techniky.

### 2.3 Plynová chromatografie

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

## Retenční charakteristiky

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

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

$t_R$  – retenční čas je celková doba, po kterou analyt setrvá v koloně

$t_R'$  – redukovaný retenční čas odpovídá době, kterou stráví analyt ve stacionární fázi

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

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

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

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

## Teorie pater

Pro teoretický popis separačního procesu na základě experimentálních dat byly vypracovány dvě základní teorie GC. Teorie pater, odvozená z principů popisu účinnosti destilačních kolon, slouží k výpočtu a popisu účinnosti separačního systému, která je určena délkou separačního systému – kolony  $L$ , jejím průměrem, druhem stacionární fáze a dalšími faktory. Je vyjádřena buď jako výškový ekvivalent teoretického patra  $H$  nebo jako počet teoretických pater  $n$ , resp. počet efektivních teoretických pater  $n_{eff}$ .

$$n = 5,545 (t_R / w_{1/2}) \quad (1-3)$$

$$n_{eff} = 5,545 (t_R' / w_{1/2}) \quad (1-4)$$

kde  $w_{1/2}$  je šířka píku v polovině výšky.

Známe-li počet pater a délku kolony, lze vypočítat hodnotu výškového ekvivalentu teoretického patra  $H$  ze vztahu:

$$H = L/n \quad (1-5)$$

## Van Deemterova teorie

Model teoretických pater názorně popisuje chromatografické chování látek, avšak použité předpoklady jsou příliš idealistické. Přiblížení se skutečným dějům v chromatografické koloně představuje druhá ze základních teorií, kinetická van Deemterova teorie, která bere v úvahu neideálnost chromatografického procesu. Tato teorie předpokládá, že k rozšíření zóny analytu při průchodu kolonou přispívají tři základní děje:

1. Vířivá difúze v mobilní fázi související s nehomogenitou náplně. Nepravidelně uspořádané částice vytvářejí síť kanálků nestejně velikosti, takže molekuly vzorku, procházející kanálky se pak pohybují různou rychlostí a díky tomu dochází k podélnému rozmytí zón separovaných látek. Vířivá difúze je závislá na velikosti částic stacionární fáze a její příspěvek k výšce teoretického patra se vyjadřuje výrazem:

$$H_F = 2\lambda d_p, \quad (1-6)$$

kde  $\lambda$  vyjadřuje způsob uložení náplně a  $d_p$  je průměr zrn. U kapilárních kolon se tento člen zanedbává.

2. Molekulární difúze v mobilní fázi – molekuly vzorku přecházejí difúzí z místa o vyšší koncentraci do míst s nižší koncentrací. Stupeň rozmytí zóny separované látky závisí na velikosti difúzního koeficientu v plynné fázi a na době strávené v koloně (závisí tedy na rychlosti mobilní fáze  $u$ ) Příspěvek k výšce teoretického patra lze vyjádřit výrazem:

$$H_L = \frac{2\gamma D_G}{u} \quad (1-7)$$

kde  $\gamma$  je labyrintový faktor,  $D_G$  je difúzní koeficient v mobilní fázi a  $u$  je lineární průtoková rychlost mobilní fáze.

3. Odpor proti převodu hmoty v mobilní a stacionární fázi. První z nich je dán existencí rychlostního gradientu mobilní fáze v parabolickém profilu proudění, a to jak mezi částicemi stacionární fáze, tak i v kapiláře. Na povrchu pevné fáze je díky viskozitnímu efektu rychlost mobilní fáze prakticky nulová, kdežto uprostřed profilu je maximální. Stupeň rozmytí zóny separované látky závisí na době strávené v koloně, ale také na velikosti difúzního koeficientu v mobilní fázi. Příspěvek k výšce teoretického patra je vyjádřen vztahem:

$$H_m = \frac{k^2}{100(1+k)^2} \frac{d_p^2}{D_G} u \quad (1-8)$$

kde  $k$  je retenční faktor.

Odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi je způsoben tím, že molekuly vzorku pronikají různě hluboko do stacionární fáze. V případě kapilárních kolon s navázaným filmem kapaliny dochází k rozmytí zón separované látky díky zpoždování molekul pronikajících hlouběji do vrstvy kapaliny. Příspěvek k výšce teoretického patra je dán vztahem:

$$H_s = \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_L} u \quad (1-9)$$

kde  $d_f$  je tloušťka filmu zakotvené stacionární fáze a  $D_L$  je difúzní koeficient v kapalině.

Van Deemterova rovnice je pak rovna součtu všech těchto příspěvků:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_G}{u} + \frac{k^2}{100(1+k)^2} \frac{d_p^2}{D_G} u + \frac{2}{3} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_L} u \quad (1-10)$$

### Charakteristiky měřicího zařízení

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

$$S_i = (Ka_i) c_i \quad (1-11a)$$

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

Koeficient linearity  $l$  je definován jako směrnice funkční závislosti  $\log S = f(\log c_i)$  a lze ho vypočítat ze zlogaritmované formy rovnice 1-11a:

$$\log S_i = \log(Ka_i) + l \log c_i \quad (1-11b)$$

$$l = \frac{\log S_i - \log(Ka_i)}{\log c} \quad (1-12)$$

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

Lineární dynamický rozsah je rozsah množství analytu, v němž je citlivost detektoru konstantní v rámci zvolené chyby lineariry, proto pro měřicí zařízení může existovat několik lineárních dynamických rozsahů.

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

#### V ý p o č e t $LOD$ a $LOQ$

V případě hodnoty koeficientu lineariry  $l$  blízkému jedné mohou být mez detekce a mez stanovitelnosti vypočítány ze společné směrodatné odchylky regrese  $SDR$  (odpovídá hodnotě  $SD$  lineární regrese v anglické verzi programu Origin), kterou získáme lineární regresi závislosti signálu na koncentraci. Pro výpočet  $LOD$  je pak brána hodnota signálu rovna  $3 \times SDR$  a pro  $LOQ$  hodnota  $10 \times SDR$ . Dosadíme-li za nejmenší signál trojnásobek  $SDR$  a za koncentraci  $LOD$  do rovnice 1-11a, pak pro  $l \sim 1$  dostaneme:

$$LOD = \frac{3SDR}{(Ka_i)} \quad (1-13)$$

Obdobně, dosadíme-li za nejmenší signál pro kvantifikaci desetinásobek  $SDR$  a za koncentraci  $LOQ$  do rovnice 1-11a, pak pro  $l \sim 1$  dostaneme:

$$LOQ = \frac{10SDR}{(Ka_i)} \quad (1-14)$$

Citlivost měřicího zařízení nejsnáze zjistíme z rovnice 1-11b kalibrační závislosti experimentálních dat. Pokud se lineariry výrazněji odchylují od jedné, je nutné přejít k výpočtu  $LOD$  a  $LOQ$  z logaritmické závislosti plochy píku na logaritmu koncentrace, dle vztahu (1-11b). Lineární regresi této logaritmické závislosti získáme společnou

směrodatnou odchylku regrese  $SDR'$ , která je ovšem odlišná od  $SDR$  zmíněné v předchozím případě. Pak je za hodnotu signálu dosazeno  $3 \times SDR'$  pro  $LOD$  a  $10 \times SDR'$  pro  $LOQ$ . Po úpravě dostáváme vztahy pro výpočet  $LOD$  (1-16) a  $LOQ$  (1-17) [54-56].

$$LOD = \sqrt[3]{\frac{10^{3SDR'}}{Ka_i}} \quad (1-16)$$

$$LOQ = \sqrt[10]{\frac{10^{10SDR'}}{Ka_i}} \quad (1-17)$$



## 3. Experimentální část

### 3.1 Standardy a chemikálie:

Použity byly tyto standardy: kyselina myristová (čistá, Lachema, Neratovice, Česká Republika), methylester kyseliny myristové (99%, Poly Science, Kit 611CX, Lot. no: 7800 Merrimac, Ave. Niles, IL 60714), kyselina pe fluorheptanová (> 95%), kyselina perfluoroktanová (95%, obě Fluka, Lancaster), kyselina pe fluorheptanová (> 95%), kyselina perfluornonanová (97%), kyselina perfluordekanová (98%) a kyselina perfluordodekanová (95%, všechny Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Použitými chemikáliemi byl hexan (99%, Baker Analyzed, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holandsko), acetonitril (p.a., Lichrosolv, Merck, Darmstadt, Německo), methanol (> 99,9%, Chromasolv, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), heptan (> 99%, Merck, Schuchardt, Německo), toluen, chloroform, dichlormetan, aceton, diethylether, isobutylalkohol (všechny p.a., Lach.-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká Republika), kyselina sírová (95-97%, Merck, Darmstadt, Německo), tetrabutylamoniumbromid (>98%, Fluka, Steinheim, Německo), pyridin (99%), chlormravenčan methylnatý (99%), chlormravenčan isobutylnatý (98%, všechny Aldrich, Steinheim, Německo) a voda (Milli-Q Plus, Millipore).

### 3.2 Přístrojové vybavení:

Analýzy byly prováděny na plynovém chromatografu PU 4600, (Unicam Analytical Systems, York Street, Cambridge, CB 12PX, Velká Británie) s plamenově ionizačním detektorem (FID) a detektorem elektronového záchyty (ECD). Nosným plynem byl dusík (4.7, Linde Technoplyn). Většina měření byla uskutečněna na nízko polární koloně SPB-5 (Supelco, Bellefonte, USA) o délce 15 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25  $\mu\text{m}$  (5 % difenyl, 95 % dimethylpolysiloxan). Při separaci na různé polárních stacionárních fázích byly instalovány tyto kolony: SPB-1 (Supelco, 30 m, 0,25 ID, film 0,25  $\mu\text{m}$ , dimethylpolysiloxan), SPB-20 (Supelco, 15 m, 0,25 ID, film 1  $\mu\text{m}$ , 20 % difenyl, 80 % dimethylpolysiloxan), SPB-35 (Supelco, 30 m, 0,25 ID, film 1  $\mu\text{m}$ , 35 % difenyl, 65 % dimethylpolysiloxan), ZB-1701 (Phenomenex, Torrance, USA, 15m, 0,25 ID, film 0,25  $\mu\text{m}$ , 14 % kyanopropylfenyl, 86 % dimethylpolysiloxan), Supelcowax 10 (Supelco, 30 m, 0,25 ID, film 0,25  $\mu\text{m}$ , polyethylenglykol). Sběr dat a

zpracování výsledků bylo provedeno v programu CSW 1.7 (DataApex s.r.o., Jinonice, Česká Republika). Dále bylo měřeno na plynovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem GCMS-GP5050A, Shimadzu (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) s kolonou DB-5MS (Agilent Technologies, USA) délky 30 m o vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25  $\mu\text{m}$  (5 % difenyl, 95 % dimethylpolysiloxan). Nosným plynem bylo helium (6.0, Linde). K dispozici byl hmotnostní spektrometr s EI ionizací (energie 70 eV). Ke sběru dat sloužil program LabSolution (GCMSsolution 1.0, Shimadzu). K interpretaci hmotnostních spekter byla použita knihovna spekter NIST 05 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, National Institute of Standards and Technology, USA). Biologické vzorky byly zlyofilizovány v lyofilizátoru (Christ, Alpha 1-4, Osterode, Německo). Při optimalizaci byly vzorky zahřívány na digitálním termostatu (SBH130DC, Stuart, Barloworld Scientific, Staffordshire, Velká Británie). K zakoncentrování vzorků byla použita rotační odparka (Rotavapor EL 130, Büchi, Flawil, Švýcarsko). Při Soxhletově extrakci byly vzorky zahřívány v topných hnízdech LTHS 250 a 1000 (Brněnská Drutěva v.d., Česká Republika). Na měření pH byl použit pH-metr (Jenway 3510 pH, East Port Praha, Česká Republika). Vzorky byly vytřepávány na třepače (Vortexgenie 2, Scientific Industries, Hampshire, Velká Británie) a promíchávány v ultrazvukové lázni (Sonorex RK 100, Bandelin, Barlen, Německo). K pipetování sloužily automatické pipety 1-5 ml, 100-1000  $\mu\text{l}$  a 10-100  $\mu\text{l}$  (všechny Biohit, Helsinky, Finsko), 100  $\mu\text{l}$  (Hamilton, Reno, USA), 50-250  $\mu\text{l}$  (Eppendorf, Hamburg, Německo), 5-40  $\mu\text{l}$  (Labsystems, Helsinky, Finsko) a 5  $\mu\text{l}$  (Plastomed, Polsko). K dávkování do plynového chromatografu byla používána 5  $\mu\text{l}$  stříkačka, plynotěsná 10  $\mu\text{l}$  stříkačka (obě Hamilton, Reno, USA) a plynotěsná 100  $\mu\text{l}$  stříkačka (Hamilton-Bonaduz, Švýcarsko).

### **3.3 Odběr reálných vzorků:**

Voda byla odebrána 24.10.2006 z rybníků v oblasti Nadějské soustavy, Rybářství Třeboň, a.s., středisko Lomnice nad Lužnicí na velikostně vyrovnaných rybnících Pěšák a Baštýř o průměrné výměře 2,35 ha. Tyto rybníky se nachází pod rybníkem Rod. Biologické vzorky (kapři a štiky) byly odebrány tamtéž. Svalové tkáně kapra a štiky byly nakrájeny, zmrazeny a zlyofilizovány (lyofilizace po dobu 48 hod.). Voda z Vltavy odebrána 15.3.2007 pod železničním mostem na Výtoni, Praha.

### **3.4 Příprava zásobních roztoků**

#### **3.4.1 Zásobní roztok methylesteru kyseliny myristové v hexanu**

Zásobní roztok methylesteru kyseliny myristové byl připraven tak, že 0,0524 g látky bylo doplněno do 10 ml hexanem (zásobní roztok o koncentraci 5,24 mg/ml).

#### **3.4.2 Zásobní roztok kyseliny myristové v acetonu**

Byl připraven zásobní roztok kyseliny myristové pro derivatizace na methylester a isobutylester (0,1002 g kyseliny bylo doplněno do 10 ml acetonem, tj. zásobní roztok o koncentraci 10,02 mg/ml).

#### **3.4.3 Zásobní roztoky perfluorovaných kyselin v acetonitrilu**

Byly připraveny zásobní roztoky 5 perfluorovaných kyselin - kyseliny perfluorheptanové (PFHpA), kyseliny perfluoroktanové (PFOA), kyseliny perfluornonanové (PFNA) kyseliny perfluordekanové (PFDA) a kyseliny perfluordodekanové (PFDoA). Poslední z nich byla získána až v průběhu práce, proto se vyskytuje až v druhé polovině analýz. Bylo naváženo asi 50 mg přesně jednotlivých kyselin a kvantitativně byly převedeny do polypropylenových odměrek a doplněny do 5 ml acetonitrilem. Takto byly získány zásobní roztoky PFHpA (10,12 mg/ml), PFOA (10,12 mg/ml), PFNA (10,00 mg/ml) PFDA (10,01 mg/ml). PFDoA byla z důvodu úspory standardu připravena v poloviční koncentraci (5,02 mg/ml).

### **3.5 Derivatizace**

#### **3.5.1 Derivatizace kyseliny myristové na methylester a isobutylester**

Reakční médium bylo připraveno o tomto složení: 10  $\mu$ l zásobního roztoku kyseliny myristové, 78  $\mu$ l acetonitrilu, 8  $\mu$ l pyridinu a 4  $\mu$ l methanolu. K reakčnímu médiu o objemu 100  $\mu$ l bylo přidáno 5  $\mu$ l chlormravenčanu methylnatého (MCF) jako činidla. Tato směs byla promíchána po dobu 20 s v ultrazvukové lázni, pak bylo ke směsi přidáno 100  $\mu$ l hexanu a na třepače byl po dobu 1 minuty vytřepáván vzniklý methylester do hexanu. Pro měření je potřeba jen horní hexanová fáze, která byla pipetou odebírána do nové čisté vialky. Tato hexanová fáze byla dávkována do plynového chromatografu. Tento postup byl opakován vždy pro nové měření. To znamená, že pro každé měření byla provedena nová derivatizace. V případě derivatizace

na isobutylester byl postup práce stejný, jen byl nahrazen methanol za isobutylalkohol a jako činidlo byl použit chlormravenčan isobutylnatý (IBCF).

### **3.5.2 Derivatizace perfluorovaných kyselin na isobutylestery**

Derivatizace byla prováděna stejně jako u kyseliny myristové, jen s tím rozdílem, že veškeré operace byly prováděny v polypropylenových vialkách a vše bylo připravováno ve dvojnásobném množství z důvodu jednodušší a přesnější práce. Reakční médium bylo připravováno o tomto složení: 20  $\mu$ l roztoku kyseliny v acetonitrilu, 156  $\mu$ l acetonitrilu, 16  $\mu$ l pyridinu a 8  $\mu$ l isobutylalkoholu. K reakčnímu médiu o objemu 200  $\mu$ l bylo přidáno 10  $\mu$ l chlormravenčanu isobutylnatého (IBCF) jako činidla. Směs byla promíchána po dobu 20 s v ultrazvukové lázni, pak bylo přidáno 200  $\mu$ l hexanu a na třepače po dobu 1 minuty byl vzniklý isobutylester vytřepán do hexanu.

## **3.6 GC analýza**

### **3.6.1 GC-FID**

Analýzy kyseliny myristové a jejích esterů byly měřeny na plynovém chromatografu PU 4600 s plamenově ionizačním detektorem (FID). Pracovní tlak nosného plynu byl 25 kPa, u plamenově ionizačního detektoru byl tlak vzduchu 16 kPa, tlak vodíku 10 kPa a make-up dusíku 7 kPa. Teplota detektoru byla 250 °C a teplota injektoru 250 °C. Byl nastaven tento teplotní program: počáteční teplota 50 °C (izotermicky 2 min), pak vzrůst po 30 °C za minutu na konečných 240 °C. Průtoková rychlost kolonou byla 0,48 ml/min. Mrtvý čas methanu je při této průtokové rychlosti 1,54 min. Byl nastaven split poměr 1:50.

### **3.6.2 GC-ECD**

Na plynovém chromatografu PU 4600 s detektorem elektronového záchytu (ECD) byly prováděny analýzy perfluorovaných kyselin a jejich isobutylesterů. Měřeno bylo za těchto podmínek: teplota detektoru 300 °C, teplota injektoru 250 °C, měřicí proud detektoru 120 (relativní škála na přístroji), make-up nosného plynu (dusíku) 30 kPa a pomocí regulátoru tlaku byl nastaven pracovní tlak na 75 kPa, resp. 25 kPa, který odpovídá průtoku kolonou 1 ml/min (resp. 0,43 ml/min). Mrtvý čas vzduchu je při této průtokové rychlosti 0,72 min (resp. 1,84 min). Teplotní program byl nastaven

takto: počáteční teplota 60 °C (izotermicky 5 min), nárůst po 10 °C za minutu na konečnou teplotu 170 °C pro split mód, pro splitless mód byla nastavena počáteční teplota na 50 °C a byla snížena doba, při které tato teplota zůstává neměnná (1 min), poté začne růst teplota po 10 °C/min do 170 °C. Splitter se otevřel po 1 minutě a zbytek analýzy zůstává otevřený.

### 3.6.3 GC-MS

Isobutylestery po derivatizacích byly proměřeny i na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem. Pro všechna měření bylo zvoleno toto nastavení: teplota injektoru 250 °C, teplota MS interface 300 °C, split poměr 1:50, konst. průtok kolonou: 1 ml/min.

Na první předběžná měření byl použit scan mód, který proměřil všechny hodnoty m/z od 40 do 560 rychlostí 1000 m/z s<sup>-1</sup> (pro analýzu isobutylesteru PFD<sub>o</sub>A ve scanu byly proměřeny hodnoty m/z od 40 do 700 rychlostí 2000 m/z s<sup>-1</sup>). Teplotní program byl nastaven stejný jako u GC-ECD od 60 °C (izotermicky 5 min) do 170 °C s teplotní rampou po 10 °C/min.

## 3.7 Extrakce

### 3.7.1 Extrakce vodné fáze organickým rozpouštědlem

Do 100 ml odměrné baňky bylo přidáno 10 µl zásobního roztoku PFOA a doplněno po rysku redestilovanou vodou (výsledná koncentrace PFOA 1 µg/ml). K tomuto množství bylo přidáno 26 ml koncentrované kyseliny sírové pro okyselení roztoku na pH = -1. Tato směs byla vytřepávána do 10 ml hexanu po dobu 10 minut. Vyextrahovaný hexan byl oddělen do srdcové baňky a extrakce byla se stejným vzorkem ještě dvakrát zopakována a extrakty spojeny. Hexan byl pak do sucha odpařen na rotační odparce. Baňka byla vypláchnuta 1 ml acetonitrilu a z toho roztoku bylo odebíráno 20 µl do derivatizační směsi. Stejný postup byl prováděn i s dalšími rozpouštědly – dichlormethanem a toluenem.

### 3.7.2 Iontově-párová extrakce

Na extrakci reálných vzorků vody byla použita iontově-párová extrakce. Ke 100 ml vzorku vody byl přidán 1 ml roztoku tetrabutylamoniumbromidu o koncentraci 1 mol/l

(výsledná koncentrace 0,01 mol/l, respektive 3,22 mg/ml) a 10 µl zásobního roztoku kyseliny perfluordodekanové jako interního standardu IS (výsledná koncentrace 0,5 µg/ml). Tato směs byla vytřepávána po dobu 10 minut do 20 ml diethyletheru. Poté byla organická fáze oddělena a byla odpařena do sucha proudem dusíku při 28 °C. Vysušený extrakt byl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu a z toho bylo bráno 20 µl do derivatizační směsi. Nejprve byl takto připraven blank z redestilované vody s přídavkem PFD<sub>o</sub>A jako interního standardu, poté se přešlo k reálným vzorkům vody z rybníka a z Vltavy. Pro vzorek Vltavy bylo navíc provedeno zakoncentrování s faktorem 1000 tak, že celkový objem 1 litr byl rozdělen na 10 dílů po 100 ml a ty byly jednotlivě vytřepávány stejně jako při předchozích extrakcích. Extrakty byly postupně sbírány do jedné nádoby a odpařeny do sucha. Interní standard byl desetkrát naředěn a přidáván do každého 100 ml podílu vzorku pro extrakci. Celkový vysušený extrakt byl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu a do derivatizační reakce bylo opět bráno 20 µl.

### **3.7.3 Soxhletova extrakce**

Soxhletova extrakce byla použita pro biologické vzorky. Zlyofilizované vzorky kaprů a štik byly extrahovány v Soxhletově extraktoru po dobu 24 hodin. Jako rozpouštědlo byl použit methanol a heptan. K dispozici byly extraktory s objemem 150 ml a 300 ml rozpouštědla. Do extraktorů bylo přidáno 250 µl (150 ml extraktor) nebo 500 µl (300 ml extraktor) zásobního roztoku PFD<sub>o</sub>A jako IS. Extrakty byly na rotační odparce při teplotě 50 °C a sníženém tlaku zahuštěny, kvantitativně převedeny do odměrné banky a doplněny rozpouštědlem po rysku. Tak byl získán extrakt s prekoncentračním faktorem 8. Takto připravené vzorky byly brány do derivatizační reakce.

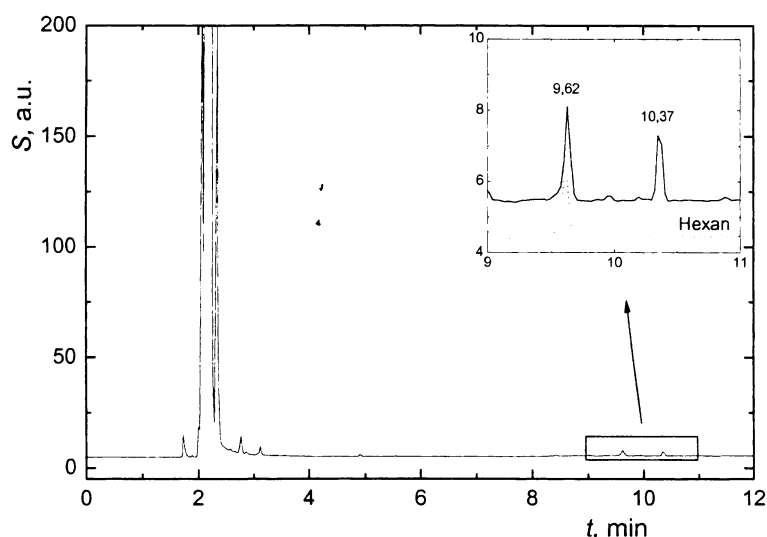
## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1 Analýza esterů kyseliny myristové

Pro seznámení se s přístrojem a k ověření jeho funkčnosti byla nejprve zahájena práce s jednoduchou mastnou kyselinou a jejími estery. Kyselina myristová byla vybrána proto, že byl k dispozici její standard, standard jejího methylesteru a její derivatizace na methylestery byla ověřená a spolehlivá.

#### 4.1.1 Analýza roztoku standardu methylesteru kyseliny myristové

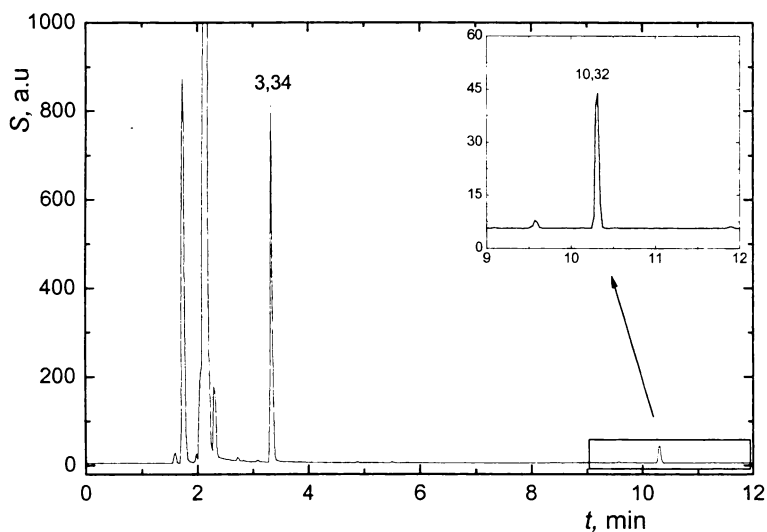
Analýzou zředěného roztoku methylesteru kyseliny myristové (obrázek 4.1.1) a čistého rozpouštědla, tedy hexanu (v obrázku 4.1.1 tečkovaně) bylo prokázáno, že methylester kyseliny myristové je pík s retenčním časem 10,37 min.



Obrázek 4.1.1 – Chromatogram roztoku standardu methylesteru kyseliny myristové (52,4  $\mu\text{g/ml}$ ) a čistého hexanu (tečkovaně), dávkovaný objem 1  $\mu\text{l}$ , teplota detektoru (FID) 250  $^{\circ}\text{C}$ , teplota injektoru 250  $^{\circ}\text{C}$ , teplotní program: 50  $^{\circ}\text{C}$  (2 min) do 240  $^{\circ}\text{C}$  (30  $^{\circ}\text{C/min}$ ), objemová průtoková rychlost 0,48 ml/min a split poměr 1:50

#### 4.1.2 Analýza esterů kyseliny myristové připravených derivatizací

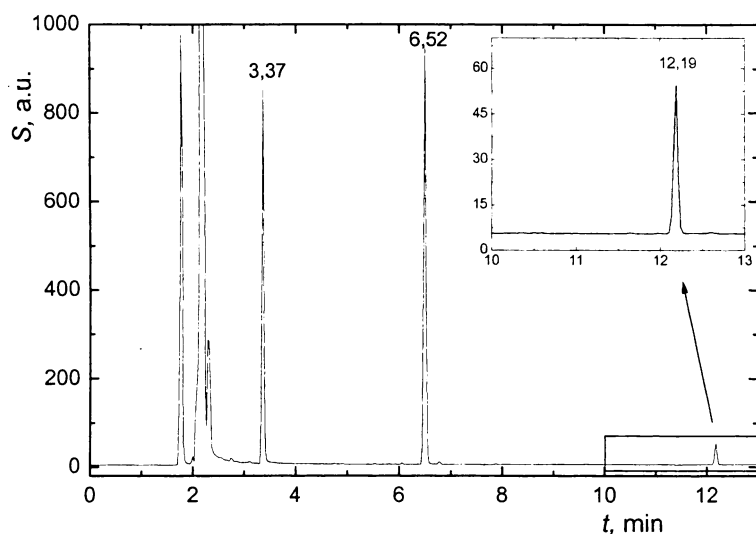
Derivatizace byla ověřena na kyselině myristové, která byla převedena na methylester účinkem MCF (obrázek 4.1.3) a na isobutylester pomocí IBCF (obrázek 4.1.4).



Obrázek 4.1.3 – Chromatogram methylesteru kyseliny myristové (10 mg/ml) derivatizované chlormravenčanem methylnatým, podmínky měření stejné jako u obrázku 4.1.1

Pík methylesteru kyseliny myristové měl retenční čas 10,32 min (obrázek 4.1.3), isobutylester za stejných podmínek retenční čas 12,19 min (obrázek 4.1.4).





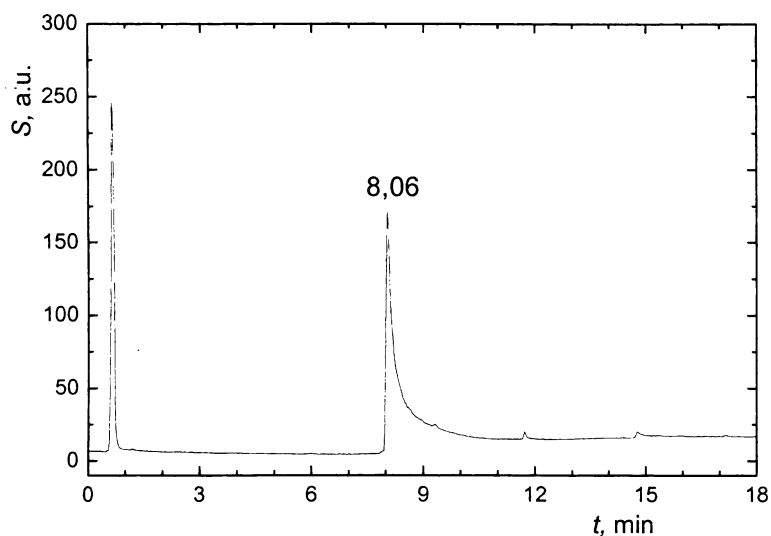
Obrázek 4.1.4 – Chromatogram isobutylesteru kyseliny myristové (10 mg/ml) derivatizované pomocí chlormravenčanu isobutylnatého, podmínky měření stejné jako u obrázku 4.1.1

Derivatizací kyseliny myristové na methylester a isobutylester bylo ověřeno, že tuto metodu využívající chlormravenčany jako činidla, lze využít pro mastné kyseliny.

## 4.2 Analýza esterů perfluorovaných kyselin

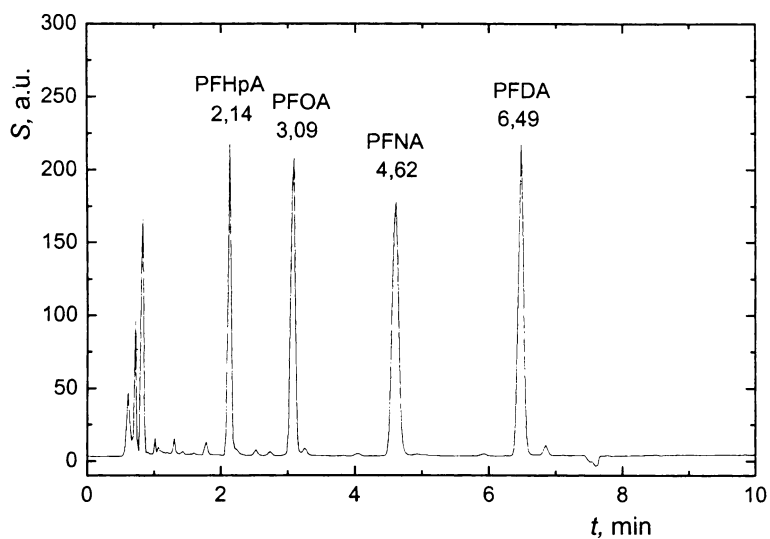
### 4.2.1 Analýza perfluorovaných kyselin a jejich isobutylesterů pomocí GC-ECD

Nejprve byly proměřeny zásobní roztoky kyselin desetkrát zředěné acetonitrilem. Píky volných kyselin vlivem silných polárních interakcí na málo polární koloně velmi chvostují a nelze je proto správně integrovat. Jako příklad je zde uveden chromatogram volné kyseliny perfluoroktanové PFOA (obrázek 4.2.1).



Obrázek 4.2.1 – Chromatogram volné kyseliny perfluoroktanové (1 mg/ml v acetonitrilu), dávkovaný objem 1  $\mu$ l, teplota detektoru (ECD) 300  $^{\circ}$ C, teplota injektoru 250  $^{\circ}$ C, teplotní program: 60  $^{\circ}$ C (5 min) do 170  $^{\circ}$ C (10  $^{\circ}$ C/min), objemová průtoková rychlost 1,02 ml/min a split poměr 1:50

Proto bylo nutné přejít k jejich derivatizaci, která byla ověřena na kyselině myristové. Bohužel se ukázalo, že methylestery perfluorovaných kyselin jsou za daných podmínek příliš těžké a z kolony vycházejí s rozpouštědlem, proto byly dále použity pouze isobutylestery. Derivatizace byla provedena jednak pro jednotlivé kyseliny s jejich desetkrát zředěnými zásobními roztoky, tak i pro jejich směsný vzorek (obrázek 4.2.2), kdy bylo do reakčního média přidáno 5  $\mu$ l zásobního roztoku každé kyseliny.

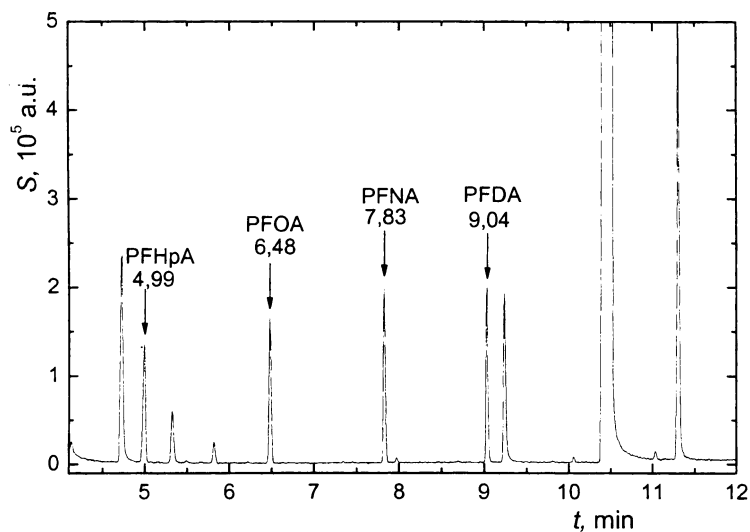


Obrázek 4.2.2 – Chromatogram směsného vzorku perfluorovaných kyselin (všechny po 10 mg/ml) derivatizovaných na isobutylestery, podmínky měření stejné jako u obrázku 4.2.1

Retenční časy isobutylesterů jednotlivých perfluorovaných kyselin za daných podmínek odpovídají: 2,14 min (PFHpA), 3,09 min (PFOA), 4,62 min (PFNA) a 6,49 min (PFDA).

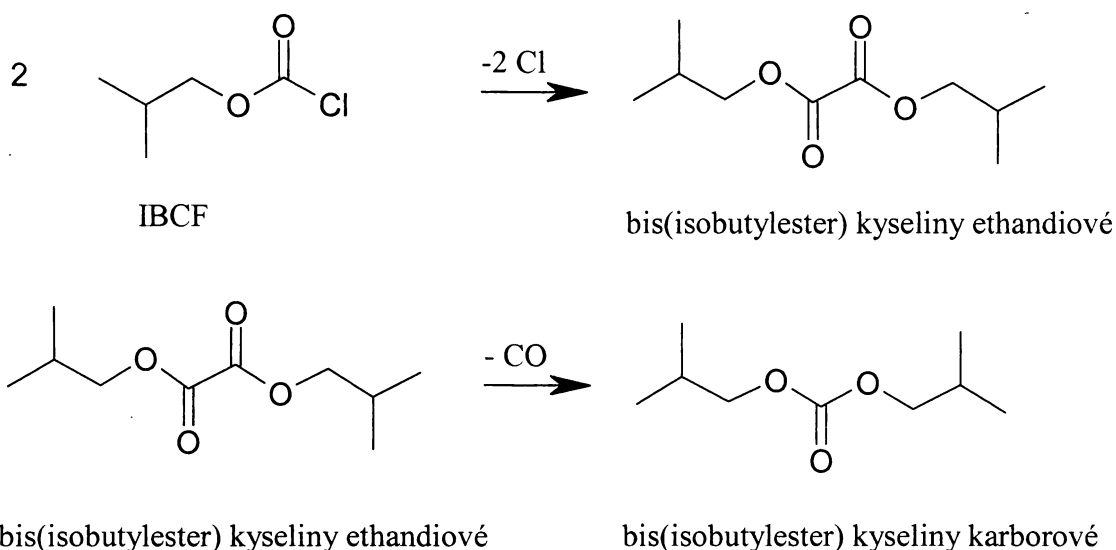
#### 4.2.2 Analýza perfluorovaných kyselin a jejich isobutylesterů pomocí GC-MS

Stejný směsný vzorek isobutylesterů 4 kyselin byl proměřen i na GC-MS (obrázek 4.2.3). Analýzy na GC-MS umožňují identifikaci látek buď vyhodnocením hmotnostních spekter příslušných píků nebo porovnáním naměřených spekter s uloženými spektry v knihovně NIST. V této knihovně bohužel spektra isobutylesterů PFC zanesena nejsou. Vyhodnocením jednotlivých molekulových fragmentů naměřených spekter ale bylo ověřeno, že produkty derivatizačních reakcí jsou opravdu požadované isobutylestery daných perfluorovaných kyselin.



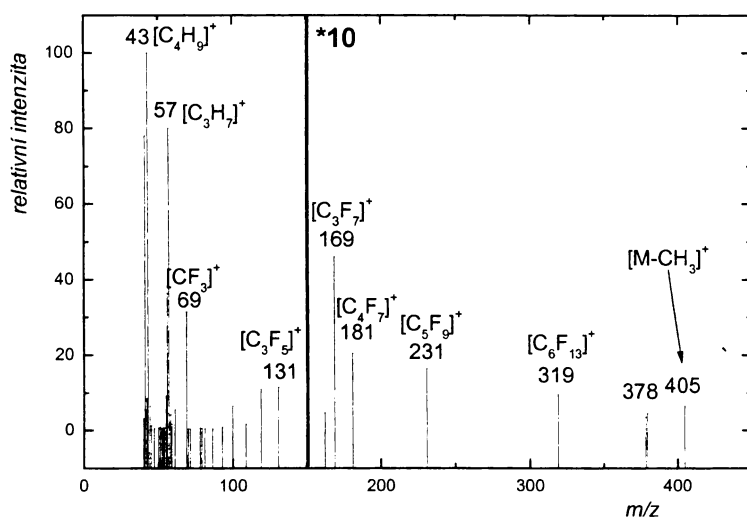
Obrázek 4.2.3 – Chromatogram směšného vzorku perfluorovaných kyselin (všechny po 10 mg/ml) derivatizovaných na isobutylestery, dávkovaný objem 1  $\mu$ l, teplota MS interface 300  $^{\circ}$ C, teplota injektoru 250  $^{\circ}$ C, teplotní program: 60  $^{\circ}$ C (5 min) do 170  $^{\circ}$ C (10  $^{\circ}$ C/min), konst. průtoková rychlost 1,0 ml/min, split poměr 1:50, scan mód: m/z od 40 do 560 rychlostí 1000 m/z s $^{-1}$

Retenční časy isobutylesterů jednotlivých perfluorovaných kyselin za daných podmínek jsou: 4,99 min (PFHpA), 6,48 min (PFOA), 7,83 min (PFNA) a 9,04 min (PFDA). Rozdíl v retenčních časech oproti analýze na GC-ECD je dán především odlišnou délkou kolon (u GC-MS dvojnásobně dlouhá kolona) a také jiným konstrukčním uspořádáním obou plynových chromatografů. Dva velké píky s retenčními časy 10,52 min a 11,30 min odpovídají derivátům IBCF. První a výraznější pík byl identifikován jako bis(isobutylester) kyseliny karborové, který vzniká z bis(isobutylesteru) kyseliny ethandiové během derivatizace. Tomuto derivátu, který vzniká reakcí dvou molekul IBCF, přísluší druhý pík s retenčním časem 11,30 min.

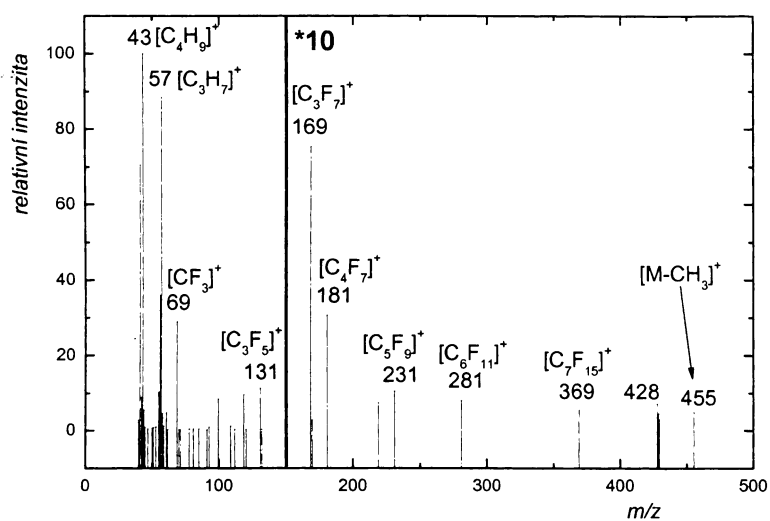


Tyto dva produkty jsou přítomny v každé analýze a na rozdíl od detekce na hmotnostním detektoru se tyto látky projevují na ECD pouze malými píky. Jde totiž o čistě uhlovodíkové sloučeniny bez halogenového prvku, na které ECD není citlivý. Druhý z těchto píků se na chromatogramu z ECD projevuje záporným píkem.

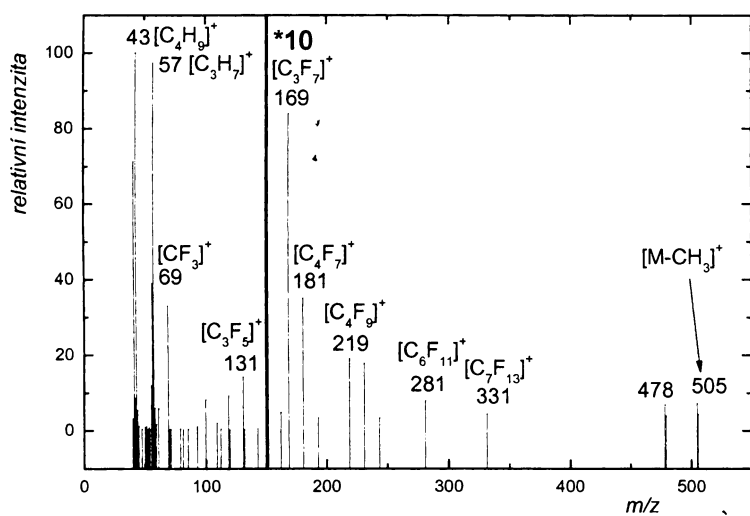
U tohoto měření byla vyhodnocena hmotnostní spektra jednotlivých isobutylesterů příslušných kyselin, která jsou prezentována na obrázcích 4.2.4 až 4.2.7.



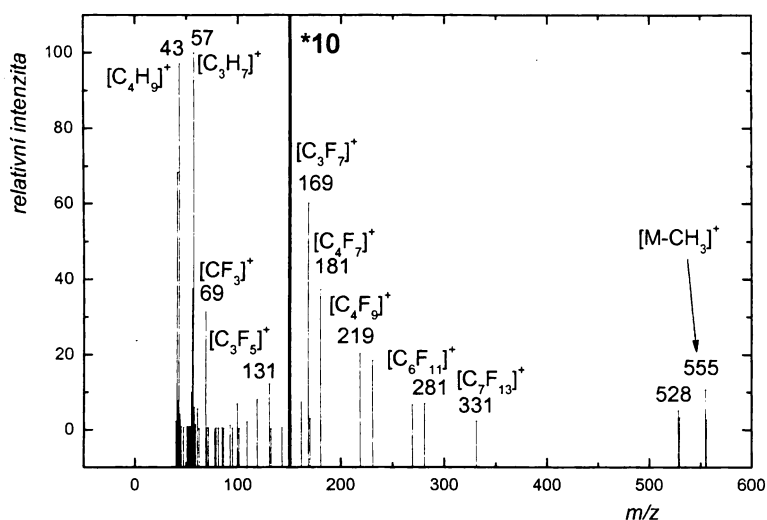
Obrázek 4.2.4 – Hmotnostní spektrum isobutylesteru kyseliny perfluorheptanové, ( $t_R = 4,99$  min, scan #108)



Obrázek 4.2.5 – Hmotnostní spektrum isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové, ( $t_R = 6,48$  min, scan #287)



Obrázek 4.2.6 – Hmotnostní spektrum isobutylesteru kyseliny perfluornonanové, ( $t_R = 7,83$  min, scan #448)



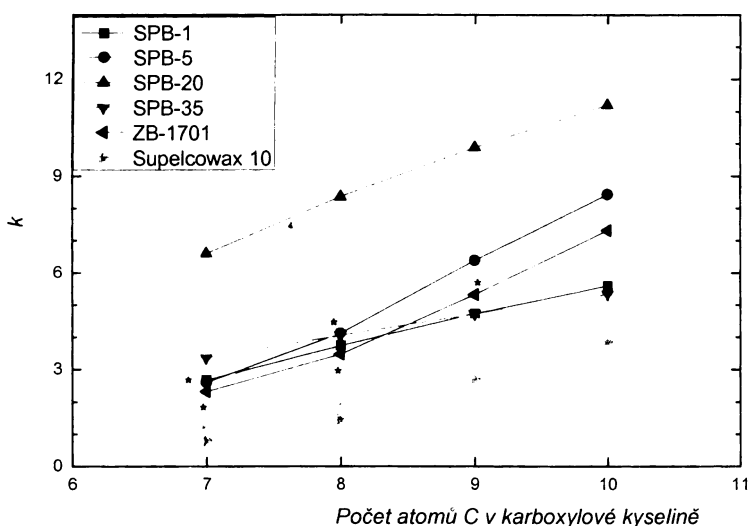
Obrázek 4.2.7 – Hmotnostní spektrum isobutylesteru kyseliny perfluordekanové, ( $t_R = 9,04$  min ,scan #593)

Ve všech spektrech se opakují některé intenzivní fragmenty, které vznikají štěpením fluorovaného řetězce. Konkrétně ion 69 odpovídá  $[CF_3]^+$ , ion 131 odpovídá  $[C_3F_5]^+$ , dále ion 169 je  $[C_3F_7]^+$ , ion 181 přísluší  $[C_4F_7]^+$ , ion 219 odpovídá  $[C_4F_9]^+$  atd. Těchto intenzivních fragmentů, které jsou shodné pro všechny perfluorované látky, lze využít pro kvantitativní analýzu. Pro kvalitativní analýzu bude vhodné vzít vždy fragment nejvyšší hodnoty  $m/z$  hmotnostního spektra jednotlivých isobutylesterů příslušných kyselin, které v tomto případě odpovídají demethylovaným iontům  $[M-CH_3]^+$ . Pro jednotlivé isobutylestery jsou to  $m/z$ : PFHpA – 405, PFOA – 455, PFNA – 505 a PFDA – 555. Velmi intenzivními fragmenty všech spekter jsou i ionty 57 a 43, které odpovídají isobutyly  $[C_4H_9]^+$ , resp. isopropyly  $[C_3H_7]^+$  (jedna z nich je vždy základním píkem).

### 4.3 Separace isobutylesterů perfluorovaných kyselin na různých stacionárních fázích

Pro výběr nejvhodnější kolony na separaci perfluorovaných kyselin bylo postupně instalováno do plynového chromatografu s ECD detektorem šest různě polárních kolon. Před kolonu byla navíc vložena 1 m dlouhá spojovací kapilára (capillary trap) sloužící

k zachycení málo těkavých nečistot, které by jinak mohly znehodnocovat kolonu. Z tohoto důvodu také došlo k mírnému posunu retenčních časů. Na každé koloně byl změřen mrtvý čas a nastaven objemový průtok kolonou 1 ml/min, dále byl měřen směsný vzorek isobutylesterů čtyř perfluorovaných kyselin (PFHpA, PFOA, PFNA a PFDA) a nakonec byl proměřen slepý vzorek reakční směsi bez přidaných kyselin. Jelikož byly k dispozici kolony o různých délkách a tloušťkách stacionární fáze, k jejich porovnání posloužily retenční faktory  $k$  příslušných isobutylesterů perfluorovaných kyselin, které jsou za konstantních experimentálních podmínek nezávislé na parametrech kolon. Byla vynesena závislost retenčních faktorů  $k$  na počtu atomů uhlíků perfluorovaných kyselin pro jednotlivé kolony (obrázek 4.3.1). Kolony jsou seřazeny podle vzrůstající polarity stacionární fáze od nepolární SPB-1 až po polární Supelcowax 10.



Obrázek 4.3.1 – Závislost retenčních faktorů  $k$  na počtu atomů uhlíku v perfluorovaném řetězci kyselin pro jednotlivé kolony (body označené \* jsou zaznamenány v prvních 5 minutách při izotermických podmínkách při 60 °C, ostatní ve fázi teplotního gradientu)

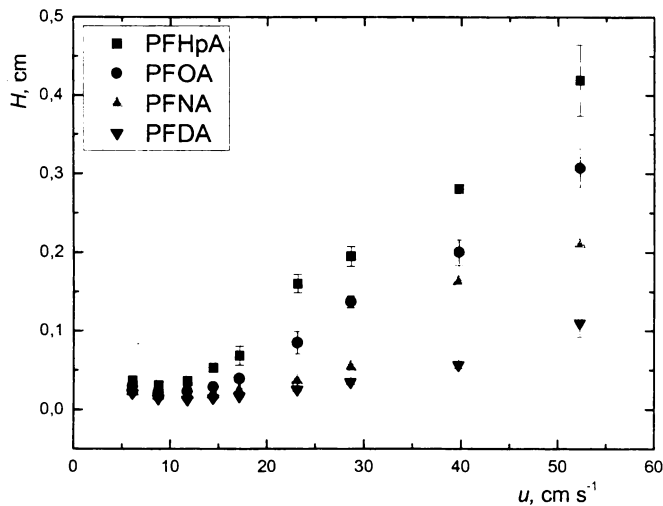
Na tomto obrázku je vidět, že kolony SPB-1 (100%-ní dimethylpolysiloxanová stacionární fáze) a SPB-35 (35 % difenyl, 65 % dimethylpolysiloxan) mají velmi podobné průběhy této závislosti, ačkoli se jedná v prvním případě o čistě nepolární a



v druhém případě středně polární kolonu. U kolony SPB-20 (20 % difenyl, 80 % dimethylpolysiloxan) došlo k posunu závislosti k vyšším hodnotám retenčních faktorů, resp. i retenčních časů, což ale prodlužuje dobu analýzy. U silně polární kolony Supelcowax 10 (polyethylenglykolová stacionární fáze) byly naopak zaznamenány nejnižší retenční faktory. Kolona SPB-5 (5 % difenyl, 95 % dimethylpolysiloxan), která byla používána i ve všech předchozích měřeních, vykazovala nejstrmější průběh závislosti a tím pádem i nejlepší rozdělení jednotlivých látek od sebe. Retenční faktory rostou od 0 % do 20 % difenylu, pak s rostoucí polaritou začnou klesat. Maximální intenzita interakce molekul se stacionární fází je tedy u kolony SPB-20. Dalším důležitým faktorem pro volbu optimální kolony pro stanovení perfluorovaných látek byl retenční čas velkého píku IBCF (jelikož byla tato měření prováděna v průběhu optimalizačních kroků, byl zaznamenáván velký pík IBCF, viz. kapitola 4.5.2). U kolony SPB-35 eluuje pík IBCF mezi píky isobutylesterů PFNA a PFDA, a částečně se s prvním z nich překrývá. U kolony SPB-20 a také u kolony Supelcowax 10 eluuje pík IBCF mezi píky isobutylesterů PFHpA a PFOA, což je pro další analýzy velice nevýhodné. U kolon ZB-1701 (14 % kyanopropylfenyl, 86 % dimethylpolysiloxan, odpovídá velmi rozšířené stacionární fázi OV-1701) a SPB-1 sice pík IBCF eluuje hned za rozpouštědlem, ale u druhé z nich zase dochází k velkému posunu retenčních časů a dochází k překrývání píku isobutylesteru PFDA s dvojpíkem příslušejícím derivátům IBCF, které vznikají jako vedlejší produkty reakce a vyskytují se při každé analýze. Za nejvhodnější byla proto vybrána kolona SPB-5, kde jsou všechny čtyři píky isobutylesterů perfluorovaných kyselin výrazně separovány a v dostatečné vzdálenosti od ostatních píků a jejich separace je velmi rychlá a účinná.

#### 4.4 Van Deemterova závislost pro kolonu SPB-5

Pro stanovení optimální účinnosti separace na koloně SPB-5 byla proměřena van Deemterova závislost pro isobutylestery čtyř perfluorovaných kyselin. Tlak nosného plynu byl nastavován od 10 kPa do 90 kPa, což odpovídá lineární průtokové rychlosti od 6,1 cm/s do 52,3 cm/s. Z redukovaných retenčních časů  $t_R'$  a hodnot šířek píků v polovině výšky  $w_{1/2}$  byly vypočítány výškové ekvivalenty teoretického patra  $H$  (dle vztahů 1-4 a 1-5), které byly vyneseny v závislosti na lineární průtokové rychlosti  $u$  (obrázek 4.4.1).



Obrázek 4.4.1 – Van Deemterova závislost výškového ekvivalentu teoretického patra  $H$  na lineární průtokové rychlosti  $u$  pro isobutylestery kyseliny perfluorheptanové, perfluoroktanové, perfluormonanové a perfluordekanové (GC-ECD, kolona SPB-5)

Z této závislosti je patrné, že minima pro všechny látky je dosaženo při lineární průtokové rychlosti mezi 8,8 a 14,5 cm/s, což odpovídá objemové průtokové rychlosti 0,26 až 0,43 ml/min. Tato průtoková rychlost je tedy optimální pro danou kolonu a pro dané látky. V tomto případě je příspěvek molekulární difúze v mobilní fázi  $H_L$  (vztah 1-7) k celkovému  $H$  velmi malý. Je to dáno pravděpodobně velmi nízkou hodnotou difúzního koeficientu v mobilní fázi. To způsobuje posun minima křivky k tak nízkým průtokovým rychlostem. K rozmytí zón více přispívá  $H_s$ , tedy příspěvek odporu proti převodu hmoty ve stacionární fázi (vztah 1-9 a 1-10). Zajímavým výsledkem je pořadí jednotlivých isobutylesterů. Jelikož je difúzní koeficient nepřímo úměrný odmocnině z molekulové hmotnosti, měl by výškový ekvivalent teoretického patra narůstat s molekulovou váhou. V našem případě je tomu přesně naopak. Důvodem je pravděpodobně to, že člen  $k/(k+1)^2$  ve vztahu 1-9 se stoupající hmotností perfluorovaných isobutylesterů výrazně klesá, a tím rozhodujícím faktorem ovlivňuje celý příspěvek  $H_s$ . Dalším faktorem může být teplota, protože van Deemterova závislost nebyla měřena při izotermických podmínkách, jak je běžné, ale s teplotním gradientem. Všechny isobutylestery perfluorovaných kyselin tedy eluovaly při různých teplotách, což mohlo také výrazně ovlivnit celkový výsledek.

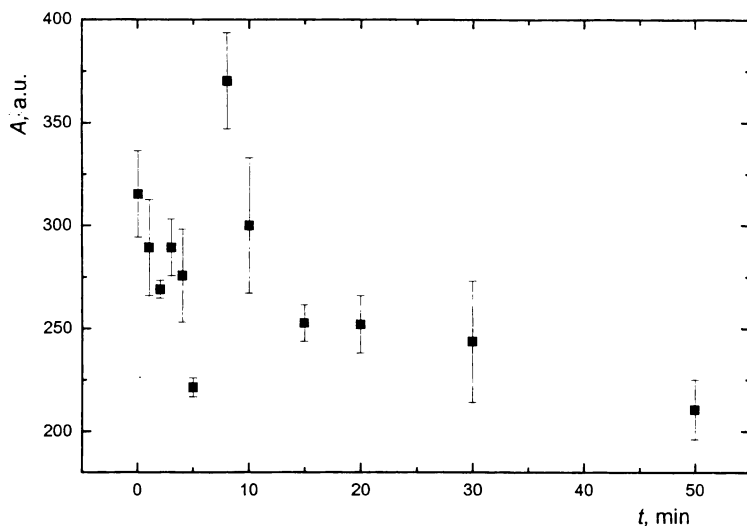
Pro další měření byla zvolena hodnota průtokové rychlosti, která je kompromisem mezi účinností a dobou analýzy, tedy 0,43 ml/min.

## **4.5 Optimalizace derivatizační reakce**

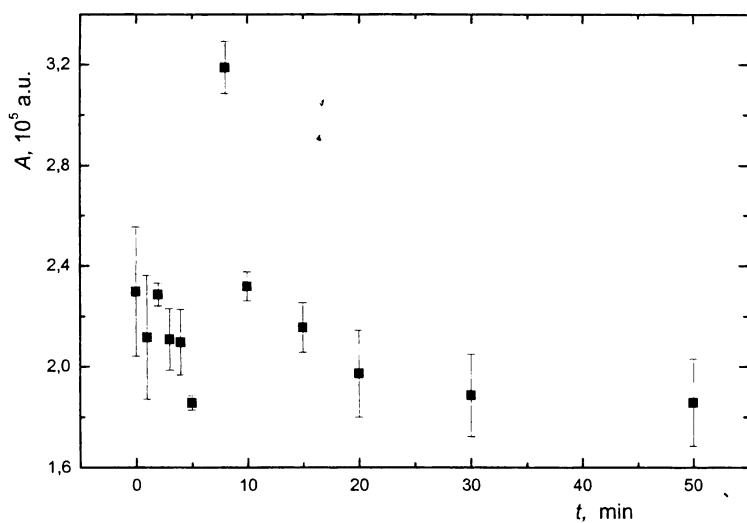
Při kvantitativním vyhodnocování isobutylesterů perfluorovaných kyselin připravených derivatizací bylo zjištěno, že naměřené plochy píků nejsou příliš reprodukovatelné. Proto bylo nutné přistoupit k optimalizaci reakčních podmínek. Tyto analýzy byly prováděny s průtokovou rychlostí vyplývající z van Deemterovy závislosti, tedy 0,43 ml/min pro GC-ECD, u GC-MS byla zachována konstantní průtoková rychlost 1 ml/min, pro niž jsou optimalizovány pracovní podmínky iontového zdroje. Jako modelová PFCA byla vybrána pro většinu optimalizačních kroků kyselina perfluoroktanová (PFOA). Tato kyselina s 8 atomy uhlíku se nachází uprostřed řady našich standardů a navíc byla průmyslově nejvíce využívána a v reálných vzorcích stanovována v nejvyšších koncentracích.

### **4.5.1 Optimalizace doby reakce**

Jako první parametr optimalizace byla zvolena doba reakce. Postup byl následující: byla připravena reakční směs s PFOA (1 mg/ml), ke které bylo přidáno činidlo IBCF a směs reagovala po dobu 20 s v ultrazvukové lázni. Poté byla směs nechána v klidu po stanovenou dobu. Pak byl přidán hexan a směs byla 1 minutu třepána na třepače a odebraná horní hexanová fáze byla dávkována do GC. U GC-MS byl zvolen citlivější SIM mód s těmito m/z pro detekci: 69, 100, 131, 169, 231, 281, 428, 455. Vynesena byla plocha píků celkového iontového proudu TIC, tedy součtu těchto m/z (viz obrázek 4.5.2). Doba reakce byla měřena od 0 min (po reakci v ultrazvukové lázni byl rovnou přidán hexan) do 50 min a pro statistické vyhodnocování byly analýzy nejméně třikrát opakovány se vždy nově připraveným vzorkem.



Obrázek 4.5.1 - Závislost plochy píku isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové na době reakce (GC-ECD)



Obrázek 4.5.2 - Závislost plochy píku isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové na době reakce (GC-MS), SIM mód, TIC (m/z: 69, 100, 131, 169, 231, 281, 428, 455)

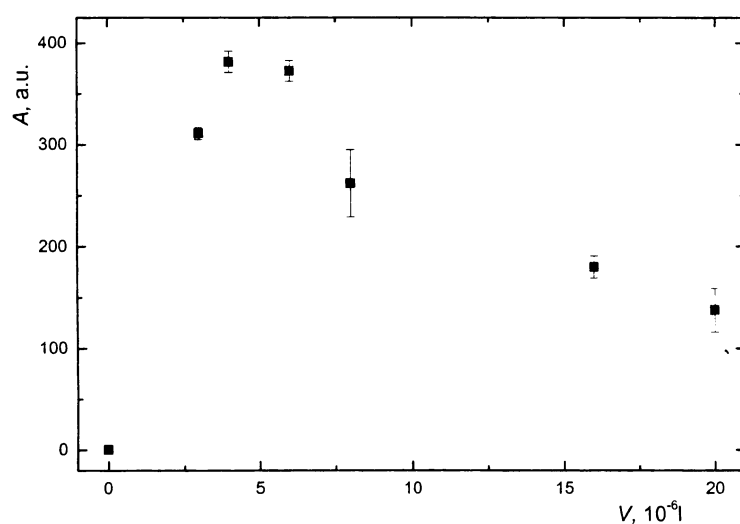
Ukázalo se, že průběh reakce je poměrně komplikovaný, jak je vidět z obrázků 4.5.1 a 4.5.2. Shoda průběhu závislosti na obou přístrojích (jde o různé vzorky připravené za stejných podmínek) dokazuje, že nejde o artefakt. Vznik produktů – isobutylesterů

probíhá přes meziproducty (anhydridy příslušných kyselin), jejichž píky byly zaznamenány při kratších dobách reakce. Největší píky a tím pádem nejvyšší výtěžky byly zaznamenány při době 8 minut, poté se hydrolyticky poměrně nestabilní isobutylestery PFOA začaly pravděpodobně hydrolyzovat a plochy jejich píků se zmenšovaly. Po vytřepání do hexanu se plochy píků s narůstající dobou již výrazně neměnily, což značí, že převedením do organické fáze došlo k jejich stabilizování.

#### 4.5.2 Optimalizace množství pomocných látek v reakčním médiu

Při předchozích měřeních se ukázalo, že výsledky z obou plynových chromatografů jsou velmi podobné, a proto byl pro další analýzy vybrán pro práci jen jeden přístroj, a to GC-ECD, protože je pro vybrané fluorované látky citlivější.

Dalším krokem optimalizace bylo množství pyridinu jako katalyzátoru reakce. Derivatizace byla opět provedena s PFOA (1 mg/ml), doba reakce byla vybrána ta s nejvyššími výtěžky – 8 minut a bylo měněno množství pyridinu přidaného do reakční směsi při zachování celkového objemu reakční směsi (v závislosti na množství pyridinu byl buď ubírán nebo přidáván acetonitril). Byla vynesena závislost plochy píku na přidaném množství pyridinu do reakčního média (obrázek 4.5.3).



Obrázek 4.5.3 – Závislost plochy píku isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové na množství pyridinu (GC-ECD)

Největší plochy píků byly zaznamenány při snížení objemu přidaného pyridinu z původních 16  $\mu\text{l}$  na 4  $\mu\text{l}$ . Výrazně se také zvětšil pík chlormravenčanu isobutylatého, což ovšem kvalitu analýzy neovlivňuje. Pík této látky eluuje hned za rozpouštědlem a před všemi isobutylestery použitých perfluorovaných kyselin ( $t_R$  (IBCF) = 4,37 min při daných podmínkách). Bez přídavku pyridinu reakce neprobíhala vůbec.

Měněno bylo i množství isobutylalkoholu, ale změny jeho objemu neměly výrazný vliv na výtěžek reakce. Byl tedy zachován jeho původní objem. Jako optimální byl určen tento poměr v reakčním médiu: 20  $\mu\text{l}$  kyseliny, 168  $\mu\text{l}$  acetonitrilu, 8  $\mu\text{l}$  isobutylalkoholu a 4  $\mu\text{l}$  pyridinu (vždy celkem 200  $\mu\text{l}$  reakčního média).

#### 4.5.3 Optimalizace teploty reakce

Dle postupu předchozích měření byla připravena reakční směs s dobou reakce 8 minut a optimálním složením reakční směsi. Práce byla prováděna tak, že reakční směs byla nechána 20 s v ultrazvukové lázni a pak byla vialka 8 min temperována v termostatu při 40, 60  $^{\circ}\text{C}$  a při laboratorní teplotě 23  $^{\circ}\text{C}$ . Poté byl přidán hexan, do kterého byl vzniklý isobutylester vytřepán.

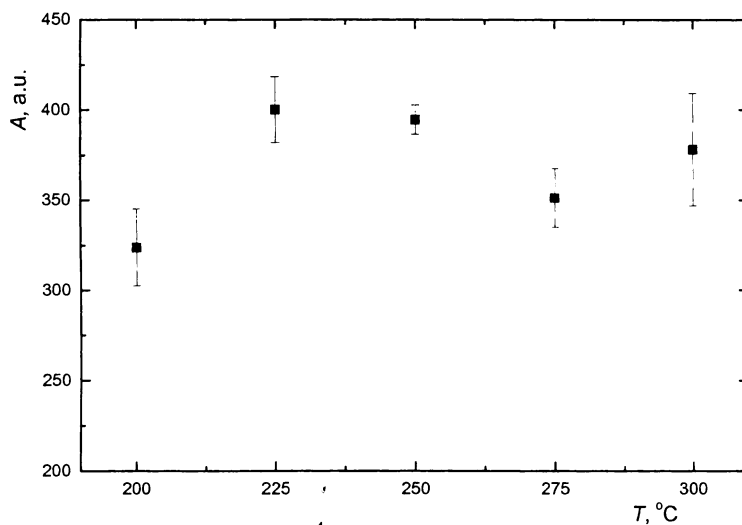
Tabulka 4.1 - Závislost plochy píku isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové na teplotě reakce (GC-ECD)

<i>Teplota (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</i>	<i>Plocha (a.u.)</i>	<i>SD</i>
23	381	11
40	367	23
60	349	16

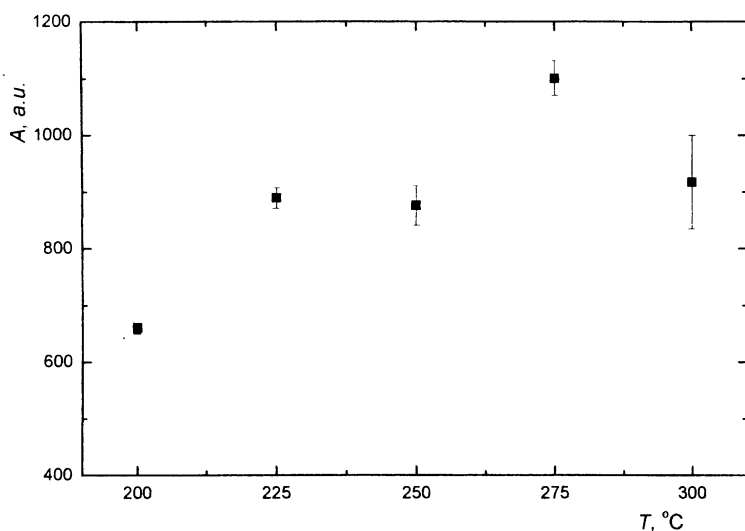
Z tabulky 4.1 je vidět, že zvýšení teploty při reakci nevedlo ke zvýšení ploch píků, naopak došlo k jejich mírnému poklesu. Důvodem poklesu účinnosti reakce při vyšších teplotách je pravděpodobně urychlení hydrolyzy, tedy rozkladu vzniklého isobutylesteru. Při dalších měřeních byla proto dále zachována práce při laboratorní teplotě.

#### 4.5.4 Optimalizace teploty injektoru

Byla provedena měření isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové po derivatizaci při různých teplotách injektoru. Při všech předchozích měřeních byla nastavena teplota nástřiku na 250 °C. Vynesena byla opět závislost plochy píku na teplotě injektoru, kdy byla teplota měněna po krocích (25 °C) v rozmezí 200 – 300 °C. Nejprve byla tato závislost naměřena se split poměrem 1:50, tak jako při předchozích měřeních (obrázek 4.5.5), potom byl použit také splitless mód (obrázek 4.5.6). Tato měření byla provedena s nižší koncentrací (100× zředěný zásobní roztok PFOA o koncentraci 0,1 mg/ml).



Obrázek 4.5.5 – Závislost plochy píku isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové na teplotě injektoru (GC-ECD, split mód)



Obrázek 4.5.6 - Závislost plochy píku isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové na teplotě injektoru (GC-ECD, splitless mód)

Při měření ve split módu se snižováním i zvyšováním teploty plochy píků většinou snižovaly, nejvyšší výtěžky byly zaznamenány při 225 a 250 °C. U první z nich byla sice zaznamenána vyšší průměrná hodnota ploch píků, ale také vyšší rozptyl hodnot. Proto byla pro další měření zachována teplota 250 °C. Ve splitless módu byl průběh jiný, výrazný nárůst ploch píků byl zaznamenán při teplotě 275 °C, přičemž dalším zvyšováním teploty docházelo k poklesu, navíc při této teplotě v obou módech značně narostl rozptyl hodnot. Pro další měření ve splitless módu byla proto jako optimální zvolena nástřiková teplota 275 °C.

#### 4.5.5 Optimalizace složení extrakčního rozpouštědla

Ze separace isobutylesterů na různě polárních stacionárních fázích (viz. kapitola 4.3) lze vyčíst, že nejvíce jsou tyto látky zadržovány na koloně SPB-20, která má 20 % dimethylpolysiloxanových skupin nahrazených fenylovými skupinami. Při tomto složení dochází k nejsilnějším interakcím perfluorovaných kyselin se stacionární fází. Z tohoto výsledku logicky vyplynul další optimalizační krok. Byla tedy postulována hypotéza: pokud bude nahrazeno 20 % hexanu při extrakci nějakým (polárnějším) aromatickým rozpouštědlem (například toluenem), měla by se zvýšit extrakční účinnost.



Pro její potvrzení byla vybrána směs hexan-toluen v poměru 4:1, kdy na vytřepávání bylo bráno 200 µl této směsi místo čistého hexanu. Byl porovnán součet ploch píků čtyř isobutylesterů perfluorovaných kyselin po extrakci touto směsí s výsledky po extrakci čistým hexanem, a to jak ve split módu, tak i splitless módu. Reakční směs byla připravena podobně jako v předchozích analýzách, ale s přidavkem 20 µl od každé kyseliny (koncentrace 1 mg/ml pro split mód, koncentrace 0,1 mg/ml pro splitless mód) a pouze 108 µl acetonitrilu. Podmínky měření byly zvoleny podle výsledků optimalizace teploty injektoru. Teploty nástřiku byly tedy pro split 250 °C a pro splitless 275 °C.

Tabulka 4.2 – Porovnání velikostí ploch píků isobutylesterů perfluorovaných kyselin po vytřepání do hexanu a do směsi hexan-toluen 4:1 ve split módu

<i>Isobutylester</i> <i>kys.</i>	<i>Hexan</i>		<i>Hexan-Toluen</i>	
	<i>Plocha (a.u.)</i>	<i>SD</i>	<i>Plocha (a.u.)</i>	<i>SD</i>
PFHpA	318	25	301	17
PFOA	419	25	408	25
PFNA	421	22	415	22
PFDA	444	25	434	31
<b>Součet</b>	<b>1602</b>	97	<b>1558</b>	95

Tabulka 4.3 - Porovnání velikostí ploch píků isobutylesterů perfluorovaných kyselin po vytřepání do hexanu a do směsi hexan-toluen 4:1 ve splitless módu

<i>Isobutylester</i> <i>kys.</i>	<i>Hexan</i>		<i>Hexan-Toluen</i>	
	<i>Plocha (a.u.)</i>	<i>SD</i>	<i>Plocha (a.u.)</i>	<i>SD</i>
PFHpA	611	29	659	26
PFOA	989	73	1088	49
PFNA	850	37	983	48
PFDA	845	47	970	54
<b>Součet</b>	<b>3295</b>	186	<b>3700</b>	177

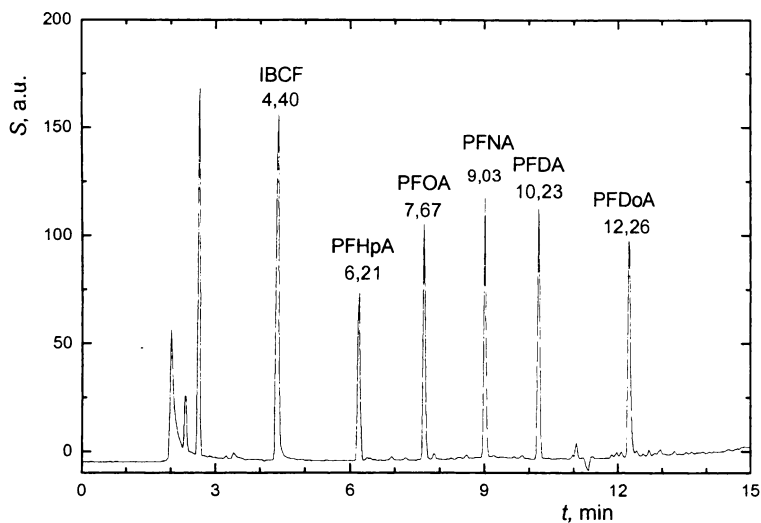
Porovnáním součtu ploch píků všech isobutylesterů perfluorovaných kyselin ve split módu (tabulka 4.2) získaných po extrakci hexanem a směsí hexan-toluen se ukázalo,

že došlo k malému snížení o necelé 3 %, což je ale hodnota, která leží v rámci chyb měření. Znamená to tedy, že změnou složení extrakční směsi se účinnost extrakce nezvýšila. Pro splitless mód jsou výsledky odlišné. Pro extrakční směs hexan-toluen se výtěžky zlepšily a součet ploch vzrostl o více než 12 % (tabulka 4.3). Možné vysvětlení je, že toluen má vyšší bod varu než hexan a tudíž účinněji fokusuje analyty po nástřiku ve splitless módu. Navíc se ve splitless používá nižší počáteční teplota 50 °C. Pro další měření ve split módu byl jako extrakční činidlo zachován hexan, pro splitless bylo výhodnější extrahovat analyty do směsi hexan-toluen v poměru 4:1.

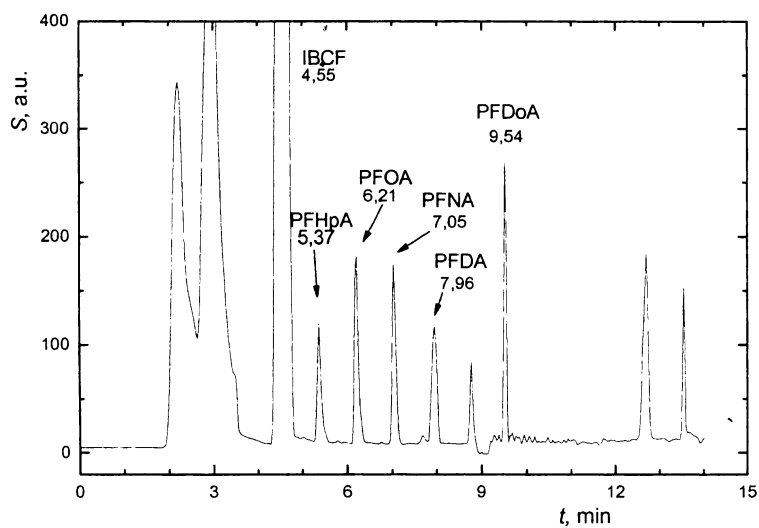
Ve směsi již dále nelze obsah toluenu zvyšovat, protože se částečně mísí i s acetonitrilem. Extrakce a oddělení jednotlivých fází pak není možné. 20 % toluenu ve směsi s hexanem je maximum, kdy lze extrakci ještě provést a jednotlivé fáze od sebe oddělit.

Celkovým výsledkem optimalizace všech uvedených parametrů bylo zvětšení ploch píků jednotlivých isobutylesterů o více než 60 %. Konkrétně pík isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové vzrostl díky jednotlivým optimalizačním krokům o 65 %. Před optimalizací byla jeho průměrná plocha ( $254 \pm 80$ ) a.u. a po optimalizaci ( $419 \pm 27$  a.u.). Navíc se optimalizací výrazně minimalizovaly odchylky měření.

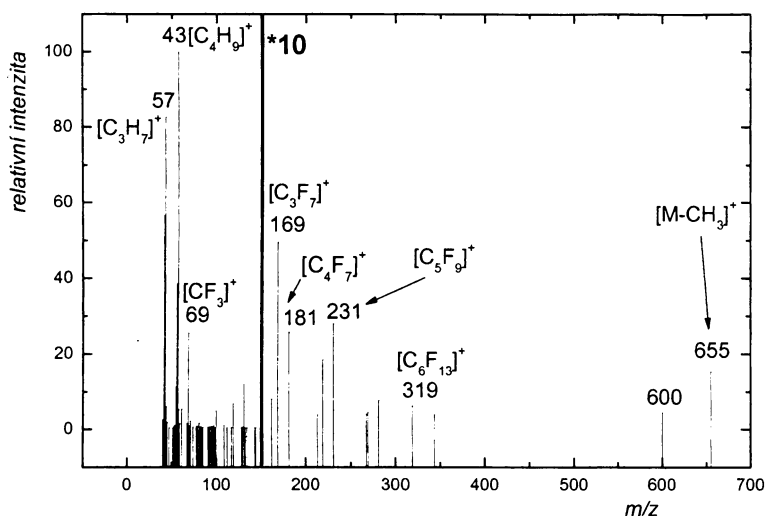
Výsledné chromatogramy směsného vzorku pěti perfluorovaných kyselin po všech optimalizačních krocích ve split módu a ve splitless módu jsou ukázány na obrázcích 4.5.7 a 4.5.8. Ke směsi byla navíc přidána kyselina perfluordodekanová (PFDoA), jejíž standard byl dodatečně získán. Ta je vhodná jako interní standard při stanovení perfluorovaných kyselin v reálných vzorcích, protože kyseliny s takto dlouhým perfluorovaným řetězcem nebyly průmyslově tolik využívány. Jako IS byla PFDoA použita v mnoha publikacích (dále se také jako IS využívá isotopicky značených sloučenin, např.  $^{13}\text{C}$ -PFOA). Spektrum jejího isobutylesteru bylo také dodatečně proměřeno na GC-MS (obrázek 4.5.9). Od každé kyseliny bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  (koncentrace 1 mg/ml pro split mód, koncentrace 0,1 mg/ml pro splitless mód), přídavek acetonitrilu byl proto snížen na 88  $\mu\text{l}$  kvůli zachování objemu reakční směsi. Takto byly připravovány i roztoky pro měření kalibračních závislostí.



Obrázek 4.5.7 – Chromatogram směšného vzorku pěti kyselin (všechny po 1 mg/ml) po derivatizaci na isobutylestery ve split módu, dávkovaný objem 1  $\mu$ l, teplota detektoru 300  $^{\circ}$ C, teplota injektoru 250  $^{\circ}$ C, teplotní program: 60  $^{\circ}$ C (5 min) do 170  $^{\circ}$ C (10  $^{\circ}$ C/min), objemová průtoková rychlost 0,43 ml/min a split poměr 1:50.



Obrázek 4.5.8 – Chromatogram směšného vzorku pěti kyselin (všechny po 0,1 mg/ml) po derivatizaci na isobutylestery ve splitless módu, dávkovaný objem 1  $\mu$ l, teplota detektoru 300  $^{\circ}$ C, teplota injektoru 275  $^{\circ}$ C, teplotní program: 50  $^{\circ}$ C (1 min) do 170  $^{\circ}$ C (10  $^{\circ}$ C/min), objemová průtoková rychlost 0,43 ml/min, splitr otevřen po 1 min.



Obrázek 4.5.9 – Hmotnostní spektrum isobutylesteru kyseliny perfluordodekanové, ( $t_R = 10,86$  min, scan #812)

#### 4.6 Kalibrační závislosti

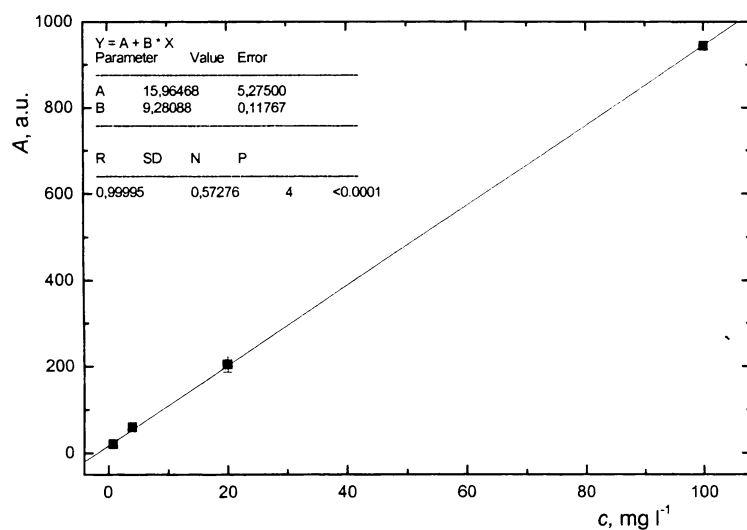
Kalibrační závislosti směsi pěti perfluorovaných kyselin byly proměřeny na GC-ECD ve split i splitless módu. Pro split mód byl použit rozsah koncentrací od 4 mg/l do 1000 mg/l, podmínky měření byly nastaveny dle výsledků optimalizace teploty injektoru (teplota injektoru 250 °C) a pro vytřepávání byl použit hexan. Pro splitless mód byly proměřeny kalibrační závislosti v rozsahu koncentrací od 0,8 mg/l do 100 mg/l při nástřikové teplotě 275 °C a vzniklé isobutylestery byly vytřepány do směsi hexan-toluen v poměru 4:1. Byly vyneseny kalibrační závislosti a také závislosti v logaritmické škále pro výpočet linearity. Zde je uvedena jako příklad kalibrační závislost isobutylesteru PFDoA ve splitless módu (obrázek 4.6.1), ze které byla vypočítána extrakční účinnost při stanovení perfluorovaných kyselin v reálných vzorcích (viz. kapitola 4.8). Ostatní kalibrační závislosti všech isobutylesterů ve split i splitless módu jsou uvedeny v příloze (obrázky 8.1 až 8.20).

Tabulka 4.4 – Charakteristiky kalibračních závislostí pro jednotlivé isobutylestery perfluorovaných kyselin ve split módu, GC-ECD

	<i>SDR (mg/l)</i>	<i>LOD (mg/l)</i>	<i>LOQ (mg/l)</i>	<i>koef. linearity</i>
PFHpA	0,03	1,1	5,3	0,9724
PFOA	0,77	5,3	21,3	0,9468
PFNA	1,37	3,7	11,7	1,0228
PFDA	1,75	3,5	9,6	1,0352
PFDoA	0,86	1,8	4,9	1,0092

Tabulka 4.5 - Charakteristiky kalibračních závislostí pro jednotlivé isobutylestery perfluorovaných kyselin ve splitless módu, GC-ECD

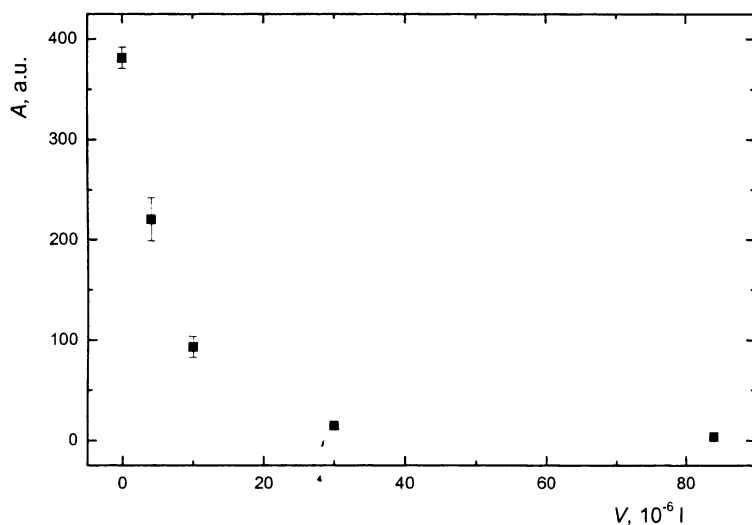
	<i>SDR (mg/l)</i>	<i>LOD (mg/l)</i>	<i>LOQ (mg/l)</i>	<i>koef. linearity</i>
PFHpA	0,07	0,26	1,1	0,8449
PFOA	0,07	0,23	1,0	0,9638
PFNA	0,04	0,14	0,6	0,8183
PFDA	0,17	0,47	1,5	1,0473
PFDoA	0,02	0,10	0,5	0,7905



Obrázek 4.6.1 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordodekanové (GC-ECD, splitless)

## 4.7 Převedení reakce do vodného prostředí

Pro stanovení PFC ve vodných matricích touto metodou bylo nutné derivatizační reakci vyzkoušet ve vodném prostředí. Jako zástupce PFC byla opět vybrána PFOA. Nejprve byl nahrazen celý objem acetonitrilu v reakčním médiu vodou, ale isobutylester PFOA nebyl vůbec detegován. Postupně byla proto do původního reakčního média přidávána různá množství vody a ekvivalentně ubíráno množství acetonitrilu až do poměru 1:1 (84  $\mu$ l vody a 84  $\mu$ l acetonitrilu). Byla vynesena závislost plochy píku isobutylesteru PFOA na přidaném množství vody do reakčního média (obrázek 4.7.1).



Obrázek 4.7.1 – Závislost plochy píku isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové na přidaném množství vody (GC-ECD)

Výsledkem bylo, že čím více vody bylo do reakce přidáno, tím menší plochy byly zaznamenány. Znamená to tedy, že reakce ve vodném prostředí buď neprobíhá, nebo dochází k okamžité hydrolyze isobutylesterů a je tedy nutné použít jinou metodu stanovení perfluorovaných látek ve vodných vzorcích, např. využitím extrakce.

## 4.8 Extrakce

### 4.8.1 Extrakce vodné fáze organickým rozpouštědlem

Tato jednoduchá metoda převodu kyselin z vody do organické fáze byla vyzkoušena s roztokem PFOA v redestilované vodě po okyselení koncentrovanou

kyselinou sírovou. Takto silné okyselení bylo nutné k převedení aniontů kyselin na částice bez náboje (díky velmi nízkému  $pK_a$  perfluorovaných kyselin, pro PFOA je  $pK_a = 0,35$ , se nacházejí ve vodných roztocích v disociované formě). Pro přechod kyseliny z vodné fáze do organické je podmínkou, aby pH bylo alespoň o jednotku nižší, než je  $pK_a$  dané látky. Tato extrakce byla vyzkoušena se třemi různými organickými rozpouštědly – hexanem, dichlormethanem a toluenem. Bohužel s žádným z těchto rozpouštědel nebyla extrakce účinná. Derivatizací a následnou analýzou nebyl zaznamenán žádný pík isobutylesteru PFOA. Tato kyselina zůstala ve vodné fázi a ani částečně nepřešla do organického rozpouštědla. Bylo to zapříčiněno pravděpodobně ještě stále slabým okyselením. Dostupná pH elektroda pracovala v záporné oblasti pH s velkou chybou a k okyselení minimálně na  $pH = -1$  by muselo být koncentrované kyseliny sírové přidáno mnohem více, to už ale nebylo možné pH-metrem změřit.

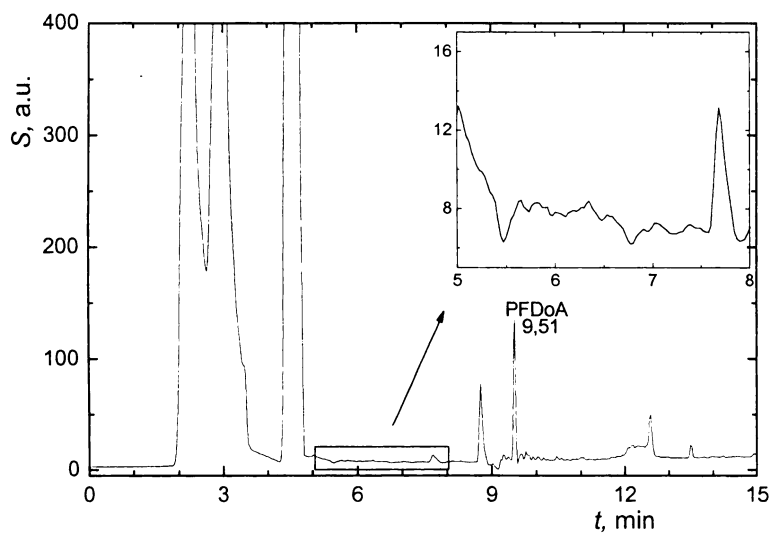
#### 4.8.2 Iontově-párová extrakce

Tato extrakce byla na rozdíl od předchozího typu jednoduchá a účinná. Z vodné fáze přecházejí anionty perfluorovaných kyselin do organické fáze v iontovém páru s tetrabutylamoniovými kationty. Vyzkoušen byl blank redestilované vody s přidavkem PFDoA jako interního standardu a tato kyselina přecházela do rozpouštědla (diethyletheru) s téměř 100%-ní účinností. Ta byla vypočítána dosazením naměřené plochy píku vzniklého isobutylesteru PFDoA do regresní rovnice příslušné kalibrační závislosti a porovnána s koncentrací PFDoA, která byla pro extrakci použita. Proto bylo možné tuto extrakci využít ke stanovení perfluorovaných kyselin v reálných vzorcích.

#### 4.8.3 Reálné vzorky vody

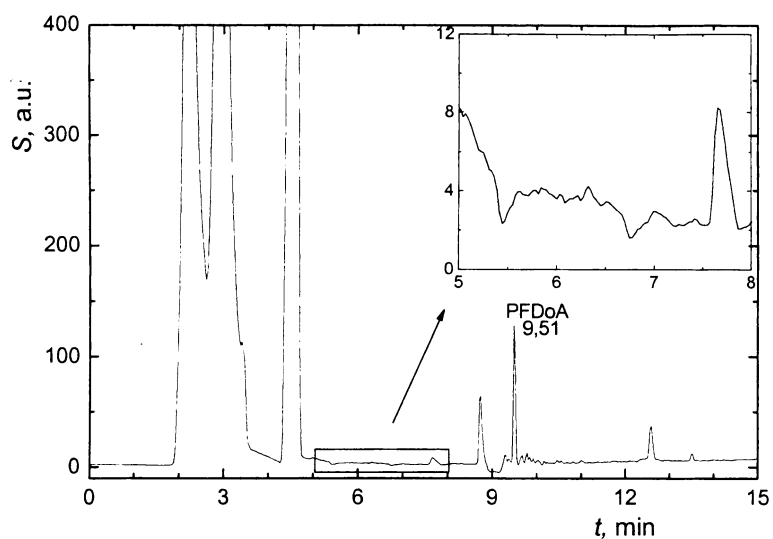
Pro stanovení perfluorovaných kyselin ve vodě byly vybrány: vzorek 1 (rybník), vzorek 2 (Vltava). S těmito vzorky byla provedena třikrát iontově-párová extrakce, derivatizace na isobutylestery a následná analýza GC-ECD. Ke vzorkům byl přidán interní standard (IS) PFDoA, s jehož pomocí byla vypočítávána extrakční účinnost (pro vzorek 1: 97 %, pro vzorek 2: 103 %). Analýza vzorků vody byla uskutečněna ve splitless módu. Výhodou bylo, že v oblasti retenčních časů stanovovaných perfluorovaných kyselin neeluovaly žádné interferující složky. Nemusel být ani přizpůsobován teplotní program a jiné parametry. Pro oba vzorky byly stanovované

látky (PFHpA, PFOA, PFNA a PFDA) pod mezí detekce této metody (obrázek 4.8.1 a 4.8.2) a to i v případě vzorku Vltavské vody (vzorek 3) s tisícinásobným zakoncentrováním (obrázek 4.8.3). Pro vzorek 1 a 2 odpovídá mez detekce po přepočtu na příslušný prekoncentrační faktor intervalu 1,4 – 4,7  $\mu\text{g/l}$  a pro vzorek 3 odpovídá intervalu 0,14 – 0,47  $\mu\text{g/l}$ .

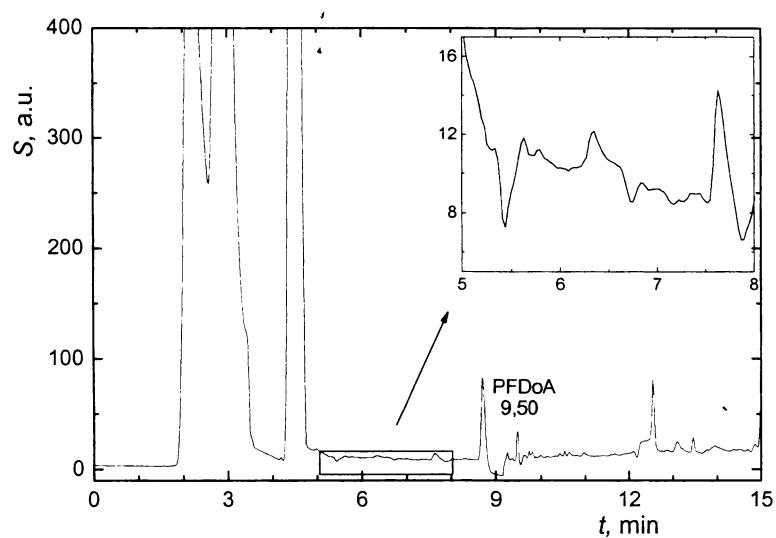


Obrázek 4.8.1 – Chromatogram vzorku vody z rybníka (vzorek 1) po iontově-párové extrakci, zakoncentrování s faktorem 100 a derivatizaci na isobutylestery, PFD0A = IS, podmínky měření stejné jako u obrázku 4.5.8





Obrázek 4.8.2 – Chromatogram vzorku vody z Vltavy (vzorek 2) po iontově-párové extrakci, zakoncentrování s faktorem 100 a derivatizaci na isobutylestery, PFDoA = IS, podmínky měření stejné jako u obrázku 4.5.8

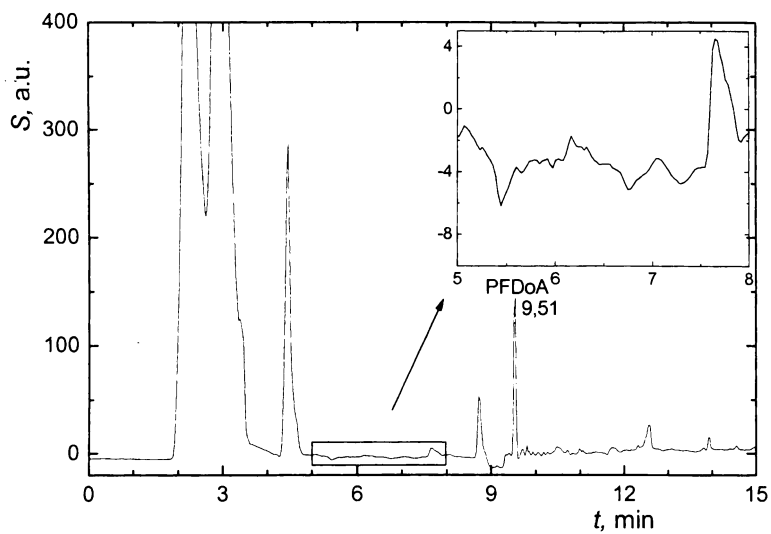


Obrázek 4.8.3 – Chromatogram vzorku vody z Vltavy (vzorek 3) po iontově-párové extrakci, zakoncentrování s faktorem 1000 a derivatizaci na isobutylestery, PFDoA = IS, podmínky měření stejné jako u obrázku 4.5.8

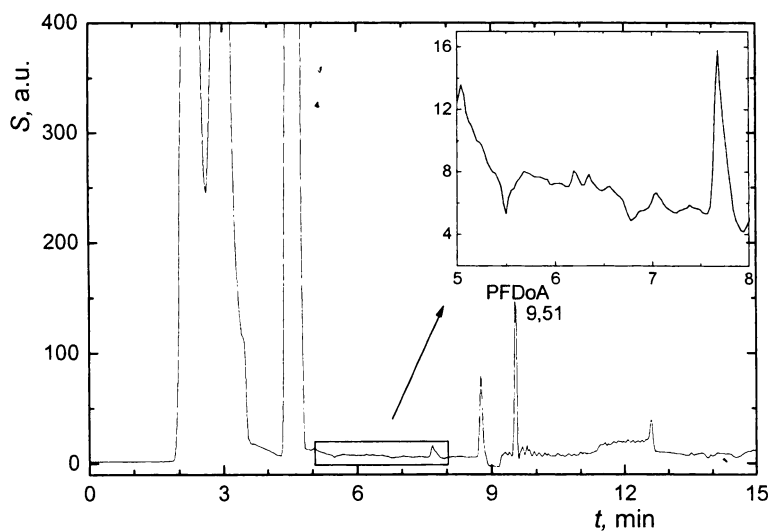
V tomto případě měla extrakce velmi nízkou účinnost (pouze 17 %), což je vidět u mnohem menšího píku interního standardu, než v předchozích případech. Bylo to způsobeno pravděpodobně velkými ztrátami při desetkrát provedené extrakci s jednotlivými díly vzorku.

#### 4.8.4 Soxhletova extrakce

Tímto typem extrakce byly zpracovány vzorky svalových tkání kaprů a štik. Extrakce methanolem nebyla úspěšná, derivatizací a následnou analýzou nebyl zaznamenán pík interního standardu a to ani v blanku, kdy byla do extraktoru vložena pouze skelná vata. Na tu se zřejmě PFD<sub>o</sub>A mohla sorbovat a do methanolu pak nepřecházela. Naopak extrakce do heptanu probíhala s téměř 80%-ní účinností (pro vzorek kapra byla účinnost 81 %, pro vzorek štiky 78 %). Proto bylo touto metodou možno stanovit perfluorované kyseliny v biologických vzorcích, v našem případě ve vzorku kapra a štiky. Po této extrakci následovala derivatizace a analýza GC-ECD (obrázek 4.8.4 a 4.8.5). Stejně jako u reálných vzorků vody nebylo nutno měnit podmínky analýz. Opět byly ale stanovované kyseliny PFHpA, PFOA, PFNA a PFDA pod mezí detekce této metody. *LOD* po přepočtu na příslušný prekoncentrační faktor odpovídá intervalu 17,5 – 58,8 µg/l.



Obrázek 4.8.4 – Chromatogram vzorku svalové tkáně kapra po Soxhletově extrakci, zakoncentrování s faktorem 8 a derivatizaci na isobutylestery, PFD0A = IS, podmínky měření stejné jako u obrázku 4.5.8



Obrázek 4.8.5 – Chromatogram vzorku svalové tkáně šťiky po Soxhletově extrakci, zakoncentrování s faktorem 8 a derivatizaci na isobutylestery, PFD0A = IS, podmínky měření stejné jako u obrázku 4.5.8

## 5. Závěr

1. Byla vypracována metoda stanovení perfluorovaných kyselin ( $C_7 - C_{10}$ ) pomocí plynové chromatografie s detektorem elektronového záchyty po převedení na isobutylestery účinkem chlormravenčanu isobutylnatého.

2. Pro separaci těchto látek byla jako nejvhodnější vybrána kolona SPB-5. Na této koloně byla proměřena van Deemterova závislost a jako optimální byla zvolena průtoková rychlost mobilní fáze 0,43 ml/min.

3. Metoda stanovení perfluorovaných kyselin byla optimalizována pomocí GC-ECD a GC-MS. Byly provedeny tyto optimalizační kroky a nalezeny tyto optimální parametry:

- doba derivatizační reakce – 8 min
- složení reakčního média – 20  $\mu$ l kyseliny, 168  $\mu$ l acetonitrilu, 8  $\mu$ l isobutylalkoholu a 4  $\mu$ l pyridinu
- teplota reakce – zachována laboratorní teplota
- teplota injektoru – pro split mód 250 °C, pro splitless mód 275 °C
- složení extrakčního rozpouštědla – pro split mód hexan, pro splitless mód směs hexan-toluen v poměru 4:1

Jednotlivými optimalizačními kroky bylo dosaženo zlepšení účinnosti této metody o více než 60 %. Před optimalizací byla např. průměrná plocha píku isobutylesteru PFOA jako modelové perfluorované kyseliny ( $254 \pm 80$ ) a.u. a po optimalizaci ( $419 \pm 27$ ) a.u.

4. Z kalibračních závislostí ve splitless módu byla stanovena mez detekce této metody pro PFHpA, PFOA, PFNA a PFDA v rozmezí 0,14 až 0,47 mg/l a mez stanovitelnosti v rozmezí 1,0 až 1,5 mg/l.

5. Bylo provedeno stanovení perfluorovaných kyselin v reálných vzorcích vody a biologických matricích (kapr a štika). Ve všech analyzovaných vzorcích se naměřené koncentrace stanovovaných látek pohybovaly pod mezí detekce této metody.

## 6. Seznam zkratek

$A$ – plocha píku	GC-PCI-MS – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a pozitivní chemickou ionizací
a.u. – arbitrární jednotka signálu	$H$ – výškový ekvivalent teoretického patra
AFFF – speciální protipožární pěna	HPLC-ESI-MS/MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí a elektrosprejovou ionizací
$a_i$ – fyzikální vlastnosti analytu	IBCF – chlormravenčan isobutylnatý
APFOA – amonná sůl	IS – interní standard
perfluoroktanové kyseliny	$K$ – parametr konstrukční vlastnosti měřícího zařízení
$c$ – molární koncentrace	$k$ – retenční faktor
CMC – kritická micelární koncentrace	$L$ – délka kolony
$d_f$ – tloušťka filmu zakotvené stacionární fáze	$l$ – koeficient linearity
$D_G$ – difúzní koeficient v mobilní fázi	LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
$D_L$ – difúzní koeficient v kapalině	$LOD$ – limit detekce
$d_p$ – průměr zrn stacionární fáze	$LOQ$ – limit stanovitelnosti
EPA – agentura ochrany životního prostředí USA	M 570 – <i>N</i> -methylperfluoroktansulfonamidacetát
FTCA – fluortelomerní karboxylová kyselina	$m/z$ – poměr hmotnosti a náboje
FTOH – fluortelomerní alkohol	MCF – chlormravenčan methylnatý
GC-ECD – plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu	$n$ – počet teoretických pater
GC-EI-MS – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a elektronovou ionizací	$n_{eff}$ – počet efektivních teoretických pater
GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí	
GC-NCI-MS – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a negativní chemickou ionizací	

*N*-EtFOSE – *N*-etylperfluoroktansulfonamidetanol  
 etylperfluoroktansulfonamidetanol  
 NIST – knihovna spekter  
 PFBuS – perfluorbutansulfonát  
 PFC – perfluorovaná sloučenina  
 PFCA – perfluorkarboxylová kyselina  
 PFDA – perfluordekanová kyselina  
 PFDoA – perfluordodekanová kyselina  
 PFDS – perfluordekansulfonát  
 PFH<sub>7</sub>A – perfluorheptanová kyselina  
 PFH<sub>x</sub>A – perfluorhexanová kyselina  
 PFH<sub>x</sub>A-Bu – butylester kyseliny perfluorhexanové  
 PFH<sub>x</sub>S – perfluorhexansulfonát  
 PFNA – perfluornonanová kyselina  
 PFOA – perfluoroktanová kyselina  
 PFOS – perfluorotansulfonát  
 PFOSA – perfluoroktansulfonamid  
 PFOSF – perfluoroktansulfónylfluorid  
 PFPeA-Me – metylester kyseliny perfluorpentanové  
 PFTA – perfluortetradekanová kyselina  
 PFUnA – perfluorundekanová kyselina  
 PTFE – polytetrafluorethylen  
 PVDF – polyvinylidenfluorid  
*S* – signál  
*SD* – směrodatná odchylka  
*SDR* – společná směrodatná odchylka regrese  
 SIM – proud iontu o zvolené hodnotě *m/z*  
 SPE – extrakce na tuhé fázi  
 SPME – mikroextrakce na tuhé fázi  
*t* – čas  
*T* – teplota  
 TIC – celkový iontový proud  
*t<sub>M</sub>* – mrtvý čas mobilní fáze  
*t<sub>R</sub>* – retenční čas  
*t<sub>R</sub>'* – redukovaný retenční čas  
*u* – lineární průtoková rychlost  
*V* – objem  
*w<sub>1/2</sub>* – šířka píku v polovině výšky  
*γ* – labyrintový faktor  
 6:2 FtS – 1H, 1H, 2H, 2H-perfluoroktansulfonát  
<sup>19</sup>F NMR – nukleární magnetická rezonance izotopu <sup>19</sup>F

## 7. Použitá literatura

- [1] de Voogt P.; Sáez M.  
Analytical chemistry of perfluoralkylated substances  
*Trends in Analytical Chemistry* **25**, 326-342 (2006)
- [2] Moody C. A.; Field J. A.  
Perfluorinated Surfactants and the Environmental Implications of Their Use in Fire-Fighting Foams  
*Environ. Sci. Technol.* **34**, 3864-3870 (2000)
- [3] Tseng C. L.; Liu L. L.; Chen C. M.; Ding W. H.  
Analysis of perfluorooctansulfonate and related fluorochemicals in water and biological tissue samples by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry  
*J. Chrom. A* **1105**, 119-126 (2006)
- [4] Schröder H. F.  
Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry after pressurised liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents  
*J. Chrom. A* **1020**, 131-151 (2003)
- [5] Schultz M. M.; Higgins C. P.; Huset C. A.; Luthy R. G.; Barofsky D. F.; Field J. A.  
Fluorochemical Mass Flows in a Municipal Wastewater Treatment Facility  
*Environ. Sci. Technol.* **40**, 7350-7357 (2006)
- [6] K. U. Goss; G. Bronner; T. Harner; M. Hertel; T. C. Schmidt  
The Partition Behavior of Fluorotelomer Alcohols and Olefins  
*Environ. Sci. Technol.* **40**, 3572-3577 (2006)
- [7] Houde M.; Martin J. W.; Letcher R. J.; Salomon K. R.; Muir D. C. G.  
Biological Monitoring of Polyfluoroalkyl Substance: A Review  
*Environ. Sci. Technol.* **40**, 3463-3473 (2006)
- [8] Nordstierna L.; Furó I.; Stilbs P.  
Mixed Adsorption of Fluorinated and Hydrogenated Surfactants  
*Langmuir* **22**, 7969-7974 (2006)
- [9] Powley C. R.; Michalczyk M. J.; Kaiser M. A.; Buxton L. W.  
Determination of perfluorooctanoic acid (PFOA) extractable from the surface of commercial cookware under simulated cooking conditions by LC/MS/MS  
*Analyst* **130**, 1299-1302 (2005)
- [10] Weremiuk A. M.; Gerstmann S.; Frank H.  
Quantitative determination of perfluorinated surfactants in water by LC-ESI-MS/MS  
*J. Sep. Sci.* **29**, 2251-2255 (2006)

- [11] Martin J. W.; Muir D. C. G.; Moody C. A.; Ellis D. A.; Kwan W. C.; Solomon K. R.; Mabury S. A. Collection of Airborne Fluorinated Organics and Analysis by Gas Chromatography/Chemical Ionization Mass Spectrometry  
*Anal. Chem.* **74**, 584-590 (2002)
- [12] Mawn M. P.; McKay R. G.; Ryan T. W.; Szostek B.; Powley C. R.; Buck R. C. Determination of extractable perfluorooctanoic acid (PFOA) in water, sweat simulant, saliva simulant, and methanol from textile and carpet samples by LC/MS/MS  
*Analyst* **130**, 670-678 (2005)
- [13] Ohya T.; Kudo N.; Suzuki E.; Kawashima Y. Determination of perfluorinated carboxylic acids in biological samples by high-performance liquid chromatography  
*J. Chrom. B* **720**, 1-7 (1998)
- [14] González-Barreiro C.; Martínez-Carballo E.; Sitka A.; Scharf S.; Gans O. Method optimization for determination of selected perfluorinated alkylated substances in water samples  
*Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 2123-2132 (2006)
- [15] Villagrasa M.; López de Alda M.; Barceló D. Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry: a review  
*Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 953-972 (2006)
- [16] Hashikawa Y.; Kawasaki M.; Waterland R. L.; Hurley M. D.; Ball J. C.; Wallington T. J.; Sulbaek Anderson M. P.; Nielsen O. J. Gas phase UV and IR absorption spectra of  $C_xF_{2x+1}CHO$  ( $x = 1-4$ )  
*Journal of Fluorine Chemistry* **125**, 1925-1932 (2004)
- [17] Kaiser M. A.; Larsen B. S.; Kao C. C.; Buck R. C. Vapor Pressures of Perfluorooctanoic, -nonanoic, -decanoic, -undecanoic, and -dodecanoic Acids  
*J. Chem. Eng. Data* **50**, 1841-1843 (2005)
- [18] Flaherty J. M.; Connolly P. D.; Decker E. R.; Kennedy S. M.; Ellefson M. E.; Reagen W. K.; Szostek B. Quantitative determination of PFOA in serum and plasma by LC-MS-MS  
*J. Chrom. B* **819**, 329-338 (2005)
- [19] Kannan K.; Choi J. W.; Iseki N.; Senthilkumar K.; Kim D. H.; Masunaga S.; Giesy J. P. Concentrations of perfluorinated acids in livers of birds from Japan and Korea  
*Chemosphere* **49**, 225-231 (2002)
- [20] Moody C. A.; Martin J. W.; Kwan W. C.; Muir D. C. G.; Mabury S. A. Monitoring Perfluorinated Surfactants in Biota and Surface Water Samples Following an Accidental Release of Fire-Fighting Foam into Etobicoke Creek  
*Environ. Sci. Technol.* **36**, 545-551 (2002)



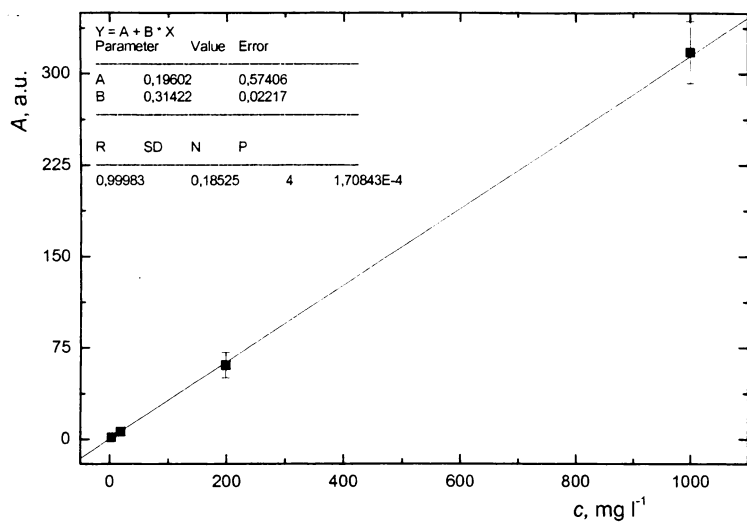
- [21] Schultz M. M.; Barofsky D. F.; Field J. A.  
Quantitative Determination of Fluorotelomer Sulfonates in Groundwater by LC-MS/MS  
*Environ. Sci. Technol.* **38**, 1828-1835 (2004)
- [22] Sinclair E.; Mayack D. T.; Roblee K.; Yamashita N.; Kannan K.  
Occurrence of Perfluoroalkyl Surfactants in Water, Fish, and Birds from New York State  
*Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **50**, 398-410 (2006)
- [23] Jahnke A.; Ahrens L.; Ebinghaus R.; Berger U.; Barber J. L.; Temme C.  
An improved method for the analysis of volatile polyfluorinated alkyl substances in environmental air samples  
*Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 965-975 (2007)
- [24] 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  
*J. Chrom. A* **1093**, 89-97 (2005)
- [25] Dinglasan M. J. A.; Ye Y.; Edwards E. A.; Mabury S. A.  
Fluorotelomer Alcohol Biodegradation Yields Poly- and Perfluorinated Acids  
*Environ. Sci. Technol.* **38**, 2857-2864 (2004)
- [26] Moody C. A.; Kwan W. C.; Martin J. W.; Muir D. C. G.; Mabury S. A.  
Determination of Perfluorinated Surfactants in Surface Water Samples by Two Independent Analytical Techniques: Liquid chromatography/ tandem mass spectrometry and <sup>19</sup>F NMR  
*Anal. Chem.* **73**, 2200-2206 (2001)
- [27] So M. K.; Taniyasu S.; Lam P. K. S.; Zheng G. J.; Giesy J. P.; Yamashita N.  
Alkaline Digestion and Solid Phase Extraction Method for Perfluorinated Compounds in Mussels and Oysters from South China and Japan  
*Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **50**, 240-248 (2006)
- [28] Shoeib M.; Harner T.; Vlahos P.  
Perfluorinated Chemicals in the Arctic Atmosphere  
*Environ. Sci. Technol.* **40**, 7577-7583 (2006)
- [29] Kärnman A.; Van Bavel B.; Järnberg U.; Hardell L.; Lindström G.  
Development of Solid-Phase Extraction – HPLC/Single Quadrupole MS Method for Quantification of Perfluorochemicals in Whole Blood  
*Anal. Chem.* **77**, 864-870 (2005)
- [30] Harada K.; Xu F.; Ono K.; Iijima T.; Koizumi A.  
Effects of PFOS and PFOA on L-type Ca<sup>2+</sup> currents in guinea-pig ventricular myocytes  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* **329**, 487-494 (2005)
- [31] Hanson M. L.; Small J.; Sibley P. K.; Boudreau T. M.; Brain R. A.; Mabury S. A.; Salomon K. R.  
Microcosm Evaluation of the Fate, Toxicity, and Risk to Aquatic Macrophytes from Perfluorooctanoic Acid (PFOA)  
*Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **49**, 307-316 (2005)

- [32] Butenhoff J. L.; Kennedy, G. L.; Hinderliter P. M.; Lieder P. H.; Jung R.; Hansen K. J.; Gorman G. S.; Noker P. E.; Thomford P. J.  
Pharmatokinetics of Perfluorooctanoate in Cynomolgus Monkeys  
*Toxicological Sciences* **82**, 394-406 (2004)
- [33] Inoue K.; Okada F.; Ito R., Kawaguchi M.; Okanouchi N.; Nakazawa H.  
Determination of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonamide in human plasma by column-switching liquid chromatography-electrospray mass spectrometry coupled with solid-phase extraction  
*J. Chrom. B* **810**, 49-56 (2004)
- [34] Hušek P.  
Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents  
*J. Chrom. B* **717**, 57-91 (1998)
- [35] Hušek P.; Šimek P.; Matucha P.  
Smooth Esterification of Di- and Tricarboxylic Acids with Methyl and Ethyl Chloroformates in Gas Chromatographic Profiling of Urinary Acidic Metabolites  
*Chromatographia* **58**, 623-630 (2003)
- [36] Maradová D.  
Stanovení C<sub>7</sub> a C<sub>8</sub> perfluorovaných kyselin metodou plynové chromatografie  
*Bakalářská práce, Katedra analytické chemie* (2006)
- [37] Belisle J.; Hagen D. F.  
A method for the determination of perfluorooctanoic acid in blood and other biological samples  
*Analytical Biochemistry* **101**, 369-376 (1980)
- [38] Moody C. A.; Field J. A.  
Determination of Perfluorocarboxylates in Groundwater Impacted by Fire-Fighting Activity  
*Environ. Sci. Technol.* **33**, 2800-2806 (1999)
- [39] Pan L.; Pawliszyn J.  
Derivatization/Solid-Phase Microextraction: New Approach to Polar Analytes  
*Anal. Chem.* **69**, 1996-2005 (1997)
- [40] Field J. A.; Miller D. J.; Field T. M.; Hawthorne S. B.; Giger W.  
Quantitative Determination of Sulfonated Aliphatic and Aromatic Surfactants in Sewage Sludge by Ion-Pair/Supercritical Fluid Extraction and Derivatization Gas Chromatography/Mass Spectrometry  
*Anal. Chem.* **64**, 3161-3167 (1992)
- [41] Field J. A.; Field T. M.; Polger T.; Giger W.  
Determination of Secondary Alkane Sulfonates in Sewage Wastewaters by Solid-Phase Extraction and Injection-Port Derivatization Gas Chromatography/Mass Spectrometry  
*Environ. Sci. Technol.* **28**, 497-503 (1994)

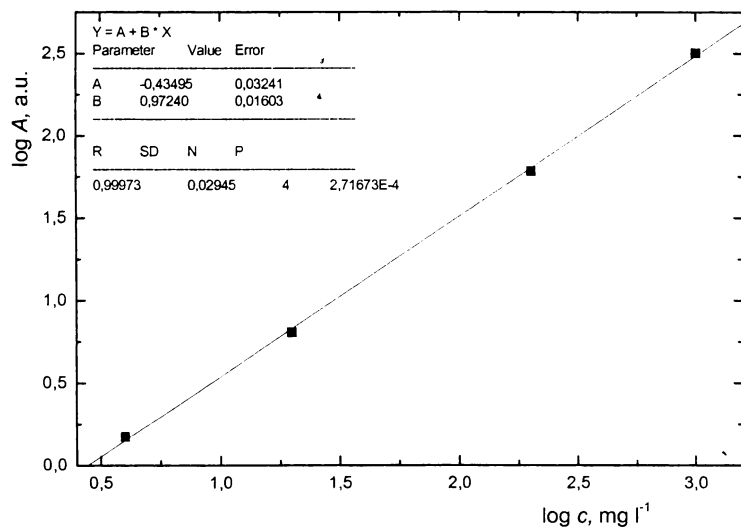
- [42] Krueger C. J.; Field J. A.  
In-Vial C<sub>18</sub> Empore Disk Elution Coupled with Injection Port Derivatization for the Quantitative Determination of Linear Alkylbenzenesulfonates by GC-FID  
*Anal. Chem.* **67**, 3363-3366 (1995)
- [43] Alzaga R.; Pena A.; Ortiz L.; Bayona J. M.  
Determination of linear alkylbenzenesulfonates in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-mass spectrometry  
*J. Chrom. A* **999**, 51-60 (2003)
- [44] Alzaga R.; Bayona J. M.  
Determination of perfluorocarboxylic acids in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry  
*J. Chrom. A* **1042**, 155-162 (2004)
- [45] Alzaga R.; Salgado-Pentinal C.; Jover E.; Bayona J. M.  
Development of procedure for the determination of perfluorocarboxylic acids in sediments by pressurised fluid extraction, headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatographic-mass spectrometric determination  
*J. Chrom. A* **1083**, 1-6 (2005)
- [46] Scott B. F.; Moody C. A.; Spencer C.; Small J. M.; Muir D. C. G.; Mabury S. A.  
Analysis for Perfluorocarboxylic Acids/Anions in Surface Waters and Precipitation Using GC-MS and Analysis of PFOA from Large-Volume Samples  
*Environ. Sci. Technol.* **40**, 6405-6410 (2006)
- [47] Scott B. F.; Spencer C.; Mabury S. A.; Muir D. C. G.  
Poly and Perfluorinated Carboxylates in North American Precipitation  
*Environ. Sci. Technol.* **40**, 7167-7174 (2006)
- [48] Schultz M. M.; Barofsky D. F.; Field J. A.  
Quantitative Determination of Fluorinated Alkyl Substances by Large-Volume-Injection Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry - Characterization of Municipal Wastewaters  
*Environ. Sci. Technol.* **40**:1, 289-295 (2006)
- [49] Higgins C. P.; Field J. A.; Criddle C. S.; Luthy R. G.  
Quantitative Determination of Perfluorochemicals in Sediments and Domestic Sludge  
*Environ. Sci. Technol.* **39**, 3946-3956 (2005)
- [50] Kannan K.; Corsolini S.; Falandysz J.; Fillmann G.; Senthil Kumar K.; Loganathan B. G.; Mohd M. A.; Olivero J.; Van Wouwe N.; Yang J. H.; Aldous K. M.  
Perfluorooctanesulfonate and Related Fluorochemicals in Human Blood from Several Countries  
*Environ. Sci. Technol.* **38**, 4489-4495 (2004)

- [51] Hansen K. J.; Clemen L. A.; Ellefson M. E.; Johnson H. O.  
Compound-Specific, Quantitative Characterization of Organic Fluorochemicals in Biological  
Matrices  
*Environ. Sci. Technol.* **35**, 766-770 (2001)
- [52] Olsen G. W.; Huang H. Y.; Helzlsouer J.; Hansen K. J.; Butenhoff J. L.; Mandel J. H.  
Historical Comparison of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorooctanoate and Other  
Fluorochemicals in Human Blood  
*Environmental Health Perspectives* **113**, 539-545 (2005)
- [53] Wójcik L.; Korczak K.; Szostek B.; Trojanowicz M.  
Separation and determination of perfluorinated carboxylic acids using capillary zone  
electrophoresis with indirect photometric detection  
*J. Chrom. A* **1128**, 290-297 (2006)
- [54] Smolková E.; Feltl L.  
*Analýza látek v plynném stavu*  
Praha, SNTL (1991)
- [55] Opekar F.; Jelínek I.; Rychlovský P.; Plzák Z.  
*Základní analytická chemie*  
Praha, Nakladatelství Karolinum (2003)
- [56] Štulík K. a kol.  
*Analytické separační metody*  
Praha, Nakladatelství Karolinum (2004)

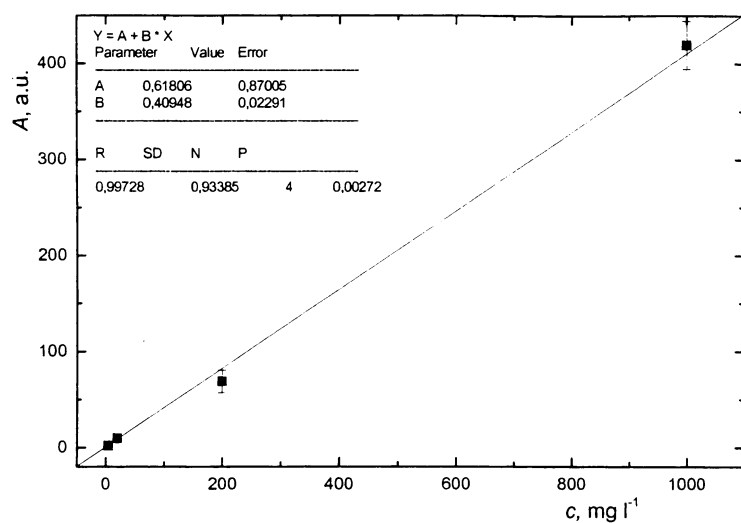
## 8. Přílohy



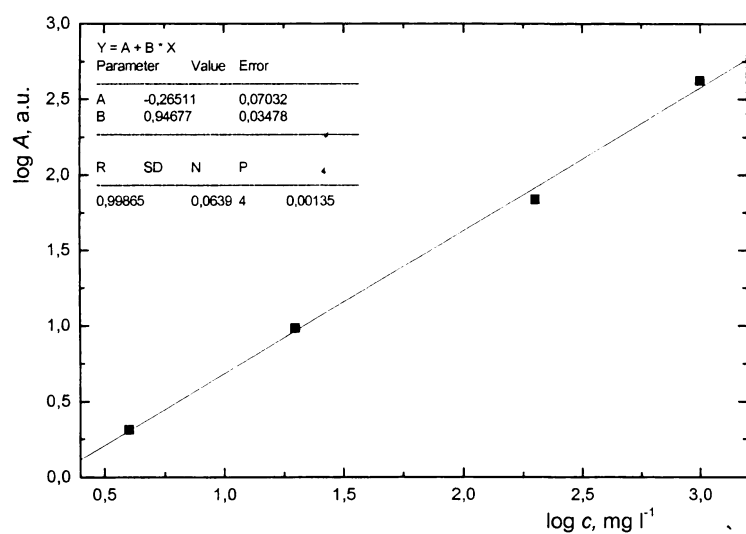
Obrázek 8.1 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluorheptanové ve split módu (GC-ECD)



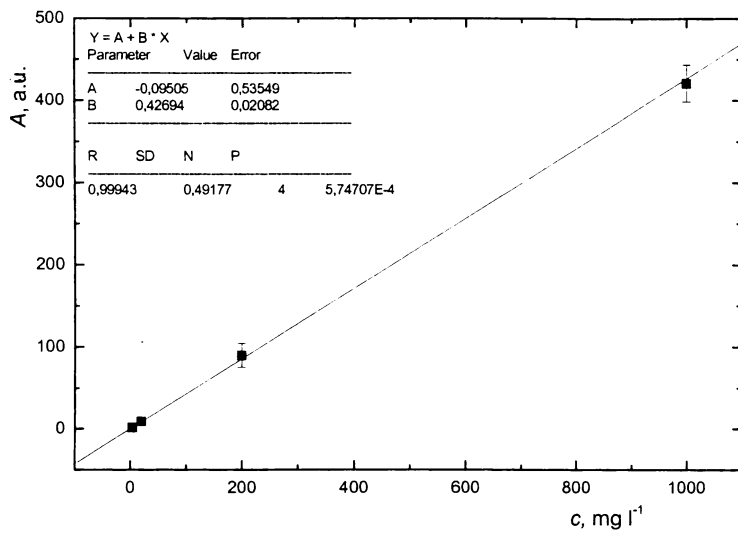
Obrázek 8.2 – Logaritmičká kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluorheptanové ve split módu (GC-ECD)



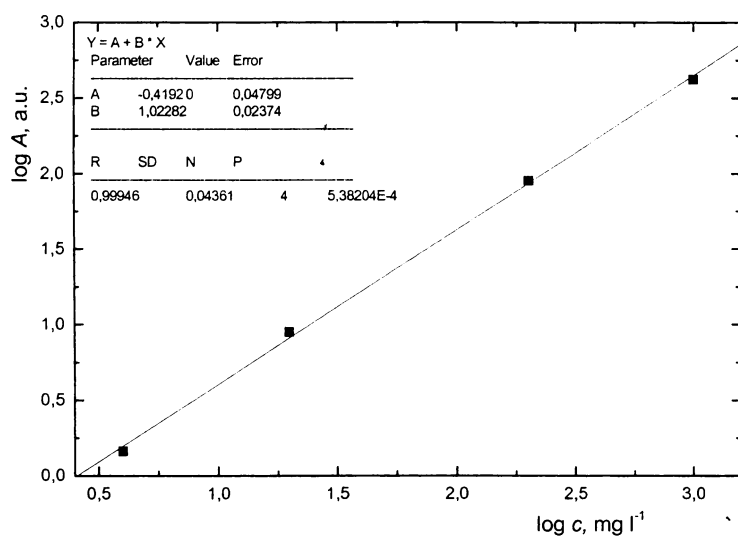
Obrázek 8.3 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové ve split módu (GC-ECD)



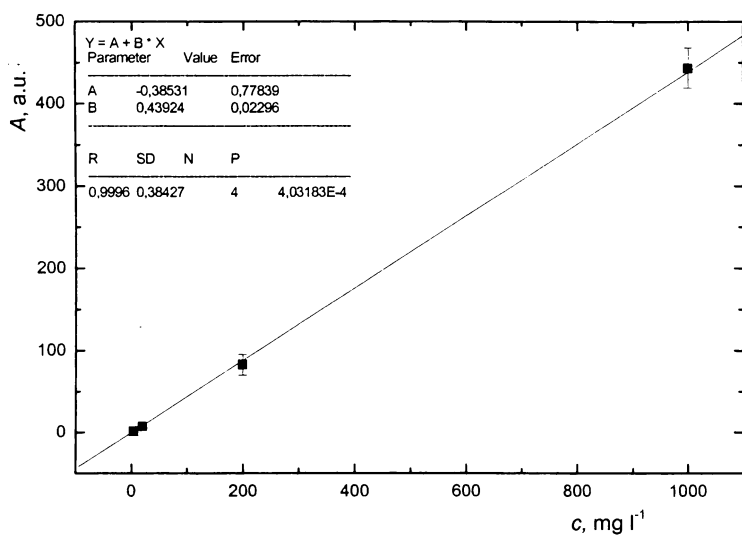
Obrázek 8.4 – Logaritmičká kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové ve split módu (GC-ECD)



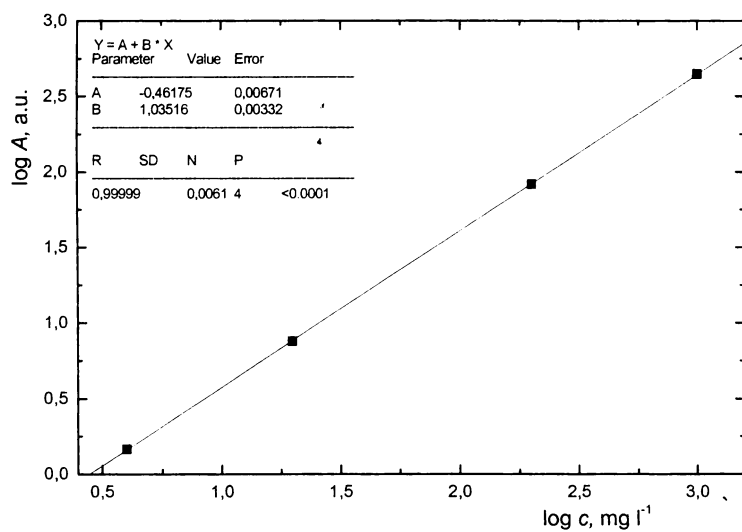
Obrázek 8.5 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluornonanové ve split módu (GC-ECD)



Obrázek 8.6 – Logaritmičká kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluornonanové ve split módu (GC-ECD)

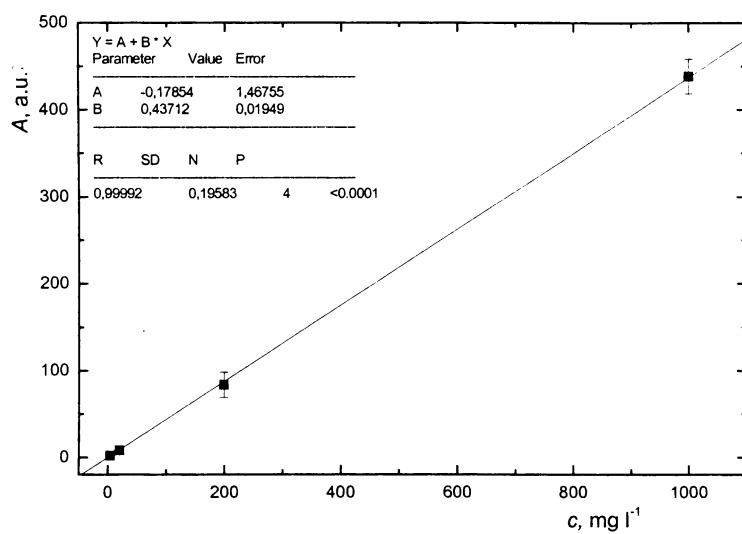


Obrázek 8.7 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordekanové ve split módu (GC-ECD)

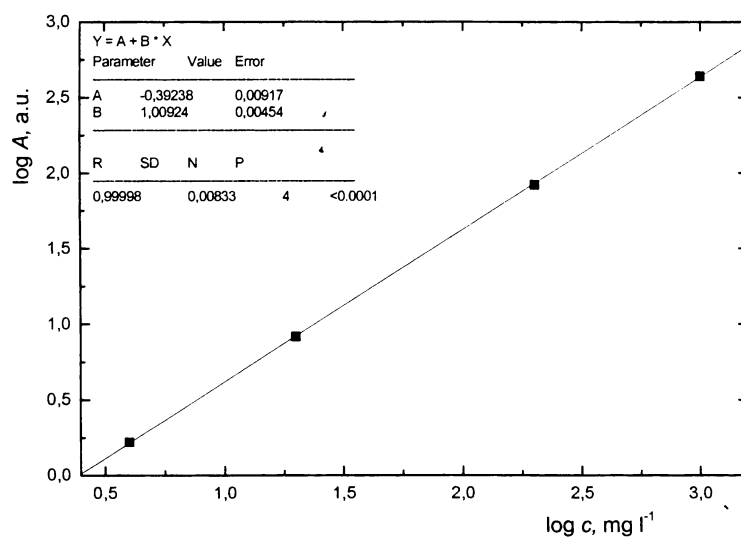


Obrázek 8.8 – Logaritmická kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordekanové ve split módu (GC-ECD)

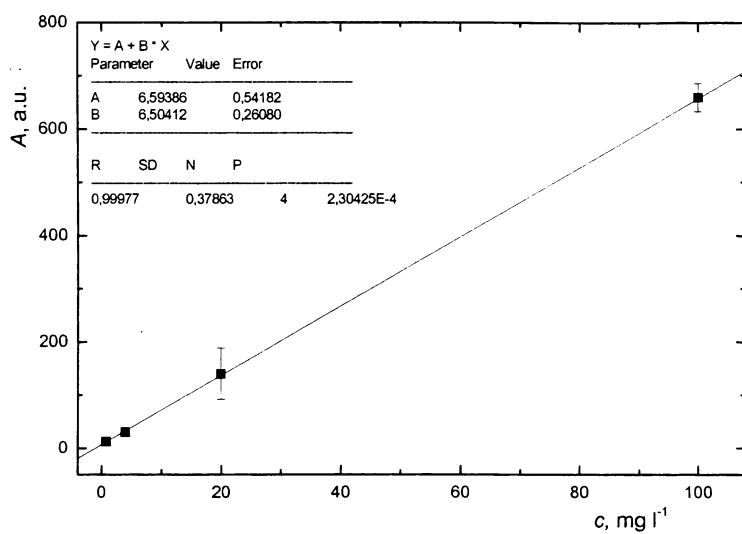




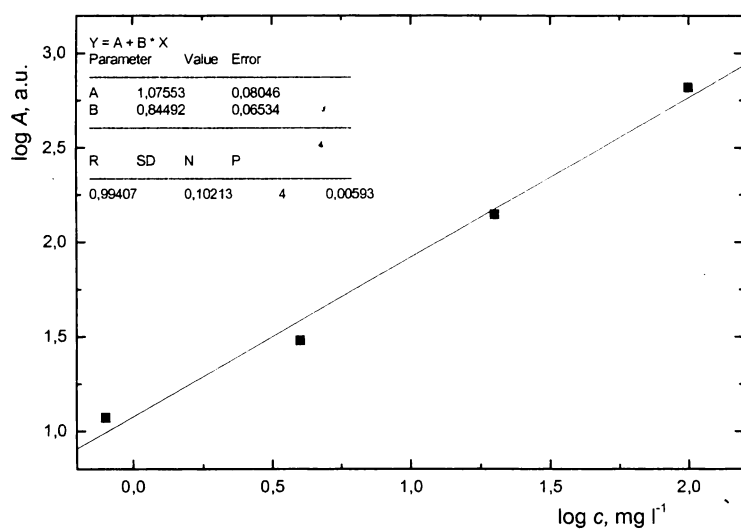
Obrázek 8.9 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordodekanové ve split módu (GC-ECD)



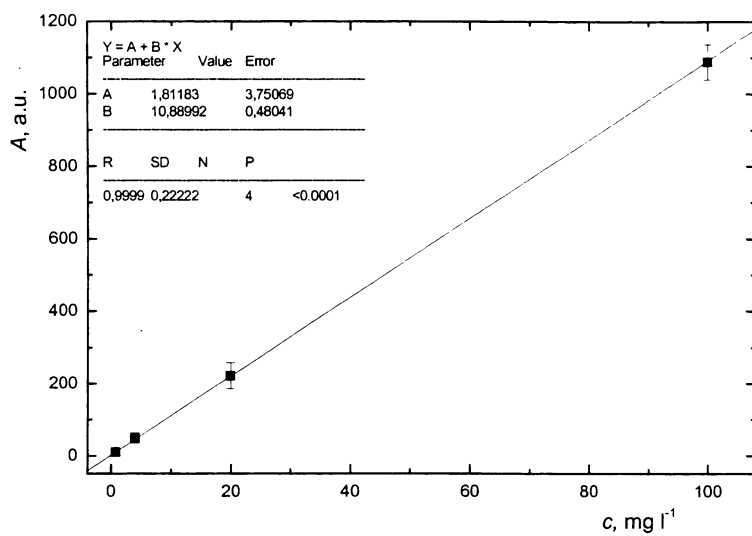
Obrázek 8.10 – Logaritmičká kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordodekanové ve split módu (GC-ECD)



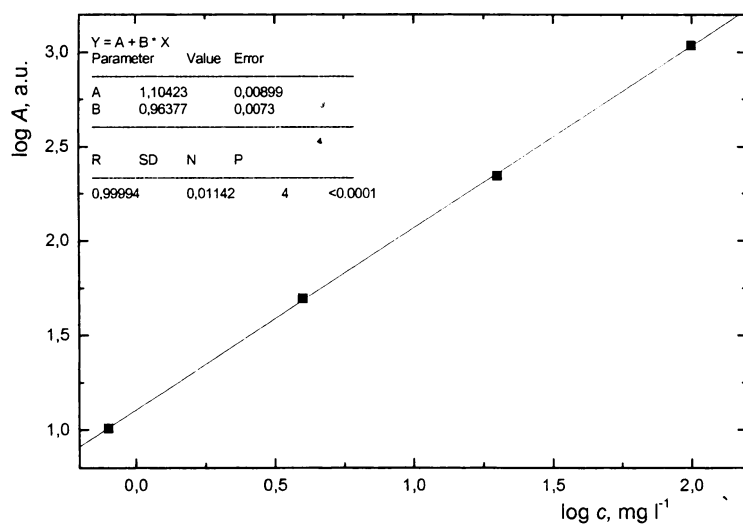
Obrázek 8.11 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluorheptanové ve splitless (GC-ECD)



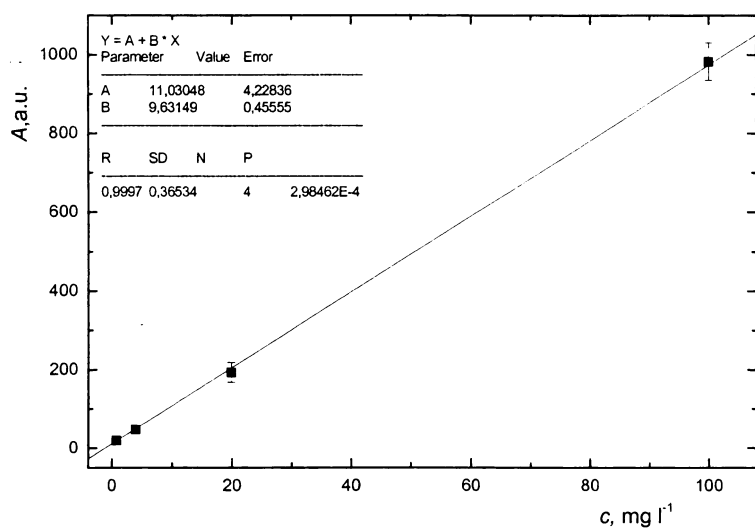
Obrázek 8.12 – Logaritmická kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluorheptanové ve splitless (GC-ECD)



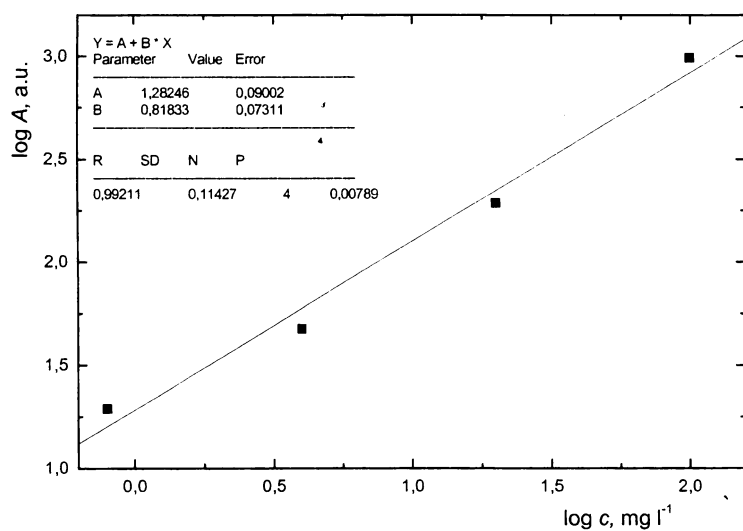
Obrázek 8.13 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové ve splitless (GC-ECD)



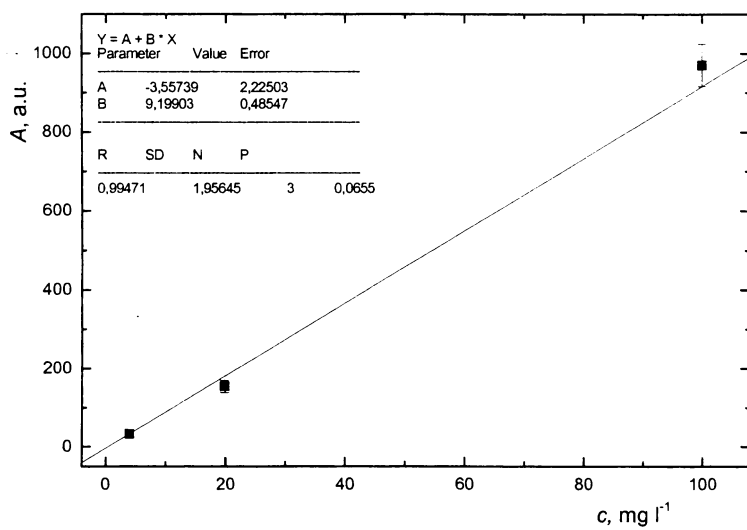
Obrázek 8.14 – Logaritmičká kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluoroktanové ve splitless (GC-ECD)



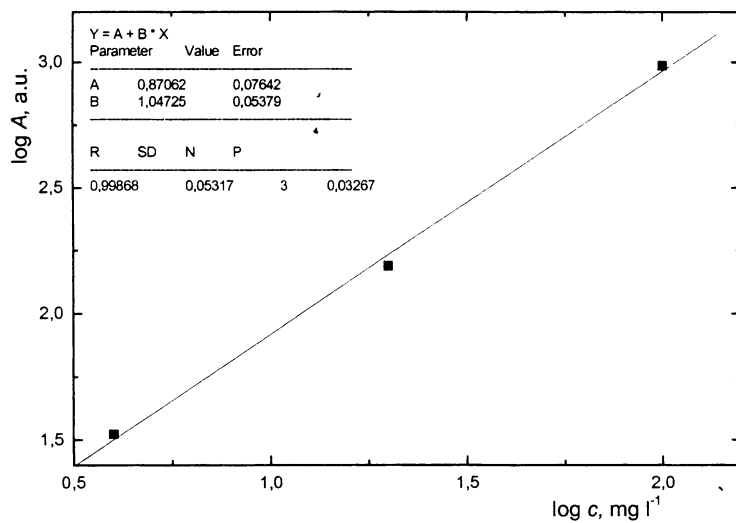
Obrázek 8.15 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluoromonanové ve splitless (GC-ECD)



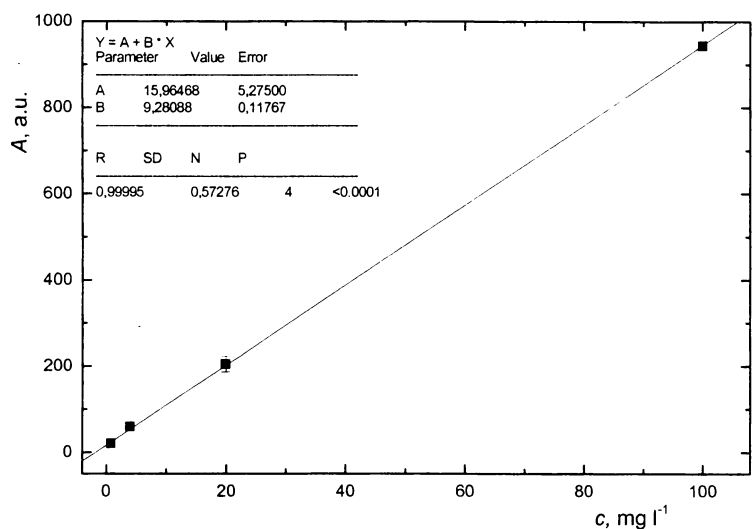
Obrázek 8.16 – Logaritmická kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluoromonanové ve splitless (GC-ECD)



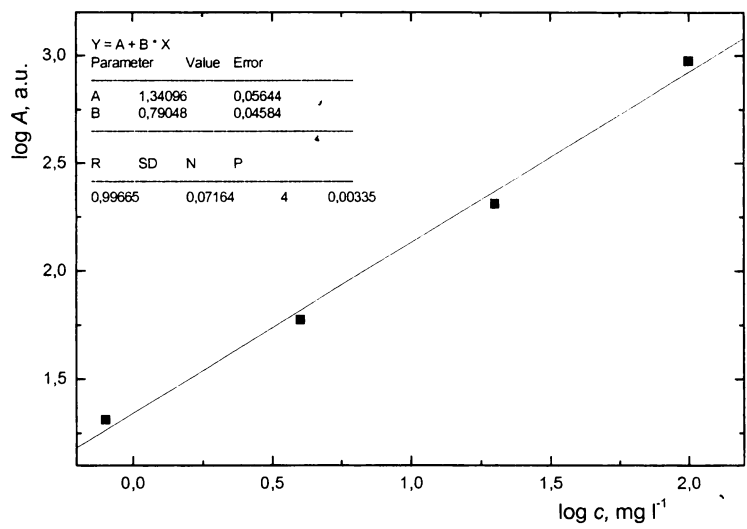
Obrázek 8.17 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordekanové ve splitless (GC-ECD)



Obrázek 8.18 – Logaritmičká kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordekanové ve splitless (GC-ECD)



Obrázek 8.19 – Kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordodekanové ve splitless (GC-ECD), totožný s obrázkem 4.6.1



Obrázek 8.20 – Logaritmičká kalibrační závislost isobutylesteru kyseliny perfluordodekanové ve splitless (GC-ECD)