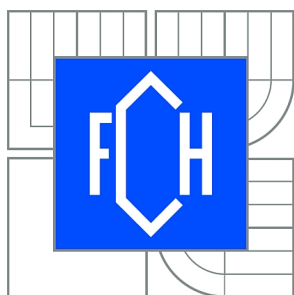


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ VYBRANÝCH PERFLUOROALKYLOVÝCH SLOUČENIN V KOMPLEXNÍCH MATRICÍCH

DETERMINATION OF SELECTED PERFLUOROALKYL COMPOUNDS IN COMPLEX MATRICES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KLÁRA KANTOŠOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Petra Kosubová, Ph.D

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0848/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Klára Kantošová	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	Mgr. Petra Kosubová, Ph.D	
Konzultanti:	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	

Název diplomové práce:

Stanovení vybraných perfluoroalkylových sloučenin v komplexních matricích

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování přehledné literární rešerše týkající se problematiky výskytu, použití a analytického stanovení perfluoroalkylových sloučenin (PFAS) v různých environmentálních matricích
2. Optimalizace přípravy vzorků pro stanovení vybraných PFAS v obtížně zpracovatelných matricích (čistírenské kaly, krmiva živočišného původu)
3. Optimalizace finální analýzy pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS)
4. Analýza souboru reálných vzorků
5. Přehledné zhodnocení získaných výsledků, porovnání s publikovanými daty

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Klára Kantošová
Student(ka)

Mgr. Petra Kosubová, Ph.D
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá stanovením vybraných zástupců perfluoroalkylových sloučenin v komplexních maticích, konkrétně v čistírenských kalech a krmivech.

V případě čistírenských kalů byly vzorky extrahovány do methanolu a byly srovnány tři extrakční techniky: zrychlený Soxhlet, tlaková extrakce rozpouštědlem a Powleyho metoda. Powleyho metoda vykazovala dostatečnou účinnost, nejmenší matricové efekty a minimální pozadí. Ve všech testovaných vzorcích kalů byl přítomen perfluorooktansulfonát ($0,74\text{--}38,02\text{ ng.g}^{-1}$). Perfluorodekanová a perfluorooktanová kyselina byly další nejčastěji detekované analyty.

Na vzorcích krmiv byly testovány tři extrakční techniky: QuEChERS, rychlá methanolová extrakce a Powleyho metoda s extrakcí do acetonitrilu. Powleyho metoda poskytovala nejčistší extrakty a zároveň vykazovala nejvyšší výtěžnost nativních perfluoroalkylových sloučenin a nejnižší matricové efekty. Ve vzorcích kompletních a doplňkových krmiv byly ojediněle detekovány perfluorooktansulfonát a perfluorooktanová kyselina. Obsahy ostatních perfluoroalkylových sloučenin byly pod limitem kvantifikace nebo nebyly detekovány vůbec. Ve všech rybích moučkách byl stanoven perfluorooktansulfonát ($0,100\text{--}2,768\text{ ng.g}^{-1}$), perfluoroundekanová kyselina a perfluorotridekanová kyselina.

ABSTRACT

Diploma work focuses on the determination of selected representatives of perfluoroalkyl substances in complex matrices, particularly, in sewage sludge and feed.

In case of sewage sludge, samples were extracted into methanol and three extractions techniques were compared: accelerated Soxhlet, pressurized liquid extraction and Powley method. Powley method showed sufficient efficiency, the lowest matrix effect and minimal background. Perfluorooctane sulfonate was present in all tested samples of sewage sludge ($0.74\text{--}38.02\text{ ng.g}^{-1}$). Other detected compounds were perfluorodecanoic acid and perfluorooctanoic acid.

Three extraction techniques were tested on feed samples (QuEChERS, fast methanol extraction and Powley method into acetonitrile). Powley method provided the cleanest extracts and showed simultaneously the highest recovery of native perfluoroalkyl substances and the lowest matrix effects. Perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid were rarely present in samples of complete and supplemental feeds, while other perfluoroalkyl substances were found at levels below limit of quantification or they were not detected at all. Perfluorooctane sulfonate ($0.100\text{--}2.768\text{ ng.g}^{-1}$), perfluoroundecanoic acid and perfluorotridecanoic acid were determined in all fish meal samples.

KLÍČOVÁ SLOVA

Perfluoroalkylové sloučeniny, PFOS, PFOA, extrakce, Powleyho metoda, komplexní matrice, čistírenský kal, krmivo, UPLC-MS/MS

KEYWORDS

Perfluoroalkyl substances, PFOS, PFOA, extraction, Powley method, complex matrix, sewage sludge, feed, UPLC-MS/MS

KANTOŠOVÁ, K. *Stanovení vybraných perfluoroalkylových sloučenin v komplexních maticích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 76 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Petra Kosubová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Klára Kantošová

PODĚKOVÁNÍ

Velmi ráda bych poděkovala Mgr. Petře Kosubové, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení a investovaný čas při realizaci a zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Josefovi Čáslavskému, CSc. za konzultace a odborné připomínky. A také bych chtěla poděkovat Ing. Markétě Pospíchalové a RNDr. Jiřímu Zbíralovi, Ph.D. za umožnění realizace této diplomové práce v laboratořích Národní referenční laboratoře ÚKZÚZ, regionální oddělení Brno.

OBSAH

1. Úvod	7
2. Teoretická část	8
2.1. Charakteristika perfluoroalkylových sloučenin	8
2.1.1. Vlastnosti	8
2.1.2. Výroba	9
2.1.2.1. Elektrochemická fluorace	9
2.1.2.2. Telomerace	10
2.1.3. Použití	10
2.1.4. Vybrané PFAS	11
2.1.4.1. Perfluorokarboxylové kyseliny	11
2.1.4.2. Perfluoroalkansulfonové kyseliny	12
2.1.4.3. PFAS s dlouhým řetězcem	13
2.2. Perfluoroalkylové sloučeniny v životním prostředí	14
2.2.1. Výskyt PFAS v životním prostředí	14
2.2.1.1. Voda	14
2.2.1.2. Ovzduší	15
2.2.1.3. Půda	15
2.2.1.4. Sedimenty	15
2.2.1.5. Čistírenské kaly	16
2.2.1.6. Krmiva	17
2.2.1.7. Potraviny	18
2.2.1.8. Zvířata	18
2.2.1.9. Člověk	18
2.2.2. Zdroje PFAS v životním prostředí	19
2.2.3. Osud PFAS v životním prostředí	20
2.2.3.1. Transformace a degradace	20
2.2.3.2. Transport	21
2.2.4. Toxicita PFAS	21
2.3. Stanovení perfluoroalkylových sloučenin	23
2.3.1. Matrice	23
2.3.1.1. Ovzduší	23
2.3.1.2. Voda	24
2.3.1.3. Abiotické pevné matrice	24
2.3.1.4. Potraviny a biotické matrice	24
2.3.2. Extrakce vzorku	25
2.3.2.1. Iontové párování	25
2.3.2.2. Alkalická hydrolýza	25
2.3.2.3. Zrychlený Soxhlet	25
2.3.2.4. Tlaková extrakce rozpouštědlem (PLE)	26
2.3.2.5. Powleyho metoda	27
2.3.2.6. QuEChERS	27
2.3.2.7. Mikroextrakce tetrahydrofuranem	28
2.3.2.8. Rychlá methanolová extrakce	28

2.3.3.	Čistění vzorku.....	28
2.3.3.1.	Extrakce tuhou fází	28
2.3.3.2.	Mikroextrakce tuhou fází (SPME).....	30
2.3.3.3.	Disperzní extrakce tuhou fází	30
2.3.4.	Analytické metody stanovení	31
2.3.4.1.	Plynová chromatografie	31
2.3.4.2.	Kapalinová chromatografie.....	32
2.3.4.3.	Hmotnostní spektrometrie.....	35
2.3.4.4.	Ultra-účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS)	37
2.3.4.5.	Ultra-účinný kapalinový chromatograf s tandemovým hmotnostním spektrometrem ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo firmy Waters	38
3.	Experimentální část	40
3.1.	Chemikálie a standardy	40
3.2.	Přístroje a pomůcky	40
3.3.	Stanovení PFAS v čistírenských kalech	41
3.3.1.	Testování extrakčních metod.....	41
3.3.1.1.	Tlaková extrakce rozpouštědlem	41
3.3.1.2.	Zrychlený Soxhlet (Büchi).....	42
3.3.1.3.	Modifikovaná Powleyho metoda (sonifikace)	43
3.3.2.	Optimalizace čištění extraktu	44
3.3.2.1.	Čištění aktivním uhlím.....	44
3.3.2.2.	Čištění hexanem.....	44
3.3.3.	Finální zpracování vzorku	44
3.4.	Stanovení PFAS v krmivech	45
3.4.1.	Rychlá methanolová extrakce.....	45
3.4.2.	Powleyho metoda	46
3.4.3.	QuEChERS.....	47
3.5.	Stanovení pomocí UPLC-MS/MS.....	49
4.	Výsledky a diskuze	51
4.1.	Stanovení PFAS v kalech	51
4.1.1.	Testování extrakčních metod.....	51
4.1.2.	Optimalizace čištění extraktu	54
4.1.2.1.	Čištění aktivním uhlím.....	54
4.1.2.2.	Čištění extrakcí do hexanu.....	54
4.1.3.	Analýza vzorků kalů pomocí UPLC-MS/MS	55
4.1.4.	Pracovní charakteristiky metody UPLC-MS/MS.....	58
4.2.	Stanovení PFAS v krmivech	59
4.2.1.	Testování metod přípravy.....	59
4.2.2.	Optimalizace UPLC-MS/MS metody	62
4.2.3.	Analýza vzorků krmiv pomocí UPLC-MS/MS.....	63
4.2.4.	Pracovní charakteristiky metody UPLC-MS/MS.....	67
5.	Závěr.....	70
6.	Seznam použitých zdrojů.....	71
7.	Seznam použitých zkratk	75

1. ÚVOD

Perfluoroalkylové sloučeniny (PFAS) představují velice rozsáhlou skupinu látek vyráběných člověkem. Jedná se o látky, jejichž struktura je složena z plně fluorovaného alkylového řetězce a hydrofilní funkční skupiny. Tyto látky mají výjimečné fyzikálně-chemické vlastnosti, a proto nalézají uplatnění v různých odvětvích průmyslu a spotřebitelském zboží především jako povrchově aktivní látky.

Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny látek jsou perfluorokarboxylové kyseliny a perfluorosulfonáty, konkrétně perfluorooktanová kyselina (PFOA) a perfluorooktansulfonát (PFOS). Obě tyto látky byly vyráběny ve velkém množství, a proto jsou nalézány ve všech složkách životního prostředí, včetně vzdálených arktických oblastí. V životním prostředí jsou velice stabilní, nepodléhají hydrolýze, fotolýze, metabolismu ani biodegradaci. Také splňují definici perzistentních organických polutantů, tj. jsou toxické, perzistentní a bioakumulativní.

Z těchto důvodů v roce 2002 zrušil výrobu PFOS největší celosvětový producent, společnost 3M. V roce 2006 podepsalo 8 světových výrobních společností program „2010/2015 PFOA Stewardship“ (US EPA), ve kterém se zavázaly snížit emise a produkci PFOA o 95 % do roku 2010 a pracovat na eliminaci jejich emisí a produkci do roku 2015. V roce 2009 byl PFOS přidán mezi POPs do Stockholmské úmluvy na seznam látek s omezeným používáním.

Přes všechna tato omezení jsou PFOS a PFOA nadále detekovány v životním prostředí, což je způsobeno jejich dlouhým poločasem života a také tím, že PFOS a PFOA jsou koncovými degradačními produkty perfluoroalkylových sloučenin.

Perfluoroalkylové sloučeniny se nacházejí v různých matricích, především ve vodě, ale také ve vzduchu, sedimentech, čistírenských kalech, potravinách, biotě a lidské krvi. Pro extrakci těchto analytů z různých typů matric existuje mnoho metod. Tři základní typy extrakce z pevných vzorků jsou iontové párování, alkalická hydrolýza a extrakce organickým rozpouštědlem. Po extrakci a čištění vzorku jsou PFAS analyzovány většinou pomocí GC-MS nebo LC-MS. V dnešní době je nejčastěji používána technika LC-MS/MS, která nevyžaduje derivatizaci sledovaných analytů, je specifická, citlivá a poskytuje nízké LOQ.

Tato diplomová práce je zaměřena na stanovení vybraných PFAS v čistírenských kalech a krmivech metodou UPLC-MS/MS. Čistírenské kaly jsou potenciálním zdrojem PFAS, které se na ně adsorbují během procesu čištění odpadních vod. Kaly mohou být používány jako hnojivo na zemědělskou půdu, a jelikož v České republice nejsou PFAS legislativně omezeny, může prostřednictvím kalu docházet k jejich vstupu do potravního řetězce člověka. V krmivech bývá často používanou surovinou rybí moučka, vyráběná jako vedlejší produkt při zpracování ryb. Ryby patří mezi komodity nejvíce kontaminované těmito látkami. Zkrmováním materiálů kontaminovaných PFAS může opět docházet ke vstupu těchto látek do potravního řetězce člověka. Cílem práce je zmapovat výskyt PFAS v uvedených matricích aplikovaných v zemědělské praxi v České republice.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Charakteristika perfluoroalkylových sloučenin

Perfluoroalkylové sloučeniny (PFAS) jsou látky, které se skládají z hydrofobního alkylového řetězce a hydrofilní funkční skupiny. Alkylový řetězec může být různě dlouhý, obvykle v rozsahu 4 až 16 atomů uhlíku, a v případě perfluorovaných látek je plně fluorovaný, tj. všechny vodíkové atomy jsou nahrazeny fluorem. Polyfluorované sloučeniny mají alkylový řetězec fluorován jen částečně a jejich vlastnosti jsou ovlivněny počtem a umístěním fluorů [1, 2].

Perfluorované sloučeniny jsou rozděleny do několika skupin. Nejvýznamnější skupiny jsou perfluorokarboxylové kyseliny, perfluoroalkansulfonáty, perfluoroalkansulfonamidy, perfluoroalkansulfoamidoethanoly, perfluoroalkylfosfonové kyseliny a fluorované telomerní alkoholy [3].

Název	Strukturní vzorec
Perfluoroalkylkarboxylové kyseliny (Perfluoroalkylcarboxylic acids)	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$
Perfluoroalkylsulfonáty (Perfluoroalkylsulfonates)	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{O}^-$
Perfluorooctansulfonamidy (Perfluorooctanesulfonamides)	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{N}(\text{R}_1)(\text{R}_2)$
Perfluorooctansulfoamidoethanoly (Perfluorooctanesulfonamidoethanol)	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})(\text{R})$
Perfluoroalkylfosfonové kyseliny (Perfluoroalkylphosphonic acid)	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}(\text{OH})_2$

Obrázek č. 1 - Názvy a strukturní vzorce hlavních skupin PFAS [3]

2.1.1. Vlastnosti

Perfluoroalkylové sloučeniny mají výjimečné fyzikálně-chemické vlastnosti. Fluor má největší elektronegativitu ze všech prvků, což způsobuje silnou polaritu vazby uhlík-fluor. Tato vazba C-F je velmi silnou kovalentní vazbou. Její vazebná energie je $515 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, zatímco vazebná energie vazby C-H (v methanu) je $410 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Proto jsou PFAS chemicky odolné vůči kyselinám, zásadám, oxidačně-redukčním činidlům. PFAS jsou také tepelně stabilní a za běžných podmínek nepodléhají fotolýze, hydrolýze ani biodegradaci [3, 4].

Jelikož PFAS obsahují ve své molekule hydrofilní i hydrofobní část, odpuzují vodu i olej. Skupiny jako např. karboxylová, sulfonová, fosfátová nebo kvartérní amoniak, připojené k perfluoroalkylovému řetězci, způsobují větší rozpustnost molekuly ve vodě díky jejich hydrofilní povaze [3, 4].

2.1.2. Výroba

Perfluoroalkylové sloučeniny byly vyráběny od 50. let 20. století v poměrně značném množství. Hlavním producentem perfluorooktansulfonátu (PFOS) a podobných sloučenin byla před rokem 2000 americká společnost 3M. Jelikož byly nalezeny vysoké koncentrace těchto látek v životním prostředí i ve vzdálených oblastech a přítomnost PFAS byla zjištěna také u zaměstnanců, společnost 3M zrušila v letech 2000–2002 jejich produkci [1, 3, 5].

V roce 2006 podepsalo 8 světových společností včetně hlavního producenta PFOA (firma DuPont) „2010/2015 PFOA Stewardship Program“ (US EPA), ve kterém se zavázaly snížit emise a produkci PFOA, vyšších homologů a prekurzorů o 95 % do roku 2010 a pracovat na eliminaci jejich emisí a produkci do roku 2015. Nyní se tyto látky vyrábí v Evropě, Asii, Latinské Americe a vyrobí se cca 12 000 tun za rok [1, 3, 5].

Pro výrobu PFAS se používají dva hlavní procesy, a to elektrochemická fluorace a telomerace [1].

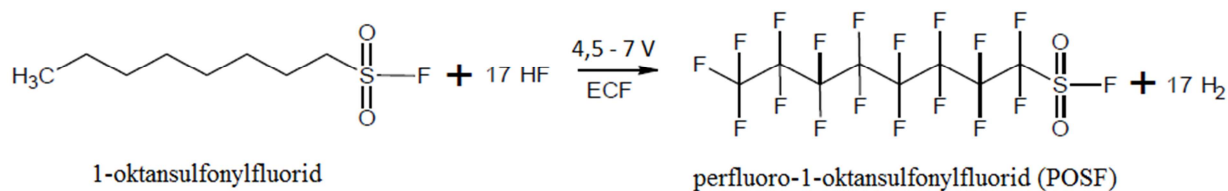
2.1.2.1. Elektrochemická fluorace

Elektrochemická fluorace (ECF) je proces, při kterém je organická surovina s přímým řetězcem rozptýlena v kapalném bezvodém fluorovodíku a tímto roztokem prochází elektrický proud (elektrolýza). To způsobuje nahrazení vodíkových atomů v molekule fluorem. Hlavní produkt tohoto procesu má stejné uspořádání uhlíkového skeletu jako původní organická surovina. Nicméně se může vyskytovat také fragmentace a přeuspořádání uhlíkového skeletu, čímž mohou vznikat rozštěpené, rozvětvené a cyklické struktury. Výsledkem je tedy směs lineárních a rozvětvených perfluorovaných isomerů, homologů surového materiálu a fluorovaných uhlovodíků. Při syntéze PFOS a PFOA vzniká 70–80 % lineárních a 20–30 % rozvětvených isomerů [4, 5].

Stupeň fluorace závisí na délce uhlíkového řetězce použité suroviny a na parametrech procesu jako jsou intenzita elektrického proudu a doba průběhu procesu. Je možno syntetizovat plně fluorované molekuly, které mají všechny vodíkové atomy vstupující organické suroviny nahrazeny atomy fluoru [4, 5].

Společnost 3M byla před ukončením provozu zaměřena především na produkci PFOS. Vstupující organickou surovinou do procesu ECF byl 1-oktansulfonylfluorid ($C_8H_{17}SO_2F$). Ten se během procesu přeměnil na cílovou sloučeninou perfluorooktansulfonylfluorid (POSF, $C_8F_{17}SO_2F$). Pomocí chemické nebo enzymatické hydrolýzy POSF byl získán výsledný PFOS, který je konečným degradačním produktem POSF. Kromě PFOS mohou být ze základního POSF vyráběny další látky, jako např. FOSA a FOSE [4, 5].

Elektrochemická fluorace oktanoylfluoridu ($C_7H_{15}COF$) je hlavní proces výroby perfluorooktanoylfluoridu ($C_7F_{15}COF$), ze kterého další reakcí vzniká PFOA a její soli [5].



Obrázek č. 2 – Příklad elektrochemické fluorace (upraveno podle [6])

2.1.2.2. Telomerace

Telomerace (TM) je reakce tetrafluoroethylenu ($\text{CF}_2 = \text{CF}_2$) s perfluoroalkyljodidem (nejčastěji perfluoroethyljodid, $\text{CF}_3 - \text{CF}_2\text{I}$) za vzniku směsi perfluoroalkyljodidů s delšími perfluorovanými řetězci $\text{C}_m\text{F}_{2m+1}(\text{CF}_2\text{CF}_2)_n\text{I}$. Tato směs jodidů reaguje dále v druhém kroku s ethylenem za vzniku fluorotelomerjodidů $\text{C}_m\text{F}_{2m+1}(\text{CF}_2\text{CF}_2)_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$. Ty jsou dále používány jako surovina pro výrobu povrchově aktivních látek a polymerů na bázi fluorotelomerů (např. fluorotelomerní alkoholy, FTOH). Přímo z perfluoroalkyljodidů lze vyrábět perfluorokarboxylové kyseliny, např. PFOA [2, 5].

Na rozdíl od ECF vznikají procesem telomerace výhradně lineární řetězce bez větvení nebo cyklení. Jen v případě, že již vstupující surovina perfluoroalkyljodid je rozvětvená nebo s lichým počtem uhlíků, vzniká směs rozvětvených produktů nebo produktů s lichým počtem uhlíků [2, 5].

2.1.3. Použití

PFAS jsou díky svým jedinečným vlastnostem používány v mnoha průmyslových odvětvích. Díky své amfifilní povaze mohou být používány jako povrchově aktivní látky, kde fluorovaný alkylový řetězec je zodpovědný za schopnost PFAS redukovat povrchové napětí [4]. Využívají se při výrobě povrchově upravených textilií, koberců, kůží a v potravinářských balících materiálech, kde působí jako odpuzovač vody a nečistot. Také se přidávají do hasících pěn a hydraulických tekutin (v letecké dopravě), používají se při pokovování, výrobě polovodičů, fotografických zařízení a čisticích prostředků. PFOA se používá jako emulgátor při výrobě polytetrafluorethylenu (teflon) a dalších fluoropolymerů [2, 3].

V roce 2004 byly v Kanadě dočasně zakázány fluoropolymery obsahující fluorotelomerní alkoholy a Norsko zakázalo používání PFOS v hasících pěnách, textiliích a impregnačních činidlech. V dnešní době je používání PFOS v Evropské unii omezeno směrnicí 2006/122/ES. V květnu 2009 bylo na 4. konferenci smluvních stran Stockholmské úmluvy o perzistentních organických polutantech rozhodnuto o zařazení PFOS na seznam zakázaných látek s omezeným použitím [3, 7].

Mezi přijatelné účely použití PFOS a jeho solí patří např. antireflexní povrchová úprava pro polovodiče, hydraulické kapaliny pro leteckou dopravu, pokovování pouze v systému uzavřené smyčky, hasící pěny a hmyzí návnady [8].

2.1.4. Vybrané PFAS

Perfluoroalkylové sloučeniny tvoří několik skupin, z nichž každá obsahuje mnoho jednotlivých homologů a jejich isomerů. Základní rozdělení PFAS je do dvou primárních kategorií: nepolymerní a polymerní. Předmětem mého zájmu je pouze jedna skupina nepolymerních PFAS, a to perfluoroalkylové kyseliny, mezi které patří mimo jiné perfluorokarboxylové a perfluoroalkansulfonové kyseliny [5].

Perfluoroalkylové kyseliny (PFAA) jsou vysoce perzistentní látky, které jsou emitovány do životního prostředí buď přímo, nebo vznikají nepřímo procesem degradace nebo metabolismu z prekurzorů. Byly široce využívány jak v průmyslu, tak ve spotřebním zboží. V závislosti na jejich disociační konstantě PFAA více či méně disociují na anionty. Disociovaná a nedisociovaná forma mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, např. perfluorooktanoát je dobře rozpustný ve vodě a má zanedbatelnou tenzi par, zatímco kyselina perfluorooktanová má malou rozpustnost ve vodě a dostatečnou tenzi par pro těkání z vody do vzduchu [5].

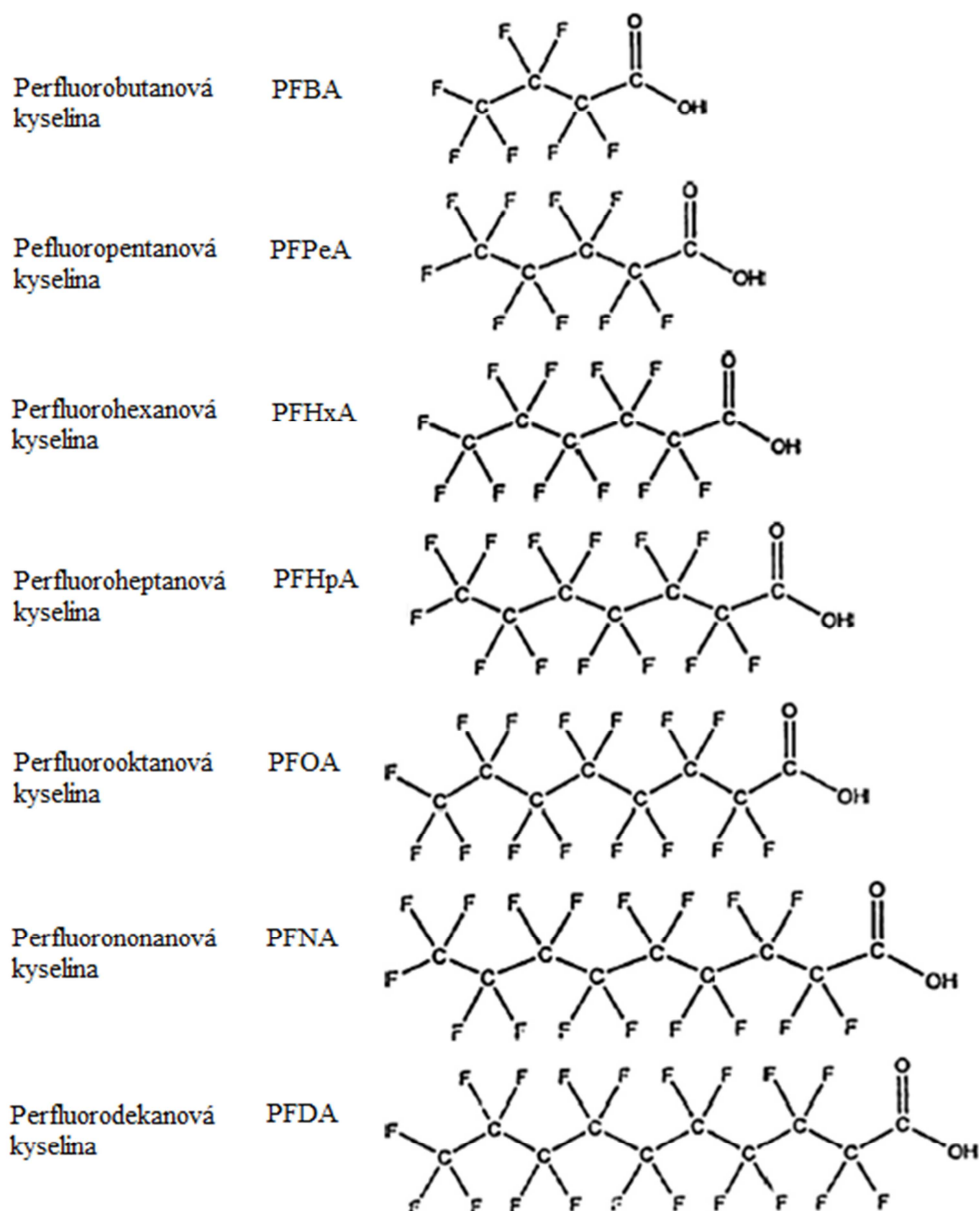
2.1.4.1. Perfluorokarboxylové kyseliny

Obecný chemický vzorec perfluorokarboxylových kyselin (PFCA) je $C_nF_{2n+1}COOH$. PFCA jsou koncovým produktem biotické a abiotické degradace určitých PFAS prekurzorů, které zahrnují fluorotelomerní alkoholy, fluorotelomerní akryláty, fluorotelomerní jodidy, fluorotelomerní olefiny, N-alkyl perfluoroalkansulfonamidy. PFCA s krátkými řetězci mohou vznikat také atmosférickou degradací určitých prekurzorů [5]. Strukturní vzorce vybraných zástupců PFCA jsou znázorněny na obrázku č. 3.

Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je PFOA ($C_7F_{15}COOH$). Její amonioková sůl byla po mnoho let používána jako nezbytné disperzní činidlo při výrobě fluoropolymerů, např. polytetrafluorethylenu (teflon). Do roku 2002 byl perfluorooktanoát amoniokový (APFO) vyráběn mnoha společnostmi po celém světě (USA, Belgie, Itálie) především procesem ECF [5, 9].

Odhaduje se, že asi 80 % PFCA uvolněných do životního prostředí pochází z výroby a používání fluoroplastů, velký podíl na tom mají emise PFOA a PFNA [5].

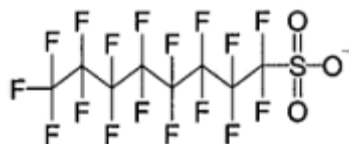
PFOA je extrémně perzistentní v životním prostředí a ve vzduchu může být transportována na velké vzdálenosti díky svému dlouhému poločasu života v atmosféře. Je detekována v půdě, vzduchu, podzemní vodě. Její toxicita a bioakumulační potenciál způsobují určité obavy v souvislosti s životním prostředím a lidským zdravím. Fyzikálně-chemické vlastnosti PFOA jsou shrnuty v tabulce č. 1 [9].



Obrázek č. 3 – Názvy, zkratky a struktury vybraných perfluorokarboxylových kyselin (upraveno podle [7])

2.1.4.2. Perfluoroalkansulfonové kyseliny

Perfluoroalkansulfonové kyseliny (PFSA) mají obecný vzorec $C_nF_{2n+1}SO_3H$. Členem této skupiny je PFOS, který přitáhl velkou pozornost v roce 2001, když byl poprvé detekován v biotě, v lidských tkáních a tělních tekutinách. V roce 2002 následovalo ukončení produkce PFOS, PFHxS, PFDS a prekursorů jejich hlavním producentem, společností 3M. Nicméně PFOS a jeho deriváty jsou nadále vyráběny např. v Číně a mohou být omezeně využívány [5, 9].



Obrázek č. 4 – Vzorec perfluorooktansulfonátu (PFOS) [6]

PFOS byl klasifikován jako perzistentní, bioakumulativní, toxická látka [5]. Stejně jako PFOA může být PFOS uvolněný do atmosféry transportován na velké vzdálenosti. Fyzikálně-chemické vlastnosti jeho draselné soli jsou shrnuty v tabulce č. 1 [9].

Tabulka č. 1 – Fyzikálně-chemické vlastnosti PFOA a draselné soli PFOS (upraveno podle [9])

	PFOS (draselná sůl)	PFOA
Registrační číslo CAS	2795-39-3	335-67-1
Vzhled (za pokojové teploty a atmosférického tlaku)	bílý prášek	bílý prášek/voskově bílá pevná látka
Molární hmotnost ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	538,22	414,07
Rozpustnost ve vodě při 25 °C ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	570 (čištěná), 370 (čerstvá)	$9,5\cdot 10^3$ (čištěná)
Bod tání (°C)	> 400	45–50
Bod varu (°C)	není měřitelný	188
Tenze par při 20 °C (mm Hg)	$2,48\cdot 10^{-6}$	0,017
Rozdělovací koeficient voda-vzduch ($\text{Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)	$< 2\cdot 10^{-6}$	není dostupný
Rozdělovací koeficient oktanol-voda ($\log K_{ow}$)	není měřitelný	není měřitelný
Henryho konstanta ($\text{atm}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)	$3,05\cdot 10^{-9}$	není měřitelná*
Poločas života	Atmosférický: 114 dní Ve vodě: > 41 let (25 °C)	Atmosférický: 90 dní Ve vodě: > 92 let (25 °C)

*Vypočítaná Henryho konstanta pro PFOA je $4,6\cdot 10^{-6}$ [6].

2.1.4.3. PFAS s dlouhým řetězcem

Jako perfluoroalkylové sloučeniny s dlouhými řetězci jsou Organizací pro ekonomickou spolupráci a vývoj (OECD) definovány perfluorokarboxylové kyseliny s 8 a více uhlíky (tj. se 7 a více fluorovanými uhlíky) a perfluoroalkansulfonáty se 6 a více uhlíky. Rozdíl v počtu uhlíků u těchto dvou skupin je proto, že perfluoroalkansulfonát (PFSA) se šesti uhlíky má větší tendenci se biokoncentrovat a bioakumulovat než perfluorokarboxylová kyselina (PFCA) se stejným počtem uhlíků [5].

2.2. Perfluoroalkylové sloučeniny v životním prostředí

V důsledku výroby a používání PFAS je široká škála těchto sloučenin detekována v životním prostředí, zvířatech i lidech. Již v roce 1974 byl v USA ve vzorcích lidské plazmy detekován metodou NMR organický fluor. Předpokládalo se, že jeho zdrojem je perfluorooktanový anion nebo strukturně příbuzné sloučeniny [10].

Zájem o tyto sloučeniny ze strany vědců neustále roste a s rostoucím poznáním roste také obava z těchto látek. Toto znepokojení je způsobeno mimo jiné tím, že PFAS splňují charakteristiku perzistentních organických polutantů, tj. jsou toxické, extrémně rezistentní, bioakumulativní v potravním řetězci a mohou mít dlouhý poločas života. Roste zájem o perfluoroalkylové kyseliny s dlouhými řetězci, které se ukazují být více akumulativní než ty s krátkými řetězci. Např. PFOS a PFOA jsou mimořádně chemicky a biologicky stabilní v životním prostředí a není znám žádný přirozený mechanismus degradace těchto látek. Jsou odolné vůči biodegradaci, nepodléhají metabolismu, atmosférické fotooxidaci, přímé fotolýze a hydrolýze [2, 5, 9].

Studie prokázaly, že jsou PFAS široce rozšířeny v životním prostředí včetně vzdálených oblastí od lidského osídlení a že se často vyskytují v krevním séru lidí. Všechna tato zjištění byla jedním z hlavních důvodů omezení produkce a emisí některých z nejvíce používaných PFAS [2].

2.2.1. Výskyt PFAS v životním prostředí

Perfluoroalkylové sloučeniny byly detekovány celosvětově v různých složkách životního prostředí, např. v povrchových a pitných vodách v blízkosti výrobního závodu těchto látek, popř. po úniku hasicích pěn. PFOA byla stanovena v polétavém prachu v okolí závodu pro výrobu fluoropolymerů. V půdách byly obě látky nalezeny v blízkosti výrobních závodů perfluoroalkylových chemikálií a na místech, kde byl hašen požár. PFOA byla dále detekována v sedimentech, v odpadních vodách, čistírenských kalech a v odtocích z čistíren odpadních vod. Některé PFAA včetně PFOA byly zaznamenány také v arktických ledovcích [11].

2.2.1.1. Voda

Značný podíl emisí PFAS je uvolněn do povrchových vod. PFCA byly zaznamenány v mořské vodě jak na hladině, tak v hloubkách [12]. Vzhledem k povrchově aktivnímu charakteru PFAS lze očekávat vertikální gradient koncentrace (pokles koncentrace s hloubkou) [1].

Ve sladké vodě byly PFAS detekovány v řekách a jezerech. Vyšší koncentrace byly nalezeny v městských oblastech a hlavně v blízkosti bodových zdrojů (průmyslové oblasti, čistírna odpadních vod). Hlavními analyty detekovanými ve vodách jsou PFOS a PFOA. Jejich koncentrace ve vodách jsou obvykle v rozsahu cca 1–100 ng.l⁻¹, ale v okolí bodových zdrojů těchto látek se koncentrace mohou pohybovat řádově v tisících ng.l⁻¹ [12].

PFAS se mohou vyskytovat v podzemní vodě jako následek používání hasicích pěn. V podzemní vodě jsou opět nejčastěji detekovány PFOS a PFOA. Nejvyšší koncentrace těchto dvou látek byly zaznamenány především ve vodách po náhodném úniku hasicích pěn, kde dosahovaly koncentrací řádově v tisících μg.l⁻¹ [6].

2.2.1.2. Ovzduší

Ovzduší není typické prostředí pro PFAA. Některé studie zaznamenaly přítomnost PFOA v dešťových nebo sněhových srážkách, což naznačuje přítomnost PFCA v atmosféře. To může být způsobeno bodovým zdrojem těchto látek v bezprostřední blízkosti vzorkovače, možnou adsorpcí PFCA na prachové částice nebo atmosférickým transportem PFCA, popřípadě jejich těkavých prekurzorů, které se mohou transformovat na PFCA [12].

2.2.1.3. Půda

Půda je velmi heterogenní materiál, který se nachází na pevném povrchu Země. Ochrana půdy je potřeba věnovat značnou pozornost. Půdy ubývá stavební činností, těžbou, znehodnocováním půdy různými kontaminanty. V půdě je omezená migrace látek, což znamená, že lokální znečištění se ve větším měřítku projeví až po delší době. Dekontaminace půdy je složitý a velmi drahý proces [13].

Hlavní příčinou výskytu PFOS v půdě a vodách je používání hasicích pěn s obsahem PFOS při požárech nebo při hasičských cvičeních na letištích a v chemických továrnách. Odstraňování PFOS je mimořádně nákladné. Dříve neexistovaly praktické a účinné metody pro odstranění PFOS z kontaminovaných půd a podzemních vod. V srpnu 2013 získala organizace ARCADIS patent na technologii sanace PFOS. Principem této technologie je degradace PFOS pomocí oxidačních a redukčních činidel, které jsou biologicky odbouratelné [14].

Dále se mohou PFCA dostávat do půdy pomocí mokré, popřípadě suché atmosférické depozice [12].

2.2.1.4. Sedimenty

Perfluoroalkylové sloučeniny se sorbují na sedimenty z vody (mořské i sladké). Studie ukazují nálezy v sedimentech řádově ve stovkách pg.g^{-1} [12].

Sorpce PFAS na sedimenty je ovlivňována různými parametry. Hlavní vliv má obsah organického uhlíku v sedimentu, což dokazuje význam hydrofobních interakcí. Sorpce PFAS roste také s rostoucím obsahem vápenatých iontů a s klesajícím pH, což naznačuje vliv elektrostatických interakcí. V případě pH se jedná pravděpodobně o změny náboje sorbentu spíše než o protonaci nebo deprotonaci sorbátu [15].

Co se týče struktury PFAS, tak dominantní vliv na sorpci má délka řetězce. S rostoucí délkou řetězce roste sorpce. Kromě délky řetězce má vliv také funkční skupina. Perfluorosulfonát se sorbuje silněji než analogický perfluorokarboxylát. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben mírně větší velikostí sulfonátové skupiny, a tím o něco větší hydrofobicitou [15].

Sedimenty jsou důležité pro stanovení konečného osudu a distribuce PFAS v životním prostředí. Byla zaznamenána rostoucí koncentrace PFAS v bentických organismech, což naznačuje biodostupnost PFAS adsorbovaných na sediment pro bentické organismy. Zkoumání této biodostupnosti může napomoci při posouzení, zda sediment slouží jako dlouhodobý a stacionární zdroj PFAS pro biosféru [15].

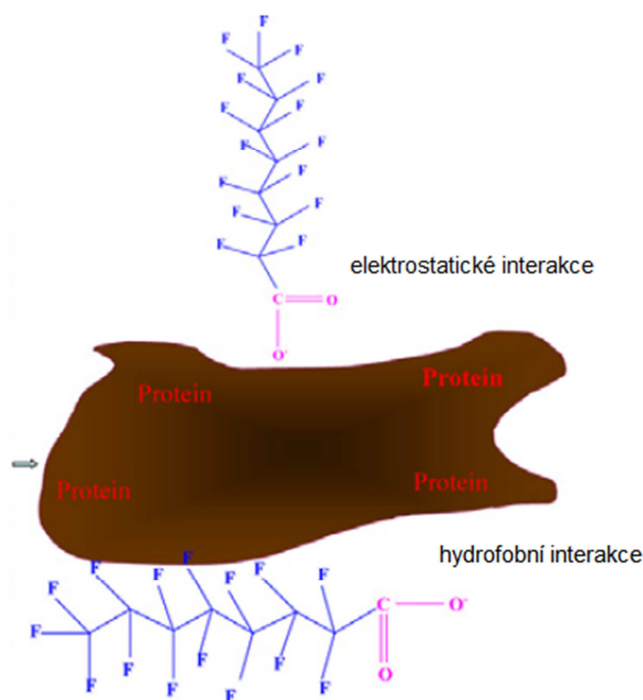
2.2.1.5. Čistírenské kaly

Kal vzniká jako nevyhnutelný odpadní produkt při čištění odpadních vod. Tvoří přibližně 1–2 % objemu čištěných vod, je v něm však obsaženo 50–80 % původního znečištění [16, 17].

Čistírenské kaly jsou bohatým zdrojem organické hmoty, živin (hlavně dusík a fosfor) a stopových prvků a mohou tedy zlepšovat fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti půd. Z toho důvodu představují stabilizované odvodněné čistírenské kaly vhodný typ hnojiva pro zemědělskou půdu. Mohou být použity jako hnojiva buď přímo nebo po předchozím kompostování [18–20].

Hlavním omezením využívání kalů v zemědělství je obsah cizorodých látek (těžké kovy, organické chlorované látky, PAHs, farmaceutika, chemikálie z domácností atd.) a přítomnost patogenních mikroorganismů [20]. V čistírenských kálech se také mohou nacházet PFAS, především PFOS a PFOA. Nejvyšší koncentrace byly pozorovány ve městech, kde jsou tyto látky vyráběny nebo průmyslově používány [6].

Perfluoroalkylové sloučeniny se dostávají do kalů z odpadních vod během procesu čištění. Předpokládá se, že sorpce PFAS na kal je hlavním mechanismem odstranění těchto látek z odpadních vod. Při této sorpci se uplatňují jak hydrofobní, tak elektrostatické interakce [21].



Obrázek č. 5 – Znázornění sorpce PFAS na čistírenský kal (upraveno podle [21])

Sorpce PFAS je závislá na mnoha parametrech. Největší vliv má množství proteinů obsažených v kalu, jelikož PFAS se mohou na proteiny snadno vázat. Přítomností proteinů se kaly liší od sedimentů, a proto je odlišné také sorpční chování PFAS u těchto dvou matric. Dalším parametrem, který má vliv na sorpci PFAS, je délka alkylového řetězce. S rostoucí délkou řetězce PFAS roste sorpce. Zde se v sorpčním procesu uplatňují hydrofobní interakce [21].

Rostoucí adsorpce byla stejně jako u sedimentů pozorována s rostoucí koncentrací vápníku a s klesajícím pH. PFAS mohou s kationty vápníku tvořit kladně nabité komplexy, které jsou dále sorbovány na záporně nabitý kal, popřípadě mohou být kationty vápníku sorbovány přímo na kal a tím redukovat záporný náboj povrchu kalu a odpudivé elektrostatické síly. Kyselé pH má pravděpodobně za následek zneutralizování negativně nabitého povrchu kalu, a tím dojde k odstranění elektrostatických odpudivých sil. Dalším výsledkem působení pH je rozpad proteinů v alkalických podmínkách [21].

Perfluoroalkylsulfonáty vykazují podstatně silnější sorpci než analogické perfluorokarboxylové kyseliny (např. PFOS se sorbuje více než PFOA) [21].

2.2.1.6. Krmiva

Jednou z významných složek krmiv živočišného původu bývá rybí moučka a rybí tuk. Rybí moučka je sypký materiál připravený z ryb a odpadu vzniklého při zpracování ryb. Typický obsah tuku je 2–20 %, proteinu 60–72 % a sušina bývá okolo 90 %. Druhy ryb používané pro výrobu rybí moučky jsou např. šproty, modrá treska, norská treska, sled' a další [22, 23].

Rybí moučka a rybí tuk jsou hlavní součásti krmiva pro ryby, ale přidávají se také do kompletních krmiv pro kočky a psy. Také krmivo pro zvířata s jedním žaludkem, jako např. drůbež a prasata, může obsahovat několik procent rybí moučky nebo rybího oleje, ale používání rybí moučky do krmiv pro skot je v Evropské unii zakázáno [22].



Obrázek č. 6 – Rybí moučka [23]

Byla provedena studie zjišťující výskyt PFAS a dalších POPs v rybích moučkách v zemích EU. Nejvyšší koncentrace PFAS byly nalezeny ve vzorcích z Dánska (až $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$) a nejčastěji detekovanou látkou byl PFOS (s podílem až 91 % ze všech PFAS). Kromě PFOS byly ve vzorcích nalezeny také PFUnA a PFTrA. Koncentrace PFAS v rybích moučkách závisí na druhu ryb a na oblasti výlovu. PFAS jsou přítomny v odtoku z čistíren odpadních vod, a proto byly vyšší koncentrace PFAS naměřeny v rybách z oblasti recipientu odpadních vod [22, 24].

V Evropské unii prozatím nejsou limity pro koncentraci PFAS v krmivech. V budoucnu by měla být věnována větší pozornost původu a čistotě krmných surovin používaných do kompletních krmiv především kvůli potenciální hrozbě vstupu PFAS a dalších kontaminantů do potravního řetězce člověka [22, 24].

2.2.1.7. Potraviny

Nejčastěji bývají PFAS analyzovány v rybách. Ryby mají příznivé vlastnosti pro lidské zdraví a konzumace ryb je celosvětově doporučována. Ale ryby jsou také významným zdrojem PFAS a dalších škodlivých látek (např. PCDDs/Fs, PCBs, PBDEs) v lidské stravě [22].

Aby bylo možné posoudit riziko spojené s expozicí člověka perfluoroalkylovými sloučeninami prostřednictvím potravy, EFSA doporučuje jejich sledování v potravinách. Jsou sledovány především PFOS a PFOA, ale je potřeba se zaměřit i na jejich prekurzory jako jsou perfluorooktansulfonamid, *N*-ethylperfluorooktan sulfonamidoethanol a 8:2 fluorotelomerní alkohol a další podobné PFAS [25].

Nejvyšší koncentrace v biotě vykazuje PFOS, ale byla zaznamenána také přítomnost PFCA a jejich koncentrace obvykle rostla s délkou řetězce. Byl pozorován trend vyšší koncentrace PFCA s lichým počtem uhlíků (C9, C11 a C13) [26].

2.2.1.8. Zvířata

U zvířat byly koncentrace PFAA zjišťovány především v játrech a krvi. Nejvyšší koncentrace byly obvykle nalezeny v játrech zvířat žijících se rybami žijících v blízkosti průmyslových oblastí. V Severní Americe byly stanoveny nejvyšší koncentrace ve vzorcích jater norků, delfínů, polárních medvědů a lachtanů. V Evropě byly zaznamenány vysoké koncentrace v játrech lachtanů, úhořů a tresek. Extrémně vysoké koncentrace PFOS byly nalezeny v Belgii v játrech myši žijících v blízkosti závodu pro výrobu fluorovaných chemikálií. PFAA byly detekovány také v organismech žijících v oblastech Arktidy a Antarktidy [11].

2.2.1.9. Člověk

Globální kontaminace těmito látkami byla poprvé demonstrována na perfluorooktansulfonové kyselině. V roce 2001 bylo zjištěno, že PFOS, PFOA a další perfluoroalkylové sloučeniny byly přítomny ve značném množství vzorků lidské krve [5].

Monitorování lidí, kteří jsou v kontaktu s perfluoroalkylovými látkami pracovní, prokázalo, že úroveň koncentrace PFOS a PFOA je přibližně o jeden řád vyšší než u běžné populace. PFAA byly nejčastěji detekovány v krvi (popř. v plazmě nebo krevním séru), v mateřském mléce nebo játrech. Nejčastěji detekované analyty byly PFOS, PFOA a PFHxS. Výsledky studií z USA a Japonska naznačují, že muži mají vyšší průměrné koncentrace PFOS, PFOA a PFHxS než ženy. Způsoby lidské expozice jsou stále zkoumány, možné zdroje zahrnují pitnou vodu, prach, jídlo (především ryby) a nádobí [5, 11].

2.2.2. Zdroje PFAS v životním prostředí

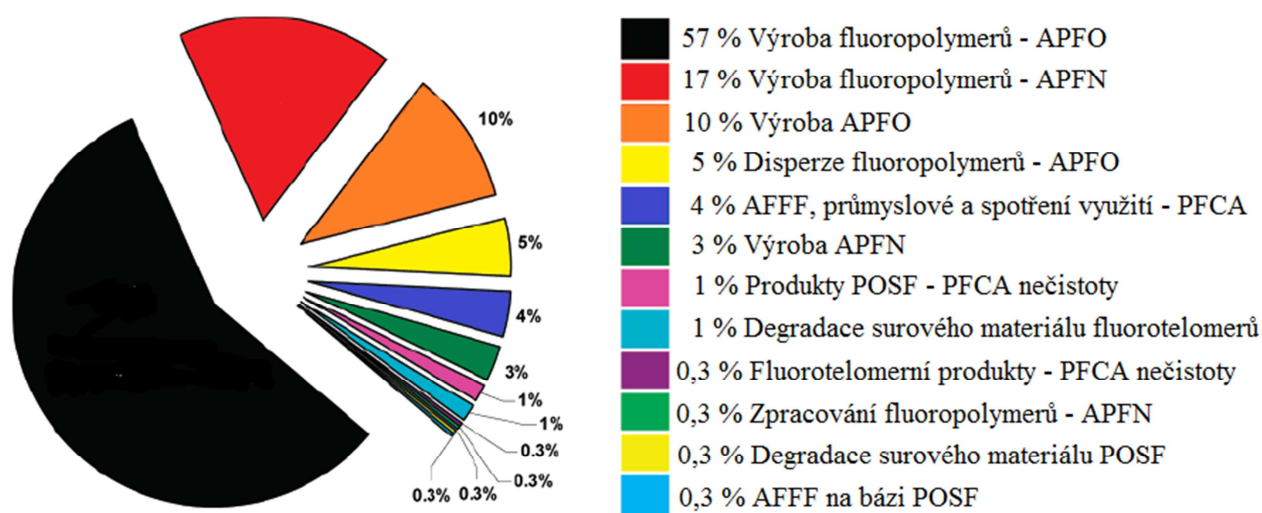
Perfluorované látky se do životního prostředí dostávají prostřednictvím antropogenní činnosti. Přímé zdroje jsou emise PFAS během jejich životního cyklu od výroby přes používání až po jejich likvidaci, včetně emisí z výrobků, ve kterých jsou PFAS přítomny jako nečistoty [3, 5]. Např. používání PFAS jako pomocné polymerizační činidlo způsobuje jejich emise do životního prostředí. Asociace evropských výrobců plastů (APME) odhaduje, že celosvětová produkce fluoropolymerů emituje 61 % těchto činidel do vody, vzduchu a půdy a 16 % je přítomných v produkovaném polymeru. Tudíž jak výroba, tak používání fluoropolymerů má za následek emise PFAS do prostředí [6].

Perfluorooktanoát amonný (APFO) byl používán při výrobě fluoropolymerů. Vyráběl se hlavně procesem ECF především v USA, Belgii a Itálii. Jeho emise v roce 2000 ze závodu v USA byly odhadovány na cca 20 t (5–10 % jeho produkce) a z toho bylo asi 5 % emitováno do vzduchu a 95 % do vody. Po roce 2002 po ukončení výroby procesem ECF v USA začaly emise znatelně klesat řádově z tun na kilogramy za rok [12].

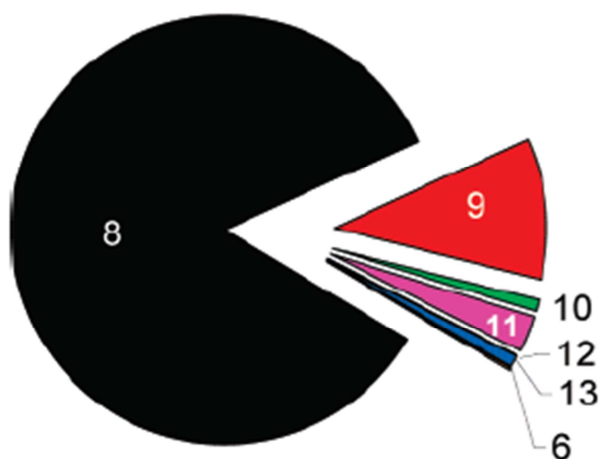
Jako pomocné činidlo pro výrobu fluoropolymerů je používán také perfluorononanoát amonný (APFN). Ten je vyráběn především v Japonsku oxidací fluorotelomerních olefinů. Jeho emise do ovzduší a vody jsou přibližně 10 % vyrobeného množství [12].

Fluoropolymery na bázi PTFE jsou prodávány především jako granule nebo pelety, ale asi 16 % se prodává jako vodná disperze, která obsahuje APFO. Asi 38 % tohoto APFO je emitováno do prostředí. Výroba fluoropolymerů je zaručeně největším přímým zdrojem emisí PFCA do životního prostředí [12].

Nepřímé emise jsou PFAS vznikající transformací prekurzorů v životním prostředí, zvířatech nebo lidech, např. PFOA vzniká biotransformací 8:2 fluorotelomerního alkoholu nebo kyselina perfluorobutanová vzniká atmosférickou degradací perfluorobutan-sulfonamidoethanolu [5].



Obrázek č. 7 – Procentuální zastoupení emisí PFCA z různých zdrojů (upraveno podle [12])



Obrázek č. 8 – Zastoupení emitovaných PFCA v roce 2000 podle délky řetězce (číslo v grafu znamená počet uhlíků v molekule) [12]

2.2.3. Osud PFAS v životním prostředí

Perfluoroalkylové sloučeniny se v životním prostředí chovají odlišně od nepolárních a mírně polárních organických polutantů. Protože jejich molekula obsahuje oleofobní a hydrofobní část, PFAS se neakumulují v tuku ani se nesorbují na organickou hmotu. PFAS jsou ve své podstatě polární látky. PFOS a PFCA v závislosti na své disociační konstantě jsou v životním prostředí přítomny převážně jako disociované soli. Proto mohou mít značný vliv na jejich distribuci elektrostatické interakce. Jak biotické membrány, tak abiotické sedimenty mají na svém povrchu různé polární části, se kterými může docházet k interakcím [6].

Po uvolnění do životního prostředí se PFAS sorbují na abiotické složky jako sediment, kal, půda. Některé látky se mohou bioakumulovat a jsou toxické, např. PFOS, jehož sorpce na sediment a kal je velmi silná. PFOS a PFOA jsou dobře rozpustné ve vodě a mají nízkou tenzi par, tudíž nejsou příliš ochotné přecházet z vody do vzduchu. Pro PFOS jsou tedy nejvýznamnější složky životního prostředí voda, sediment, kal a biota. Voda je cílovou složkou pro PFOA [3, 6].

Na bioakumulaci má podstatný vliv délka perfluoroalkylového řetězce. Sloučeniny s počtem uhlíků 8 a více jsou obvykle bioakumulativnější než sloučeniny s menším počtem uhlíků. Určitou výjimku tvoří PFOA, která má pouze 7 perfluorovaných uhlíků, ale v lidské krvi se akumuluje snadno [2].

2.2.3.1. Transformace a degradace

Jak už bylo zmíněno, PFAA jsou odolné vůči kyselinám, zásadám, oxidantům a v životním prostředí nepodléhají metabolismu ani biodegradaci. Proto se předpokládá, že odbourávání těchto látek pomocí biodegradace je zanedbatelné [12].

Transformace perfluoroalkylového řetězce postupuje velmi pomalu, protože vazba uhlík-fluor je nejsilnější jednoduchou vazbou s uhlíkem. PFOS a PFOA jsou koncové degradační produkty perfluoroalkylových sloučenin vyrobených procesem ECF. Prekurzorem pro PFOS je například 2-N-ethylperfluorooktansulfonamidoctová kyselina [27]. Fluorotelomerní

alkoholy (např. 8:2 FTOH) mohou být transformovány na PFOA. Ukazuje se, že PFOS a PFOA už dále nedegradují, nejsou štěpitelné přímou fotolýzou a nepodléhají ani hydrolýze. Nepřímá fotolýza ve vzduchu reakcí s OH radikály může hrát určitou roli v rozkladu fluorovaných chemikálií [6].

2.2.3.2. Transport

PFAS byly naměřeny v krvi arktických zvířat, mořských ptáků a dalších druhů zvířat, které žijí na místech vzdálených od lidského osídlení. Jako vysvětlení výskytu těchto látek ve vzdálených oblastech se objevily dvě hlavní teorie transportu. První teorie je dálkový transport pomocí oceánských proudů, která je podpořena nálezy PFAA ve vodách Atlantského a Tichého oceánu [2, 11].

Druhá teorie zahrnuje atmosférický transport těkavých PFAS (např. fluorotelomerních alkoholů) a jejich následnou transformaci na PFOS a PFOA. Tato transformace je pravděpodobně důležitým zdrojem PFAA ve vzdálených oblastech [2, 11, 12]. Z atmosféry se mohou PFAS dále transportovat pomocí mokré, popřípadě suché atmosférické depozice na půdu nebo do povrchových vod [12, 28].

2.2.4. Toxicita PFAS

Po roce 2000 začalo být zřejmé, že se PFAS vyskytují v životním prostředí i v lidské krvi. V několika studiích byla zkoumána ekotoxicita těchto látek na vodní organismy. Zkoumány byly především PFOS a PFOA. Testy byly prováděny na řasách, dafniích a rybách a výsledky ukazují, že PFOS je středně akutně toxický a mírně chronicky toxický pro vodní organismy (např. pro ryby $96hEC_{50} = 7,8 \text{ mg.l}^{-1}$) a PFOA je prakticky netoxická (např. pro ryby $96hLC_{50} = 300 \text{ mg.l}^{-1}$). Na základě ekotoxických dat byla stanovena orientační maximální přípustná koncentrace na $5 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ pro PFOS a $300 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ pro PFOA [6].

Studie na zvířatech ukazují, že PFOS a PFOA jsou přijímány orálně a špatně se eliminují, nejsou metabolizovány. Obě sloučeniny jsou distribuovány především do krevního séra, ledvin a jater, přičemž koncentrace v játrech bývá několikrát vyšší než v séru [11].

Byly prováděny studie chronické expozice krys a primátů látkou PFOS, které ukázaly pokles tělesné váhy, rostoucí váhu jater, redukci cholesterolu a strmou křivku dávka-odpověď pro mortalitu. Bylo zjištěno, že PFOA je slabě karcinogenní a u hlodavců byla expozice PFOA spojována se zvýšeným výskytem tumoru jater, slinivky a varlat, spolu se ztrátou váhy, zvětšením jater a změnami v metabolismu lipidů. U březích myší, kterým byla podávána PFOS nebo PFOA, docházelo k neonatálnímu úmrtí a k redukci růstu přeživších mláďat [2].

Použití laboratorních zvířat pro odhad potenciálního zdravotního rizika pro člověka je obtížné, jelikož toxikokinetika jednotlivých PFAS se výrazně liší mezi různými druhy zvířat a dokonce jsou zde rozdíly podle pohlaví v rámci jednoho druhu. Např. poločas života PFOA u samice krysy je přibližně 4 hodiny, zatímco u samce je to téměř 6 dní. U psů je to 8–13 dní u samic a 20–30 u samců. Odlišné je to u myší, u kterých je tento poločas 17–19 dní, ale rozdíl mezi pohlavími není tak zřejmý [2, 11].

Také byl zkoumán vliv PFAS na zdravotní stav pracovníků, kteří jsou pravidelně v kontaktu s těmito látkami. Výsledky těchto studií jsou ale sporné a neprůkazné, proto je těžké z nich udělat konkrétní závěry [2].

Do lidského organismu mohou PFAS pronikat orálně, inhalací nebo dermálně. V organismu se vážou na proteinovou složku tkání a akumulují se v krevním séru, játrech, ledvinách a močovém měchýři. Také byla zaznamenána detekovatelná množství PFOS a PFOA v pupečnickové krvi, což naznačuje přestup těchto chemikálií placentou [11]. Z organismu člověka jsou PFAS postupně vylučovány, ale kvůli stálé expozici nejsou zcela eliminovány. Předpokládá se, že polovinu přijatého množství PFOS vyloučí člověk za cca 9 let a PFOA za 1–3 roky [3].

V roce 2010 bylo Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) vydáno doporučení o monitorování přítomnosti PFAS v potravinách (2010/161/EU). EFSA stanovil tolerovatelný denní příjem na 0,15 µg na kg za den pro PFOS a 1,5 µg na kg za den pro PFOA [3, 7].

2.3. Stanovení perfluoroalkylových sloučenin

2.3.1. Matrice

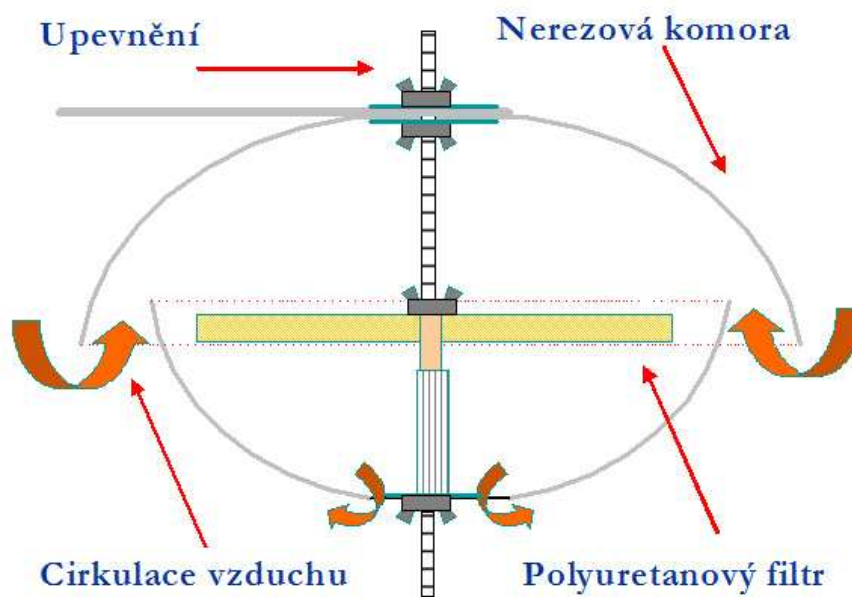
Perfluoroalkylové sloučeniny byly zaznamenány v celé řadě environmentálních matric včetně bioty, vody, vzduchu, kalu, sedimentu a půdy. Nejčastěji detekované PFAS v životním prostředí jsou PFOS a PFOA [6, 29].

V závislosti na zkoumané matrici se pro dosažení nejlepších výsledků musí zvolit vhodná extrakční a čistící metoda. Např. půda, čistírenské kaly a krmiva jsou komplexní matrice. Může docházet k různým interakcím mezi jednotlivými složkami a to může zkomplikovat dosažení spolehlivé kvantitativní analýzy [29].

2.3.1.1. Ovzduší

V ovzduší se většinou stanovují těkavé PFAS, např. fluotelomery a polyfluorované sulfonamidy. Pro odběr vzorků jsou používány různé vzorkovače, např. s polyuretanovou pěnou, polystyrenovými pryskyřicemi nebo filtrem z křemenných vláken [1].

Filtry a pryskyřice se následně extrahují organickým rozpouštědlem [1].



Obrázek č. 9 – Schéma pasivního vzorkovače ovzduší s polyuretanovým sorbentem [30]

2.3.1.2. *Voda*

Při vzorkování vody musí být brán v úvahu povrchově aktivní charakter PFAS a je zapotřebí se vyhnout ztrátám díky adsorpci a absorpci (např. se nesmí používat skleněné nádoby). Také nesmí být použity materiály s obsahem fluoropolymerů a při konzervaci vzorků se nedoporučuje formaldehyd kvůli potlačení analytického signálu [1].

Vzorky vody mohou být extrahovány metodou iontového párování nebo přímo pomocí SPE popřípadě SPME [1].

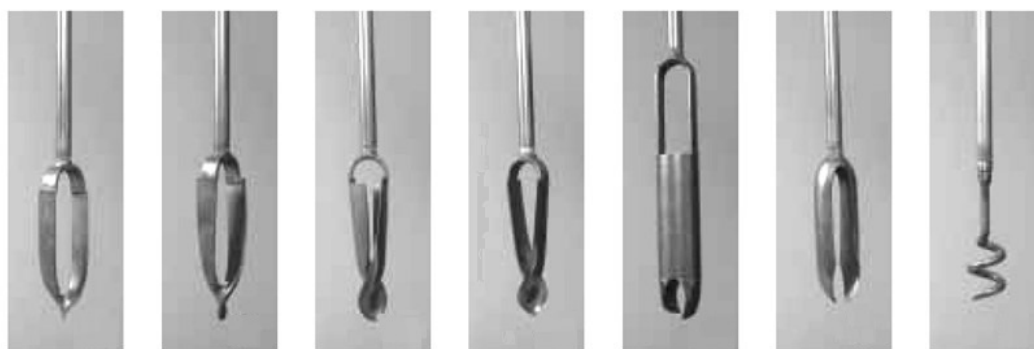
Pro stanovení PFOS a PFOA ve vodě existuje norma ČSN ISO 25101 Jakost vod - Stanovení perfluoroktansulfonátu (PFOS) a perfluoroktanoátu (PFOA) - Metoda pro nefiltrované vzorky s použitím extrakce tuhou fází a kapalinové chromatografie/hmotnostní spektrometrie [31].

2.3.1.3. *Abiotické pevné matrice*

Mezi tyto matrice patří půda, sediment, čistírenský kal, prachové částice. Stejně jako u vody mohou PFAS v sedimentech vykazovat vertikální distribuci, tudíž je potřeba větší odběr a důsledná homogenizace. Při vzorkování je opět třeba vyhnout se fluoropolymerním materiálům [1].

Analýza čistírenských kalů je obtížný úkol vzhledem k složitosti této matrice a široké škále sloučenin, které mohou způsobit interference [32].

Pevné matrice jsou většinou extrahovány organickým rozpouštědlem pomocí Soxhletu, tlakové extrakce rozpouštědlem nebo sonifikace, ale lze použít také iontové párování. [1].



Obrázek č. 10 – Příklady vzorkovačů pevných matric [33]

2.3.1.4. *Potraviny a biotické matrice*

Potraviny a biota jsou také komplexní matrice s určitým obsahem tuku a je poměrně obtížné najít extrakční metodu, která by umožnila rychlou analýzu širokého rozsahu PFAS v iontové a neutrální formě. Testováno bylo iontové párování, ale v případě matric s vyšším obsahem tuku má tato metoda nedostatky v podobě koextrakce lipidů a dalších lipofilních složek z matrice, které významně komplikují analýzu PFAS [26].

U alkalické hydrolýzy byly pozorovány větší matricové efekty kvůli přítomnosti koextraktů z hydrolýzy lipidů (uvolnění mastných kyselin a glycerolu) a také byly pozorovány interference především pro PFBA a PFPeA [26].

Další extrakční metody pro analýzu PFAS v biotě jsou tlaková extrakce rozpouštědlem [34], mikroextrakční metoda využívající směs tetrahydrofuranu s vodou (75:25) a modifikovaná metoda QuEChERS, vhodná pro extrakci matric s vyšším obsahem tuku (např. ryby, mléko) [26].

2.3.2. Extrakce vzorku

Pro extrakci PFAS z pevných vzorků jsou využívány tři hlavní postupy: iontové párování, alkalické štěpení a použití různých organických rozpouštědel ve spojení se zdrojem energie, např. zahřívání, zvyšování tlaku nebo ultrazvuk. Jako rozpouštědla mohou být použita např. methanol nebo acetonitril, případně ve směsi s vodou [7].

2.3.2.1. Iontové párování

Jako iontově párové činidlo je používáno tetrabutylamonium (TBA) s upraveným pH 10. Uhličitan sodný se používá jako pufr. TBA vytváří s anionty PFAS neutrální sloučeniny, které jsou extrahovány do methyl-terc-butyletheru (MTBE) pomocí třepání. Po extrakci se odebere organická fáze, která se odfouká pod dusíkem do sucha. Analyty jsou následně rozpuštěny např. v methanolu nebo ve směsi methanol/voda a finální vzorek se přefiltruje přes 0,2µm nylonový filtr [10].

Tato metoda je poměrně pracná a jsou získávány proměnlivé výtěžnosti, které kolísají od nízkých (< 50 %) po vysoké (> 200 %), způsobené mimo jiné matricovým efektem. Ten může souviset s koextrakcí lipidů a dalších lipofilních složek [7].

2.3.2.2. Alkalická hydrolýza

Tato extrakční metoda používá KOH nebo NaOH v methanolu. Hydroxid je přidán ke vzorku a směs je po určitou dobu třepána. Po alkalické hydrolýze je extrakt odstředěn, odebrán a přečištěn [7, 34].

Alkalický rozklad napomáhá extrakci PFAS odstraněním lipidů a proteinů před extrakcí. Studie prokázaly, že alkalická hydrolýza poskytuje vyšší koncentrace PFAS ve vzorcích jater než iontové párování. Koncentrační rozdíly byly přičítány účinnému rozkladu matrice a uvolnění analytů ze vzorku [7].

2.3.2.3. Zrychlený Soxhlet

Na principu Soxhletova extraktoru pracuje zařízení B-811 (Büchi). Pevný vzorek ve skleněné patroně je v první fázi extrahován horkým zkondenzovaným rozpouštědlem. Po dosažení určité hladiny se přepnutím ventilu rozpouštědlo vypustí zpět do sběrné baňky spolu s rozpuštěnými analyty [35].

Po této horké extrakci následuje v druhé fázi extrakce studená, při které je vzorek smáčen zkondenzovaným rozpouštědlem, ale vypouštěcí ventil je otevřený a rozpouštědlo hned stéká do baňky. Posledním krokem je zakoncentrování extraktu, při kterém je výpustní ventil po celou dobu zavřený, čisté rozpouštědlo se hromadí v prostoru patrony a analyty se koncentrují ve sběrné baňce.

Tato extrakční metoda je jednoduchá a oproti klasickému Soxhletu poměrně rychlá (doba trvání extrakce je cca 1 hodina).



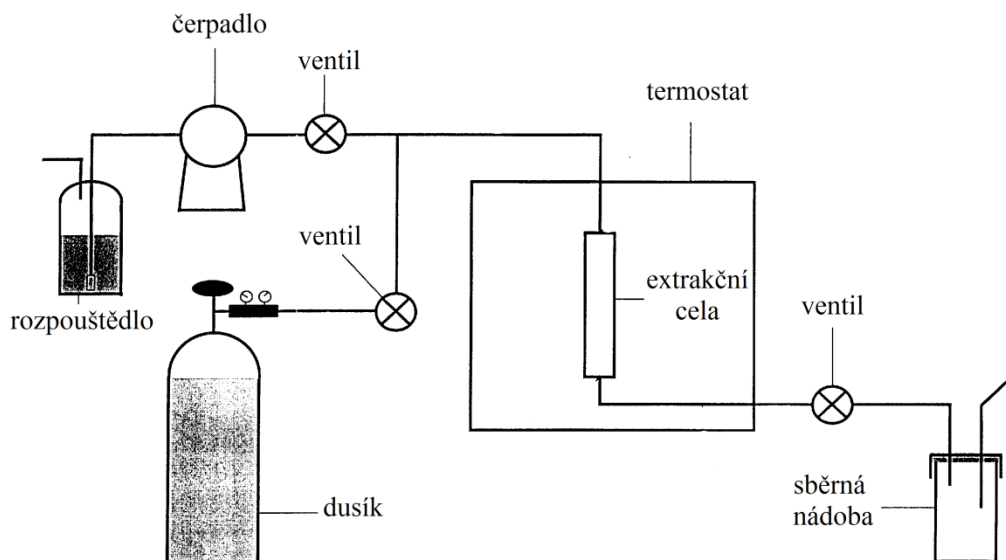
Obrázek č. 11 – Extraktor B-811 (Büchi) [36]

2.3.2.4. Tlaková extrakce rozpouštědlem (PLE)

Tato metoda využívá zvýšené teploty a tlaku, a proto je extrakce rychlá a účinná. Při vyšší teplotě roste rozpustnost látek v organických rozpouštědlech. V pórech vzorku je přítomna voda, jejíž rozpustnost v organických rozpouštědlech také roste a tím jsou analyty dostupnější. Zvýšený tlak udržuje rozpouštědla v kapalném skupenství [35].

Při extrakci pomocí PLE je vzorek v extrakční cele umístěný do termostatu. Extrakční činidla se přivádí pod tlakem a extrakt je jímán do sběrné nádoby. Jsou používány teploty 50 °C až 200 °C a tlaky 5 MPa až 20 MPa. Výhody této metody jsou vyšší účinnost, menší spotřeba rozpouštědel, kratší doba extrakce (cca 20–30 minut) a možnost automatizace (např. přímé spojení PLE s HPLC) [35].

Tlaková extrakce rozpouštědlem poskytuje lepší výtěžnosti než alkalická hydrolýza a iontové párování [7]. Nevýhodou této metody jsou teflonové součásti, které vlivem vysokého tlaku a teploty mohou uvolňovat PFAS do extraktu a způsobovat tím jeho dodatečnou kontaminaci.



Obrázek č. 12 – Schéma přístroje pro tlakovou extrakci rozpouštědlem (ASE) (upraveno podle [37])

2.3.2.5. Powleyho metoda

Tato metoda je rychlá, jednoduchá a spolehlivá pro kvantitativní stanovení perfluorokarboxylových kyselin v environmentálních matricích pevného skupenství. Kombinuje alkalickou hydrolýzu a extrakci rozpouštědlem podporovanou ultrazvukem nebo třepáním. Průměrné výtěžnosti této metody jsou v rozsahu 70–120 % s relativní odchylkou menší než 20 % [29].

K naváženému vzorku je přidán NaOH a po 30 minutách je ke směsi přidáno extrakční činidlo. Jako extrakční činidlo lze použít methanol nebo acetonitril (acetonitril je doporučován pro biotické vzorky). Extrakce je provedena pomocí třepačky nebo pomocí ultrazvuku. Po extrakci je směs zneutralizována přidáním potřebného množství HCl. Po odstředění je odebrán supernatant a následuje čištění extraktu [29].

2.3.2.6. QuEChERS

Extrakční postup QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe) je založen na extrakci analytů ze vzorku pomocí směsi vody a acetonitrilu a jejich následném přestupu do acetonitrilové fáze. Metoda byla původně vyvinuta pro stanovení reziduí pesticidů v ovoci a zelenině. Později byla metoda modifikována pro analýzu matric s vyšším obsahem tuku. Jak již název napovídá, tato metoda je rychlá, jednoduchá, levná, a ve spojení s LC-MS/MS poskytuje pro stanovení PFAS nízké LOQ v rozsahu 0,002–0,013 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a výtěžnosti v rozmezí 70–120 % [26].

Při tomto extrakčním postupu se navážené množství vzorku smíchá s MiliQ vodou a po protřepání a obohacení vnitřním standardem se ke vzorku přidá kyselina mravenčí a acetonitril. Poté je směs intenzivně třepána. Následuje přidání MgSO_4 a NaCl a okamžité protřepání, aby nedošlo ke koagulaci síranu. Po odstředění se odebere podíl acetonitrilové fáze, který je dále přečištěn [26].

Slabou stránkou této metody je omezený přestup iontových analytů do organické fáze, ale tento problém byl překonán použitím acetátového nebo citrátového pufru pro upravení pH extraktu. Významný vliv na výtěžnost má obsah vody ve vzorku, a proto u vzorků s obsahem vody méně než 80 % musí být voda přidána. Pozitivní vliv na účinnost má kyselina mravenčí, pravděpodobně díky svému částečnému přestupu do acetonitrilové fáze, což zvyšuje její polaritu [26].

2.3.2.7. Mikroextrakce tetrahydrofuranem

Tato extrakční metoda byla použita pro stanovení PFAA v biotických vzorcích (játra a svaly mořských ryb a ptáků). Principem extrakce je smíchání vzorku s malým množstvím směsi tetrahydrofuranu (THF) s vodou (75:25). Vzniklá suspenze je po určitou dobu míchána pomocí vortexu a následně odstředěna. Podíl odstředěného extraktu je poté přenesen přímo do vialky a analyzován [38].

Jako analytická koncovka byla v dané studii použita LC-IT-MS, ale je možné použít také trojitý kvadrupól. Extrakce je jednoduchá, rychlá a účinná. Hlavní výhodou je přiměřená rovnováha mezi polárními a nepolárními silami a možnost ustanovení různých typů interakcí s polární skupinou PFAA. To umožňuje extrakci PFAA s délkou řetězce C4–C14 v iontové i neutrální formě. Použití malého množství rozpouštědla umožňuje vyhnout se kroku zakoncentrování. Výtěžnosti se pohybují v rozsahu 85–111 %, relativní směrodatná odchylka 1–11 % [38].

2.3.2.8. Rychlá methanolová extrakce

Metoda je založena na extrakci biotického vzorku do methanolu pomocí třepání a následném čištění surového extraktu metodou DSPE pomocí aktivního uhlí. Výtěžnost se pohybuje v rozmezí 81–107 %, což odpovídá požadavkům doporučení komise 2010/161/EU (požadovaná výtěžnost 70–120 %) a RSD 3–12 % [39].

Tato extrakční metoda je jednoduchá, velmi rychlá a levná. Byla navržena pro analýzu tří nejvýznamnějších zástupců PFAS, tj. PFOS, PFOA a FOSA, ve vzorcích potravin a krmiv, ale může být použita také pro analýzu ostatních PFAS. Metoda byla vyvinuta v rámci evropského projektu CONFIDENCE a byla validována v souladu s rozhodnutím komise 2002/657/EC [39].

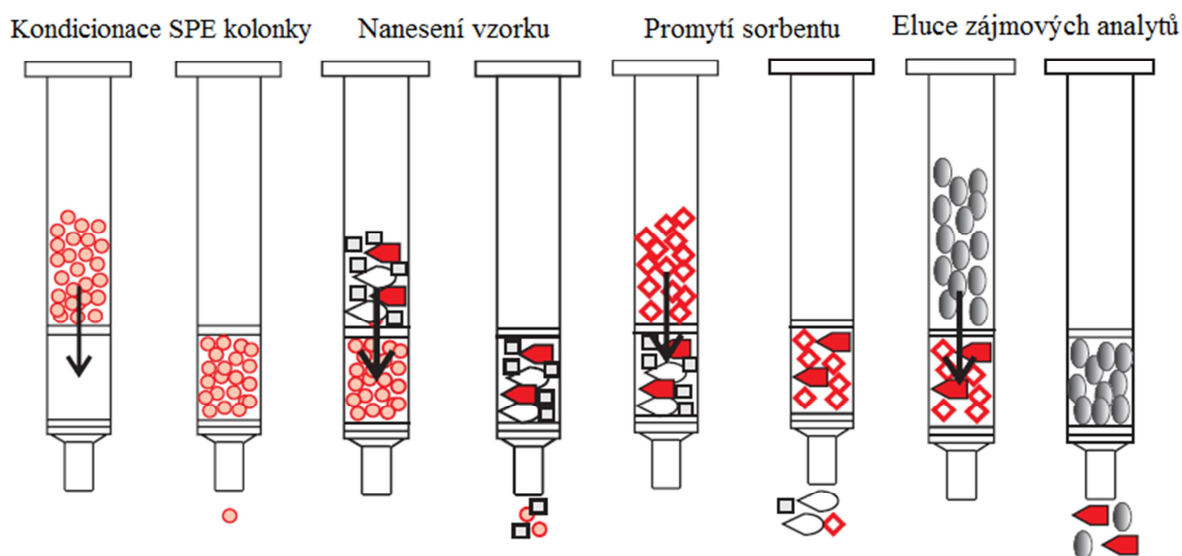
2.3.3. Čištění vzorku

Po extrakci vzorku následuje proces čištění. Tento krok je zapotřebí především v případě extrakce pomocí alkalické hydrolýzy nebo organických rozpouštědel. Nejčastěji je používána extrakce tuhou fází, která umožňuje izolaci a zakoncentrování PFAS [7].

2.3.3.1. Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází se používá pro zakoncentrování analytů a pro odstranění interferujících složek. Principem metody je, že roztok analytu se přivede do kontaktu se sorbentem, který silně sorbuje analyt, ale ostatní složky sorbuje co nejméně. Zachycený analyt je poté uvolněn zahřátím nebo elucí rozpouštědlem [13].

Před použitím kolonky se většinou provádí aktivace sorbentu (solvatace fáze vázané na sorbentu, aktivace měniče iontů) s následným vymytím přebytku činidla. Poté následuje nanesení vzorku na kolonku a oddělení analytu od matrice. Dalším krokem je promytí sorbentu, které slouží k odstranění interferujících složek, ale nedochází k eluování analytu. U málo zadržovaných analytů lze tento krok vynechat a kolonku vysušit proudem plynu. Posledním krokem je desorpce koncentrovaného analytu nejčastěji elucí malým objemem rozpouštědla [13].



Obrázek č. 13 – Znáznornění jednotlivých kroků extrakce tuhrou fází (upraveno podle [40])

Vzorky pro stanovení PFAS lze čistit a zakoncentrovat pomocí oktadecylsilikagelových kolonek (C18). Nejčastěji je SPE využívána u analýzy vody a používány jsou kolonky WAX (slabé měniče aniontů), SAX (silné měniče aniontů) a HLB (hydrophilic-lipophilic balanced) [7], [26]. Tento proces je ale časově náročný a můžou zde být problémy u analytů s širokým rozsahem fyzikálních vlastností [29].

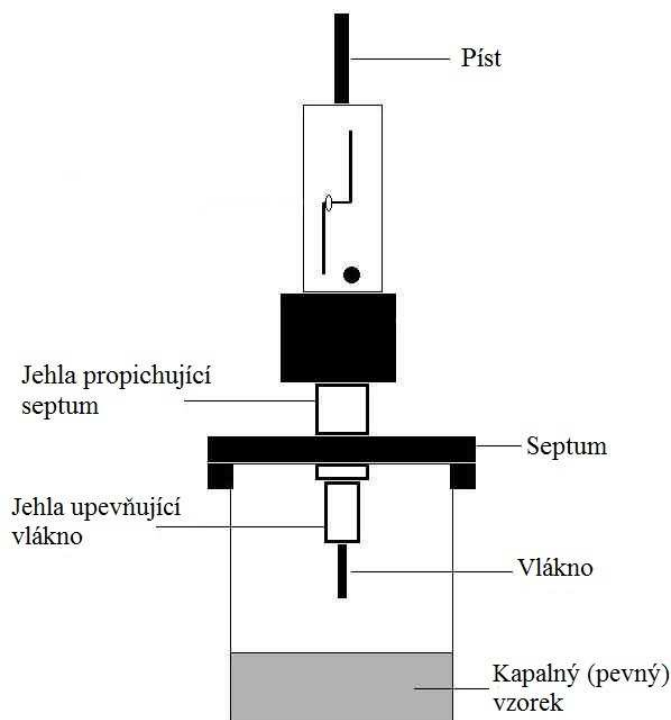
Účinnost čištění pomocí SPE může být ovlivněna složením matrice vzorku. Velké množství složek matrice může soutěžit se sorpčním materiálem. Bylo pozorováno, že WAX kolonky jsou více účinné, jelikož z vody zachytí velký rozsah PFAS a výtěžnosti se pohybují v rozmezí 50–90 % (výjimkou jsou neutrální FOSAs a FTOHs). Nižší výtěžnosti byly získány také pro PFCAs s délkou řetězce > C11 [7, 26].

Čištění pomocí kolonek HLB vykazuje nízké výtěžnosti PFCA s krátkým řetězcem (C4–C6) [26]. Také byl zaznamenán významný matricový efekt potlačením signálu PFOA [7].

V případě biotických matric bylo použitím SPE dosaženo nižších LOQ v porovnání s iontovým párováním, ale žádná dnes dostupná SPE kolonka neumožňuje současné zadržení všech běžně monitorovaných PFAS s přijatelnou výtěžností [26].

2.3.3.2. Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Čistící krok pomocí SPME byl zkoumán ve spojení s derivatizací extraktů vzorků před analýzou PFCA pomocí GC-MS. Pro SPME je možné použít polydimethylsiloxanové vlákno (PDMS). Po derivatizaci vzorku se pomocí PDMS vlákna sorbují z rovnovážné plynné fáze (head-space) nejčastěji těkavé methylestery. Následuje tepelná desorpce sledovaných látek přímo v injektoru plynového chromatografu [41].



Obrázek č. 14 – Mikroextrakce tuhou fází (head-space) (upraveno podle [42])

2.3.3.3. Disperzní extrakce tuhou fází

Disperzní extrakce tuhou fází (DSPE) s využitím práškového aktivního uhlí je jednoduchá, rychlá a účinná metoda čištění vzorku, při které jsou dostatečně odstraněny nežádoucí složky matrice. Aktivní uhlí adsorbuje sloučeniny díky disperzní interakci s π elektrony. PFAS se sorbentem neinteragují, nicméně všechny nefluorované aromatické složky budou silně vázány na aktivní uhlí. Díky tomuto kroku jsou odstraněny koextrakty ze vzorku a výtěžnosti PFAS jsou konzistentní a reprodukovatelné [29].

V případě extrakce vzorku pomocí QuEChERS se pro DSPE používá směs sorbentu C18, aktivního uhlí (ENVI-Carb) a MgSO_4 . Aktivní uhlí nahradilo běžně používaný sorbent PSA (slabý měnič aniontů), který pro tyto analyty není vhodný vzhledem k jejich kyselé povaze. Sorbent C18 slouží k odstranění triacylglycerolů a dalších lipofilních látek, které mohou zanášet analytické kolony nebo zvýšit sorpci neutrálních PFAS. Síran hořečnatý zde působí jako vysoušedlo pro odstranění zbytkové vody, která komplikuje vypařování a zakoncentrování vzorku. Po protřepání a odstředění je přečištěný extrakt odpařen téměř do sucha a rozpuštěn v malém množství methanolu [26].

2.3.4. Analytické metody stanovení

V minulosti byly snahy identifikovat PFOA a podobné sloučeniny v lidské krvi pomocí NMR. Kromě toho existovaly také pracné a nespecifické metody měření organického fluoru pomocí žhání, ale ty byly brzo nahrazeny méně pracnými technikami jako např. detekce elektronového záchytu nebo mikrovlnná plazmová detekce. Tyto techniky měly vysoké limity detekce a poskytovaly pouze orientační identifikaci cílových analytů. Byly používány především pro hodnocení kontaminace pracovníků, kteří byli v častém kontaktu s danými látkami [2].

Pro studium toxicity PFOA bylo potřeba stanovit její koncentraci v tkáni zvířat a lidí. Byly používány metody stanovení celkového organického fluoru nebo bylo navrženo použití radioaktivně značených materiálů. Jednoduché, citlivé a specifické metody nebyly dostupné. Limity detekce PFAS byly v minulosti omezovány málo citlivými a nespecifickými metodami stanovení, jako plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem, plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu a vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí [10].

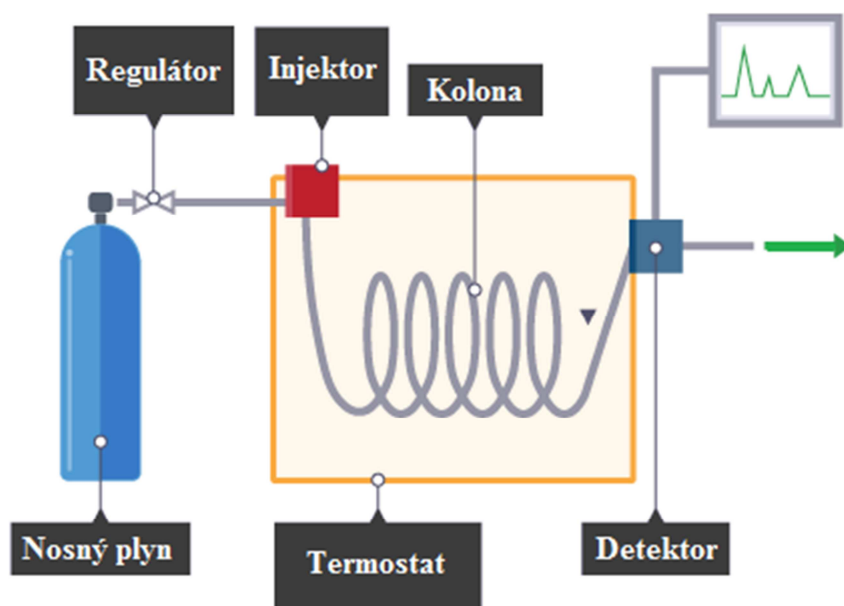
V současné době jsou PFAS nejčastěji analyzovány pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Od doby, kdy je tato metoda běžně dostupnou, je možné měřit PFAS v biologických a environmentálních vzorcích v koncentracích menších než jsou jednotky ng.ml^{-1} . V minulosti byl také velkým problémem nedostatek standardů, nedostatek standardizovaných extrakčních technik, nízké koncentrace v matricích. S rostoucím zájmem o tyto látky se na trhu začaly objevovat vysoce čisté standardy a izotopicky značené vnitřní standardy. Podstatně se zlepšila spolehlivost identifikace těchto sloučenin a přesnost stanovení [2].

2.3.4.1. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je analytická separační metoda, při které dochází k rozdělování složek vzorku mezi stacionární a mobilní fází na základě adsorpce a rozpouštění. Mobilní fází je inertní plyn (např. vodík, dusík, helium), který zajišťuje transport látek kolonou, ale neúčastní se separace. Jako zdroj pohybu se využívá tlakový spád. Stacionární fáze je uspořádána v koloně, náplňové nebo kapilární. Nejčastěji jsou používány kapilární kolony vzhledem k jejich vyšší účinnosti. Stacionární fáze zadržuje jednotlivé složky vzorku v závislosti na jejich distribučních konstantách. Volba stacionární fáze závisí na charakteru vzorku a na rozsahu teplot varu. Nejčastěji používané stacionární fáze jsou na bázi polysiloxanů [35, 43].

Analýzovaný vzorek musí být v plynné fázi, a proto je GC vhodné pro látky tepelně stabilní s teplotou varu do cca 400 °C [43].

Základní části plynového chromatografu jsou zdroj nosného plynu, regulace plynu, injektor (nástříková komora), chromatografická kolona, termostat, detektor, vyhodnocovací zařízení [43].



Obrázek č. 15 – Schéma plynového chromatografu (upraveno podle [44])

Úkolem detektoru je zaznamenat eluci jednotlivých složek vzorku a generovat signál. Detektor musí mít stabilní signál, velkou citlivost, rychlou reakci na změnu složení eluentu. Nejznámější detektory v GC jsou plamenový ionizační, detektor elektronového záchytu, tepelně vodivostní, plamenový fotometrický a hmotnostně spektrometrický. Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je velmi efektivní technika pro analýzu složitých směsí organických látek [43].

Plynová chromatografie může být použita přímo pro stanovení neutrálních, těkavých PFAS jako jsou např. perfluoroalkansulfonamidy, fluorotelomerní alkoholy nebo olefiny [1].

Stanovení perfluorokarboxylových kyselin v environmentálních a biologických matricích pomocí plynové chromatografie je složitější kvůli jejich nízké těkavosti. Pomocí chemické derivatizace je možné vytvořit alkylestery těchto kyselin, které mohou být separovány plynovou chromatografií a stanoveny detektorem elektronového záchytu nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí [29].

Jako derivatizační činidlo lze použít např. methanol [41] nebo isobutylester kyseliny chlormravenčí [45].

2.3.4.2. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je separační technika, jejíž podstatou je distribuce složek vzorku mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní a stacionární. Mobilní fáze je kapalná a na rozdíl od GC má v separačním procesu důležitou roli. Jednotlivé složky vzorku jsou v různé míře zadržovány stacionární fází na základě jejich vlastností a tím jsou od sebe separovány. Složky poté postupně opouští kolonu v určitých časech (retenční čas) a jsou registrovány detektorem. Podle těchto časů můžeme jednotlivé látky identifikovat. Kapalinovou chromatografií můžeme rozdělit podle principu separace na rozdělovací, adsorpční, gelovou permeační, iontově výměnnou a afinitní [43, 46].

Ukazatelem kvality kolony je její účinnost, která charakterizuje míru rozšiřování elučních zón dělených na koloně. Mírou účinnosti kolony je počet teoretických pater (bezrozměrná veličina N). Čím větší je počet teoretických pater, tím méně je rozšířena zóna analytu, a tím je kolona účinnější. Počet teoretických pater je závislý na délce kolony, retenčním čase, rychlosti průtoku mobilní fáze, velikosti částic náplně kolony, teplotě a viskozitě mobilní fáze. Pro praktické účely lze pro výpočet počtu teoretických pater použít rovnici:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_R}{w_{50}} \right)^2, \quad (1)$$

kde w_{50} je šířka píku v polovině výšky a V_R je retenční objem [47].

Pro porovnání účinností kolon různých délek je používán výškový ekvivalent teoretického patra H (HETP – *Height Equivalent to a Theoretical Plate*):

$$H = \frac{L}{N}, \quad (2)$$

kde L je délka kolony [47].

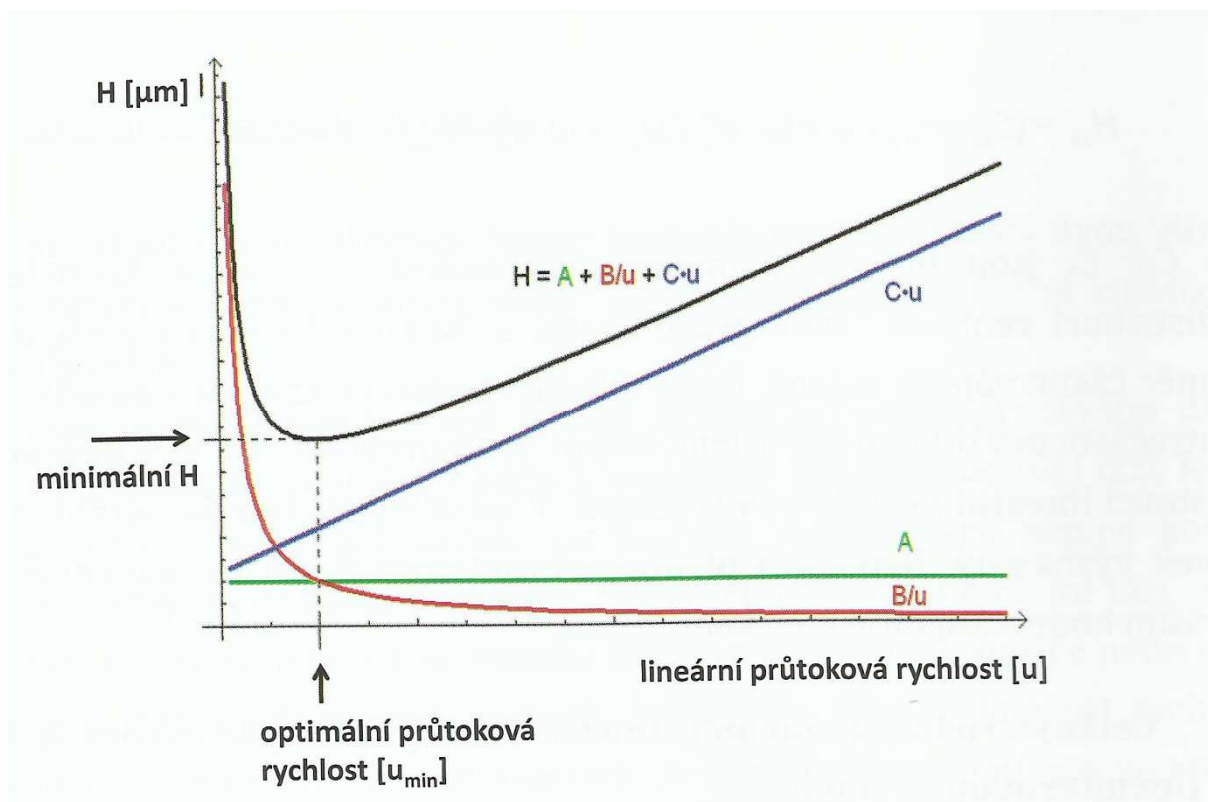
Chromatografickou separaci ovlivňují kinetické děje, které způsobují rozmývání elučních zón, což má dopad na výsledný tvar píku a na účinnost separace. Tyto děje umožňuje popsat dynamická van Deemterova teorie, která přisuzuje rozmývání elučních zón třem nezávislým aditivním procesům: turbulentní (vířivé) difúzi, molekulární difúzi a odporu proti převodu hmoty ve stacionární a mobilní fázi. Výškový ekvivalent teoretického patra lze poté vyjádřit jako součet těchto dílčích příspěvků:

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u} + \frac{8}{\pi} \frac{k d_f^2}{(1+k)^2} u + \frac{(1+6k+11k^2)d_p}{24(1+k)^2} u, \quad (3)$$

kde λ je geometrický faktor, d_p je velikost částic náplně kolony (průměr), γ je faktor charakterizující tvar kanálků v náplni kolony, D_m je difúzní koeficient analytu v mobilní fázi, u je lineární rychlost mobilní fáze, k je retenční faktor a d_f tloušťka filmu stacionární fáze [46, 47].

Na základě van Deemterovy teorie je účinnost separace vyjádřena jako výškový ekvivalent teoretického patra závislá na druhé mocnině velikosti částic. Využití menších částecek tedy na jedné straně přináší zvýšení účinnosti kolony, ale na druhé straně výrazně snižuje permeabilitu kolony, takže se zvyšují nároky na vstupní tlak nezbytný pro dosažení potřebného průtoku mobilní fáze [46, 47].

Grafickým vyjádřením je van Deemterova křivka (viz Obrázek č. 16). Minimum van Deemterovy křivky odpovídá nejnižší hodnotě H a tím i maximální účinnosti, které je dosaženo při průtokové rychlosti mobilní fáze odpovídající tomuto minimu. Optimální průtoková rychlost roste s klesající velikostí částic [47].



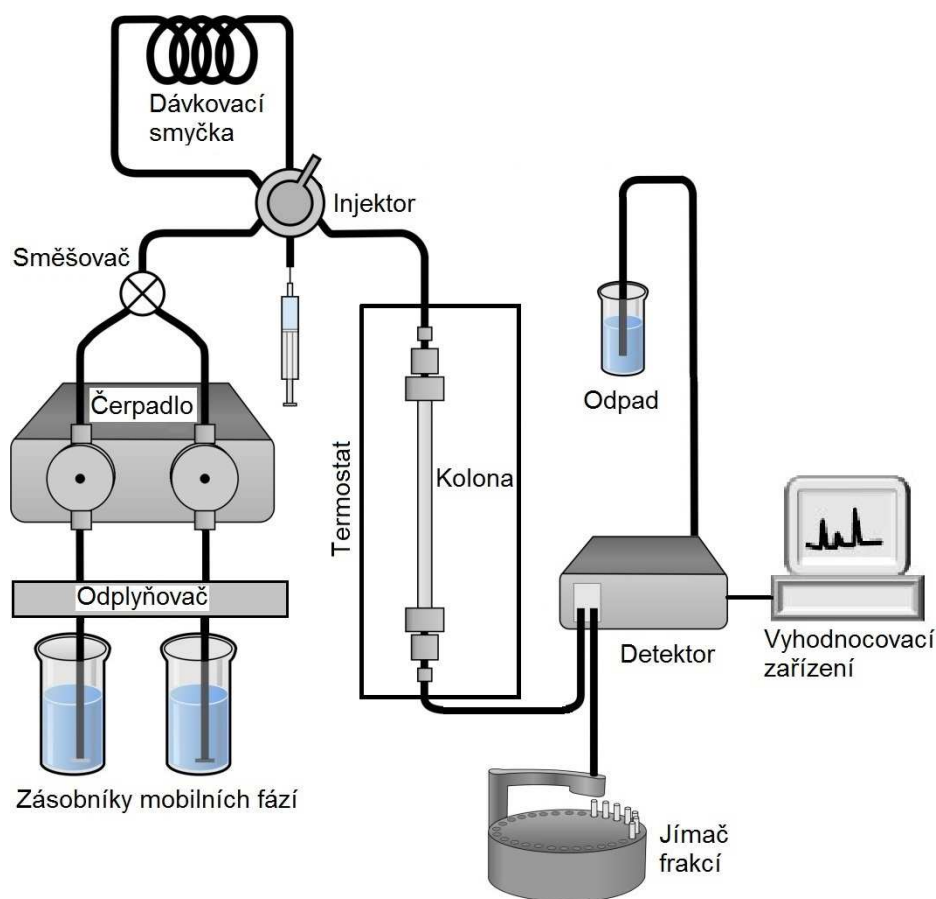
Obrázek č. 16 – Znázornění van Deemterovy křivky [47]

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) využívá kolony, plněné malými částicemi sférického tvaru a jednotné velikosti (3,5–10 μm). Ty rovnoměrně vyplňují kolonu. Účinnost je řádově v desítkách tisíc pater na metr kolony. Pohyb mobilní fáze zajišťuje vysoký vstupní tlak, u HPLC omezený hodnotou do 40 MPa. Pro analýzu jsou potřeba jen malá množství vzorku. V UPLC a UHPLC jsou používány velikosti částic náplně kolon pod 2 μm , vstupní tlak na koloně dosahuje hodnot až 120 MPa [35, 46].

Základní části kapalinového chromatografu jsou čerpadlo, zásobník mobilní fáze, odplyňovač mobilní fáze, dávkovač vzorku, kolona, termostat, detektor a vyhodnocovací zařízení [35, 43].

V dnešní době se nejčastěji používají čerpadla s dvěma písty v sériovém uspořádání, která umožňují bezpulzní tok mobilní fáze na kolonu. Pro odplynění mobilní fáze se používají především vakuové odplyňovače, které jsou rychlejší, účinnější a levnější než probublávání heliem. Pro dávkování vzorku jsou využívány dávkovače s částečně plněnou smyčkou, které umožňují rychlou změnu dávkovaného objemu vzorku. Kolona bývá umístěna v termostatu, který udržuje konstantní teplotu během chromatografické separace. Jako vyhodnocovací zařízení se používá standardní osobní počítač vybavený příslušným softwarem [46, 47].

Detektor reaguje na změnu složení mobilní fáze a převádí ji na signál. Jsou zapotřebí velmi citlivé detektory, které kontinuálně zaznamenávají látky vystupující z kolony. Nejčastěji používané detektory jsou spektrofotometrický (UV-VIS/DAD), fluorescenční, refraktometrický, vodivostní, elektrochemický a hmotnostně spektrometrický [35, 43].



Obrázek č. 17 – Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu (upraveno podle [48])

Výsledným záznamem analýzy je chromatogram, na kterém jsou zaznamenány jednotlivé signály jako tzv. píky. Kvalitativní informace je retenční čas píku (doba od nástřiku po maximum příslušného píku) a kvantitativní informace je plocha píku. Při spojení LC-MS získáme kromě chromatogramu také hmotnostní spektrum [46].

Výhodou HPLC je rozsah použitelnosti. Můžou být analyzovány ionty, polární i nepolární látky, sloučeniny málo těkavé, tepelně nestabilní, vysokomolekulární. Dále lze ovlivňovat separaci látek složením mobilní fáze. Ta se na rozdíl od GC významně podílí na separaci. Nevýhodou HPLC je náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace než u GC [35].

2.3.4.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda sloužící k určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné nebo záporné ionty. Je to velmi účinná identifikační technika. Hlavní využití této metody je stopová analýza organických látek a zjištění jejich struktury [35].

Hlavní části hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, analyzátor, detektor, vyhodnocovací zařízení a vakuový systém [43].

V iontovém zdroji vznikají z molekul vzorku ionty. Existuje řada způsobů ionizace, mezi nejznámější a v současnosti nejčastěji využívané patří elektronová a chemická ionizace

pro spojení GC-MS (plynné vzorky) [43], dále elektrosprej, fotoionizace za atmosférického tlaku, chemická ionizace za atmosférického tlaku pro spojení LC-MS a MALDI pro ionizaci pevných vzorků [46].

Analýzátor separuje vzniklé ionty podle jejich efektivní hmotnosti, tj. podle poměru m/z . Základní typy analyzátorů jsou sektorové, kvadrupól, sférická iontová past, lineární iontová past, analyzátor doby letu, iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací a orbitrap [43, 49].

Kvadrupól je nízkorozlišovací analyzátor. Patří mezi nejoblíbenější a nejrozšířenější analyzátory a to z toho důvodu, že je konstrukčně jednoduchý, spolehlivý při provozu, relativně snadný na obsluhu a nenáročný na údržbu. Skládá se ze čtyř tyčí, z nichž dvě protilehlé jsou vždy vodivostně spojeny. Tyče byly původně kruhového průřezu, ale v dnešní době je výrobci nahrazují tyčemi hyperbolickými, které zvyšují propustnost a zlepšují rozlišení analyzátoru [49].



Obrázek č. 18 – Kvadrupól [50]

Ionty vstupující do kvadrupólu se pohybují v elektrickém poli, které má stejnosměrnou a radiofrekvenční složku. Poměr těchto složek určuje rozsah hmot, které jsou propuštěny na detektor. Ionty oscilují mezi elektrodami opačné polarity. Při určité hodnotě radiofrekvenčního napětí dosáhnou ionty o určité hmotnosti stabilní trajektorie a ostatní ionty oscilují s rostoucí amplitudou. Pouze ionty se stabilní trajektorií dopadají na detektor. Hmotnost dopadajících iontů lze měnit změnou amplitudy radiofrekvenčního napětí spolu se změnou stejnosměrné složky tak, aby jejich poměr zůstal zachován [43].

Jako detektor se používá elektronový násobič, který zaznamenává dopadající ionty. Na konverzní dynodu dopadá iont a dojde k uvolnění 1–2 elektronů, které jsou potenciálovým spádem urychleny k dynodě, ze které jsou po dopadu vyraženy další elektrony a dalším urychlením a dopadem na dynody dochází k zesílení signálu [43].

V hmotnostním spektrometru je nezbytností vysoké vakuum, jelikož srážkou iontů s molekulami by docházelo k jejich zániku. Vysoké vakuum je zajištěno dvoustupňovým vakuovým systémem. Většinou je první stupeň tvořen rotační olejovou vývěvou s rotujícími lamelami a druhý stupeň tvoří turbomolekulární nebo difuzní vývěva [43, 49].



Obrázek č. 19 – Turbomolekulární vývěva [49]

2.3.4.4. Ultra-účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS)

Ultra-účinná kapalinová chromatografie se od HPLC poněkud liší. Proces probíhá za velmi vysokých tlaků (cca 100 MPa), který je nutný vzhledem k malým rozměrům kolony (délka 2–15 cm, vnitřní průměr 1–4,6 mm) a malé velikosti částic (1,7 popř. 1,8 μm). Kvůli těmto tlakům musí být náplně kolon mechanicky odolné. Doba analýzy je ve srovnání s HPLC kratší (cca 5–10 min). UPLC má menší spotřebu rozpouštědel a tím i nižší náklady. Další výhody UPLC jsou zvýšení separační účinnosti, nižší meze detekce, vyšší citlivost a více kvalitativních informací [51].

Perfluoroalkylové sloučeniny jsou v dnešní době obvykle analyzovány pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí [2], [7]. Tandemové uspořádání MS umožňuje vybrat produktový ion vzniklý fragmentací molekulového iontu, což poskytuje vysokou selektivitu analýzy a zároveň minimalizuje chemický šum, což vede k výraznému snížení mezí detekce. Tento měřicí režim se označuje MRM, tj. sledování vybraných přechodů [10, 49].

Od doby zavedení elektrospreje jako ionizační techniky pro spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je usnadněna stopová analýza PFAS. Analýza touto metodou je vysoce citlivá a specifická bez nutnosti chemické derivatizace [29]. V mnoha laboratořích se pro stanovení PFAS standardně používají LC-MS systémy s trojitým kvadrupólovým analyzátozem (QqQ). Trojitý kvadrupólový MS je jeden z nejvhodnějších a nejrozšířenějších detektorů pro kvantitativní analýzu PFAS v environmentálních matricích díky jeho nízkým mezím detekce a selektivitě v MRM módu. Sledované produktové ionty jsou pro PFSA $[\text{SO}_3]^-$ s m/z 80 a pro PFCA $[\text{M-H-COO}]^-$ [7, 38].

Dále se jako analyzátoři využívají také sférická a lineární iontová past a analyzátor doby letu (TOF) [7]. Sférická iontová past je levnější varianta než trojitý kvadrupól, je také schopna provádět tandemovou MS a je vhodnější pro objasnění struktury PFAS isomerů, protože spektra obsahují specifické produktové ionty. Je možné měření v MRM módu, ale fragmentace poskytuje specifické ionty s větší efektivní hmotností s nízkou intenzitou a ionty s malou efektivní hmotností (např. 80) nemohou být na sférické iontové pasti sledovány. Tudíž lze iontovou past využívat pro kvantifikaci PFAS v SIM módu. Před analýzou je nutné důkladné čištění vzorku pro odstranění koeluuujících interferentů, které často způsobují prostorový náboj [38].

Hybridní analyzátoři (např. QqLIT nebo QqTOF) se ukazují být vysoce citlivé a selektivní díky kombinaci hlavních výhod dvou různých analyzátorů. Hlavní výhodou QqLIT je dosažení jednoznačné identifikace a potvrzení cílových analytů s nízkými mezemi detekce. Díky tomu je možné dosáhnout lepších LOQ (až $0,01 \mu\text{g.kg}^{-1}$) v porovnání s QqQ systémem. Analyzátor je schopen pracovat v různých módech jako je sledování vybraných přechodů (SRM), sken produktových iontů, neutrálních ztrát nebo prekurzorových iontů. Další výhodou QqLIT je možnost MS³ [34].

Stále zůstávají otázky týkající se kvantitativní analýzy z důvodu matricového efektu. Vlivem nečistot přítomných v extraktu jsou kvantitativní výsledky často nepříznivě ovlivněny matricovým potlačením nebo zvýšením signálu. Potlačení signálu se vyskytuje, když koextrakty z matrice soutěží s analytem o náboj a tím redukuje počet plynných iontů analytu dostupných pro detekci. A naopak, pokud koextrakty usnadňují ionizaci (např. snížením povrchového napětí) dochází ke zvýšení signálu. Pro kompenzaci matricového efektu může být použita metoda izotopového ředění, která využívá jako vnitřní standard stabilní izotopické analogy příslušného analytu. Ty se v analytickém systému chovají stejně jako nativní analyty a tím mohou kompenzovat vliv matrice pozorovaný u nativních látek, ale jsou velmi drahé vzhledem k jejich nákladné syntéze [29, 52].

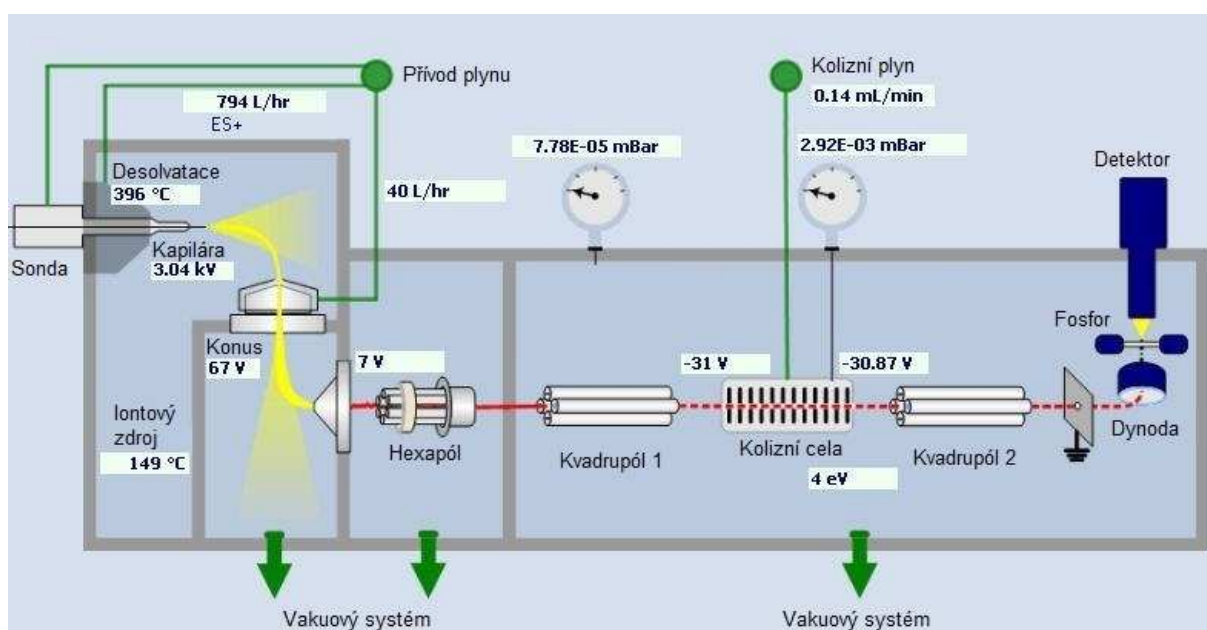
2.3.4.5. Ultra-účinný kapalinový chromatograf s tandemovým hmotnostním spektrometrem ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo firmy Waters

Systém ACQUITY UPLC je vybaven binárním vysokotlakým čerpadlem s tvorbou gradientu ve vysokotlaké části a vakuovým odplyňovačem. Průtoková rychlost mobilní fáze je v rozmezí $0,01\text{--}2 \text{ ml.min}^{-1}$. Maximální tlak je 15 000 psi (103,4 MPa) při průtoku 1 ml.min^{-1} . Pro dávkování vzorku je využíván dávkovač s částečně plněnou smyčkou o objemu 10 μl . Zásobník vzorků je termostatovaný v rozmezí $4\text{--}40^\circ\text{C}$. Kolona o délce 2–15 cm je umístěna v termostatu, který je schopen zahřívat v rozmezí od 5°C nad okolní teplotou až do 90°C . Systém nedisponuje konvenčním detektorem, pro detekci je využíván tandemový hmotnostní spektrometr [53].

Hmotnostní spektrometr TQ MS Xevo (Waters) je vybaven elektrosprejem ZSprayTM. Iontovou optiku tvoří hexapól, analyzátoři jsou dva kvadrupóly s tyčemi kruhového průřezu. Mezi kvadrupóly je kolizní cela T-Wave/ScanWave. Vakuový systém je tvořen dvěma turbomolekulárními vývěvami chlazenými vzduchem a jednou rotační olejovou vývěvou. Detektorem je fotonásobič. Systém je schopen pracovat v módu plného skenu, skenování produktových iontů, skenování prekurzorových iontů, skenování konstantních neutrálních ztrát a sledování vybraných reakcí (SRM a MRM). Hmotnostní rozsah je 2–2 048 m/z. Skenovací rychlost dosahuje až $10\,000 \text{ Da.s}^{-1}$ [53].



Obrázek č. 20 - ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters)



Obrázek č. 21 – Schéma hmotnostního spektrometru TQ MS Xevo (Waters)

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této práce je optimalizovat extrakční metodu pro stanovení vybraných perfluorokarboxylových kyselin (PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA) a PFOS v čistírenských kalech, optimalizovanou metodou připravit a stanovit 21 vzorků čistírenských kalů a zjistit koncentrační hladiny těchto látek.

Dalším cílem je optimalizovat extrakční metodu a analytickou metodu stanovení pro detekci PFAS s dlouhými řetězci (PFOA, PFNA, PFDA, PFUdA, PFDoA, PFTrDA, PFTeDA, PFHxDA, PFODA, PFHxS, PFOS, PFDS) a stanovit koncentrace těchto látek v kompletních a doplňkových krmivech a krmných surovinách.

3.1. Chemikálie a standardy

- Deionizovaná voda (Millipore)
- Methanol, pro LC-MS analýzu (Merck)
- Acetonitril, pro LC-MS analýzu (Merck)
- Hexan, pro organickou stopovou analýzu (Merck)
- Octan amonný, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pro LC-MS (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid sodný, NaOH, p.a. (Lach-ner)
- Kyselina chlorovodíková, HCl, p.a. (Lach-ner)
- Aktivní uhlí, Supelclean Envi-Carb (Supelco)
- Síran hořečnatý, MgSO_4 , sušen při 100 °C po dobu 16 h, žíhán při 550 °C po dobu 16 h
- Chlorid sodný, NaCl, p.a. (Lach-ner)
- Sorbent ODS C18 (Agilent Technologies)
- Mořský písek, žíhaný při 550 °C po dobu 5 h
- Křemelina
- Směsný standard pro kvantifikaci PFAS (Wellington Laboratories): PFAS-MXA (pro kaly) a PFAC-MXB (pro krmiva)
- Směsné izotopově značené standardy (Wellington Laboratories): vnitřní standard pro stanovení kalů (PFOA-13C4, PFOS-13C4), vnitřní standard pro stanovení krmiv (PFHxS-18O2, PFOA-13C4, PFNA-13C5, PFOS-13C4, PFDA-13C2, PFUdA-13C2, PFDoA-13C2) a nástříkový standard (PFOA-13C8, PFOS-13C8)

3.2. Přístroje a pomůcky

- Ultra-účinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem: ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters)
- Kolona ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters)
- Analytické váhy (Sartorius)
- Ultrazvuková lázeň, Ecoson (Labicom)
- Extraktor ASE 100 (Dionex)
- Extraktor B-811 (Büchi)
- Centrifuga Sigma 2-16K (Sigma)
- Centrifuga (Eppendorf)
- Koncentrátor Termovap (Ecom)

- Vysokorychlostní míchadlo, Vortex (IKA)
- Třepačka (Kavalier)
- Polypropylenové zkumavky (15 ml, 50 ml)
- Eppendorf zkumavky (1,5 ml)
- Stříkačky (2 ml)
- Stříkačkové nylonové filtry (0,2 µm)
- Injekční jehly
- Skleněné sběrné nádoby a frity pro Büchi
- Nerezové patrony pro ASE o objemu 10 ml
- Sběrné skleněné nádobky pro ASE
- Filtrační papír
- Pasteurovy pipety
- Automatické pipety
- Dávkovače Hamilton bez teflonového těsnění (50 µl, 100 µl, 500 µl)
- Polypropylenové vialky (2 ml; 0,7 ml; 0,3 ml)
- Běžné vybavení analytické laboratoře

3.3. Stanovení PFAS v čistírenských kalech

3.3.1. Testování extrakčních metod

Pro optimalizaci extrakční metody byly vybrány tři vzorky kalů a blank (mořský písek). Vzorky o navážce 1 g byly obohaceny 6 ng vnitřního standardu a extrahovány do methanolu. Pro porovnání účinnosti extrakce vzorků byly vybrány tři metody: tlaková extrakce rozpouštědlem, zrychlený Soxhlet a modifikovaná Powleyho metoda.

3.3.1.1. Tlaková extrakce rozpouštědlem

Pro extrakci byly použity patrony o objemu 10 ml. Na dno patrony byl umístěn filtrační papír, na který byly naváženy 3 g jemného mořského písku a dále 1 g vzorku. Vzorek byl obohacen vnitřním standardem. Patrona byla dosypána mořským pískem a křemelinou a pevně zašroubována. Pro slepé stanovení byla patrona naplněna pouze mořským pískem.

Přístroj byl promyt methanolem, patrona byla vložena do přístroje a byla spuštěna extrakce. Methanolový extrakt byl sbírán do sběrné nádobky. Parametry extrakce viz Tabulka č. 2.

Tabulka č. 2 – Parametry extrakční metody PLE

Teplota	100 °C
Tlak	11,7 MPa
Doba předeřtí	1 minuta
Počet cyklů	3
Doba cyklu	5 minut
Promytí	60 %
Doba čištění dusíkem	1 minuta



Obrázek č. 22 – ASE 100 (Dionex)



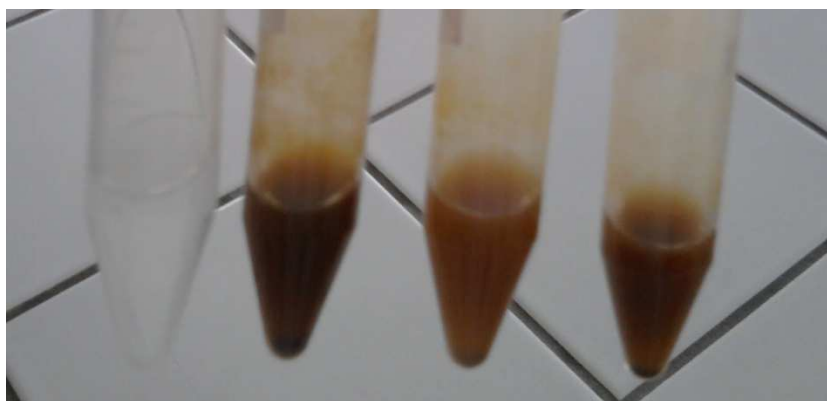
Obrázek č. 23 – Extrakty ve sběrných nádobách

3.3.1.2. Zrychlený Soxhlet (Büchi)

Do skleněné patrony s fritou byl umístěn navážený vzorek, vzorek byl obohacen vnitřním standardem a patrona byla nasazena do přístroje na chladič. Pro slepé stanovení byl opět použit mořský písek. Do sběrné nádoby bylo nalito 80 ml methanolu a přidán varný kamínek. Sběrná nádoba byla upevněna do závitu na varnou desku. Po nastavení senzorů byla spuštěna extrakce. Po extrakci byl vzorek zakonzentrován pomocí Büchi. Parametry extrakce viz Tabulka č. 3.

Tabulka č. 3 – Podmínky extrakce metodou zrychleného Soxhletova extraktoru

Stupeň ohřevu varné desky	14
Stupeň ohřevu horní plotýnky	4
Doba extrakce za horka	20 minut
Doba extrakce za studena (prokapávání)	40 minut



Obrázek č. 24 – Extrakty slepého pokusu a reálných vzorků

3.3.1.3. Modifikovaná Powleyho metoda (sonifikace)

Vzorek byl navážen do polypropylenové zkumavky a obohacen vnitřním standardem. Ke vzorku bylo přidáno 0,5 ml roztoku NaOH v methanolu o koncentraci $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$. Po důkladném promíchání pomocí vortexu byl vzorek ponechán stát po dobu 30 minut. Poté byla provedena neutralizace přidáním 50 μl roztoku HCl v methanolu o koncentraci 2 mol.dm^{-3} . Vzorek byl následně extrahován 5 ml methanolu v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut. Po extrakci byl vzorek odstředěn (5 minut, 5000 ot.min^{-1}) a odstředěný extrakt byl převeden pomocí automatické pipety do nové polypropylenové zkumavky. Extrakce byla zopakována a druhý extrakt byl přidán do polypropylenové zkumavky k prvnímu extraktu.



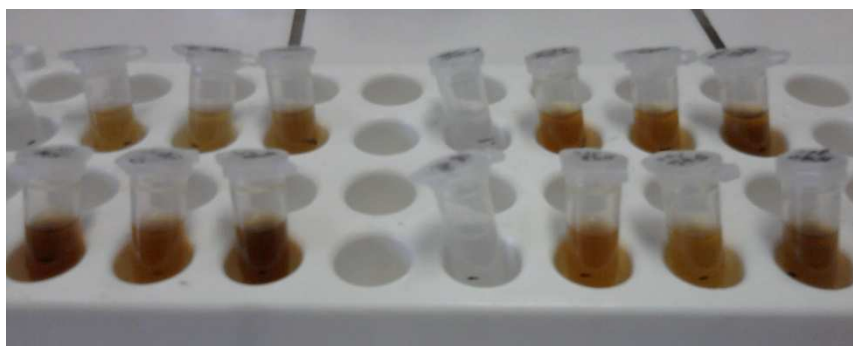
Obrázek č. 25 – Slepý pokus a extrakty vzorků

3.3.2. Optimalizace čištění extraktu

Po všech extrakcích byly extrakty převedeny do polypropylenových zkumavek a zakonzentrovány pod proudem dusíku pomocí koncentrátoru (Termovap).

3.3.2.1. Čištění aktivním uhlím

Pro zjištění optimálního množství aktivního uhlí potřebného k přečištění extraktu byly testovány opět tři vzorky. Byly provedeny tři paralelní pokusy s množstvím 25, 100 a 300 mg aktivního uhlí. Extrakty byly zakonzentrovány na objem 2 ml a k extraktu bylo přidáno konkrétní množství aktivního uhlí. Suspenze byla intenzivně třepána po dobu 1 minuty. Poté byla suspenze odstředěna a podíl extraktu o objemu 1 ml byl odebrán do zkumavky Eppendorf.



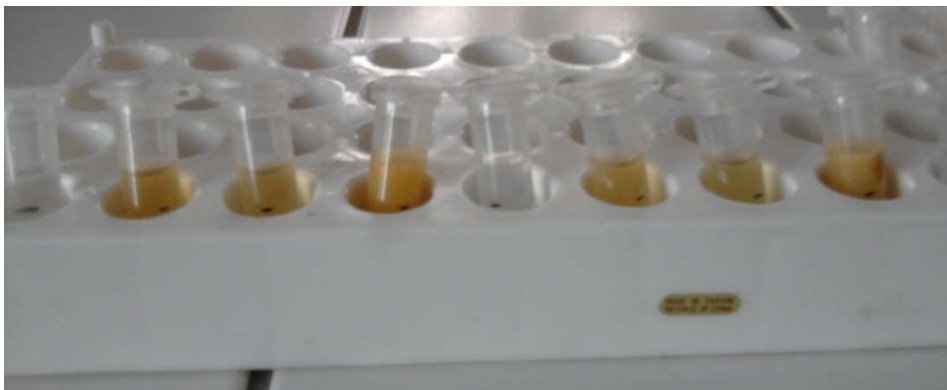
Obrázek č. 26 – Přečištěné extrakty ve zkumavkách Eppendorf

3.3.2.2. Čištění hexanem

Bylo vybráno 6 vzorků, u kterých byly provedeny 2 paralelní metody čištění. První série vzorků byla po extrakci přečištěna pouze pomocí aktivního uhlí. Druhá série byla přečištěna třepáním s hexanem a DSPE s aktivním uhlím. Série zahrnující hexanové čištění byla zakonzentrována na objem 3 ml. K extraktu byly přidány 3 ml hexanu a směs byla intenzivně třepána po dobu 1 minuty. Následovalo odstředění a odebrání hexanové fáze. Methanolová fáze byla zakonzentrována pod dusíkem na objem 2 ml a dočištěna pomocí aktivního uhlí.

3.3.3. Finální zpracování vzorku

Přečištěné extrakty ve zkumavkách Eppendorf byly zakonzentrovány pod proudem dusíku na objem 0,5 ml. Následně byly obohaceny 3 ng nástřikového standardu a doplněny deionizovanou vodou na výsledný objem 1 ml. Takto připravené extrakty byly promíchány pomocí vortexu, odstředěny a zfiltrány přes stříkačkové nylonové filtry (0,2 μ m) do polypropylenových vialek.



Obrázek č. 27 – Extrakty po zakoncentrování, obohacení standardem a doplnění vodou na 1 ml

3.4. Stanovení PFAS v krmivech

Série vzorků krmiv obsahovala kompletní krmiva na bázi obilovin (pro hospodářská zvířata), kompletní krmiva živočišného původu (pro domácí zvířata, tj. psy a kočky), doplňková krmiva živočišného původu (pro domácí zvířata) a krmné suroviny (rybí moučka). Pro optimalizaci byl vybrán jeden vzorek z každé skupiny krmiv. Vybrané vzorky kompletních a doplňkových krmiv byly obohaceny nativními PFAS tak, aby výsledná koncentrace analytů ve vzorku byla 1 ng.g^{-1} . Vzorky rybí moučky nebyly obohaceny, jelikož se podle dostupných informací z literatury předpokládal přirozený výskyt PFAS v této matrici. Na těchto vybraných zástupcích krmiv byly testovány 3 odlišné extrakční a čisticí metody, vždy ve třech opakováních.

3.4.1. Rychlá methanolová extrakce

Byly naváženy 2 g vzorku, které byly obohaceny nativními PFAS a ponechány v digestoři do druhého dne. Druhý den bylo ke vzorku přidáno 12 ng vnitřního standardu a vzorky byly extrahovány 6 ml methanolu pomocí třepačky po dobu 15 minut.

Po extrakci bylo ke vzorkům přidáno 340 mg aktivního uhlí a suspenze byla třepána po dobu 1 minuty. Následovalo odstředění vzorků (5 minut, $9\,000 \text{ ot.min}^{-1}$) a z odstředěného extraktu byl odebrán podíl o objemu 1,5 ml pomocí automatické pipety do zkumavky Eppendorf.

Poté byly extrakty zakoncentrovány pod proudem dusíku na 0,5 ml, obohaceny 3 ng nástrikového standardu a doplněny deionizovanou vodou na výsledný objem 1 ml. Po promíchání byly vzorky odstředěny (5 minut, $12\,000 \text{ ot.min}^{-1}$) a přefiltrovány přes $0,2 \mu\text{m}$ nylonové filtry do polypropylenových vialek.



Obrázek č. 28 – Extrakty vzorků krmiv zakoncentrované na 0,5 ml

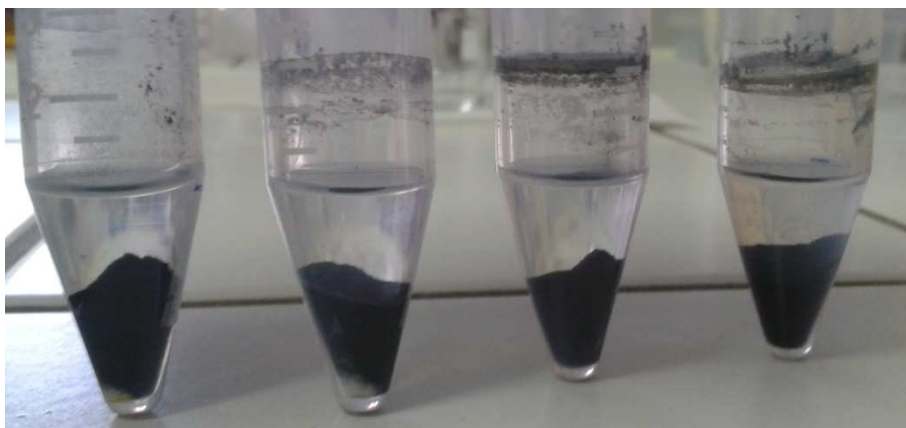
3.4.2. Powleyho metoda

Byl navážen 1 g vzorku, který byl obohacen nativními PFAS a ponechán stát v digestoři do druhého dne. Druhý den bylo ke vzorkům přidáno 6 ng vnitřního standardu. Vzorky byly extrahovány 5 ml acetonitrilu v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut. Poté byly vzorky odstředěny (5 minut, 5000 ot.min⁻¹), odstředěný extrakt byl odebrán pomocí automatické pipety do nové polypropylenové zkumavky a extrakce byla zopakována. Spojené extrakty byly následně zakoncentrovány pod proudem dusíku na 2 ml pomocí Termovapu.



Obrázek č. 29 – Zakoncentrování vzorků pod proudem dusíku

Zakoncentrované vzorky byly přečištěny pomocí extrakce kapalina-kapalina třepáním s hexanem (2 × 2 ml). Poté byl extrakt zakoncentrován pod dusíkem na 1 ml a přečištěn metodou DSPE přidáním 100 mg aktivního uhlí a třepáním směsi po dobu 1 minuty. Po odstředění bylo odebráno 500 µl přečištěného extraktu do zkumavky Eppendorf.



Obrázek č. 30 – Extrakty přečištěné pomocí aktivního uhlí

Vzorky byly obohaceny 3 ng nástřikového standardu a doplněny deionizovanou vodou na výsledný objem 1 ml. Po promíchání pomocí vortexu byly vzorky filtrovány přes 0,2 μ m nylonové filtry do polypropylenových vialek.

3.4.3. QuEChERS

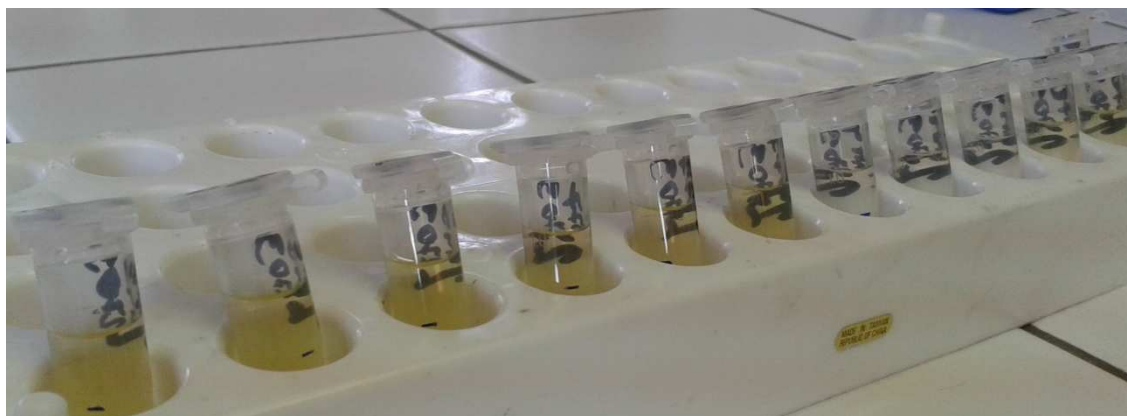
Bylo naváženo 5 g vzorku. Vzorky byly obohaceny nativními PFAS a ponechány do druhého dne v digestoři. Následující den bylo ke vzorkům přidáno 30 ng vnitřního standardu, 10 ml deionizované vody a směs byla protřepána. Poté následovala extrakce 10 ml acetonitrilu na třepačce po dobu 15 minut. Po extrakci bylo provedeno vysolení pomocí směsi 4 g MgSO_4 a 1 g NaCl . Extrakty byly s touto směsí třepány po dobu 1 minuty a následně odstředěny (5 minut, 9 000 ot.min⁻¹).



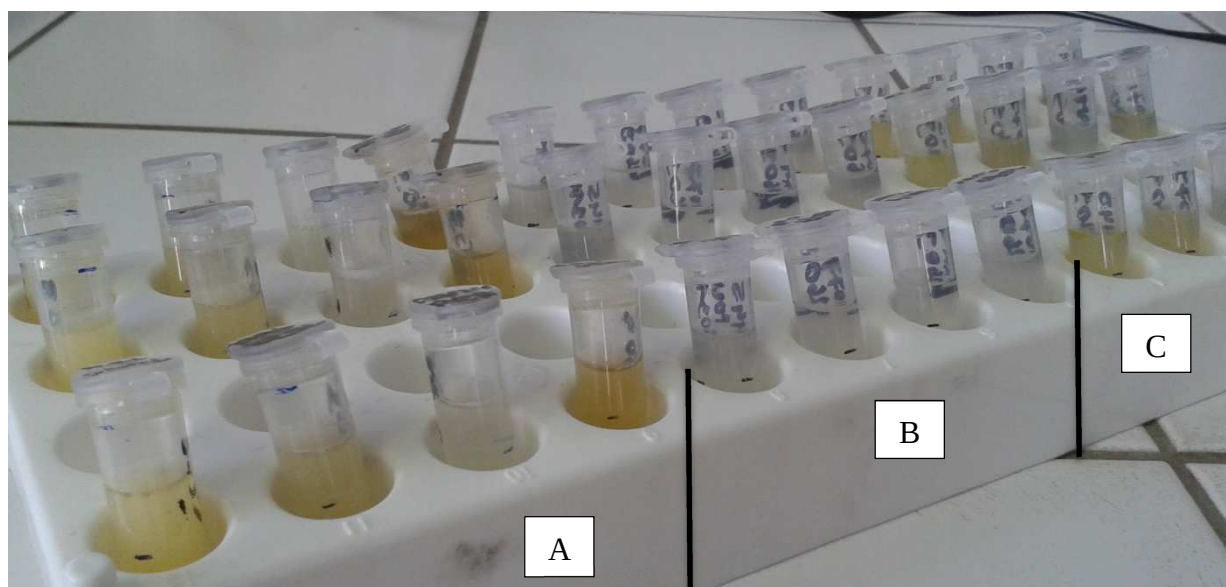
Obrázek č. 31 – Extrahovaný vzorek po odstředění

Po odstředění byl odebrán 2ml podíl acetonitrilové fáze. Tento podíl byl přečištěn metodou DSPE pomocí směsi 300 mg MgSO_4 , 30 mg C18 a 15 mg aktivního uhlí. Extrakty byly s touto směsí třepány po dobu 1 minuty a poté odstředěny (5 minut, 5 000 ot.min⁻¹).

Z odstředěného extraktu byl odebrán podíl o objemu 1 ml do zkumavky Eppendorf, který byl zakonzentrován na 0,5 ml pod proudem dusíku. Vzorky byly obohaceny 3 ng nástrikového standardu a byly doplněny deionizovanou vodou na celkový objem 1 ml. Po promíchání byly vzorky filtrovány přes 0,2 μm nylonové filtry do polypropylenových vialek.



Obrázek č. 32 – Odebraný podíl přečištěného extraktu



Obrázek č. 33 – Finální vzorky před filtrací ze všech tří metod, rychlá methanolová extrakce (A), Powleyho metoda (B) a QuEChERS (C)

3.5. Stanovení pomocí UPLC-MS/MS

Přečištěné extrakty vzorků kalů a krmiv byly analyzovány metodou UPLC-MS/MS. Použitá kolona byla ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters). Před nástřikový ventil byla zařazena izolátorová kolona s katalogovým číslem 186004476 (Waters) pro odstranění interferujících PFAS, které se mohou uvolňovat z UPLC systému. Teplota kolony byla 60 °C a objem nástřiku 5 μl. Mobilní fáze byla složena z deionizované vody (2 mmol.dm⁻³ CH₃COONH₄) a methanolu (2 mmol.dm⁻³ CH₃COONH₄). Eluce byla gradientová a průtok 0,6 ml.min⁻¹ v případě kalů a 0,3 ml.min⁻¹ v případě krmiv. Eluční programy jsou znázorněny v tabulkách č. 4 a 5.

Tabulka č. 4 - Eluční program UPLC pro průtok 0,6 ml.min⁻¹(kaly)

čas (minuty)	A % (voda)	B % (methanol)
0	70	30
0,2	70	30
1,8	15	85
2	0,5	99,5
3,8	0,5	99,5
4,3	70	30
5	70	30

Tabulka č. 5 – Eluční program UPLC pro průtok 0,3 ml.min⁻¹(krmiva)

čas (minuty)	A % (voda)	B % (methanol)
0	50	50
0,5	50	50
2,5	0,5	99,5
5,5	0,5	99,5
6	50	50
7	50	50

Detekce a identifikace analytů byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólovým analyzátozem. Ionizace byla provedena elektrosprejem v negativním módu. MS detekce probíhala v režimu sledování vybraných přechodů (MRM), čímž byla zajištěna selektivita analýzy. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík, jako kolizní plyn argon. Parametry UPLC-MS/MS pro stanovení PFAS jsou vypsány v tabulce č. 6.

Kalibrační standardy byly zařazeny na začátek a na konec sekvence vzorků. Před analýzou vzorků byla ověřena citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu. Pro kvantifikaci byly využity specifické přechody [M-H]⁻ → [M-H-COO]⁻ pro PFCA, [M-H]⁻ → [SO₃]⁻ pro PFSA v případě kalů a [M-H]⁻ → [FSO₃]⁻ pro PFSA v případě krmiv.

Tabulka č. 6 – Parametry UPLC-MS/MS pro jednotlivé PFAS

		R_t pro průtok 0,6 ml.min⁻¹ (minuty)	R_t pro průtok 0,3 ml.min⁻¹ (minuty)	MRM	Ionizační napětí (V)	Kolizní energie (V)
Nativní PFAS	PFHxA	1,53	-	313 → 269	15	8
				313 → 119	15	24
	PFHpA	1,76	-	363 → 319	15	11
				363 → 169	15	18
	PFOA	1,92	2,43	413 → 369	15	10
				413 → 169	15	18
	PFNA	2,05	2,64	463 → 419	15	11
				463 → 219	15	14
	PFDA	2,15	2,80	513 → 469	20	10
				513 → 219	20	16
	PFUdA	-	2,94	563 → 519	16	10
				563 → 269	16	18
	PFDoA	-	3,05	613 → 569	16	12
				613 → 319	16	18
	PFTTrDA	-	3,13	663 → 619	18	12
				663 → 369	18	18
	PFTeDA	-	3,21	713 → 669	18	12
				713 → 319	18	22
	PFHxDA	-	3,34	813 → 769	20	13
				813 → 219	20	25
Izotopově značené PFAS	PFOA-13C4	1,92	2,43	417 → 372	15	10
				468 → 423	15	11
	PFDA-13C2	-	2,80	515 → 470	20	10
	PFUdA-13C2	-	2,94	565 → 520	16	10
	PFDoA-13C2	-	3,05	615 → 570	16	12
	PFHxS-18O2	-	2,14	403 → 103	50	30
	PFOS-13C4	2,05	2,64	503 → 99	62	38
				503 → 80	62	36
	PFOA-13C8	1,92	2,43	421 → 376	15	10
	PFOS-13C8	2,05	2,64	507 → 99	62	38
				507 → 80	62	36

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

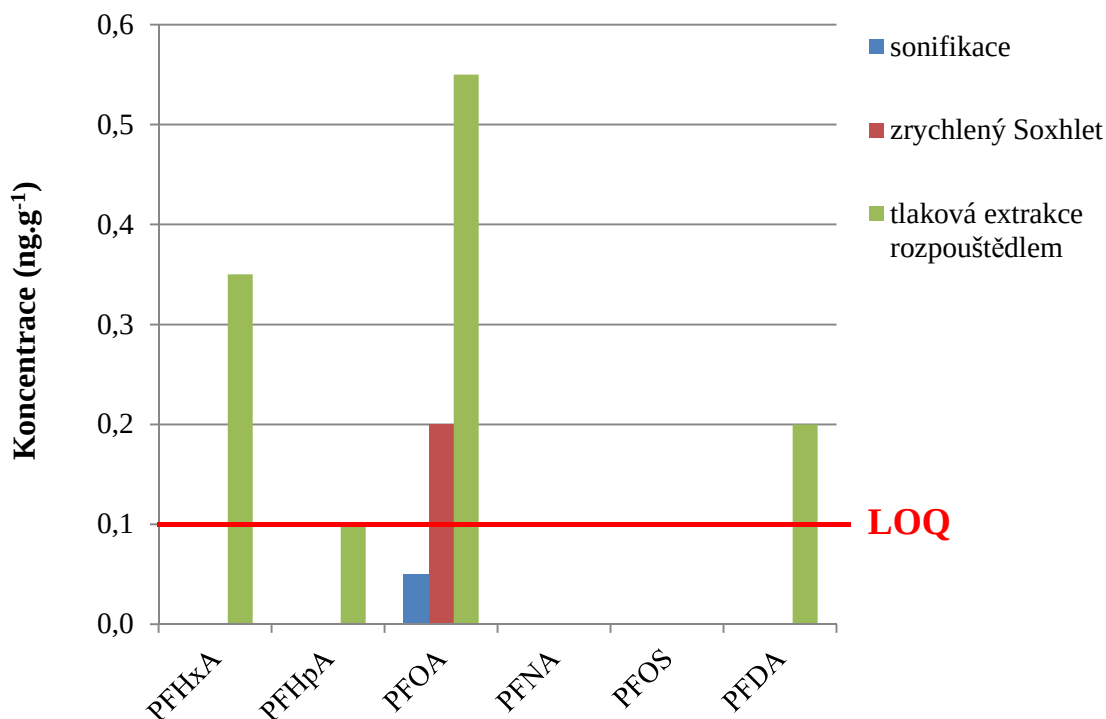
4.1. Stanovení PFAS v kalech

4.1.1. Testování extrakčních metod

Pro extrakci sledovaných analytů byly testovány tři metody: tlaková extrakce rozpouštědlem, zrychlený Soxhlet a Powleyho metoda. Pro zjištění pozadí vybraných extrakčních metod byly extrahovány slepé pokusy (mořský písek) a výsledné hodnoty byly porovnány v grafu č. 1.

Z výsledků lze vidět, že extrakce pomocí zrychleného Soxhletu a PLE vykazují alespoň u jednoho analytu vysoké pozadí. Zvláště u tlakové extrakce rozpouštědlem je pozadí některých analytů podstatně vyšší než limit kvantifikace. To je pravděpodobně způsobeno tím, že obě tyto metody obsahují v přístrojové technice teflonové součásti. Ty jsou během extrakce vystavovány vysoké teplotě a tlaku a mohou uvolňovat sledované analyty do extraktu (především PFOA).

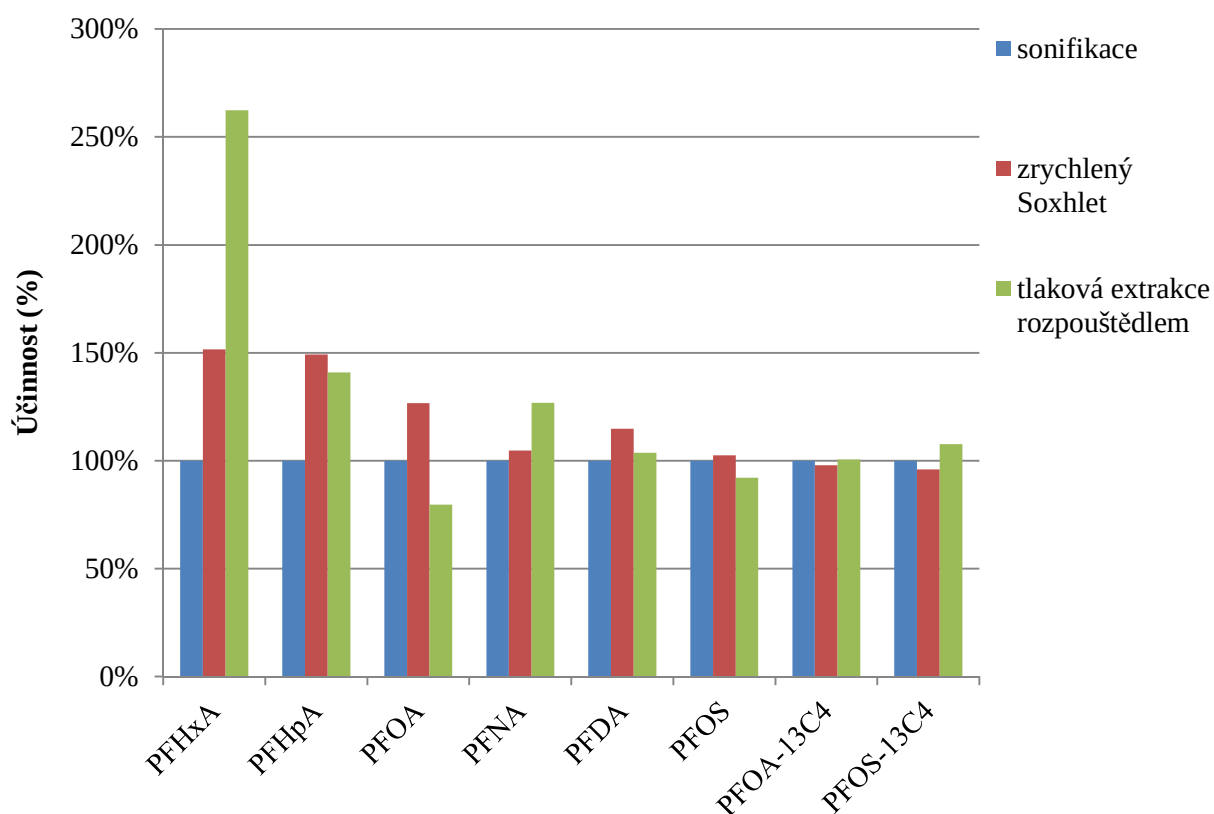
Pouze sonifikace má hodnoty slepého pokusu pod limitem kvantifikace. Pozadí této extrakční metody je minimální, tudíž nedochází k ovlivňování stanovení sledovaných analytů, jejichž hladiny jsou často v okolí LOQ. Toto je jeden z důvodů proč byla sonifikace shledána vhodnou extrakční metodou.



Graf č. 1 – Stanovení sledovaných analytů ve slepém pokusu

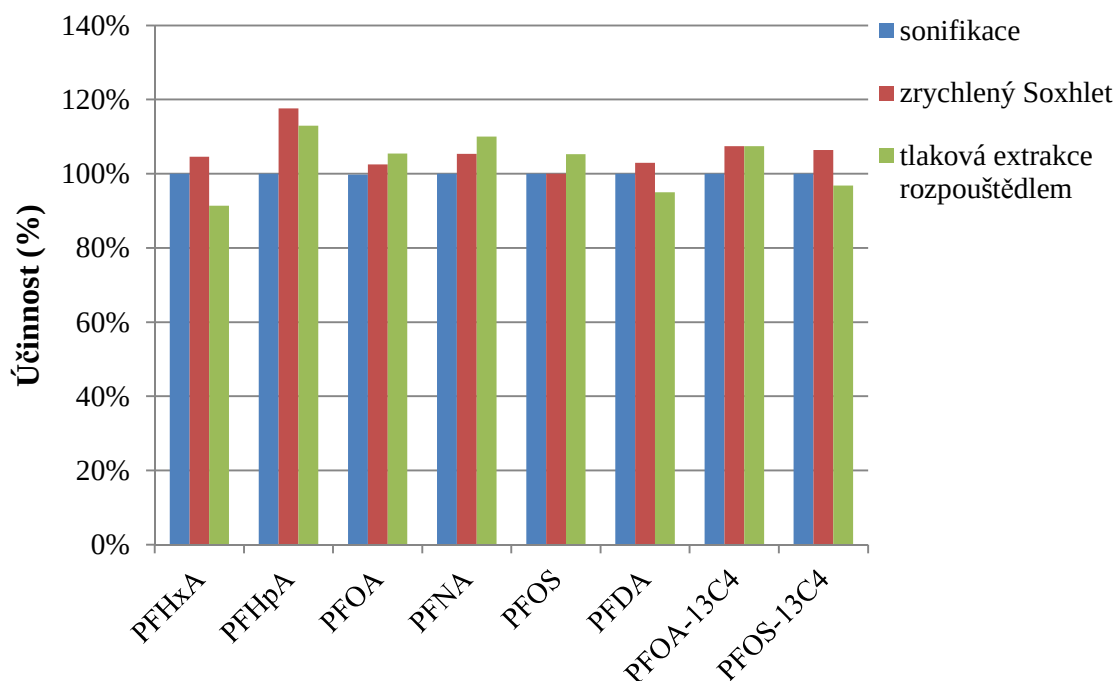
Dále byly vybranými extrakčními metodami analyzovány tři vzorky kalů (vzorky 5, 17 a 19). Pro porovnání účinností jednotlivých extrakčních metod byla do grafu č. 2 vynesena průměrná procenta tak, že sonifikace byla brána jako 100% a k ní byly vztaženy ostatní metody. Kromě analytů PFHxA a PFHpA lze vidět, že výsledky neukazují výrazný trend. Hodnoty jsou variabilní a žádná z testovaných metod není podstatně účinnější.

V případě analytů PFHxA a PFHpA se účinnosti jednotlivých extrakcí liší podstatně více. Průměrná hodnota těchto účinností je značně ovlivněna vzorky č. 17 a 19. Jelikož koncentrace analytů v těchto vzorcích jsou velice nízké (v okolí LOQ) a hodnoty blanku vysoké, může dojít k ovlivnění výsledné hodnoty analytu blankem.



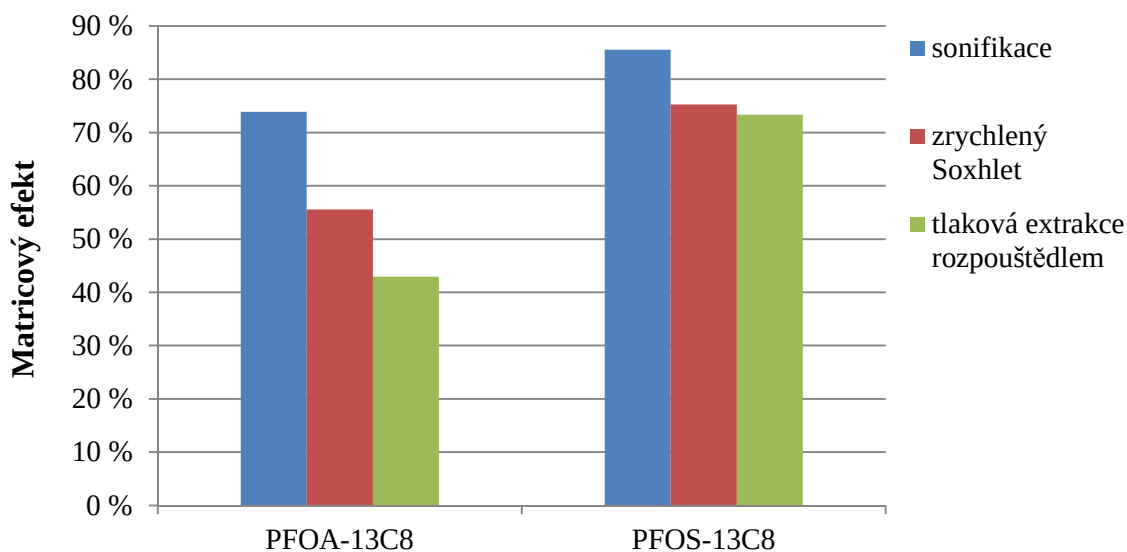
Graf č. 2 – Porovnání účinností extrakčních metod

Ve vzorku kalu č. 5 byly nálezy PFCA řádově vyšší než ve vzorcích 17 a 19 a výsledky porovnání extrakčních metod v případě tohoto vzorku neukazují žádný významný rozdíl v účinnosti, jak lze vidět v grafu č. 3.



Graf č. 3 – Porovnání účinností extrakčních metod pro vzorek č. 5

U vybraných vzorků kalů byl také posuzován matricový efekt pro dané extrakční metody. Při měření PFAA byl sledován negativní matricový efekt, který se projevoval potlačením (supresí) signálu. Tento matricový efekt byl pozorován u všech testovaných extrakčních technik. Sonifikace poskytovala nejnižší matricové efekty, a to z toho důvodu, že v porovnání s extrakcí za zvýšeného tlaku a se zrychleným Soxhletem dochází k extrakci menšího množství koextraktů. Čím silnější extrakce, tím více se uvolní koextraktů a tím větší je potlačení signálu. Průměrný matricový efekt pro jednotlivé extrakční techniky je znázorněna v grafu č. 4.



Graf č. 4 – Porovnání matricových efektů

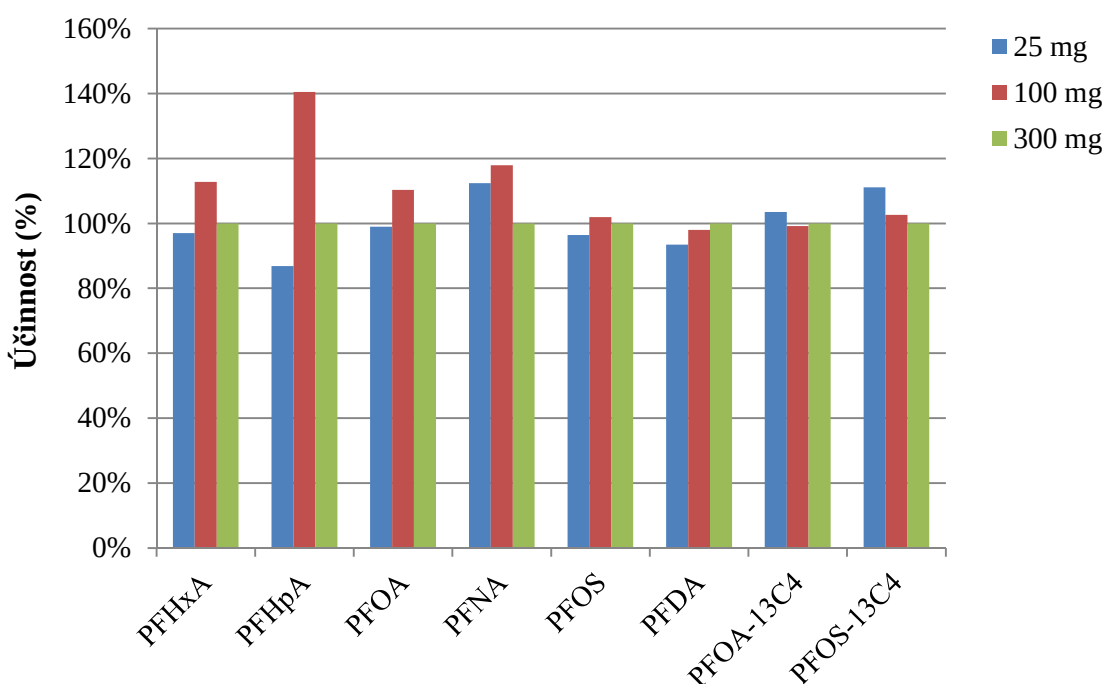
Po zhodnocení všech těchto výsledků byla vybrána sonifikace jako nejvhodnější extrakční metoda pro přípravu všech 21 vzorků kalů. Tato metoda poskytuje nejčistší extrakty, je dostatečně účinná, s nejmenším matricovým efektem a s nízkým pozadím.

4.1.2. Optimalizace čištění extraktu

4.1.2.1. Čištění aktivním uhlím

Součástí Powleyho metody je čištění extraktu metodou DSPE pomocí aktivního uhlí. Aktivním uhlím jsou v tomto případě z extraktu odstraněny především huminové látky. Experimentálně bylo zjišťováno optimální množství aktivního uhlí.

V grafu č. 5 jsou porovnány výsledky, při čemž množství 300 mg bylo vzato jako 100% hodnota a k ní byla vztažena množství 25 mg a 100 mg. Výsledky se významně neliší, ale pro většinu analytů byla nejvyšší účinnost pro množství 100 mg. S přihlédnutím k těmto výsledkům a k ekonomickým důvodům bylo množství 100 mg shledáno dostačující pro účinné přečištění vzorku.



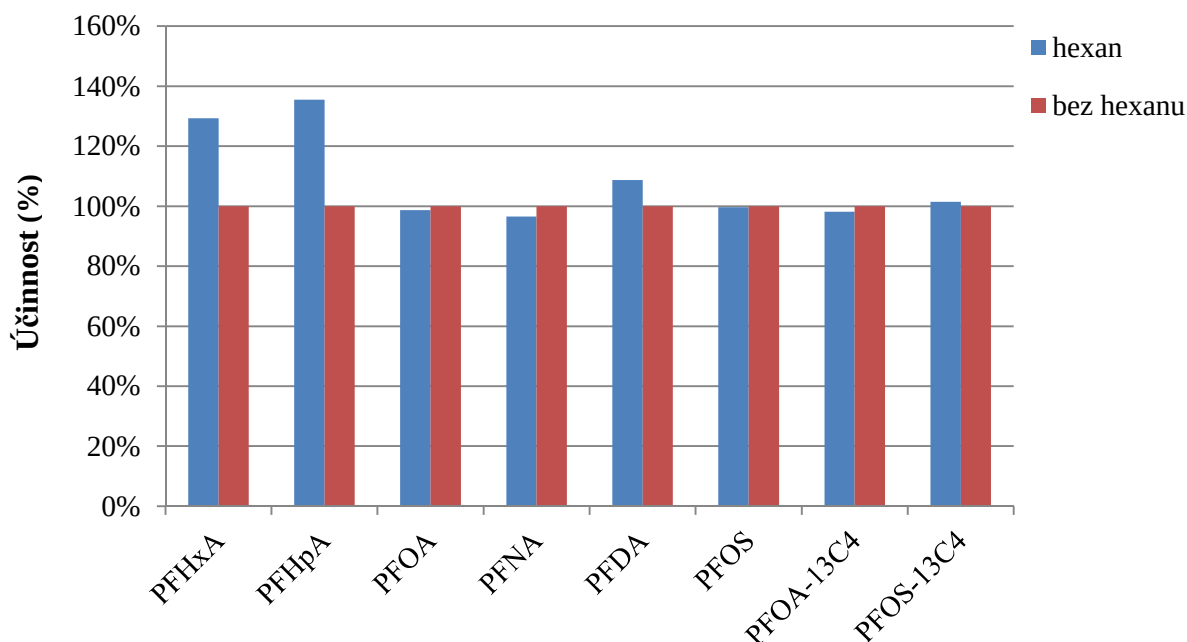
Graf č. 5 – Porovnání účinnosti čištění extraktu různými množstvími aktivního uhlí

4.1.2.2. Čištění extrakcí do hexanu

Čistírenské kaly mohou obsahovat proměnlivé množství olejů (např. minerálních). Odstranění této nepolární frakce je možné pomocí extrakce kapalina-kapalina do hexanu. Pro posouzení, zda je zařazení tohoto kroku nutné, bylo testováno 6 vzorků kalů. První série vzorků byla čištěna jen pomocí aktivního uhlí a druhá série měla zařazeno také čištění extrakcí do hexanu.

V grafu č. 6 je srovnání výsledků obou sérií vzorků. Výsledky první série byly brány jako 100% a k nim byly vztaženy výsledky druhé série. Z grafu je patrné, že s výjimkou PFHxA a PFHpA jsou výsledky obou sérií srovnatelné a zařazení hexanového čištění není nezbytně nutné. V případě PFHxA a PFHpA jsou výsledné průměrné hodnoty ovlivněny vzorky s nízkými koncentracemi těchto analytů (v okolí LOQ) a dané odchylky jsou pravděpodobně způsobeny variabilitou odezev v oblasti LOQ. Jelikož je extrakce prováděna do methanolu, který není vhodné činidlo pro extrakci frakce olejů, je předpokládáno, že obsah oleje v extraktu kalů je minimální a neovlivní významně koncové stanovení. A dále je nutné vzít v úvahu, že je extrahováno a analyzováno více analytů s odlišnými vlastnostmi a chováním, tudíž je nutné zvážit kompromisní postup vhodný pro všechny sledované PFAS.

Z těchto důvodů bylo rozhodnuto, že zařazení hexanového čištění není nezbytné, a aby nedocházelo ke zbytečné manipulaci se vzorkem a případným ztrátám, bude tento krok při přípravě reálných vzorků vynechán.

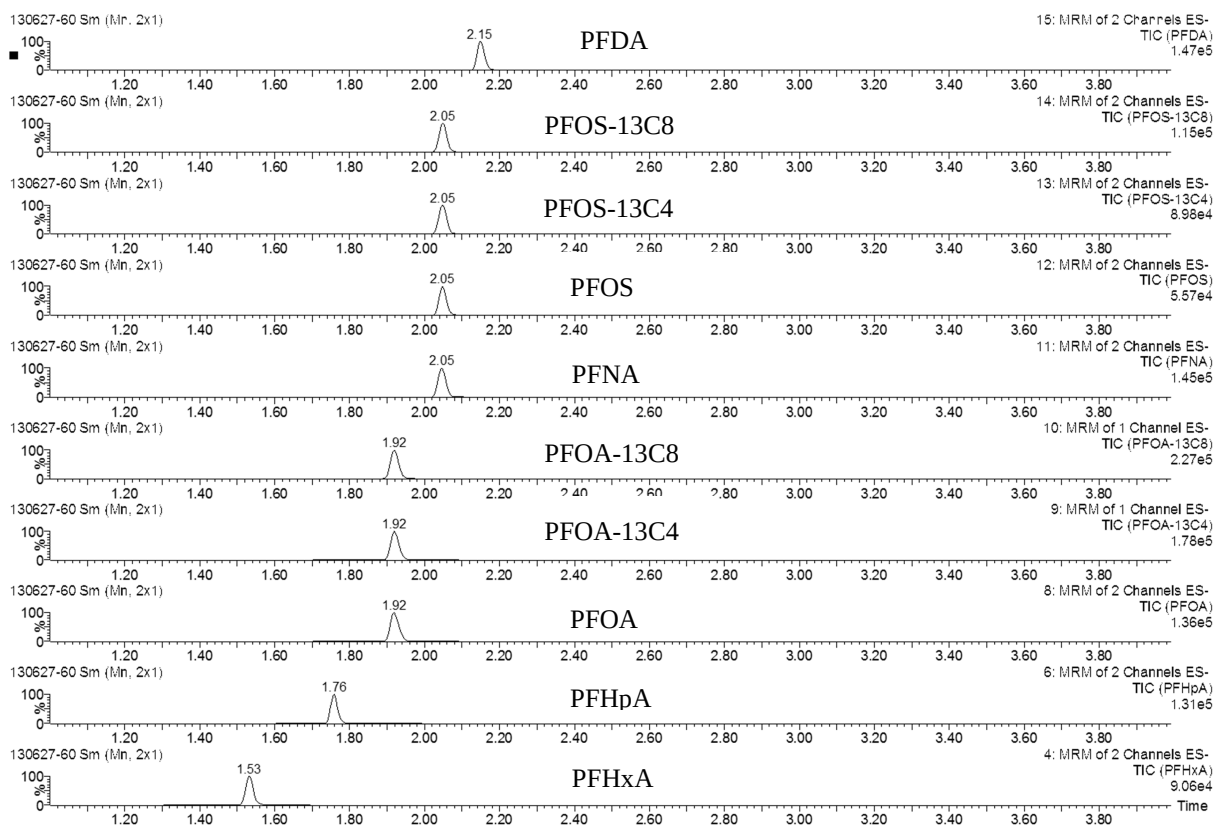


Graf č. 6 – Porovnání dvou sérií vzorků, první série se zařazeným hexanovým čištěním a druhá bez hexanového čištění

4.1.3. Analýza vzorků kalů pomocí UPLC-MS/MS

Optimalizovanou extrakční metodou bylo vyextrahováno 21 vzorků čistírenských kalů, které byly následně analyzovány pomocí UPLC-MS/MS. Ve vzorcích bylo sledováno 5 PFCA a PFOS. Na obrázku č. 34 jsou znázorněny chromatogramy sledovaných PFAS. Identifikace sloučenin byla provedena pomocí retenčních časů a poměrů produktových iontů.

Kvantifikace analytů byla provedena pomocí kalibračních standardů v rozsahu 0,1–50 ng.g⁻¹. Kalibrační křivka byla lineární s korelačním koeficientem > 0,99. Nejnižší kalibrační bod byl limit kvantifikace, tj. 0,1 ng.g⁻¹. Limit kvantifikace byl ověřen experimentálně z poměru signál k šumu, který musí být minimálně 10.



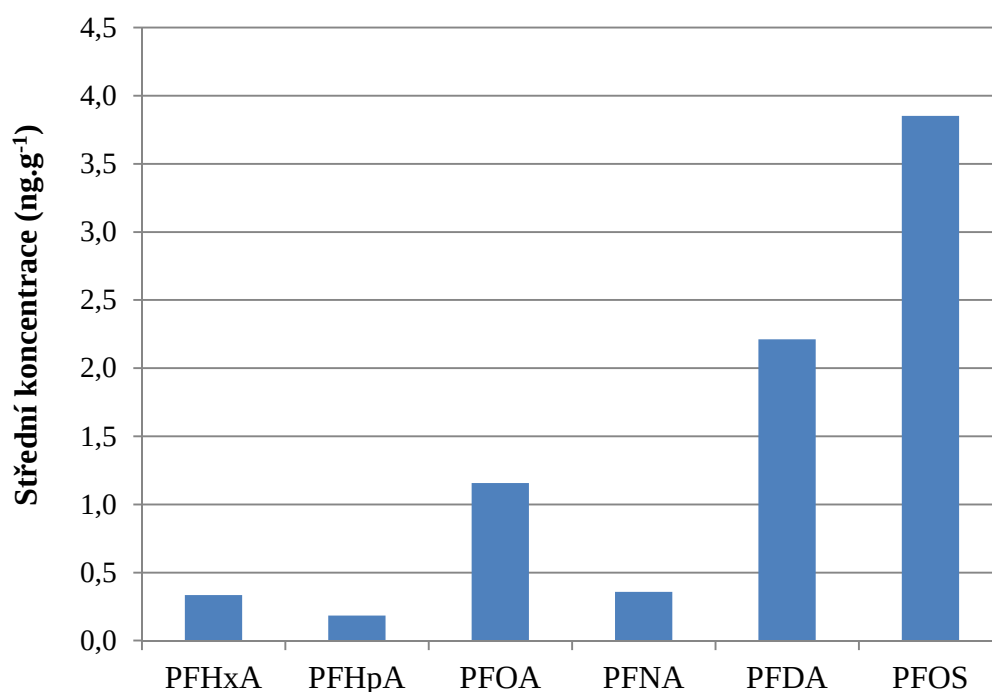
Obrázek č. 34 – Chromatogramy PFAS analyzovaných ve vzorcích kalů

Nejčastěji se vyskytujícím analytem ve vzorcích byl PFOS (viz Graf č. 7), což souhlasí s poznatky v odborné literatuře. PFOS byl přítomen ve všech testovaných vzorcích a jeho koncentrace se pohybovaly v rozmezí $0,74\text{--}38,02\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Z dostupné literatury byly zjištěny podobné výsledky, ve kterých byl PFOS nejčastěji detekovaným analytem a jeho koncentrace se pohybovaly v různých úrovních, od jednotek [32] až po tisíce $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ [27].

Druhý nejčastěji detekovaný analyt byla PFDA a hned za ní PFOA. Obě tyto kyseliny byly stejně jako PFOS stanoveny ve všech vzorcích kalů. Výsledné koncentrace všech sledovaných analytů v jednotlivých vzorcích jsou shrnuty v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7 – Celkové koncentrace PFAS v čistírenských kalech ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ sušiny)

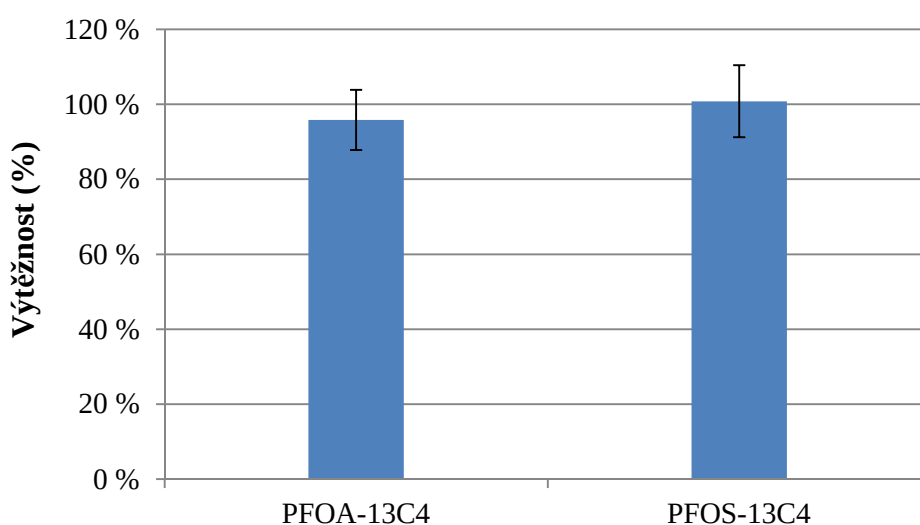
číslo vzorku	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFOS
1	0,33	<0,1	0,81	<0,1	1,27	3,31
2	0,47	<0,1	1,10	<0,1	1,59	2,60
3	0,60	<0,1	1,16	0,18	2,84	4,17
4	0,19	0,19	1,12	0,25	2,71	0,74
5	4,42	4,45	21,04	3,69	46,90	5,54
6	0,24	0,13	1,15	0,63	3,43	1,86
7	0,34	<0,1	1,17	<0,1	2,77	5,03
8	0,26	<0,1	1,49	0,25	2,02	1,57
9	0,36	<0,1	0,49	<0,1	1,28	3,51
10	0,24	<0,1	1,78	0,66	7,49	6,06
11	<0,1	<0,1	0,85	0,23	1,26	2,32
12	0,42	<0,1	1,54	0,31	3,39	3,44
13	0,53	<0,1	1,03	<0,1	2,02	2,17
14	<0,1	<0,1	2,20	0,89	3,76	3,85
15	1,84	0,14	1,17	<0,1	2,07	1,23
16	0,23	<0,1	1,18	<0,1	0,42	38,02
17	0,32	0,18	0,72	0,40	1,48	28,68
18	0,21	<0,1	0,78	0,18	1,50	11,90
19	0,22	0,22	2,27	1,22	8,34	5,81
20	0,39	0,18	0,85	<0,1	2,21	16,40
21	2,57	0,30	1,50	<0,1	5,01	11,88



Graf č. 7 – Střední koncentrace analytů ve vzorcích kalů

4.1.4. Pracovní charakteristiky metody UPLC-MS/MS

Ke korekci ztrát při přípravě vzorku a eliminaci vlivu matricových efektů byla využita metoda izotopového ředění a vnitřního standardu. Všechny vzorky byly před extrakcí obohaceny vnitřním standardem tak, aby výsledná koncentrace izotopově značených PFAS byla 6 ng.g^{-1} . Výtěžnosti vnitřních standardů byly vypočítány pomocí nástřikového standardu a v analyzovaných vzorcích kalů byly v rozsahu 79–122 %. Průměrné výtěžnosti a RSD vnitřních standardů pro opakovaná měření byly statisticky vyhodnoceny pomocí softwaru EffiValidation 3.0 a jsou znázorněny v grafu č. 8.



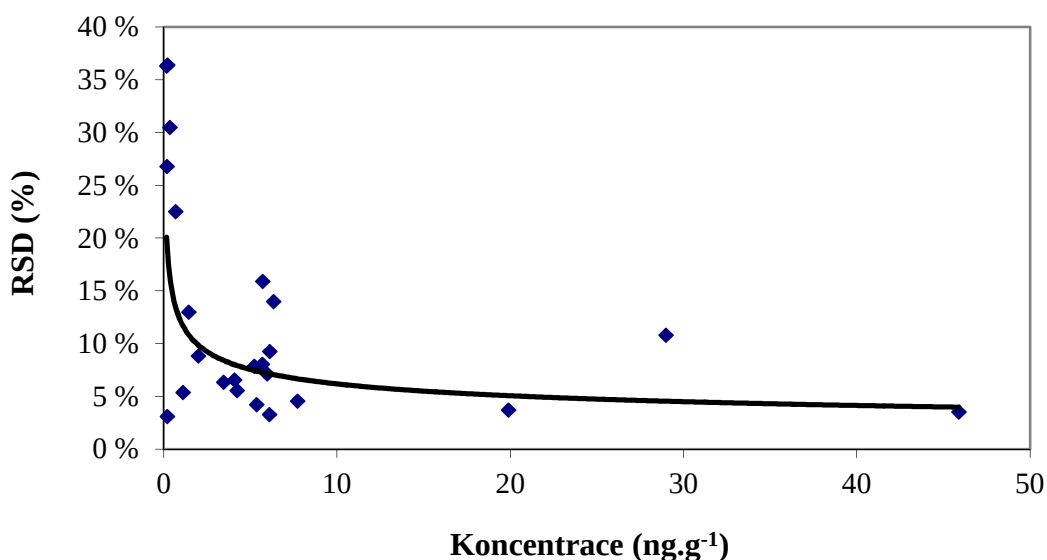
Graf č. 8 – Průměrné výtěžnosti a RSD vnitřních standardů

Byla vybrána sada vzorků s rozdílnými hladinami sledovaných analytů, na kterých byla testována opakovatelnost měření (4 opakování) za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti. U těchto opakovaných stanovení byla hodnocena RSD vnitřních standardů a nativních analytů. Pro statistické vyhodnocení byl použit software EffiValidation 3.0. Výsledky pro nativní analyty jsou zobrazeny v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8 – Výsledky statistického hodnocení opakovaných měření

číslo vzorku		PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFOS
5	ng.g ⁻¹	4,24	4,09	19,90	3,47	45,90	5,37
	RSD	5,6 %	6,6 %	3,7 %	6,4 %	3,5 %	4,2 %
17	ng.g ⁻¹	0,22	0,19	0,69	0,36	1,45	29,00
	RSD	36,4 %	26,8 %	22,5 %	30,5 %	13,0 %	10,8 %
19	ng.g ⁻¹	0,20	0,17	2,01	1,12	7,73	5,71
	RSD	3,1 %	36,3 %	8,8 %	5,4 %	4,6 %	15,9 %
metoda	RSD	19,9 %	24,5 %	14,1 %	18,3 %	8,2 %	11,4 %

RSD pro jednotlivé vzorky se pohybovaly v rozsahu 3,1–36,4 %. Vysoké hodnoty RSD byly stanoveny u analytů, jejichž koncentrace ve vzorku byly velmi nízké, v okolí LOQ. U těchto nízkých koncentrací je velká variabilita a i malé rozdíly v nálezech mají značný vliv na výslednou RSD. Celková RSD metody pro jednotlivé analyty se pohybuje v rozsahu 8,2–24,5 %. V grafu č. 9 lze pozorovat trend, že s rostoucí koncentrací analytu ve vzorku klesá RSD jeho stanovení.



Graf č. 9 – Trend poklesu RSD s rostoucí koncentrací analytu ve vzorku

4.2. Stanovení PFAS v krmivech

4.2.1. Testování metod přípravy

Na vybraných vzorcích krmiv byly testovány tři odlišné metody přípravy vzorku, tj. Powleyho metoda, QuEChERS a rychlá methanolová extrakce. Aby bylo možné posoudit účinnost těchto metod, byly vzorky obohaceny nativními PFAS tak, aby jejich koncentrace ve vzorku byla vždy 1 ng.g^{-1} . Vybrané vzorky byly extrahovány ve třech opakováních, ze kterých byla vypočítána výtěžnost a relativní směrodatná odchylka metody. Výsledky experimentu jsou znázorněny v tabulce č. 9.

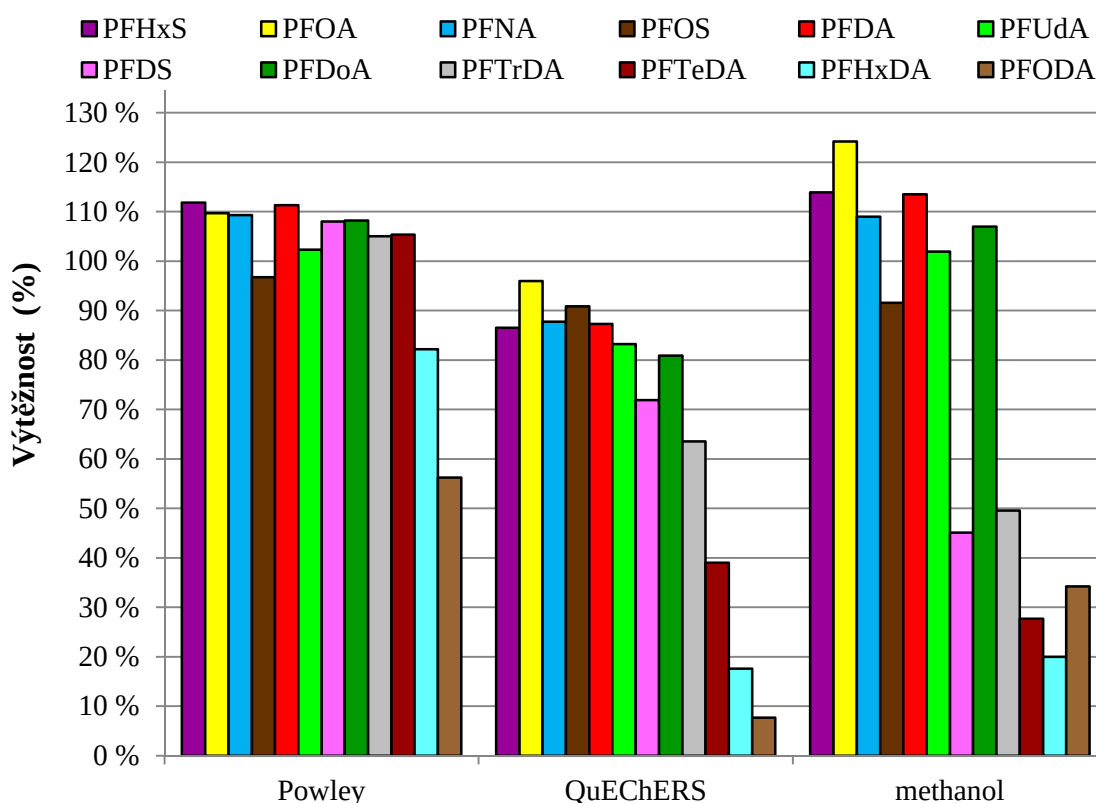
Tabulka č. 9 – Výtěžnosti a RSD nativních PFAS (%) pro různé metody přípravy vzorku, tj. Powley (žlutý), QuEChERS (zelený) a rychlá methanolová extrakce (modrý)

	výtěž./ RSD (%)	PFHxS	PFOA	PFNA	PFOS	PFDA	PFUdA	PFDS	PFDoA	PFTrDA	PFTeDA	PFHxDA	PFODA
KK_DZ_7	1	107,7	110,0	102,9	80,5	100,1	94,8	110,0	109,4	99,7	98,3	92,3	76,1
	2	107,5	104,7	97,7	96,3	107,6	89,4	84,2	101,6	103,2	105,3	90,2	81,2
	3	109,4	105,8	91,7	103,4	93,7	104,3	108,8	89,8	99,4	96,0	87,9	71,6
	prům.	108	107	97	93	100	96	101	100	101	100	90	76
	RSD	0,9	2,6	5,8	12,6	6,9	7,9	14,4	9,8	2,1	4,9	2,5	6,3
DK_DZ_4	1	107,7	107,3	123,4	99,7	125,2	101,5	106,6	113,2	108,9	110,3	69,5	42,2
	2	123,1	110,3	131,3	95,5	109,6	117,4	131,9	138,1	116,2	110,1	83,7	38,7
	3	120,9	121,2	121,9	84,0	127,1	117,0	114,4	107,8	106,3	101,4	73,7	41,4
	prům.	117	113	126	93	121	112	118	120	110	107	76	41
	RSD	7,1	6,5	4,0	8,7	7,9	8,1	11,0	13,5	4,6	4,8	9,6	4,5
KK_HZ_9	1	113,0	103,4	104,8	92,5	114,9	98,2	92,6	102,7	97,4	111,3	73,9	49,9
	2	101,1	100,3	102,5	110,3	110,0	94,4	113,0	105,2	112,6	110,4	84,8	56,5
	3	116,7	124,4	108,0	109,0	113,7	104,4	110,8	106,5	102,2	105,5	83,7	48,9
	prům.	110	109	105	104	113	99	105	105	104	109	81	52
	RSD	7,4	12,0	2,7	9,6	2,3	5,1	10,6	1,9	7,5	2,9	7,4	8,0
KK_DZ_7	1	85,2	114,9	107,5	93,6	74,4	90,3	108,7	75,5	72,8	41,7	30,3	12,8
	2	86,3	107,5	94,5	99,7	83,7	85,1	92,1	73,1	64,4	42,0	25,9	9,6
	3	91,2	94,7	91,9	86,3	87,6	75,3	90,9	74,5	68,0	41,7	23,4	11,8
	prům.	88	106	98	93	82	84	97	74	68	42	27	11
	RSD	3,7	9,7	8,5	7,2	8,3	9,1	10,2	1,6	6,2	0,3	13,3	14,4
DK_DZ_4		72,6	91,3	79,0	80,8	86,9	84,0	66,8	81,4	66,3	36,2	6,9	4,5
		78,4	91,2	71,3	71,8	83,1	77,2	53,5	79,1	63,9	39,8	7,1	4,5
		67,6	90,0	75,9	79,4	84,0	78,4	58,2	73,3	63,2	37,7	6,3	4,4
	prům.	73	91	75	77	85	80	59	78	64	38	7	4
	RSD	7,4	0,8	5,1	6,2	2,3	4,5	11,3	5,4	2,5	4,7	5,9	1,3
KK_HZ_9	1	101,4	85,4	80,4	114,6	97,5	90,1	60,3	81,8	62,2	37,5	18,5	8,0
	2	99,9	93,1	89,6	100,2	91,1	83,6	61,8	89,2	55,7	36,8	21,4	7,0
	3	96,4	96,0	100,2	91,5	97,4	85,4	55,0	100,4	55,5	38,2	18,4	7,1
	prům.	99	91	90	102	95	86	59	90	58	37	19	7
	RSD	2,6	6,0	11,0	11,4	3,9	3,9	6,1	10,3	6,6	1,8	8,6	7,5
KK_DZ_7	1	95,3	116,3	85,4	77,5	126,1	107,7	39,3	87,9	34,0	3,9	0,1	5,0
	2	104,1	120,3	100,9	52,4	103,2	86,1	28,6	102,9	42,5	4,3	0,1	4,8
	3	117,1	128,2	108,9	65,4	90,4	115,6	29,8	117,8	36,1	3,9	0,3	4,7
	prům.	105	122	98	65	107	103	33	103	38	4	0,1	5
	RSD	10,4	5,0	12,1	19,3	17,0	14,8	18,0	14,5	11,8	5,4	108,3	3,3
DK_DZ_4	1	131,9	120,9	116,2	90,5	103,9	100,0	45,1	97,4	83,7	65,7	67,4	86,0
	2	117,9	131,7	124,5	96,4	124,9	97,0	33,8	104,5	72,3	61,3	53,5	99,9
	3	112,5	133,7	106,8	126,4	125,1	95,8	32,1	84,4	63,0	69,2	58,3	94,0
	prům.	121	129	116	104	118	98	37	95	73	65	60	93
	RSD	8,3	5,5	7,7	18,4	10,3	2,2	19,0	10,7	14,2	6,0	11,8	7,5
KK_HZ_9	1	128,0	117,7	108,3	124,1	124,6	99,4	69,7	118,3	37,6	12,1	0,0	4,5
	2	99,5	125,5	126,3	97,0	119,9	112,9	58,7	132,4	41,5	16,1	0,0	4,8
	3	119,4	123,8	104,0	94,6	103,9	103,4	69,2	117,4	35,6	13,0	0,0	4,7
	prům.	116	122	113	105	116	105	66	123	38	14	0	5
	RSD	12,6	3,3	10,5	15,6	9,4	6,6	9,5	6,8	7,9	15,4	0,0	2,8

Z výsledků lze vidět, že metoda QuEChERS poskytovala průměrně nejnížší výtěžnosti nativních analytů. Především v případě analytů PFTeDA, PFHxDA a PFODA jsou výtěžnosti velmi nízké (< 40 %). Může to být způsobeno nedostatečným přestupem analytů do acetonitrilové fáze.

V případě metody rychlé methanolové extrakce byly průměrné výtěžnosti značně odlišné, bez viditelného trendu. V případě analytu PFOA byla výtěžnost vysoká, pohybovala se nad 120 % a u analytů PFDS, PFTTrDA, PFTeDA, PFHxDA a PFODA naopak nízké, pod 50 %.

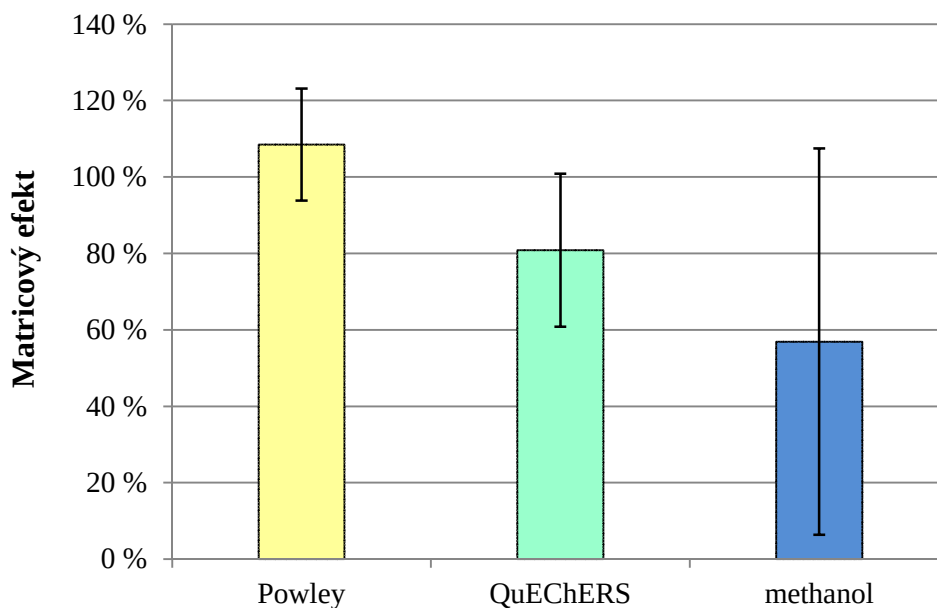
Powleyho metoda vykazovala poměrně konstantní výtěžnosti nativních PFAS v okolí hodnoty 100 %. Výjimku tvořily analyty PFHxDA (průměrně 82 %) a PFODA s průměrnou výtěžností 56 %. Vzhledem k nízké výtěžnosti PFODA bude v případě nálezu ve vzorku nutné provést korekci obsahu na výtěžnost. Ale i přesto je Powleyho metoda v souladu s rozhodnutím komise 2002/657/ES, ve kterém je na hladině 1 ng.g⁻¹ povolena výtěžnost 50–120 %. Pro lepší přehlednost jsou průměrné výtěžnosti pro všechny tři metody zobrazeny v grafu č. 10.



Graf č. 10 – Průměrné výtěžnosti nativních PFAS pro jednotlivé analyty

Dále byl pro testované metody přípravy vzorku posouzen matricový efekt. Průměrný matricový efekt je znázorněn v grafu č. 11. Z grafu můžeme vidět, že rychlá methanolová extrakce vykazuje největší matricový efekt v podobě potlačení signálu. To je patrně způsobeno tím, že methanol je silnější extrakční činidlo než acetonitril, proto může docházet k extrakci většího množství polárních koextraktů, které mají vliv na signál analytu.

Powleyho metoda vykazuje nejmenší matricový efekt.

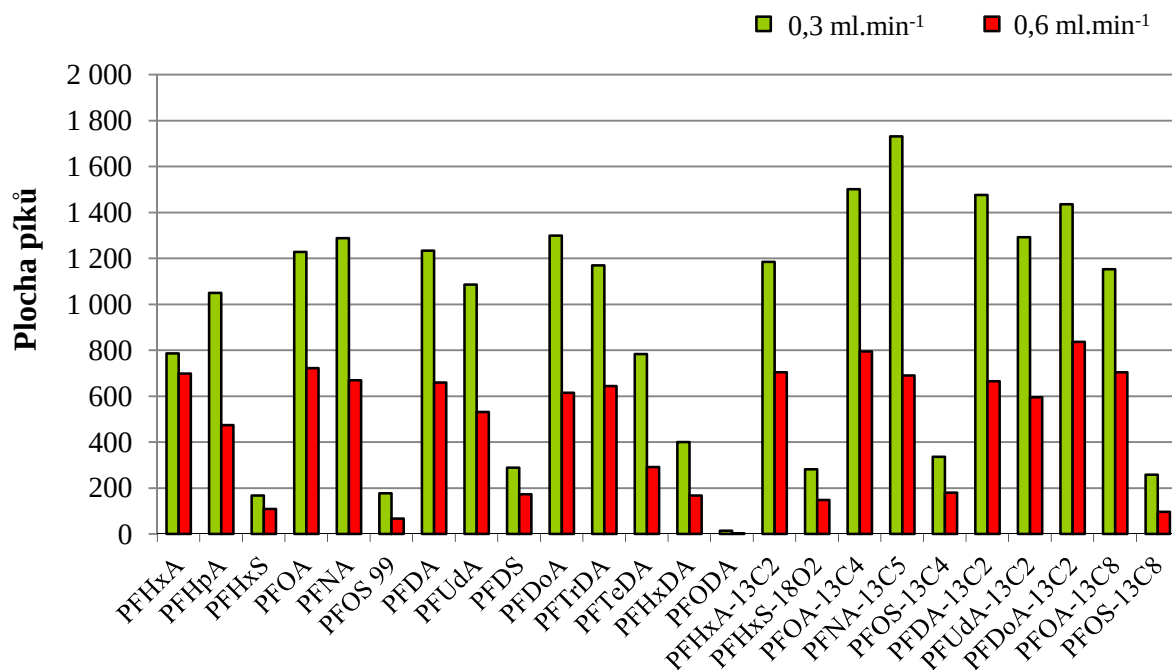


Graf č. 11 – Matricový efekt pro jednotlivé metody přípravy vzorku

Pro přípravu 30 vzorků krmiv byla vybrána Powleyho metoda. Důvody pro zvolení této metody jsou výsledky porovnání výtěžností nativních PFAS, které ukazují, že tato metoda je dostatečně účinná. Dále metoda vykazuje nejnižší matricové efekty, což potvrzuje fakt, že tato metoda poskytuje nejčistší extrakty.

4.2.2. Optimalizace UPLC-MS/MS metody

Při optimalizaci stanovení PFAS ve vzorcích krmiv bylo na kalibračních roztocích provedeno porovnání dvou průtokových rychlostí mobilní fáze. Rychlost $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ poskytovala kratší dobu analýzy, ale snížením průtokové rychlosti na $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ bylo dosaženo přibližně dvojnásobného zvýšení odezvy detektoru pro sledované analyty, což vedlo ke snížení limitů detekce a kvantifikace. Proto byla tato rychlost zvolena pro analýzu PFAS ve vzorcích krmiv. Plochy píků pro obě průtokové rychlosti jsou porovnány v grafu č. 12.

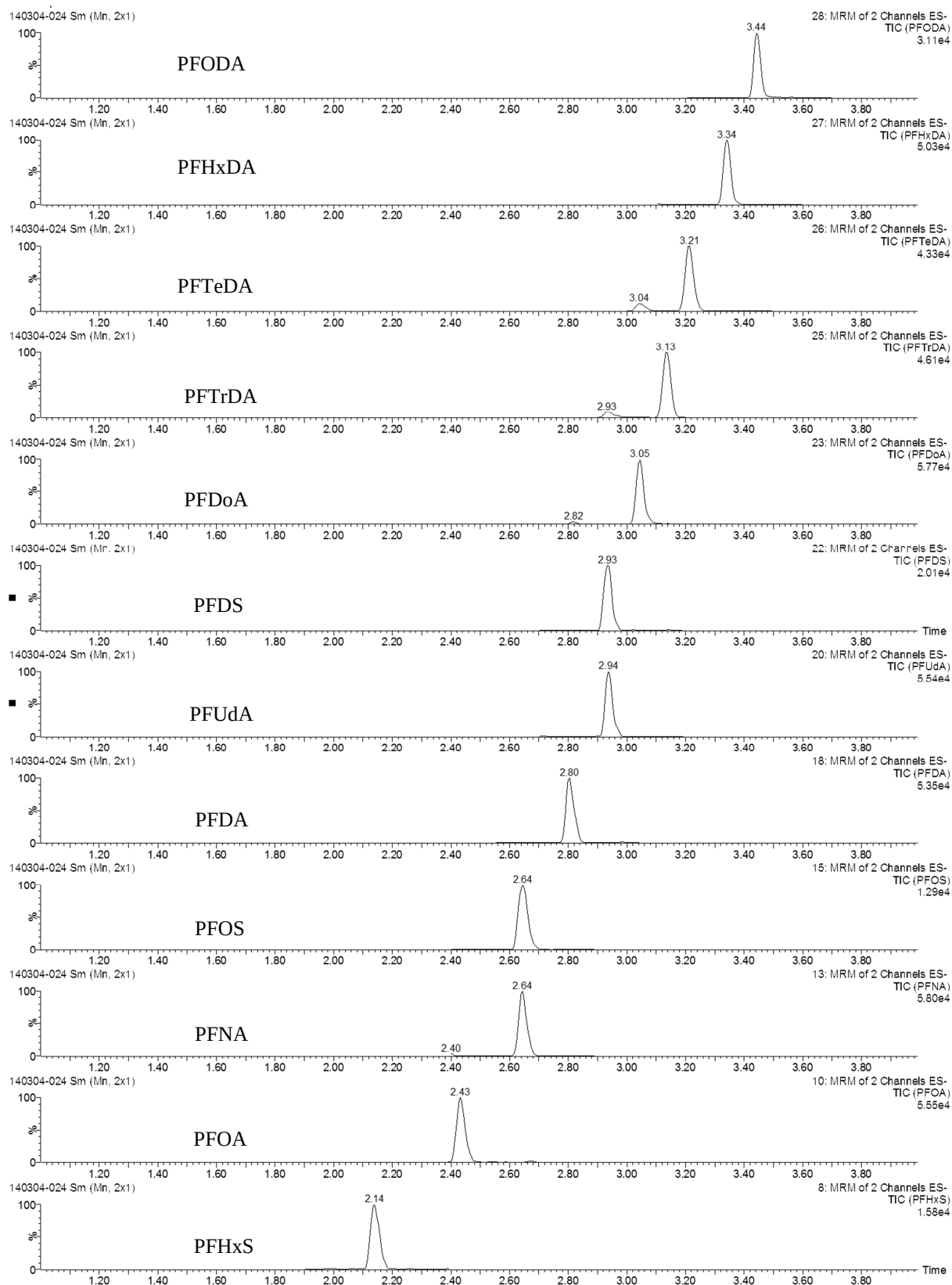


Graf č. 12 – Porovnání vlivu průtokové rychlosti na plochu píku

4.2.3. Analýza vzorků krmiv pomocí UPLC-MS/MS

Analýza vybraných PFAS byla provedena u 30 vzorků krmiv. Z těchto vzorků bylo 12 kompletních krmiv pro hospodářská zvířata (KK_HZ), 10 kompletních krmiv pro domácí zvířata (KK_DZ), 4 doplňková krmiva pro domácí zvířata (DK_DZ) a 4 krmné suroviny rybí moučky (KS_RM).

Ve vzorcích bylo sledováno 9 zástupců PFCA s délkou řetězce C8 až C18 a 3 zástupci PFSA. Chromatogramy sledovaných PFAS jsou znázorněny na obrázku č. 35. Identifikace sloučenin byla provedena pomocí retenčních časů a poměrů produktových iontů. Kvantifikace analytů byla provedena pomocí kalibračních standardů v rozsahu 0,1–40 ng.g⁻¹. Kalibrační křivka byla lineární s korelačním koeficientem > 0,99.

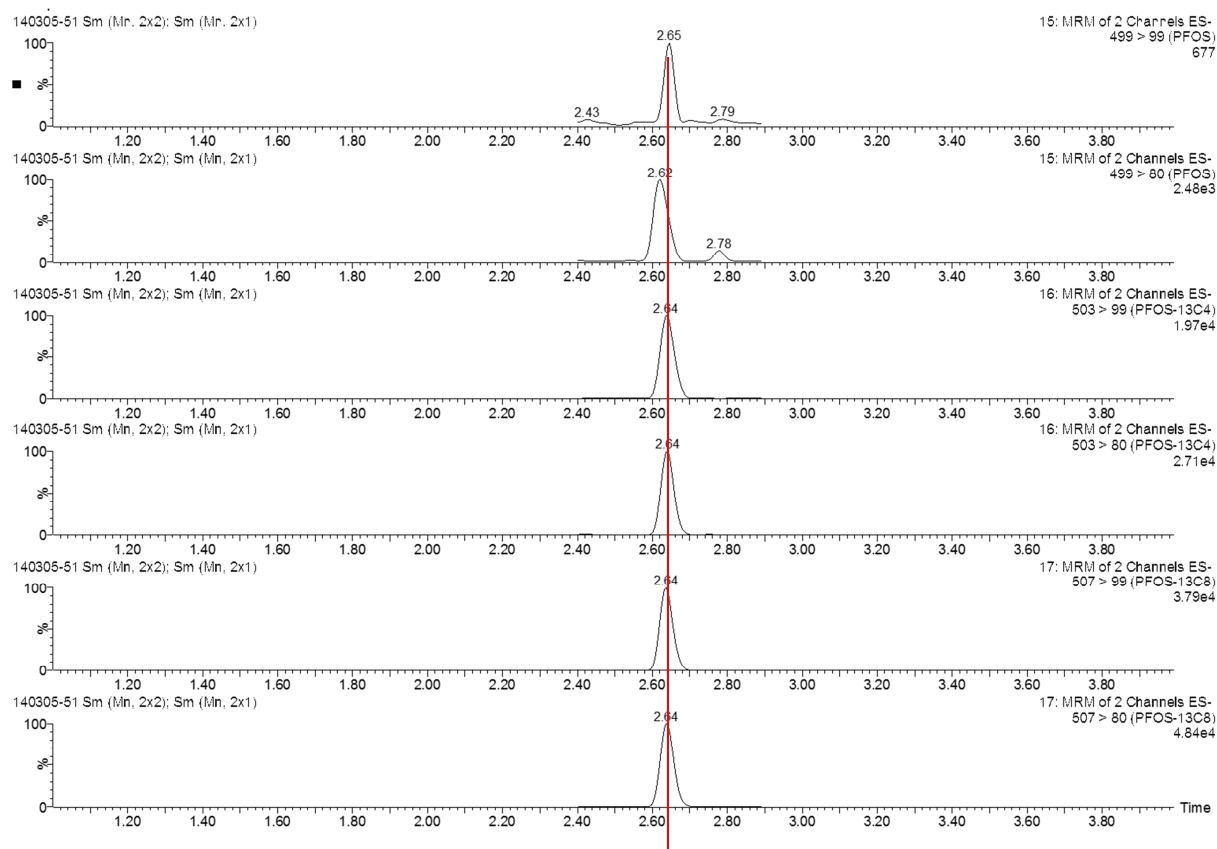


Obrázek č. 35 – Chromatogramy PFAS analyzovaných ve vzorcích krmiv

Kvantifikace PFOS v krmivech byla provedena na přechodu 499 → 99, který je pro PFOS specifický. V biotických vzorcích se totiž PFOS na chromatografických fázích C18 koeluuje s interferentem taurodeoxycholátem (žlučová kyselina) [54]. Zároveň tento interferent poskytuje odezvu na přechodu PFOS 499 → 80, což vede k deformaci chromatografického píku PFOS a nadhodnocení jeho obsahu v biotických vzorcích (viz Obrázek č. 36). Proto byla kvantifikace PFOS v krmivech provedena na přechodu 499 → 99, který taurodeoxycholát neposkytuje. V tabulce č. 10 jsou na příkladech vzorků porovnány obsahy PFOS kalkulované pomocí obou přechodů.

Tabulka č. 10 – Porovnání obsahu PFOS ve vybraných vzorcích krmiv s nálezy (ng.g^{-1})

	KK_HZ_9	KK_HZ_12	DK_DZ_4	KS_RM_1	KS_RM_2	KS_RM_3	KS_RM_4
499 → 99	0,041	<0,03	0,043	0,722	2,768	0,891	0,100
499 → 80	0,122	0,146	0,238	3,297	5,759	3,111	0,654



Obrázek č. 36 – Znázornění retenčního posunu chromatografického píku PFOS v důsledku koeluce s taurodeoxycholátem

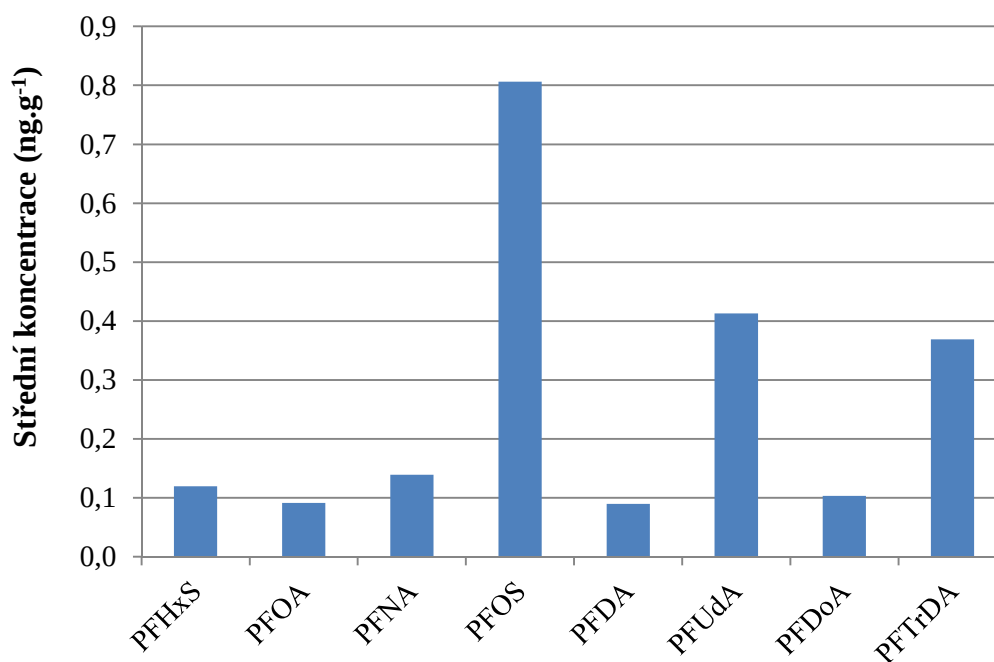
Výsledné koncentrace PFAS ve vzorcích krmiv jsou shrnuty v tabulce č. 11. Z výsledků lze vidět, že ve vzorcích kompletních a doplňkových krmiv nejsou PFAS skoro vůbec přítomny. V několika vzorcích byl nalezen PFOS v nízkých koncentracích, ale většina analytů (až na pár výjimek) nebyla vůbec detekována nebo byly pod limitem kvantifikace, což naznačuje, že tyto vybrané komodity jsou perfluoroalkylovými sloučeninami kontaminovány minimálně anebo vůbec ne.

Tabulka č. 11 – Celkové koncentrace PFAS ve vzorcích krmiv (ng.g^{-1} původní hmoty)

	č. vz.	PFHxS	PFOA	PFNA	PFOS	PFDA	PFUdA	PFDS	PFDoA	PFTTrDA	PFTeDA	PFHxDA	PFODA
KK_HZ	1	n.d.	<0,07	<0,05	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	n.d.	0,077	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	3	n.d.	<0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	4	n.d.	<0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	<0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.
	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,08
	7	n.d.	<0,07	n.d.	0,135	n.d.	<0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	8	n.d.	<0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	9	n.d.	<0,07	n.d.	0,041	n.d.	n.d.	<0,04	<0,04	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	10	n.d.	<0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,08
	11	n.d.	n.d.	<0,05	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	12	n.d.	n.d.	n.d.	<0,03	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.
KK_DZ	1	n.d.	0,130	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	2	n.d.	<0,07	n.d.	<0,03	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	3	n.d.	<0,07	<0,05	<0,03	<0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,08
	4	n.d.	<0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,08
	5	n.d.	<0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,08
	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,08
	10	n.d.	<0,07	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.
DK_DZ	1	<0,04	0,093	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
	2	n.d.	<0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	n.d.	<0,08
	3	n.d.	<0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0,08
	4	n.d.	<0,07	n.d.	0,043	n.d.	n.d.	n.d.	<0,04	n.d.	n.d.	<0,04	<0,08
KS_RM	1	n.d.	0,093	0,072	0,722	n.d.	0,202	n.d.	<0,04	0,281	n.d.	n.d.	n.d.
	2	<0,04	0,082	0,169	2,768	0,090	0,586	n.d.	0,165	0,623	n.d.	<0,04	n.d.
	3	0,120	0,092	0,139	0,891	n.d.	0,426	n.d.	0,065	0,331	n.d.	<0,04	n.d.
	4	n.d.	n.d.	n.d.	0,100	n.d.	0,401	n.d.	0,103	0,407	n.d.	<0,04	<0,08

Pouze ve vzorcích rybích mouček byly určité nálezy, což souhlasí s poznatky z literatury [22]. Nejčastěji v nich byl detekován PFOS (v rozsahu 0,100–2,768 ng.g^{-1}), dále PFUdA a PFTTrDA. Tyto tři zmíněné analyty bylo přítomny ve všech testovaných vzorcích rybích mouček. Podobných poznatků bylo dosaženo ve studii [22], kde byl PFOS také nejvíce zastoupeným analytem v rybích moučkách, a také zde zaznamenali přítomnost PFUnA a PFTTrDA. Střední koncentrace všech PFAS v testovaných vzorcích rybích mouček jsou znázorněny v grafu č. 13.

Vzhledem k tomu, že o stanovení PFAS v krmivech je velmi málo dostupné literatury, nelze tyto výsledky porovnat s dalšími autory.



Graf č. 13 – Střední koncentrace PFAS ve vzorcích rybí moučky

4.2.4. Pracovní charakteristiky metody UPLC-MS/MS

Limity kvantifikace a limity detekce pro jednotlivé analyty byly stanoveny z poměru S/N z roztoků standardů v čistém rozpouštědle. LOQ byly v rozsahu 0,03–0,08 ng.g⁻¹ a LOD 0,01–0,02 ng.g⁻¹. LOD a LOQ pro jednotlivé analyty jsou znázorněny v tabulce č. 12.

Tabulka č. 12 – LOD a LOQ pro jednotlivé analyty (ng.g⁻¹)

	PFHxS	PFOA	PFNA	PFOS	PFDA	PFUdA	PFDS	PFDoA	PFTTrDA	PFTeDA	PFHxDA	PFODA
LOD	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02
LOQ	0,04	0,07	0,05	0,03	0,04	0,05	0,04	0,04	0,06	0,05	0,04	0,08

Ke korekci ztrát při přípravě vzorku a eliminaci vlivu matricových efektů byla použita metoda izotopového ředění a vnitřního standardu. Vzorky byly před extrakcí obohaceny vnitřním standardem tak, aby výsledná koncentrace izotopově značených PFAS byla 6 ng.g⁻¹. Výtěžnosti vnitřních standardů byly vypočítány pomocí nástřikového standardu (koncentrace opět 6 ng.g⁻¹). Pro všechny analyzované vzorky krmiv byly zjištěny výtěžnosti a relativní směrodatné odchylky. Průměrné výtěžnosti jednotlivých izotopově značených PFAS pro danou skupinu krmiv jsou znázorněny v tabulce č. 13.

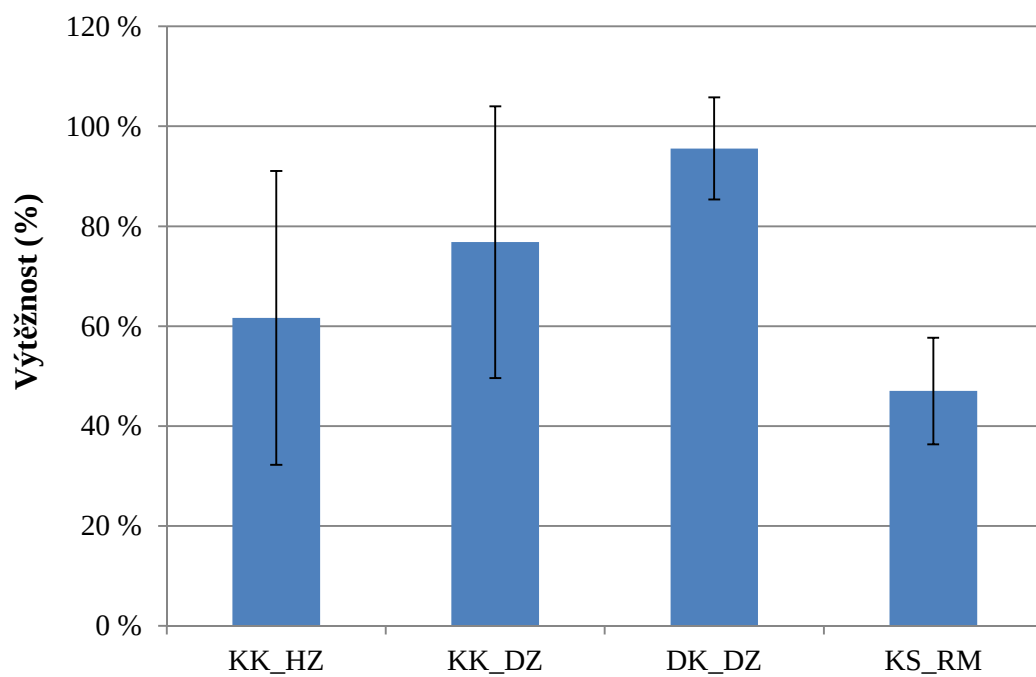
Tabulka č. 13 – Průměrné výtěžnosti a RSD izotopově značených PFAS

		PFHxS-18O2	PFOA-13C4	PFNA-13C5	PFOS-13C4	PFDA-13C2	PFUdA-13C2	PFDoA-13C2
KK_HZ	prům. výtěžnost	59 %	55 %	52 %	65 %	63 %	69 %	69 %
	RSD	30,0 %	32,1 %	32,4 %	26,6 %	30,6 %	30,2 %	23,9 %
KK_DZ	prům. výtěžnost	81 %	72 %	66 %	85 %	78 %	80 %	76 %
	RSD	32,6 %	27,1 %	28,4 %	28,0 %	25,4 %	25,6 %	23,4 %
DK_DZ	prům. výtěžnost	97 %	90 %	84 %	101 %	97 %	101 %	98 %
	RSD	11,5 %	11,6 %	10,8 %	5,5 %	9,1 %	12,8 %	10,2 %
KS_RM	prům. výtěžnost	48 %	39 %	37 %	57 %	49 %	48 %	51 %
	RSD	20,3 %	15,9 %	6,1 %	4,1 %	10,1 %	10,9 %	7,2 %

Výtěžnosti vnitřních standardů se pohybovaly v širokém rozsahu 37–101 % a RSD v rozsahu 4,1–32,6 %. Vzorky krmiv pro domácí zvířata vykazovaly průměrnou výtěžnost nad 70 %, což je v souladu s rozhodnutím komise 2002/657/ES. Vzorky kompletních krmiv pro domácí zvířata měly průměrnou výtěžnost 77 % a RSD 27,2 % a vzorky doplňkových krmiv výtěžnost 96 % a RSD 10,2 %.

Vzorky krmiv pro hospodářská zvířata měly výtěžnost o něco nižší, průměrně 62 %. Tyto vzorky vykazovaly nejvyšší hodnoty RSD. To může být způsobeno variabilitou vzorků, jelikož v této skupině jsou zástupci krmiv pro různé druhy hospodářských zvířat (např. prasata, skot, kuřata, husy), tudíž jsou zde zastoupeny odlišné matrice a tato různorodost může mít za následek rozdíly ve výtěžnosti vnitřních standardů.

Nejnižší výtěžnost byla pozorována u vzorků rybích mouček, kde byla průměrná hodnota 47 %. Tato nízká hodnota výtěžnosti vnitřních standardů nemá zřejmé odůvodnění. Může docházet ke zvýšeným ztrátám standardů při jednotlivých krocích extrakce a čištění z důvodu značné manipulace se vzorkem, ale v tomto případě by se dalo předpokládat, že se podobně významné ztráty projeví také u ostatních typů krmiv. Výtěžnosti vnitřních standardů v rybích moučkách jsou také srovnatelné, průměrné RSD je 10,7 %, což naznačuje spíše konstantní ztráty související s typem matrice. Pravděpodobně může docházet k pevnějšímu navázání vnitřních standardů na živočišné proteiny přítomné v matrici a tím k jejich ztrátám při odstranění matrice. Problematika rybích mouček bude předmětem dalšího studia.



Graf č. 14 – Průměrné výtěžnosti vnitřních standardů pro jednotlivé skupiny krmiv

5. ZÁVĚR

Perfluoroalkylové sloučeniny jsou syntetické amfifilní látky. Pro své užitečné vlastnosti jsou hojně používány v průmyslu a spotřebním zboží, kde jsou využívány především jako povrchově aktivní látky. Díky jejich výrobě a používání jsou tyto látky dnes všudypřítomné, nacházejí se ve všech složkách životního prostředí včetně zvířat a lidské populace.

Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny látek jsou PFOS a PFOA. Obě tyto látky jsou perzistentní v životním prostředí, bioakumulativní v potravním řetězci a vykazují rozličné toxické efekty. V organismu se vážou na proteinovou složku a akumulují se především v krvi a játrech. PFOS je v současné době zapsán mezi perzistentní organické polutanty Stockholmské úmluvy.

Cílem této diplomové práce bylo stanovit vybrané PFAS ve vzorcích čistírenských kalů a krmiv. Za tímto účelem bylo testováno několik metod přípravy vzorku.

V případě čistírenských kalů bylo zjištěno, že nejvhodnější extrakční technikou je Powleyho metoda s extrakcí do methanolu, která poskytuje nejčistší extrakty, je dostatečně účinná, s nejmenším matricovým efektem a minimálním pozadím. Pro čištění vzorku byla zvolena metoda DSPE pomocí 100 mg aktivního uhlí. Optimalizovanou extrakční metodou bylo připraveno 21 extraktů vzorků kalů, které byly analyzovány metodou UPLC-MS/MS. Bylo zjištěno, že nejčastěji se vyskytujícím analytem ve vzorcích kalů je PFOS, který byl přítomen ve všech vzorcích v koncentracích 0,74–38,02 ng.g⁻¹. Dalšími často detekovanými analyty byla PFDA a PFOA. Limit kvantifikace byl 0,1 ng.g⁻¹. Výtěžnost vnitřních standardů se pohybovala v rozmezí 79–122 % a RSD metody se pohybovala v rozsahu 8,2–24,5 %.

V případě vzorků krmiv byly testovány tři metody přípravy vzorku. Bylo zjištěno, že vhodnou metodou je Powleyho metoda s extrakcí do acetonitrilu, která vykazovala nejčistší extrakty, nejvyšší výtěžnost nativních PFAS a nejnižší matricové efekty. Touto metodou bylo připraveno 30 extraktů vzorků krmiv. Nejčastěji byl opět detekován PFOS, který byl v nízkých koncentracích přítomen v 7 vzorcích. Ostatní analyty byly ve většině případů pod LOQ nebo nebyly detekovány vůbec. Určitou výjimku tvořily 4 vzorky rybích mouček, ve kterých bylo detekováno více analytů, nejčastěji byl detekován PFOS (v rozsahu 0,100–2,768 ng.g⁻¹) a dále PFUdA, PFTrDA a PFNA. Limity detekce a limity kvantifikace byly stanoveny z poměru S/N. LOD byly v rozsahu 0,01–0,02 ng.g⁻¹ a LOQ 0,03–0,08 ng.g⁻¹. Výtěžnosti vnitřních standardů se pohybovaly v širokém rozsahu 37–101 % a RSD v rozsahu 4,1–32,6 %. Nízké výtěžnosti byly získány u vzorků rybích mouček, kde pravděpodobně dochází k navázání sledovaných sloučenin na živočišné proteiny přítomné v matrici.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VOOGT, P a M. SAEZ. Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2006, vol. 25, issue 4. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2005.10.008>.
- [2] LINDSTROM, Andrew B., Mark J. STRYNAR a E. Laurence LIBELO. Polyfluorinated Compounds: Past, Present, and Future. *Environmental Science*. 2011, vol. 45, issue 19, s. 7954-7961. DOI: 10.1021/es2011622. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/es2011622>.
- [3] Projekt Voda Živá. Výskyt perfluorovaných a bromovaných sloučenin ve vzorcích ryb a sedimentů z vybraných lokalit České republiky. VŠCHT v Praze, 2011.
- [4] 3M. The Science of Organic Fluorochemistry. 1999, 12 s.
- [5] BUCK, Robert C, James FRANKLIN, Urs BERGER, Jason M CONDER, Ian T COUSINS, Pim DE VOOGT, Allan Astrup JENSEN, Kurunthachalam KANNAN, Scott A MABURY a Stefan PJ VAN LEEUWEN. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2011, vol. 7, issue 4, s. 513-541. DOI: 10.1002/ieam.258. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ieam.258>.
- [6] HEKSTER, Floris M., Remi W.P.N. LAANE a Pim DE VOOGT. Environmental and Toxicity Effects of Perfluoroalkylated Substances. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology*. USA: Springer, 2003, s. 99-121. ISSN 0179-5953.
- [7] ZABALETA, Itsaso, Ekhiñe BIZKARGUENAGA, Arantza IPARRAGIRRE, Patricia NAVARRO, Ailette PRIETO, Luis Ángel FERNÁNDEZ a Olatz ZULOAGA. Focused ultrasound solid-liquid extraction for the determination of perfluorinated compounds in fish, vegetables and amended soil. *Journal of Chromatography A*. 2014, vol. 1331, s. 27-37. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.025>.
- [8] *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs)*. 2009.
- [9] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Emerging Contaminants - Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Perfluorooctanoic Acid (PFOA)*. 2012.
- [10] HANSEN, Kristen J., Lisa A. CLEMEN, Mark E. ELLEFSON a Harold O. JOHNSON. Compound-Specific, Quantitative Characterization of Organic Fluorochemicals in Biological Matrices. *Environmental Science*. 2001, vol. 35, issue 4, s. 766-770. DOI: 10.1021/es001489z. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es001489z>.
- [11] LAU, C., K. ANITOLE, C. HODES, D. LAI, A. PFAHLES-HUTCHENS a J. SEED. Perfluoroalkyl Acids: A Review of Monitoring and Toxicological Findings. *Toxicological Sciences*. 2007-05-04, vol. 99, issue 2, s. 366-394. DOI: 10.1093/toxsci/kfm128.
- [12] PREVEDOUROS, Konstantinos, Ian T. COUSINS, Robert C. BUCK a Stephen H. KORZENIOWSKI. Sources, Fate and Transport of Perfluorocarboxylates. *Environmental Science*. 2006, vol. 40, issue 1, s. 32-44. DOI: 10.1021/es0512475. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0512475>.
- [13] POPL, Milan a Jan FÄHNRIK. *Analytická chemie životního prostředí*. 4. přepř. vyd. Praha: VŠCHT, 1999, 218 s. ISBN 80-708-0336-3.
- [14] ARCADIS [online]. 2013 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: http://www.arcadis.cz/press/news_patent_pfos.aspx.

- [15] HIGGINS, Christopher P. a Richard G. LUTHY. Sorption of Perfluorinated Surfactants on Sediments †. *Environmental Science*. 2006, vol. 40, issue 23, s. 7251-7256. DOI: 10.1021/es061000n. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es061000n>.
- [16] DOHÁNYOS, M. *Efektivní využití a likvidace čistírenských kalů*. Biom.cz [online]. 2006-05-09 [cit. 2013-11-03]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/efektivni-vyuziti-a-likvidace-cistirenskych-kalu>>. ISSN: 1801-2655.
- [17] Kaly z čistíren odpadních vod. *Ministerstvo životního prostředí* [online]. 2012 [cit. 2013-10-15]. Dostupné z: http://www.mzp.cz/cz/kaly_cistiren_odpadnich_vod.
- [18] HRNČÍŘOVÁ, J. *Aplikace kalů z ČOV na zemědělskou půdu s ohledem zejména na obsah těžkých kovů v kalech*. Dostupné z WWW: http://www.registrpovinnosti.com/df23h54/odpady/registrlegislativy/Aplikace_kalu.pdf.
- [19] DOHÁNYOS, Michal, Jan KOLLER a Nina STRNADOVÁ. *Čištění odpadních vod*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-619-7.
- [20] ČERNÝ, J. *Využití odpadů z ČOV jako zdroje organických látek a živin*. Biom.cz [online]. Dostupné z WWW: <http://biom.cz/cz/projekty/konference-racionalni-pouziti-hnojiv-2009>.
- [21] ZHANG, Chaojie, Hong YAN, Fei LI, Xiang HU a Qi ZHOU. Sorption of short- and long-chain perfluoroalkyl surfactants on sewage sludges. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, vol. 260, s. 689-699. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.06.022. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389413004226>.
- [22] SUOMINEN, K., A. HALLIKAINEN, P. RUOKOJÄRVI, R. AIRAKSINEN, J. KOPONEN, R. RANNIKKO a H. KIVIRANTA. Occurrence of PCDD/F, PCB, PBDE, PFAS, and Organotin Compounds in Fish Meal, Fish Oil and Fish Feed. *Chemosphere*. 2011, vol. 85, issue 3, s. 300-306. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653511006539>.
- [23] Fish meal. FUXINGKANG FOOD STUFF CO. *FUXINGKANG* [online]. 2013 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: http://www.fxkfoodstuff.com/html_products/fish-mea-24.html.
- [24] Kosubová, P., Perkola, N., Huhtala, S.: Analysis Of Perfluorosulfonic Acids And Perfluorocarboxylic Acids In Feed Using UPLC-MS/MS, Organohalogen Compounds 73/2011, 216-218.
- [25] COMMISSION RECOMMENDATION: on the monitoring of perfluoroalkylated substances in food. In: 2010, 2010/161/EU.
- [26] LACINA, Ondrej, Petra HRADKOVA, Jana PULKRABOVA a Jana HAJŠLOVA. Simple, high throughput ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry trace analysis of perfluorinated alkylated substances in food of animal origin: Milk and fish. *Journal of Chromatography A*. 2011, vol. 1218, issue 28, s. 4312-4321. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.04.061. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311005711>.
- [27] HIGGINS, Christopher P., Jennifer A. FIELD, Craig S. CRIDDLE a Richard G. LUTHY. Quantitative Determination of Perfluorochemicals in Sediments and Domestic Sludge. *Environmental Science*. 2005, vol. 39, issue 11, s. 3946-3956. DOI: 10.1021/es048245p. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es048245p>.
- [28] CLARA, M., O. GANS, S. WEISS, D. SANZ-ESCRIBANO, S. SCHARF a C. SCHEFFKNECHT. Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: An Austrian case study. *Water Research*. 2009, vol. 43, issue 18, s. 4760-

4768. DOI: 10.1016/j.watres.2009.08.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135409005065>.
- [29] POWLEY, Charles R., Stephen W. GEORGE, Timothy W. RYAN a Robert C. BUCK. Matrix Effect-Free Analytical Methods for Determination of Perfluorinated Carboxylic Acids in Environmental Matrixes. *Analytical Chemistry*. 2005, vol. 77, issue 19, s. 6353-6358. DOI: 10.1021/ac0508090. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0508090>.
- [30] Metodika: Metodika pasivního vzorkování ovzduší. *MONET* [online]. [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: <http://monet-cz.cz/index.php?pg=metodika>.
- [31] ČSN ISO 25101. *Jakost vod - Stanovení perfluoroktansulfonátu (PFOS) a perfluoroktanoátu (PFOA) - Metoda pro nefiltrované vzorky s použitím extrakce tuhou fází a kapalinové chromatografie/hmotnostní spektrometrie*. 2010.
- [32] MARTÍNEZ-MORAL, María Pilar a María Teresa TENA. Focused ultrasound solid-liquid extraction of perfluorinated compounds from sewage sludge. *Talanta*. 2013, vol. 109, s. 197-202. DOI: 10.1016/j.talanta.2013.02.020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914013000933>.
- [33] Pedologický průzkum. *Učebnice remediačních technologií: Elektronické učební texty* [online]. 2010 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: <http://ucebnice.remediace.cz/default.asp?oid=03020100003&fid=140>.
- [34] LLORCA, Marta, Marinella FARRÉ, Yolanda PICÓ a Damià BARCELÓ. Development and validation of a pressurized liquid extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for perfluorinated compounds determination in fish. *Journal of Chromatography A*. 2009, vol. 1216, issue 43, s. 7195-7204. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.06.062.
- [35] ŠTULÍK, Karel, Jiří ŠEVČÍK, Věra PACÁKOVÁ, Ivan JELÍNEK, Pavel COUFAL a Zuzana BOSÁKOVÁ. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [36] Büchi: Products and Solutions. *Büchi* [online]. 2014 [cit. 2014-02-25]. Dostupné z: <http://www.buchi.com/en/products/extraction/extraction-system-b-811-b-811-lsv>.
- [37] AVDALOVIC, Nebojsa, EZZELL, JONES, Christopher A. POHL, PORTER a Bruce E. RICHTER. *Accelerated solvent extraction method* [patent]. US patent 5,843,311. Uděleno 1.12.1998. Dostupné z: <https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US5843311.pdf>.
- [38] LUQUE, Noelia, Ana BALLESTEROS-GÓMEZ, Stefan VAN LEEUWEN a Soledad RUBIO. Analysis of perfluorinated compounds in biota by microextraction with tetrahydrofuran and liquid chromatography/ion isolation-based ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010, vol. 1217, issue 24, s. 3774-3782. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.04.014.
- [39] HRÁDKOVÁ, P., J. POUSTKA, J. PULKRABOVÁ, V. HLOUSKOVÁ, V. KOCOUREK, M. LLORCA, M. FARRÉ, D. BARCELÓ a J. HAJŠLOVÁ. A fast and simple procedure for determination of perfluoroalkyl substances in food and feed: a method verification by an interlaboratory study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, vol. 405, issue 24, s. 7817-7827. DOI: 10.1007/s00216-013-6962-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-013-6962-6>.
- [40] SIGMA-ALDRICH. *Guide to Solid Phase Extraction*. 1998.

- [41] ALZAGA, R., C. SALGADO-PETINAL, E. JOVER a J.M. BAYONA. Development of a procedure for the determination of perfluorocarboxylic acids in sediments by pressurised fluid extraction, headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatographic–mass spectrometric determination. *Journal of Chromatography A*. 2005, vol. 1083, 1-2, s. 1-6. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.06.036. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305011751>.
- [42] GALIPO, Randolph C., Alfredo J. CANHOTO, Michael D. WALLA a Stephen L. MORGAN. Analysis of Volatile Fragrance and Flavor Compounds by Headspace Solid Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. An instrumental analysis experiment. 2002. Dostupné z: <http://www.chem.sc.edu/analytical/chem621/lab/spme.html>.
- [43] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 236 s. ISBN 80-708-0227-8.
- [44] GCSE Bitesize. *BBC* [online]. 2014 [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/triple_ocr_21c/further_chemistry/chromatography/revision/5/.
- [45] JURADO-SÁNCHEZ, Beatriz, Evaristo BALLESTEROS a Mercedes GALLEGO. Semiautomated solid-phase extraction followed by derivatisation and gas chromatography–mass spectrometry for determination of perfluoroalkyl acids in water. *Journal of Chromatography A*. 2013, vol. 1318, s. 65-71. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.10.034. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967313016348>.
- [46] ČÁSLAVSKÝ, J. *Přednášky z předmětu Chromatografie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 2012.
- [47] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. . ISBN 978-80-260-4243-3.
- [48] High performance (high pressure) liquid chromatography (HPLC). *ELTE* [online]. 2012 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/practical_biochemistry/ch06s05.html
- [49] ČÁSLAVSKÝ, J. *Přednášky z předmětu Hmotnostní spektrometrie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 2013.
- [50] Quadrupole Mass Filters. *Reliance: Precision Limited* [online]. 2014 [cit. 2014-04-11]. Dostupné z: <http://www.reliance.co.uk/en/news/66/quadrupole+mass+filters>.
- [51] *HPLC* [online]. 4.4.2013 [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>.
- [52] Document SANCO/12571/2013: *Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residue analysis in food and feed*. 2014, 46 s.
- [53] WATERS. *Instrument Specifications*. 2007.
- [54] STRYNAR, Mark, Amy DELINSKY, Andrew LINDSTROM, Shoji NAKAYAMA a Jessica REINER. US EPA. *LC/TOFMS and UPLC-MS/MS Methods for the Analysis of Perfluorooctanesulfonate (PFOS) and the Reduction of Matrix Interference in Complex Biological Matrices*. Dostupné z: <https://www.chem.agilent.com/Library/posters/Public/LCTOFMS%20and%20UPLC-MSMS%20Methods%20for%20the%20Analysis%20of%20Perfluorooctanesulfonate%20%28PFOS%29.pdf>.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PFAS – per(poly)fluoroalkylové sloučeniny (per(poly)fluoroalkyl substances)
PFSA – perfluoroalkansulfonáty (perfluoroalkane sulfonates)
PFCA – perfluorokarboxylové kyseliny (perfluorocarboxylic acids)
PFAA – perfluoroalkylové kyseliny (perfluoroalkyl acids)
POSF – perfluorooktansulfonylfluorid (perfluorooctane sulfonyl fluoride)
FOSE – perfluorooktansulfoamidoethanol (perfluorooctanesulfonamidoethanol)
FOSA – perfluorooktansulfonamidy (perfluorooctanesulfonamides)
PFOS – perfluorooktansulfonová kyselina (perfluorooctan sulfonic acid)
PFHxS – perfluorohexansulfonová kyselina (perfluorohexane sulfonic acid)
PFDS – perfluorodekansulfonová kyselina (perfluorodecane sulfonic acid)
PFHxA – perfluorohexanová kyselina (perfluorohexanoic acid)
PFHpA – perfluoroheptanová kyselina (perfluoroheptanoic acid)
PFOA – perfluorooktanová kyselina (perfluorooctanoic acid)
PFNA – perfluorononanová kyselina (perfluorononanoic acid)
PFDA – perfluorodekanová kyselina (perfluorodecanoic acid)
PFUnA – perfluoroundekanová kyselina (perfluoroundecanoic acid)
PFDa – perfluorododekanová kyselina (perfluorododecanoic acid)
PFTrDA – perfluorotridekanová kyselina (perfluorotridecanoic acid)
PFTeDA – perfluorotetradekanová kyselina (perfluorotetradecanoic acid)
PFHxDA – perfluorohexadekanová kyselina (perfluorohexadecanoic acid)
PFODA – perfluorooktadekanová kyselina (perfluorooctadecanoic acid)
FTOHs – perfluorotelomerní alkoholy (perfluorotelomer alcohols)
APFO – perfluorooktanoát amonný (ammonium perfluorooctanoate)
APFN – perfluorononanoát amonný (ammonium perfluorononanoate)
AFFF – hasící pěny (aqueous fire-fighting foams)
TBA – tetrabutylamonium
MTBE – methyl-terc-butylether
PSA – primární sekundární amin (primary-secondary amine)
EFSA – Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
US EPA – Agentura pro ochranu životního prostředí Spojených států amerických (United States Environmental Protection Agency)
OECD – Organizace pro ekonomickou spolupráci a vývoj (Organisation for Economic Co-operation and Development)
APME – Asociace evropských výrobců plastů (The Association of Plastic Manufacturers Europe)
ECF – Elektrochemická fluorace (electrochemical fluorination)
TM – Telomerace (telomerization)
LC-QqQ-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s trojitým kvadrupólem jako analyzátořem
QqLIT – hybridní analyzátoř kvadrupól-lineární iontová past
QqTOF – hybridní analyzátoř kvadrupól-analyzátoř doby letu
THF – tetrahydrofuran
DSPE – disperzní extrakce tuhou fází (dispersive solid-phase extraction)
SPE – extrakce tuhou fází (solid-phase extraction)

WAX – slabý měnič aniontů (weak anion exchanger)
SAX – silný měnič aniontů (strong anion exchanger)
HLB – hydrofilně-lipofilně vyvážené (hydrophilic lipophilic balanced)
SPME – mikroextrakce tuhou fází (solid-phase microextraction)
PLE – tlaková extrakce rozpouštědlem (pressurized liquid extraction)
ASE – tlaková extrakce rozpouštědlem (accelerated solvent extraction)
UV-VIS/DAD – spektrofotometrický detektor s diodovým polem
LC – kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
GC – plynová chromatografie (gas chromatography)
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

UHPLC – ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography)
UPLC – ultra-účinná kapalinová chromatografie (zkratka patentově chráněná firmou Waters)
LC-IT-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s analyzátozem iontovou pastí
RSD – relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
LOQ – limit kvantifikace (limit of quantification)
LOD – limit detekce (limit of detection)
S/N – poměr signál/šum (signal to noise)
KK_HZ – kompletní krmivo pro hospodářská zvířata
KK_DZ – kompletní krmivo pro domácí zvířata
DK_DZ – doplňkové krmivo pro domácí zvířata
KS_RM – krmná surovina rybí moučka