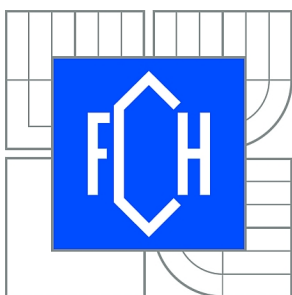




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

BISFENOL A VE VODNÍM EKOSYSTÉMU

BISPHENOL A IN WATER ECOSYSTEM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. GABRIELA NOHELOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JOSEF ČÁSLAVSKÝ, CSc.

BRNO 2014



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0692/2012	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Gabriela Nohelová	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Bisfenol A ve vodním ekosystému

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na problematiku vlastností bisfenolu A a jeho neblahých účinků na živé organismy, a rovněž na možnosti jeho stanovení ve vodním ekosystému.
2. Na základě získaných poznatků navrhnete a optimalizujete metodu stanovení bisfenolu A v odpadních vodách s přihlédnutím k podmínkám laboratoří ÚCHTOŽP.
3. Analyzujte sérii reálných vzorků z ČOV Brno-Modřice, případně z další vhodné čistírny odpadních vod.
4. Proveďte zhodnocení získaných výsledků a jejich porovnání s dosud publikovanými daty.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2014

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. Gabriela Nohelová
Student(ka)

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá problematikou Bisfenolu A, zejména jeho vlivem na vodní ekosystém.

V práci jsou přehledně shrnuty informace o jeho vlastnostech, výrobě a současném využití. Byl zde popsán jeho škodlivý dopad na životní prostředí, především na vodní ekosystém, a také na lidský organismus. V rámci vodního prostředí byly popsány také způsoby jeho degradace.

Součástí práce je shrnutí možností stanovení Bisfenolu A ve vzorcích vody. V experimentální části je porovnávána metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/TOF-MS) a metoda dvoudimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GCxGC/TOF-MS). Vlastnímu analytickému stanovení předchází izolace analytu ze vzorku vody metodou extrakce tuhou fází (SPE) s použitím kolonek SupelcleanTM ENVITM – 18 a derivatizace použitím silylačního činidla *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA).

Výsledkem této práce je analýza série reálných vzorků z Čistírny odpadních vod Brno - Modřice a Luhačovice metodou dvoudimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GCxGC/TOF-MS).

ABSTRACT

This diploma thesis deals with Bisphenol A, especially with its impact on the aquatic ecosystem. Information about its properties, production and current use are summarized here. Its harmful impact on the environment, especially on the aquatic ecosystem and the human body is characterized. Also the methods of its degradation within the aquatic environment have been described.

A summary of the options of a determination of Bisphenol A in water samples is incorporated and the method of gas chromatography with mass spectrometry (GC/TOF-MS) and comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry (GCxGC/TOF-MS) is compared in the experimental part.

Analytical determination precedes the isolation of the analyte from the water samples by solid phase extraction (SPE) using SupelcleanTM ENVITM - 18 and derivatization using the silylation reagent, *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA). The result of this work is the analysis of a series of real samples from wastewater treatment plants Brno - Modřice and Luhačovice by a two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry (GCxGC/TOF-MS).

KLÍČOVÁ SLOVA

Bisfenol A, derivatizace, dvoudimenzionální plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GCxGC/TOF-MS), plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/TOF-MS), čistírna odpadních vod

KEYWORDS

Bisphenol A, derivatization, two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry, gas chromatography with mass spectrometry, wastewater treatment plant

NOHELOVÁ, G. *Bisfenol A ve vodním ekosystému*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 78 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že 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.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce, doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc., za vedení této diplomové práce, odborné rady a za trpělivou a neocenitelnou pomoc během celého studia. Dále bych chtěla velice poděkovat paní profesorce RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za odborný dohled během experimentální části této práce a organizační podporu při jejím průběhu.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 BPA	8
2.1.1 Vlastnosti BPA	8
2.1.2 Výroba a využití BPA.....	8
2.1.2.1 Výroba BPA	8
2.1.2.2 Využití BPA	9
2.1.3 Vliv BPA na životní prostředí a na člověka	10
2.1.3.1 Vodní prostředí.....	11
2.1.3.2 Biologická degradace BPA	12
2.1.4 Legislativa	13
2.2 Metody stanovení BPA	13
2.2.1 Izolace analytů	13
2.2.1.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)	14
2.2.1.2 Extrakce tuhou fází (SPE)	14
2.2.1.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)	15
2.2.2 Analytické stanovení BPA.....	16
2.2.2.1 Derivatizace BPA	17
2.2.2.2 Kapalinová chromatografie (LC)	20
2.2.2.3 Plynová chromatografie (GC)	21
2.2.2.3.1 Nosný plyn.....	22
2.2.2.3.2 Regulátor tlaku a průtoku	23
2.2.2.3.3 Injektor.....	24
2.2.2.3.4 Kolona.....	24
2.2.2.3.5 Detektor	25
2.2.2.3.6 Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení chromatogramu	29
2.2.2.4 Kompletní dvoudimenzionální plynová chromatografie (GCxGC).....	32
2.2.2.4.1 Pegasus® 4D GCxGC/TOF-MS.....	33
2.2.2.5 ELISA.....	35
2.3 Čistírny odpadních vod vybrané pro analýzu.....	35
2.3.1 Čistírna odpadních vod Modřice	35
2.3.2 Čistírna odpadních vod Luhačovice	37
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1 Použité chemikálie	38
3.2 Přístroje a zařízení	38
3.3 Optimalizace rozpouštědla a derivatizace	39
3.3.1 Podmínky analýzy	39
3.3.2 Analýza vzorku o známé koncentraci BPA bez derivatizace	39
3.3.3 Analýza roztoku vzorku o známé koncentraci BPA po derivatizaci	39
3.3.4 Analýza odparku vzorku o známé koncentraci BPA po derivatizaci	39
3.3.5 Odpaření vzorku o známé koncentraci BPA a derivatizace a analýza po 24 hod.	40

3.3.6	Odpaření vzorku o známé koncentraci BPA a aplikace 50 µl pyridinu, derivatizace BSTFA a analýza po 24 hodinách	41
3.4	Kalibrace GC/TOF-MS	41
3.4.1	Podmínky analýzy	41
3.4.2	Určení kalibrační závislosti	41
3.5	Kalibrace GCxGC/TOF-MS	42
3.5.1	Podmínky analýzy	42
3.5.2	Určení kalibrační závislosti	42
3.6	Optimalizace SPE.....	42
3.6.1	Optimalizace rozpouštědla	42
3.6.2	Optimalizace typu SPE kolonky.....	43
3.6.3	Stanovení výtěžnosti metody.....	43
3.7	Odběr vzorků.....	43
3.8	Příprava, extrakce a derivatizace vzorku.....	43
3.9	Analýza vzorků	44
3.9.1	Podmínky analýzy	45
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
4.1	Optimalizace rozpouštědla a derivatizace	46
4.2	Kalibrace GC/TOF-MS	47
4.2.1	Výpočet LOD a LOQ	48
4.3	Kalibrace GCxGC/TOF-MS.....	48
4.3.1	Výpočet LOD a LOQ	51
4.4	Optimalizace SPE.....	52
4.4.1	Optimalizace typu SPE kolonky.....	52
4.4.2	Stanovení výtěžnosti metody.....	53
4.5	Analýza reálných vzorků.....	53
4.5.1	ČOV Luhačovice	54
4.5.1.1	Přítok na ČOV Luhačovice	55
4.5.1.2	Odtok z ČOV Luhačovice	56
4.5.2	ČOV Modřice	58
4.5.2.1	Přítok na ČOV Modřice	60
4.5.2.2	Odtok z ČOV Modřice	62
5.	ZÁVĚR	66
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	67
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	74
8.	PŘÍLOHY	76
8.1	Příloha 1	76
8.1.1	Obecné vlastnosti BPA.....	76
8.1.2	Fyzikální a chemické vlastnosti.....	76

1. ÚVOD

Bisfenol A (dále jen BPA) patří spolu s alkylfenoly 4-terc-oktylfenolem, 4-oktylfenolem, isomery 4-nonylfenolem a 4-n-nonylfenolem do skupiny látek, které jsou v environmentálních matricích sledovány pro svoji toxicitu. Jedná se o endokrinní disruptory, které napodobují působení přirozeně produkovaných hormonů, blokují v buňkách receptory hormonů, ovlivňují syntézu, transport, metabolismus a vylučování hormonů.

Jsou to látky antropogenního původu, v životním prostředí se jednotlivé alkylfenoly a BPA nacházejí v různých koncentracích v závislosti na jejich používání.

BPA má sice odlišnější strukturu než alkylfenoly, ale byly u něj prokázány podobné estrogení účinky. Látka je toxická pro reprodukci a je podezření, že působí také neurotoxicky. Toxikologický výzkum prokazuje, že jeho vliv na lidské zdraví není zanedbatelný [1-3].

V současnosti je BPA používán zejména jako surovina na výrobu polykarbonátů. Polykarbonáty našly velmi široké technické použití a jsou součástí každodenního života. Jsou vynikajícím materiálem pro řadu výrobků, protože jsou chemicky, tepelně a mechanicky velmi odolné. Jsou lehké, čiré jako sklo a libovolně barvitelné.

BPA a výrobky z něj nacházejí stále širší použití také v potravinářském průmyslu, v medicíně, stavebnictví, elektronice i jinde, proto se tato chemikálie stává prakticky všudypřítomnou složkou našeho životního prostředí [4].

Koncentrace BPA a dalších endokrinních disruptorů v životním prostředí jsou nepatrné, postupně se kumulují v různých organismech a potravinovými řetězci se předávají z organismu na organismus [4, 5].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 BPA

2.1.1 Vlastnosti BPA [4, 6, 7]



Obr. 1 Chemická struktura BPA

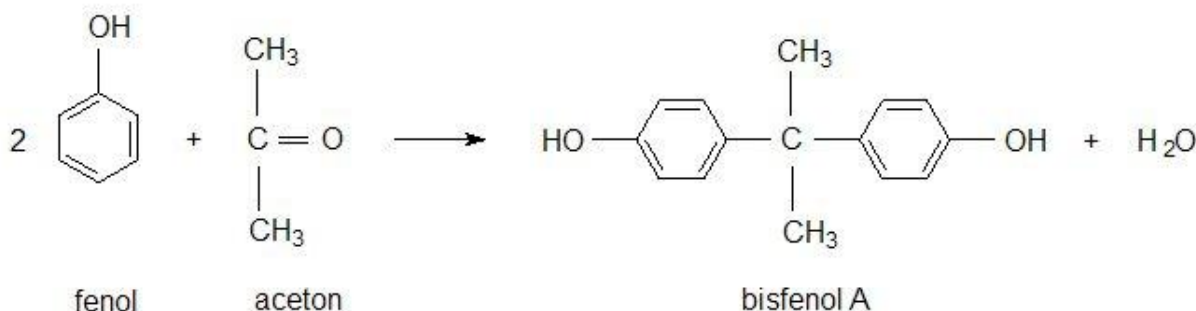
- Systematický název: 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan
- Sumární vzorec: $C_{15}H_{16}O_2$
- Molekulová hmotnost: $228,2863 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
- Barva: bílá až světle hnědá
- Skupenství: pevné, ve formě granulí, vloček nebo prachu
- Hygroskopicitá: slabá
- Rozpustnost: rozpustný ve vodných alkalických roztocích, v ethanolu a v acetonu, málo rozpustný v tetrachloru, prakticky nerozpustný ve vodě
- Teplota tání: $155 - 156 \text{ }^\circ\text{C}$
- Teplota varu: $220 \text{ }^\circ\text{C}$
- Hustota: $1,195 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$
- Minimální teplota vznícení: $532 \text{ }^\circ\text{C}$

Podrobná charakteristika studované látky je v Příloze 1.

2.1.2 Výroba a využití BPA

2.1.2.1 Výroba BPA

BPA (2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan) je organická látka, která byla připravena v roce 1891 v laboratoři ruského chemika Alexandra P. Dianina. Příprava BPA je snadná a spočívá v kondenzaci fenolu s acetonem v kyselém prostředí (viz obrázek 2) - proto to A za jménem látky [4].



Obr. 2 Příprava BPA [4]

Pro výrobu epoxidových pryskyřic a polykarbonátů pro vodovodní potrubí a potravinové obaly se spolu s BPA může používat i bisfenol F (Bis(2-hydroxyfenyl)methan). K výrobě se používá i směs těchto bisfenolů. Bisfenol F je podobně jako BPA vymýván a vyluhován z konečných produktů, jeho distribuce a osud v životním prostředí jsou srovnatelné s BPA [7].

2.1.2.2 Využití BPA

BPA neměl dlouho žádné významné využití, ale s rozvojem chemie polymerů se stal důležitou surovinou pro přípravu některých plastů. Produkuje se v obrovském množství. Jeho celosvětová produkce se pohybuje přes 3 miliony tun ročně. Produkce BPA i jeho použití rok od roku roste [4].

V následujícím přehledu a částečně na obrázku 4 je znázorněno masivní využití BPA v každodenním životě.

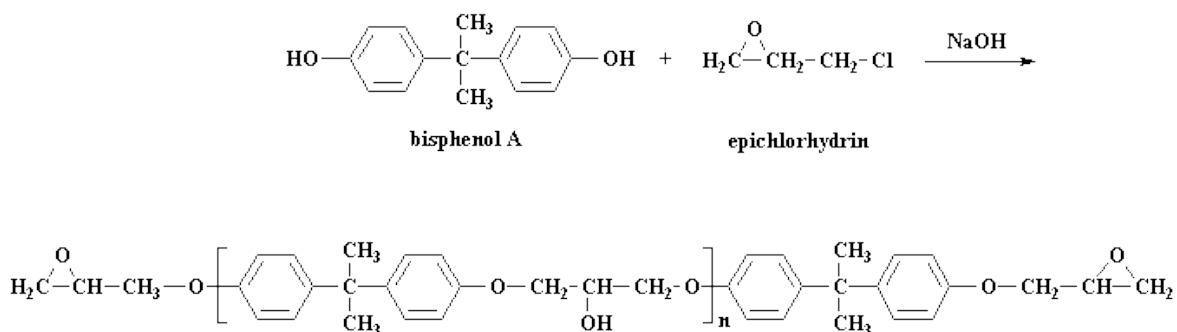
Téměř tři čtvrtiny produkce BPA (72 %) se používají jako monomer pro výrobu polykarbonátů.

Z polykarbonátů se vyrábí zejména tzv. makrolonové desky - vysoce kvalitní, tepelně izolační materiál, vhodný pro zasklívání a zastřešování, s vysokou odolností vůči povětrnostním vlivům.

Mezi výrobky z polykarbonátových plastů patří nárazuvzdorné glazury, banež pouličního osvětlení, součásti domácích spotřebičů, komponenty elektrospotřebičů (mobilní telefony, počítače) nebo CD a DVD. Protože od samého začátku je polykarbonát považován za zdravotně nezávadný materiál, ve stále větší míře se používá i tam, kde přichází do styku s potravinami, od kojeneckých lahví a nádob na nápoje, nádobí do mikrovlnné trouby, jídelní příbory, nádoby na potraviny až k ošetření vnitřního povrchu konzerv. Polykarbonátové plasty mají také využití při výrobě součástí automobilů (nárazníky, přístrojová deska), slunečních brýlí, polic v lednicích a kontaktních čoček [1, 2, 4].

Téměř jedna čtvrtina produkce BPA (21 %) se používá při výrobě epoxidových pryskyřic jeho alkalickou polykondenzací s epichlorhydrinem (viz obrázek 3). Molekulární poměry jednotlivých komponent ovlivňují molekulovou hmotnost a tím i užité vlastnosti [8].

Epoxidové pryskyřice mají další využití jako potahové nátěry, povrchová úprava konzerv a plechovek, desky pro tištěné spoje, kompozity, lepidla, nátěrové hmoty nebo laky na nehty [1, 2, 8].



Obr. 3 Výroba epoxidové pryskyřice alkalickou polykondenzací epichlorhydrinu a BPA [9]

Zbývajících 7 % produkce BPA je použito při výrobě dalších produktů, např. pesticidních přípravků, antioxidantů, retardérů hoření, brzdových kapalin, stabilizátorů gumy a PVC, vodovodních trubek, zubních plomb, aditiv termopapírů, vodovodních filtrů, vyztužených trubek, podlahového materiálu a elektrické izolace [1, 2, 4].



Obr. 4 Ukázka využití BPA [10]

2.1.3 Vliv BPA na životní prostředí a na člověka

Jak již bylo řečeno, roční světová produkce BPA se pohybuje již přes 3 milionů tun a stále stoupá. Tím také narůstá pravděpodobnost jeho vstupu do životního prostředí. Zároveň rostou i obavy, zda BPA nemůže mít negativní vliv na lidské zdraví [4].

Již ve 30. letech minulého století se objevilo podezření na toxicitu BPA. Naprostá většina studií však byla prováděna na laboratorních zvířatech. Toxicita BPA pro laboratorního

potkana při perorálním podání je nízká, jeho střední smrtelná dávka (LD50) je 3250 mg/kg, ale to ještě neznamená, že není nebezpečný pro člověka [4].

Velmi často se objevuje otázka, zda používání polykarbonátových plastových lahví pro kojence nebo široké využití tohoto plastu v potravinářství není nebezpečné. Vyvíjející se organismus kojenců totiž nemá schopnost odstranit BPA z těla stejně rychle jako dospělý jedinec [4].

Později byly u BPA prokázány podobné estrogenní účinky jako u alkylfenolů, i přes odlišnou strukturu. Je tedy toxický pro reprodukci a je podezřelý z vývojové toxicity. Nové studie také prokázaly, že může zvyšovat riziko výskytu rakoviny, zatím ale není prokázáno, že by šlo o karcinogenní látku [1, 2, 4].

BPA je součástí řady běžných spotřebních výrobků, ze kterých se může uvolňovat do životního prostředí. Byl zaznamenán jeho výskyt v ovzduší, ve vodě nebo v tělech zvířat, ale také v prachu z domácností, v potravinách, v lidské moči, v krvi a v mateřském mléce, dokonce i v pupečnickové krvi a v tělech dosud nenarozených dětí vyvíjejících se v děloze matky. Nachází se v různých koncentracích všude na Zemi, dokonce i v Arktidě a Antarktidě [4, 11].

Nejnovější výzkumy řadí BPA mezi látky označované jako endokrinní disruptory. Tyto látky narušují endokrinní systém, který tvoří řídicí systém endokrinních žláz. Ty vylučují chemické posly zvané hormony, které cirkulují v těle v krevním oběhu a jsou schopny ovlivňovat funkce vzdálených orgánů. Hormony jsou účinné již v nepatrných koncentracích a proto i nepatrná množství látek, která jejich funkci narušují (disruptory), mohou být nebezpečná pro lidské zdraví. Proto i BPA, který se prokazatelně chová jako endokrinní disruptor, představuje pro lidské zdraví určité riziko, jehož velikost je však velmi obtížné odhadnout [4].

Naše životní prostředí je zamořeno velkým množstvím látek, které se také chovají jako endokrinní disruptory, např. ftaláty, nonylfenol, polybromované bifenyly, polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany, polyfluorované uhlovodíky a mnoho dalších. Objevují se v půdě, ve vodě i ve vzduchu. I když jejich koncentrace v životním prostředí jsou nepatrné, postupně se kumulují v různých organismech a potravinovými řetězci se předávají z organismu na organismus [4].

Primárním zdrojem expozice člověka BPA je potrava. Zatímco vzduch, prach a voda jsou další možné zdroje expozice, BPA v potravinách a nápojích představuje většinu denní expozice u člověka. BPA se může uvolňovat do potravin z jejich obalů a ze spotřebitelských produktů, jako je polykarbonát používaný při výrobě nádobí, nádob na skladování potravin a nápojů a speciálně kojeneckých lahví. Jakou měrou se BPA uvolňuje z polykarbonátových lahví do nápoje, závisí více na teplotě kapaliny než na věku nádoby [12].

Množství vědeckých studií z posledních let poukazuje na roli, kterou může hrát vystavení se nízkým dávkám BPA při vzniku vážných onemocnění jako je cukrovka, rakovina prsu u žen nebo rakovina varlat a prostaty u mužů [13].

2.1.3.1 Vodní prostředí

Tato práce se zabývá výskytem a osudem BPA ve vodním ekosystému, proto se zaměřuje na účinky BPA právě na tuto složku životního prostředí.

Hlavními zdroji kontaminace vodního prostředí jsou odtoky z průmyslových a komunálních čistíren odpadních vod, vedle těchto zdrojů se však na celkové zátěži podílí i průsak vody ze skládek a transport atmosférickou cestou. Dalším zdrojem BPA jsou odpady v řekách a mořích. Plasty plovoucí na povrchu oceánu jsou nalézány po celém světě a představují tak riziko pro vodní ekosystém [14, 15].

BPA má v aerobním prostředí poločas rozpadu mezi 4,5 - 4,7 dny, v anaerobním prostředí se rozkládá pomaleji, proto jsou koncentrace BPA v sedimentech větší než v povrchové vodě. BPA je ve vodě rychle degradován prostřednictvím mikrobiální biodegradace a fotodegradace, má nízký potenciál k bioakumulaci u živočichů.

Koncentrace BPA ve vodě se liší podle místa a času odběru. Ve většině řek se ale koncentrace těchto látek ve vodě pohybuje v rozmezí od 0,1 ng/ml do 1 ng/ml [15].

BPA se v různých vodních organismech chová jako teratogen i jako endokrinní disruptor.

Teratogenní účinky se u zvířat žijících ve volné přírodě většinou vyskytují při působení vysokých koncentrací. Například expozice nad 4,6 mg/l indukuje u obojživelníka Drápatky vodní (*Xenopus laevis*) vznik mikrocefalie, vývojovou poruchu mozku, projevující se jeho zakrněním. Následkem je zkrácení doby života. Dalším příkladem mohou být histologické změny, zjištěné v jaterních buňkách u lososa obecného (*Salmo solar*), vystaveného účinkům 1 a 0,1 mg/l BPA. Některé z teratogenních vad způsobených BPA jsou podobné těm, které jsou vyvolány embryonální expozicí 17 β -estradiolu [15].

Endokrinní narušení organismu se projevuje již při nižších koncentracích. Mezi endokrinní narušení živočichů patří změna určení pohlaví z expozice v průběhu gonádové organogeneze, změna gonadální funkce z expozice během gonadální organogeneze i po ní a indukce jaterního vitellogeninu po expozici dospělých jedinců.

BPA je schopen feminizovat samce obojživelníků a ryb. Může také přispívat k výskytu intersexu např. u dospívající parmy (*Barbus* sp.). BPA může měnit i časování reprodukce u volně žijících ryb a gonadální funkce u samic ryb [15].

2.1.3.2 Biologická degradace BPA

V čistírnách odpadních vod dochází pomocí směsné mikrobiální kultury v podobě aktivovaného kalu k sorpci a degradaci BPA. Na sorpci BPA má vliv zejména teplota a koncentrace celkové sušiny aktivovaného kalu. Odstraňování BPA v systému aktivace lze charakterizovat jako rychlou sorpci na vločkách usazenin a jeho následnou biodegradaci [16].

V půdě, říční vodě nebo aktivovaném kalu ČOV byla nalezena řada bakterií schopných biodegradace BPA. Patří sem *Sphingomonas* sp. AO1, *Pseudomonaspaucimobilis* FJ-4, druhy rodu *Pseudomonas* sp. a *Streptomyces* sp. a několik neidentifikovaných gramnegativních bakterií zahrnujících izoláty z aktivovaného kalu a říčních sedimentů [17].

Je popsána metabolická cesta degradace BPA některými druhy bakterií za aerobních podmínek na 4-hydroxybenzoovou kyselinu a 4-hydroxyacetofenon. Gramnegativní aerobní bakterie, kmen MV1 (NRRL-B-18737), byly schopny oxidace alifatické methylové skupiny BPA za vzniku 1,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan-2-olu a 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan-1-olu. Oba meziprodukty jsou dále degradovány pomocí oxidace, dehydratace a štěpení na výsledné produkty 4-hydroxybenzoovou kyselinu, 2-hydroxy-1-(4-hydroxyfenyl)ethanol a 2,2-bis(hydroxyfenyl)propanovou kyselinu [17, 18].

Bakterie izolované z aktivovaného kalu a říčního ekosystému (*Arthrobacter*, *Pseudomonas* a zástupci *Enterobacteriaceae*) byly schopny metabolizovat BPA cestou podobnou jako výše zmíněný izolát MV178 [17].

Podle literárních údajů se účinnost čistícího procesu pro alkylfenolové látky u jednotlivých čistíren značně liší, v průměru se pohybuje v rozmezí 50 – 95 % [14].

V anaerobních podmínkách probíhá degradace BPA velmi obtížně. Ronen a Abeliovich ve své studii prokázali, že BPA v anaerobních podmínkách kalu nebyl degradován ani po třech měsících inkubace [17, 19].

2.1.4 Legislativa

Podle nařízení vlády ze dne 29. ledna 2003 o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech (Příloha č. 3 k nařízení vlády č. 61/2003 Sb.) je uvedena pro BPA norma environmentální kvality v povrchových vodách 0,035 ng/ml [20].

Ministerstvo zdravotnictví ČR, společně se Státním zdravotním ústavem (SZÚ), průběžně sleduje významné rizikové faktory, které ovlivňují nebo mohou ovlivňovat lidské zdraví. Nové skutečnosti jsou průběžně vyhodnocovány, a to nejen ve vztahu k BPA. Podle současné legislativy (na základě nařízení vlády č. 23/2011 Sb.) byla pro BPA v České republice nově stanovena nejvyšší přípustná průměrná hodnota koncentrace pro povrchové vody 35 µg/l [14, 21].

BPA je dlouhodobě v centru pozornosti odborníků v EU a pochopitelně i v ČR. Otázkou, která se diskutuje, je možný zákaz této sloučeniny pro určité typy výrobků [21].

Dle Evropské agentury pro bezpečnost potravin (EFSA) je stanovený tolerovatelný denní příjem 0,05 mg/kg tělesné hmotnosti. Naproti tomu Kanada, jako první země, přijala opatření k regulaci BPA, když zakázala prodej, dovoz a reklamu na dětské plastové láhve s obsahem BPA. Nedávno ho dokonce přidala na oficiální seznam toxických látek. Následně podobná opatření přijalo několik dalších zemí. V Evropě zakázalo BPA v kojeneckých lahvích první Dánsko, podobný zákaz přijal i francouzský parlament. Švédsko a Rakousko oznámilo, že v případě nepřijetí rychlého zákazu v rámci EU podniknou individuální kroky směřující k regulaci této nebezpečné chemikálie na národní úrovni. Od 1. června 2011 se v Evropské unii nesmějí prodávat kojenecké láhve s obsahem BPA. V dubnu 2012 švédská vláda ohlásila zákaz použití BPA v obalech potravin určených dětem do 3 let věku [6, 22].

2.2 Metody stanovení BPA

2.2.1 Izolace analytů

Vlastnímu analytickému stanovení předchází extrakce vzorku vhodným rozpouštědlem a přečištění extraktu. Obecně se pro izolaci analytů z kapalné matrice používají následující metody:

Extrakce kapalina–pevná fáze

- Extrakce tuhou fází (SPE)
- Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Extrakce kapalina–kapalina (LLE)

- Standardní uspořádání
- Mikroextrakce

Extrakce kapalina–plyn

- Statické uspořádání (Head–Space)
- dynamické uspořádání (Stripping)

K izolaci BPA a jeho derivátů je využívána extrakce kapalina-kapalina (LLE), extrakce tuhou fází (SPE) a mikroextrakce tuhou fází (SPME) [23,24].

2.2.1.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Extrakce kapalina-kapalina je oblíbenou technikou izolace analytu pro svoje snadné provedení. Při této metodě většinou dochází k extrakci složky z vodného roztoku do organického rozpouštědla, které je s vodou nemísitelné [24].

Příkladem využití této metody je studie popisující stanovení BPA v odpadní vodě metodou plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií po extrakci kapalina-kapalina. 500 ml vzorku vody bylo po přidavku 80 g NaCl mícháno, dokud se NaCl nerozpustil. Roztok byl přenesen do dělicí nálevky a bylo přidáno 5 ml chloroformu. Směs byla mechanicky protřepávána jednu minutu při 1 700 otáčkách za minutu. Organická fáze byla zachycena do skleněné nálevky naplněné bezvodým síranem sodným a vzorek byl odpařen téměř do sucha na rotační vakuové odparce při 40 °C. Vzorek byl přenesen do mikrovialky, která byla po odpaření do sucha pod proudem dusíku uzavřena. Následovala derivatizace a analýza GC/MS [25].

2.2.1.2 Extrakce tuhou fází (SPE)

SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těžkých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a odstranění nežádoucích látek, rušících následná analytická stanovení [26].

Extrakce tuhou fází je založena na použití pevné fáze absorbentů, přičemž pro stanovení BPA se obvykle používá adsorbent na bázi oktadecylsilikagelu [24].

Provedení SPE se skládá z pěti kroků (znázorněno také na obrázku 5):

- Předúprava (kondicionace) kolonky - příprava kolonky na reprodukovatelnou interakci složek vzorku s pevnou fází, která je umožněna solvatací pevné fáze.
- Dávkování vzorku - dochází ke specifickým reakcím látek s pevnou fází. Žádaná skupina látek se selektivně sorbuje a matrice prochází volně kolonkou.
- Promývání - propláchnutí kolonky vhodným rozpouštědlem, vede k vymytí zbytků matrice vzorku a případně i slaběji zadržovaných interferentů z kolonky, žádané látky zůstávají sorbovány na pevné fází.
- Sušení - pokud se použité eluční rozpouštědlo liší od promývacího roztoku, kolonku je třeba vysušit proudem inertního plynu, nejčastěji dusíku.
- Eluce (vymývání) - promytí kolonky elučním rozpouštědlem, dochází k selektivní desorpci žádaných látek z pevné fáze a k jejich vymytí z kolonky. Eluát je jímán pro další analýzu.

Hlavními výhodami SPE ve srovnání s LLE je nižší spotřeba rozpouštědel, nižší potřebný objem vzorku a snadná automatizace [27].

Příkladem izolace BPA pomocí SPE může být publikovaná studie stanovení endokrinních disruptorů metodou GC/MS po extrakci tuhou fází. Pro SPE byly použity kolony se sorbentem na bázi oktadecylsilikagelu a následující podmínky extrakce:

Kondicionace kolony: 2 x 3,5 ml methanolu, 2 x 3 ml Milli-Q vody

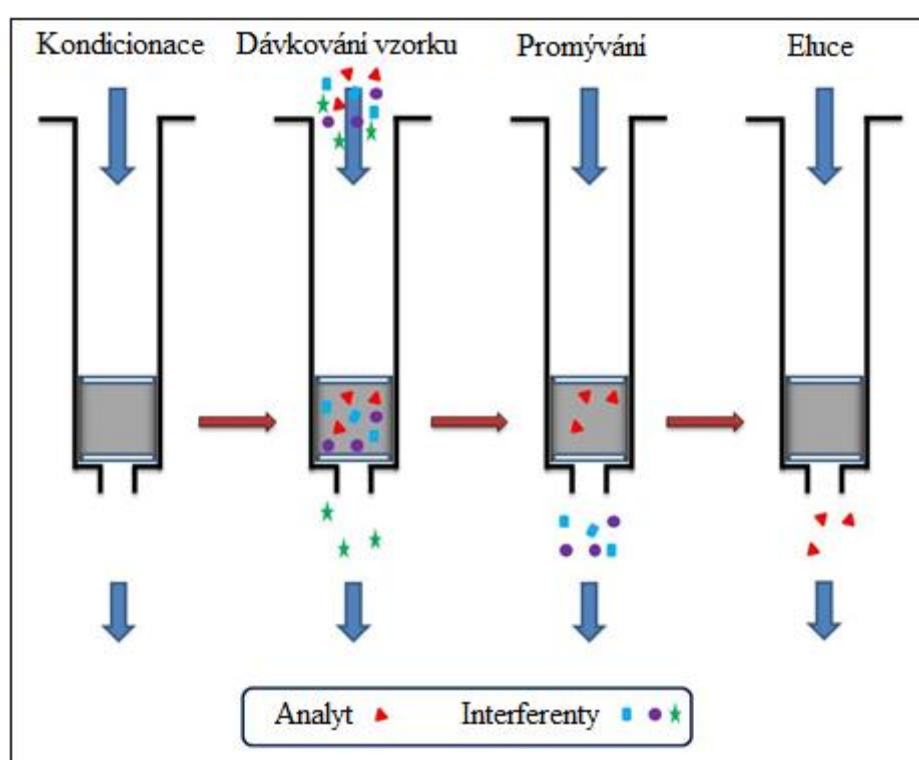
Aplikace vzorku: 100 ml vzorku vody

Promytí: 4 x 2,5 ml Milli-Q vody

Sušení: vakuum 60 minut

Eluce: 4 x 2 ml DCM – hexan

Vzorek byl dále odpařen do sucha, následovala derivatizace a analýza metodou GC/MS [28].



Obr. 5 Postup extrakce tuhou fází (SPE) [29]

2.2.1.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Mikroextrakce tuhou fází je další oblíbená metoda v poslední době používaná pro analýzu BPA [24].

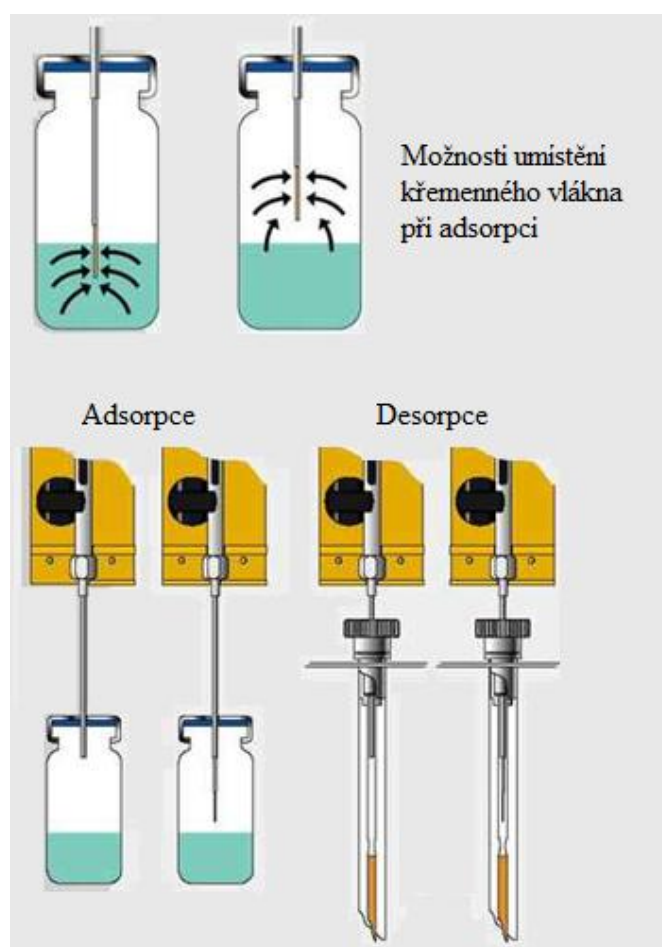
Principem je expozice malého množství sběrné fáze nadbytkem vzorku. Dochází k sorpci analytů na SPME vlákno do dosažení rovnováhy. Množství extrahovaného analytu závisí na hodnotě rozdělovacího koeficientu.

Tuto metodu lze použít ve spojení s plynovou a kapalinovou chromatografií i pro nízké koncentrace analytů.

Postup SPME je znázorněn na obrázku 6. Křemenné vlákno je pokryto vrstvou sběrné fáze. Je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v duté ocelové jehle, která vlákno chrání

před mechanickým poškozením. Při sorpci propíchne jehla septum v zátce zkumavky a vlákno se vysune buď do kapalného vzorku (DI – Direct Immersion), nebo do rovnovážné plynné fáze nad jeho hladinou (HS – Head-Space). Po dosažení rovnováhy se vlákno opět zasune dovnitř jehly a je vytaženo ze zkumavky se vzorkem. Jehla je poté zavedena do injektoru plynového chromatografu, kde je analyt tepelně desorbován do proudu nosného plynu postupujícího na GC kolonu. Při použití adaptéru SPME-HPLC se analyt eluuje mobilní fází a postupuje na kolonu kapalinového chromatografu [30].

Například ve studii zaměřené na stanovení BPA ve vzorcích vody a mléka metodou GC/MS po derivatizaci a izolaci pomocí SPME byly tyto vzorky derivatizovány ethylchlorformiátem v přítomnosti pyridinu po dobu 20 s při pokojové teplotě. Vzniklé nepolární deriváty byly extrahovány metodou SPME použitím polydimethylsiloxanových vláken s tloušťkou vrstvy 100 μm . Následovala analýza pomocí GC/MS [31].



Obr. 6 Postup mikroextrakce tuhou fází (SPME) [32]

2.2.2 Finální analýza BPA

Pro stanovení alkylfenolů a BPA jsou nejpoužívanějšími instrumentálními metodami obecně chromatografické metody (plynová, kapalinová chromatografie) spojené s hmotnostní detekcí. Jsou také využívány chromatografické metody s fluorescenční nebo DAD detekcí, v tomto případě však není dosaženo potřebných limitů detekce a kvantifikace. Nejpoužívanější ionizační technika u hmotnostní detekce je ionizace elektrosprejem v negativním modu.

U metody LC-MS/MS může být právě ionizace analytů elektrosprejem nedostačující a může být potlačena vlivem přítomnosti mnoha látek v komplexní matici [33,34,35].

Další možností je metoda UPLC (Ultra-Performance Liquid Chromatography) s tandemovou hmotnostní detekcí UPLC-MS/MS (ACQuity, Quattro Premier Micromass, Waters) [36].

Velmi citlivou metodou stanovení je ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, která patří mezi nejpoužívanější imunologické metody. Díky vývoji v posledních letech se tato metoda začala používat také pro detekci BPA [37].

Norma ČSN EN ISO 18857-2 (757568) (Kvalita vod - Stanovení vybraných alkylfenolů - Část 2: Stanovení alkylfenolů, jejich ethoxylátů a BPA v nefiltrovaných vzorcích plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí po extrakci tuhou fází a derivatizací) specifikuje metodu stanovení vybraných alkylfenolů, jejich ethoxylátů a BPA v nefiltrovaných vzorcích pitné, podzemní, povrchové a odpadní vody pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí po extrakci tuhou fází a derivatizací. Metoda je použitelná v pracovním rozsahu od 0,05 g/l do 0,2 g/l pro BPA. V závislosti na matici je tato metoda použitelná také pro odpadní vody v pracovním rozsahu od 0,1 g/l do 50 g/l BPA [38].

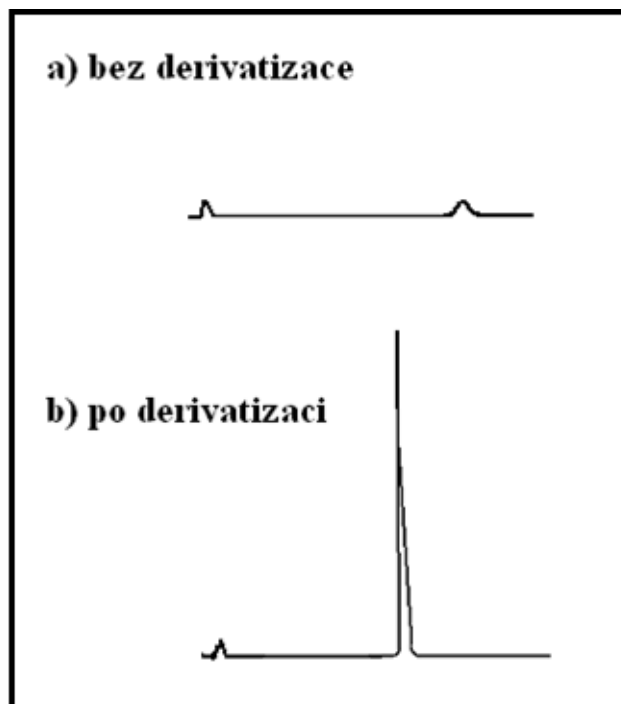
2.2.2.1 Derivatizace BPA

Derivatizace je cílená chemická reakce pro určitý typ sloučenin a určitý typ detekce v GC analýze za účelem zlepšení chromatografického chování, snížení polarit analytů blokováním polárních funkčních skupin a snížení limitu detekce při cílené stopové analýze zvýšením odezvy detektoru (viz obrázek 7). Rovněž může sloužit ke confirmaci identifikace domnělého analytu po předběžné analýze převedením na vhodný derivát a následnou nezávislou analýzou [39].

V tabulce č. 1 jsou příklady typických derivátů vybraných sloučenin.

Tabulka č. 1 Deriváty vybraných sloučenin [39]

Původní analyt	Typické deriváty
Kyselina	silyl, alkyl, halogenalkyl
Alkohol, fenol	silyl, acetyl, propionyl, butyryl, halogenacetyl
Amin	acetyl, halogenacetyl
Vicinální dioly, glykol	cyklické boronáty

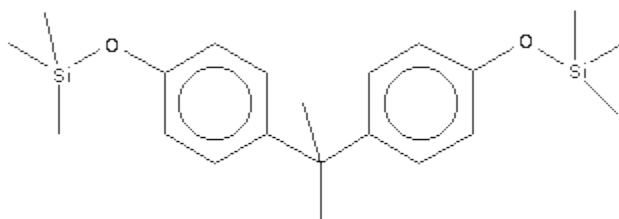


Obr. 7 Porovnání intenzity odezvy v hmotnostním spektru analytu bez derivatizace a s derivatizací [39]

Před analýzou plynovou chromatografií bývá BPA derivatizován N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamidem (BTSFA). Jeho trimethylsilylová skupina reaguje s hydroxylovou skupinou analytu. Vzniká tepelně stabilní trimethylsilylderivát 2,2-bis[(4-trimethylsiloxy)fenyl]propan. Do BTSFA se přidává 1 % trimethylchlorsilanu TMCS, sloužícího ke zvýšení reaktivity BSTFA. Místo BSTFA se také používá silylační činidlo N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) [28, 40, 41].

Derivát 2,2-bis[(4-trimethylsiloxy)fenyl]propan (obrázek 8) má tyto obecné vlastnosti:

- Sumární vzorec: $C_{21}H_{32}O_2Si_2$
- Molekulová hmotnost: 372,6486
- CAS registrační číslo: 4387-16-0

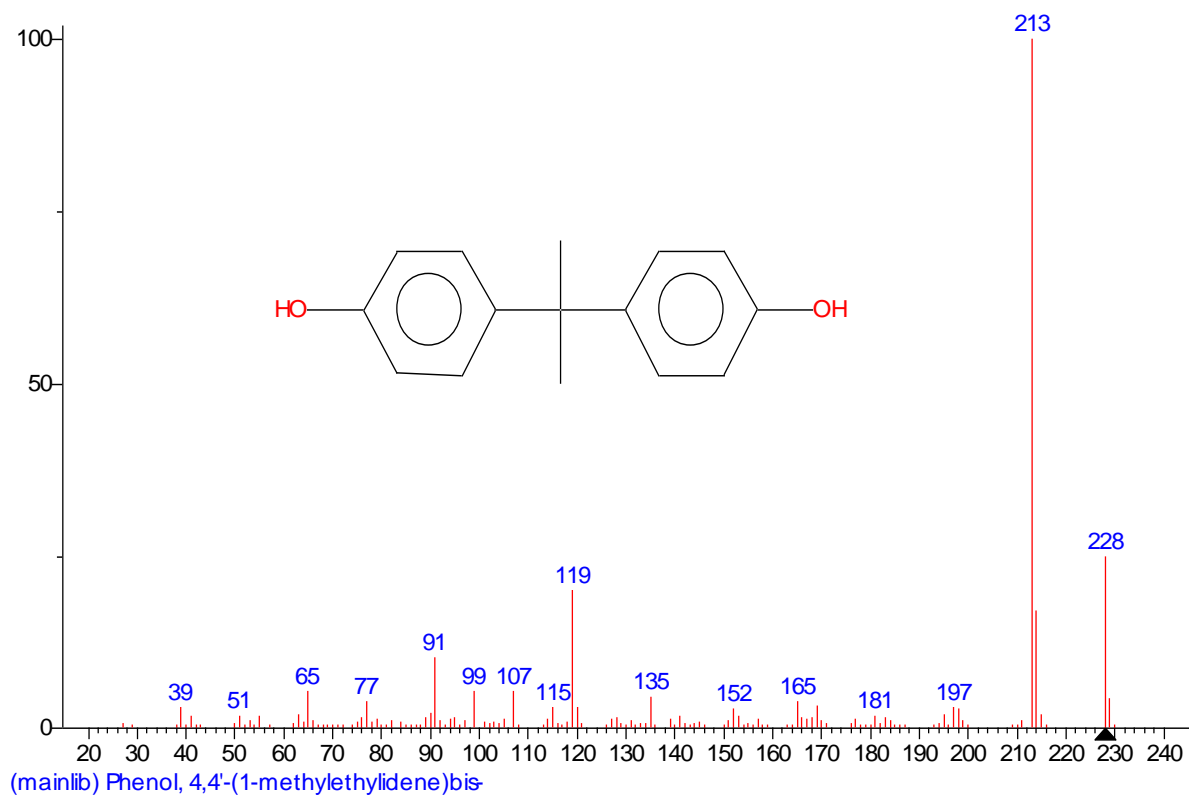


Obr. 8 Chemická struktura 2,2-bis[(4-trimethylsiloxy)fenyl]propanu [42]

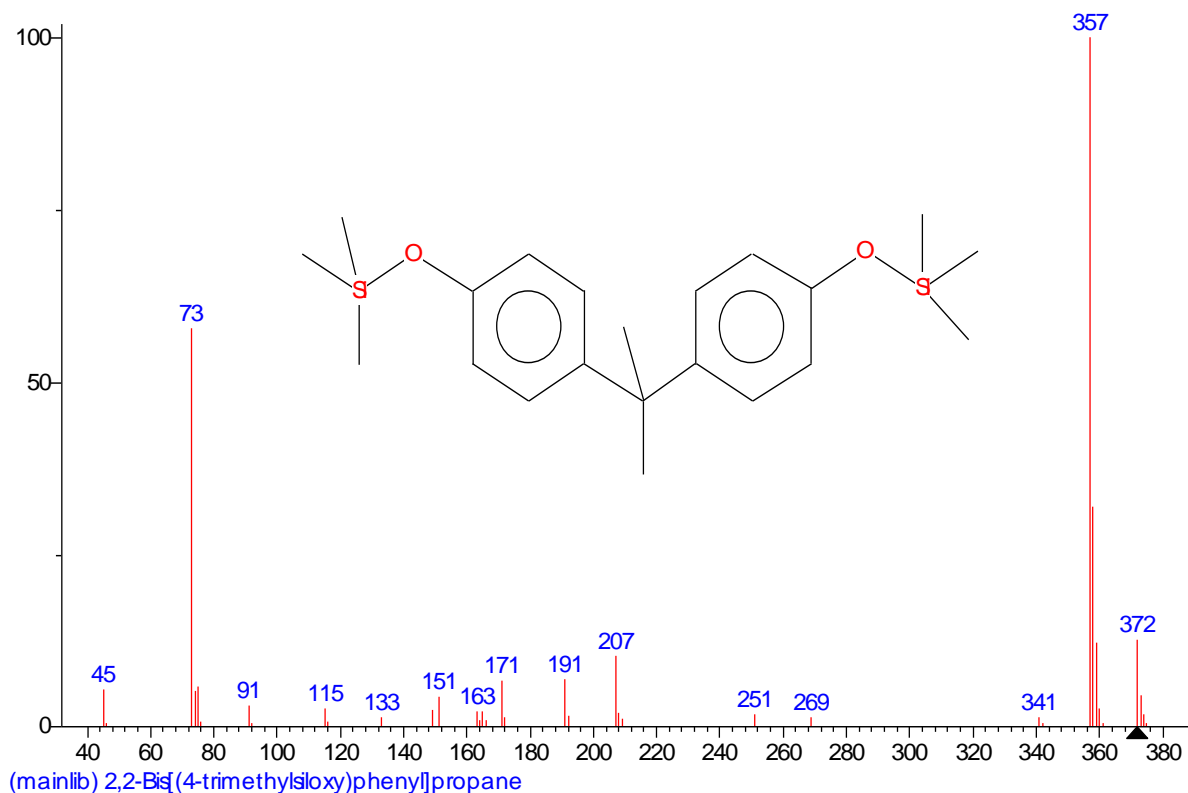
Hmotnostní spektra BPA a jeho derivátu 2,2-bis[(4-trimethylsiloxy)fenyl]propanu s jejich typickými m/z po fragmentaci molekuly jsou znázorněna na obrázcích 9 a 10.

Výsledek fragmentace závisí na molekulární struktuře, vazebných energiích a elektronických stavech vznikajících iontů. Nejpravděpodobnější je odtržení elektronu

s nejnižší ionizační energií. Pravděpodobnost ionizace roste v pořadí σ -, π - a n-elektrony, přičemž pravděpodobným místem lokalizace kladného náboje jsou násobné vazby a heteroatomy s nepárovými elektrony. Mezi molekulárním iontem a fragmenty iontů existují logické ztráty odštěpitelných fragmentů [39].



Obr. 9 Hmotnostní spektrum BPA [43]



Obr. 10 Hmotnostní spektrum 2,2-bis[4-(trimethylsilyloxy)fenyl]propanu[44]

2.2.2.2 Kapalinová chromatografie (LC)

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Čas, který stráví analyt v mobilní nebo stacionární fází, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Podle uspořádání chromatografického systému rozlišujeme kapalinovou chromatografii v plošném a kolonovém uspořádání. LC je vhodná i pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin (až 85 % všech chromatografovatelných sloučenin) [45, 46].

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) je jednou z nejčastěji používaných separačních metod. Společným znakem všech technik HPLC je použití kapalně mobilní fáze, účinných kolon a vysokotlakých čerpadel [47].

Kapalinový chromatograf má následující součásti:

- Zásobník mobilní fáze
- Odplyňovač
- Programování gradientu
- Čerpadlo
- Dávkovací zařízení
- Kolona, příp. s předkolonou
- Detektor
- Řídící počítač

Kapalina se do kolony čerpá bezpulzním čerpadlem, nejčastěji s dvěma písty zapojenými sériově [47].

Nejčastější dávkovače jsou obtokové, v nichž je vzorek umístěn v kapilární smyčce kalibrovaného objemu, zařazované do toku mobilní fáze vícecestným ventilem.

K vlastnímu rozdělení analyzované směsi dochází na koloně. Měřítkem kvality kolony je počet teoretických pater n (respektive výškový ekvivalent teoretického patra H). Pláště kolon se vyrábějí nejčastěji z nerezové oceli. Z hlediska účinnosti kolon jsou výhodné malé částice sorbentu, v současnosti se používají částičky o průměru $2\ \mu\text{m}$ i méně. Na trhu je dostupný široký sortiment náplní [47].

Pro výběr mobilní fáze jsou teoretickým podkladem volby hodnoty polarita a selektivity rozpouštědel. Prakticky je třeba brát v úvahu i jejich viskozitu, bod varu, mísitelnost, podle použitého detektoru též index lomu, hranici absorpce UV záření, apod.

Detektor je zařízení, které převádí množství složky na elektrický signál (odezvu) [47].

Tato práce je zaměřena na stanovení BPA metodou plynové chromatografie, metoda kapalinové chromatografie je tu tedy zmíněna pro úplnost.

2.2.2.3 Plynová chromatografie (GC)

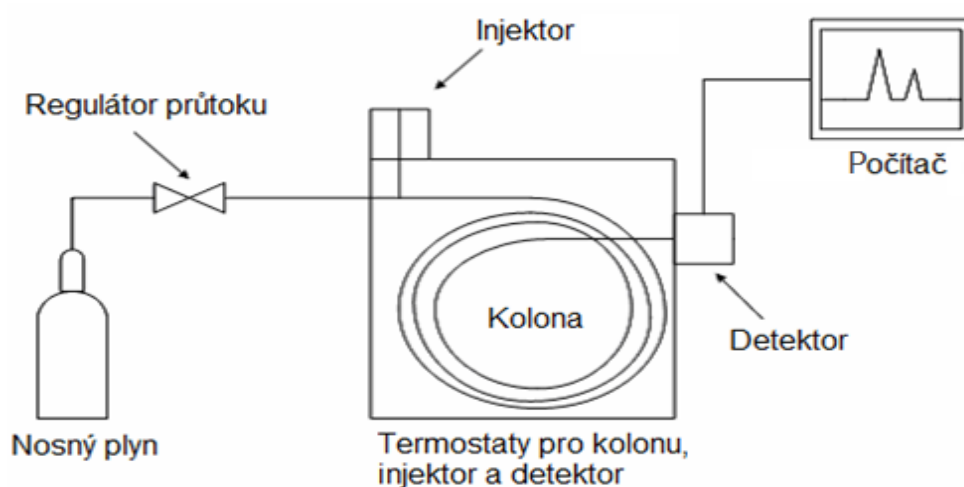
Plynová chromatografie (Gas Chromatography, GC) je typ separační metody, kdy se od sebe oddělují složky obsažené ve vzorku, které mohou být převedeny do plynné fáze, aniž by došlo k jejich rozkladu. Je nejčastější metodou pro analýzu volatilních a semivolatilních látek. Mezi hlavní výhody této techniky patří jednoduché a rychlé provedení analýzy, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebné k analýze [48, 49].

Principem je rozdělení látek mezi mobilní a stacionární fází. Koncentrace těchto látek je definována distribuční konstantou K_D (popisuje rovnováhu mezi koncentracemi analytu v obou fázích) charakterizovanou rovnicí č. 1:

$$K_D = c_s / c_m \quad (1)$$

kde c_s a c_m jsou rovnovážné koncentrace složky ve stacionární a mobilní fázi.

Obrázek 11 zachycuje schematické uspořádání plynového chromatografu [49].



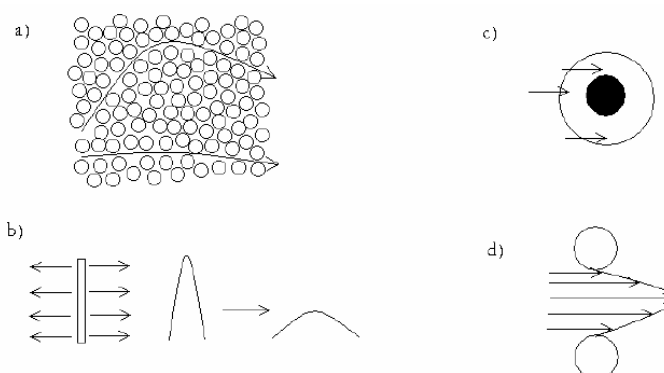
Obr. 11 Schéma plynového chromatografu [48]

2.2.2.3.1 Nosný plyn

U plynové chromatografie je vzorek dávkován přímo do nosného plynu, kde je následně transportován separační kolonou. Mobilní fází je zde plyn. Jako nosné plyny se nejčastěji používají vodík, dusík, helium a argon. Při volbě nosného plynu se uvažují následující faktory: viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, typ používaného detektoru a cena plynu [48].

Průtok mobilní fáze musí být optimalizován tak, aby se dosáhlo co nejlepšího rozdělení látek na koloně, tj. nejmenšího rozšíření zón separovaných látek. Čtyři hlavní děje (viz obrázek 12), které se podílejí na rozšiřování zón během průchodu kolonou, jsou [48]:

- vířivá (turbulentní) difúze – různé molekuly musí při průchodu náplňovou kolonou v důsledku nepravidelných kanálků mezi částicemi náplně urazit různé vzdálenosti
- molekulární difúze – molekuly putují z místa o vyšší koncentraci do místa o nižší koncentraci, po i proti směru proudění mobilní fáze
- odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi – různé molekuly difundují různě hluboko do vrstvy stacionární fáze
- odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi – rychlostní profil mobilní fáze je parabolický



Obr. 12 Hlavní mechanismy rozšiřování zón analytu na chromatografické koloně [48]

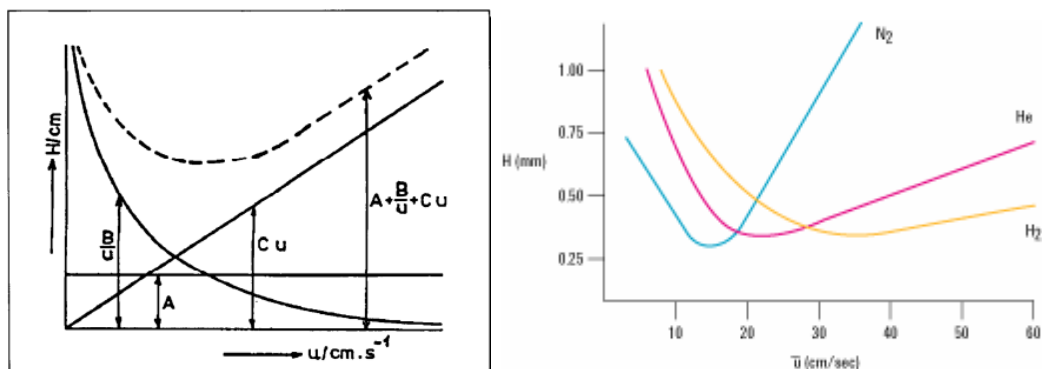
Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na průměrné lineární rychlosti mobilní fáze (u) pro daný typ nosného plynu popisuje van Deemterova rovnice (rovnice č. 2):

$$H = A + B/u + C \cdot u \quad (2)$$

kde konstanta A vyjadřuje příspěvek vířivé (turbulentní) difúze, B příspěvek podélné difúze a C příspěvek odporu proti přenosu hmoty. Pro plynovou chromatografii na kapilárních kolonách platí Golayova rovnice (rovnice 2a):

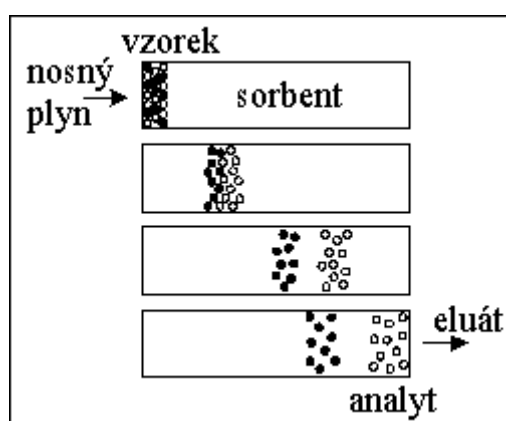
$$H = \frac{B}{u} + C_S \cdot u + C_M \cdot u \quad (2a)$$

kde C_S a C_M jsou příspěvky odporu vůči přenosu hmoty ve stacionární a mobilní fázi. Obrázek 13 zobrazuje van Deemterovu křivku s jednotlivými příspěvky a Golayovy křivky pro nejčastěji používané nosné plyny v plynové chromatografii [48].



Obr. 13 Van Deemterova křivka s příspěvky turbulentní (A) a molekulární (B) difuze a odporu vůči převodu hmoty a Golayovy křivky pro vybrané nosné plyny [48, 50]

Vzorek je v dávkovači převeden do plynné fáze. Dále prochází kolonou, v níž dochází k separaci jednotlivých složek (viz obrázek 14). Složky, které opouštějí kolonu, jsou detekovány pomocí detektoru, jenž určuje kvalitativní a po kalibraci i kvantitativní zastoupení jednotlivých složek [51].



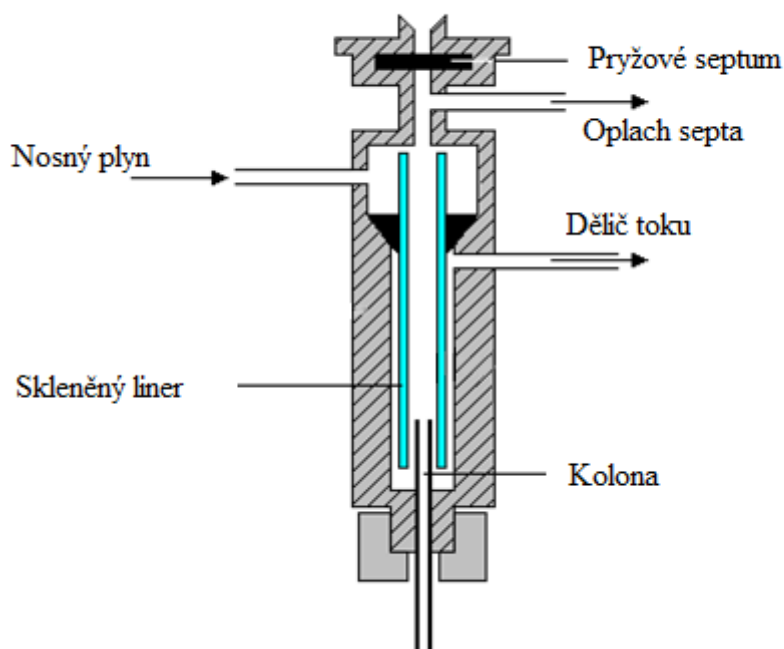
Obr. 14 Separace v GC [52]

2.2.2.3.2 Regulátor tlaku a průtoku

Regulátory tlaku a průtoku jsou elektronická regulační zařízení, sloužící k ovládní průtoku a tlaku nosného plynu. Regulátor průtoku zaručuje požadovaný průtok plynu kolonou a detektorem bez ohledu na typ nosného plynu, teplotu a rozměry kolony, a to prostřednictvím nastavení tlaku na vstupu kolony podle viskozity plynu, vnitřního průměru kolony a délky kolony [48].

2.2.2.3.3 Injektor

K zavedení vzorku do proudu nosného plynu slouží injektor. Technika dávkování musí zajistit optimální tvar nástřikové zóny tak aby bylo možno plně využít separační účinnosti kolony. Nástřik látky se nejčastěji provádí pomocí speciální injekční stříkačky přes septum, které odděluje vnitřní část injektoru od vnějšího prostoru. K rychlému odpaření vzorku pomocí vysoké teploty a ke správnému promíchání par vzorku s nosným plynem dochází v lineru, skleněné vložce, která je součástí injektoru. Dělič toku (splitter) umožňuje vést jen část odpařeného vzorku na kolonu, podle nastaveného dělicího poměru (split ratio). Při stopové analýze se používá technika nástřiku bezděličová (splitless injection). Před nástřikem dojde k uzavření dělice toku a na kolonu vstupuje celý dávkovaný objem vzorku. Na obrázku 15 je zobrazeno možné schéma injektoru plynového chromatografu [48].



Obr. 15 Schéma injektoru plynového chromatografu [53]

2.2.2.3.4 Kolona

Kolony se používají dvojího typu, náplňové a kapilární (viz obrázek 16).

Náplňové kolony jsou trubice o vnitřním průměru většinou 2 až 5 mm a délce od desítek centimetrů do několika metrů, obsahující adsorbent nebo nosič, který je pokrytý kapalnou stacionární fází. Zhotovují se z nerezové oceli nebo skla a mají vyšší kapacitu než kapilární kolony. Adsorbentem je silikagel, grafitizované saze, případně oxid hlinitý [54].

Nosičem v náplňových kolonách pro rozdělovací plynovou chromatografii je nejčastěji upravená křemelina a stacionární fáze se volí podle povahy analyzovaného vzorku. Pro nepolární látky se používá polydimethylsiloxan, pro mírně polární fenyl-dimethylsiloxan

(5 - 35 % fenylu), pro středně polární fenyldimethylsiloxan (75 % fenylu) a pro polární Carbowax (polyethylenglykol různé molekulové hmotnosti, PEG) [54].

Kapilární kolony se zhotovují z oxidu křemičitého velmi vysoké čistoty potaženého polyimidem pro udržení pružnosti. Jejich vnitřní průměr je nejčastěji od 0,1 do 0,53 mm, délka se může pohybovat od několika do stovek metrů. Stacionární fáze je zde nanášena na vnitřní stěně kapiláry. Účinnost je kolem 1 000 až 3 000 teoretických pater na 1 m [54].



Obr. 16 Náplňová a kapilární kolona [53]

Kolona je umístěna v termostatu, který je temperován na určitou teplotu. Teplota je důležitá proměnná v plynové chromatografii. Pokud je teplota kolony během analýzy vzorku konstantní, jedná se o isotermální analýzu. Pro analýzu multikomponentních směsí látek s rozdílnými body varu je vhodné použít teplotního programu, kdy se teplota kolony během analýzy bude měnit. Výhodou použití teplotního gradientu je zlepšení tvaru chromatografických piků (zúžení piků, vyšší poměr signál/šum), zlepšení rozlišení a výrazné zkrácení doby analýzy [48].

2.2.2.3.5 Detektor

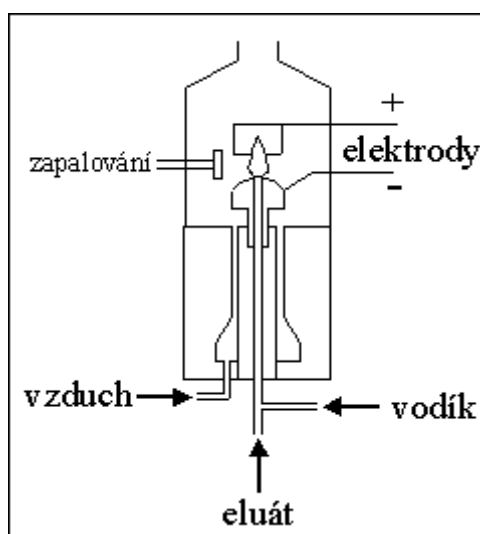
Z kolony je nosný plyn veden do detektoru, který následně reaguje na přítomnost analytu a signál je zaznamenáván. Podmínkou efektivní funkce detektoru je dostatečná citlivost s možností dosahovat dostatečně nízké detekční limity pro určité analyty. Důležitá je rovněž vysoká selektivita pro stanovované analyty [46, 54].

Teplota detektoru by měla být vyšší než je teplota plynů vycházejících z kolony, aby se zabránilo kondenzaci látek na stěnách detektoru. V plynové chromatografii se využívá několik typů detektorů.

Tepelně vodivostní detektor (TCD, Thermal Conductivity Detector) obsahuje zahřívané odporové vlákno. To se ochlazuje protékajícím plynem a tím se mění jeho elektrický odpor. Průchod látky detektorem se projeví změnou tepelné kapacity proudícího plynu a tudíž i změnou teploty odporového vlákna, což způsobí změnu jeho elektrického odporu, která se měří. V praxi se vedle sebe zapojují dvě měrné cely s vlákny, do jedné se přivádí čistý nosný plyn, do druhé eluát. Jedná se o univerzální typ detektoru s širokým rozmezím linearit odezvy detektoru [48, 49].

U **plamenového ionizačního detektoru** (FID, Flame Ionization Detector) je eluát z chromatografické kolony zaváděn do plamínku vytvářeného hořením vodíku ve vzduchu,

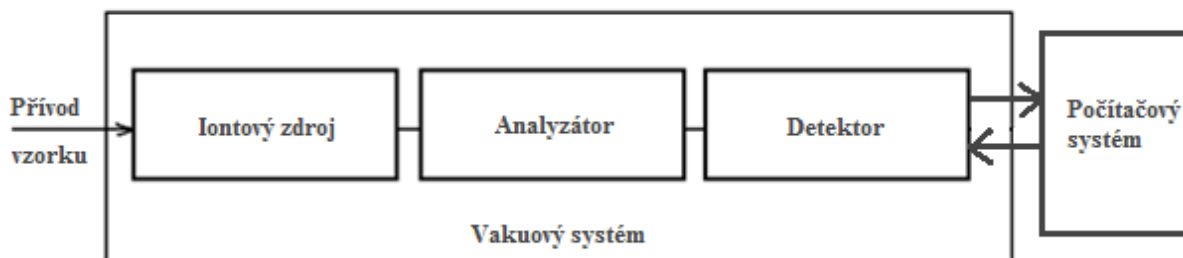
kde probíhají procesy vedoucí ke vzniku iontů. Detektor se skládá z ocelové trysky, do které vstupuje směs nosného plynu s přídavkem paliva (vodíku) a přídavného plynu (nejčastěji dusík). V proudu vzduchu na špičce mikrohořáku dochází ke spálení této směsi za vzniku iontů, které se detekují na polarizovaných elektrodách (viz obrázek 17). FID poskytuje odezvu téměř na všechny organické látky, pro uhlovodíky je odezva úměrná počtu uhlíkových atomů v molekule. Nelze ho použít pro většinu anorganických plynů a par a některé organické látky (formaldehyd, chlorid uhličitý). Nastavení průtoku vodíku a vzduchu musí být provedeno i s ohledem na nosný plyn. Maximální linearitu a citlivosti se dosahuje při optimálním poměru přídavný plyn/vodík. Následkem odchylek od optimálního poměru je nestabilní plamen a velký šum [48, 49].



Obr. 17 Schéma plamenově ionizačního detektoru FID [53]

Detektor elektronového záchytu (ECD, Electron Capture Detector) je selektivním ionizačním detektorem, který poskytuje odezvu na sloučeniny obsahující elektronegativní atomy, a to zejména halogeny. Přídavný plyn (dusík) je vlivem β záření v cele detektoru ionizován, čímž vznikají kationty N_2^+ a uvolňují se pomalé (termální) elektrony. Mezi elektrodami v cele detektoru tak prochází konstantní proud. Elektronegativní atomy halogenu zachytávají pomalé elektrony a tím dochází ke snížení ionizačního proudu. Zdrojem ionizujícího β záření je v ECD 3H nebo ^{63}Ni . Nejmenší detekované množství je o několik řádů nižší než u plamenového ionizačního detektoru [48, 49].

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně chemická metoda, která slouží k určování hmotnosti atomů, molekul a jejich fragmentů po převedení na ionty kladně nebo záporně nabitě. Schéma hmotnostního spektrometru je znázorněno na obrázku 18 [39].



Obr. 18 Blokové schéma hmotnostního spektrometru [39]

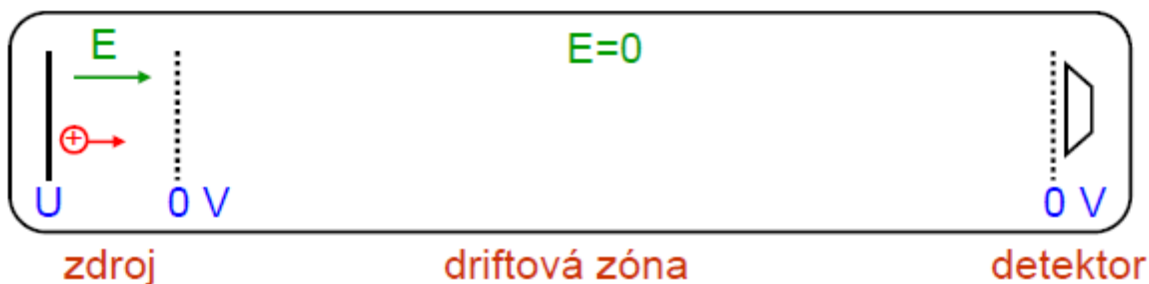
Do ionizovaného stavu převádí látky iontový zdroj. Ionizační techniky se dělí na měkké a tvrdé. Při měkkých ionizačních technikách je předaná energie malá a pravděpodobnost fragmentace primárně vzniklého iontu je malá, zatímco u tvrdých ionizačních technik energie k fragmentaci postačuje.

Příkladem tvrdé ionizační techniky je elektronová ionizace, která byla použita v této práci při analýze BPA. Jedná se o ionizaci svazkem urychlených elektronů, které jsou emitovány žhaveným vláknem (W nebo Re) a přitahovány protilehlou elektrodou. Standardní kinetická energie ionizujících elektronů je 70 eV. Vzorek je přiváděn kolmo k proudu elektronů. Přiblížením emitovaného elektronu k elektronovému obalu neutrální molekuly dojde k vyražení elektronu z obalu molekuly, čímž dojde k ionizaci a následné fragmentaci molekuly přebytkem energie. Vzniklé ionty jsou vytěšňovací elektrodou (repelerem) vypuzeny z iontového zdroje, svazek iontů je dále zaostřen a urychlen do hmotnostního analyzátoru [55].

Analyzátoři slouží k separaci iontů na základě poměru m/z . Používají se tyto typy analyzátorů [55]:

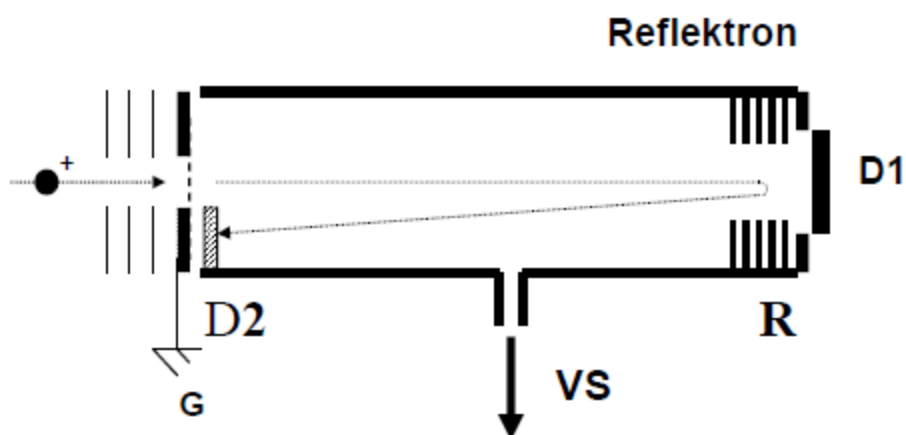
- Magnetický analyzátor (B)
- Elektrostatický analyzátor (ESA)
- Kvadrupólový analyzátor (Q)
- Iontová past (IT)
- Průletový analyzátor (TOF)
- Iontová cyklotronová rezonance (ICR)
- Sektorový analyzátor s dvojitou fokusací (HRMS)

U analyzátoru doby letu (TOF - Time-Of-Flight), který je znázorněn na obrázku 19, jsou ionty urychleny napěťovým pulsem na stejnou kinetickou energii a vstupují do letové trubice (oblast bez pole), kde letí různou rychlostí v závislosti na jejich m/z a dopadají na detektor v různém čase. Ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii se pohybují rychleji, takže se rychleji dostanou na detektor.



Obr. 19 Analyzátor Time-of-Flight (TOF) [55]

Na konci letové trubice může být umístěn reflektron (viz obrázek 20). Reflektron odráží ionty elektrostatickým polem zpět na sekundární detektor, čímž se prodlouží dráha letu alepší se tak separace iontů. Čím delší je dráha letu, tím vyššího rozlišení může být dosaženo [55, 56, 57].



Obr. 20 Schéma analyzátoru Time-of-Flight (TOF) s reflektronem [55]

Měření spekter je velice rychlé a hmotnostní rozsah m/z není teoreticky omezen, prakticky záleží na konstrukci a určení přístroje, v němž je tento analyzátor využíván [39, 55, 56].

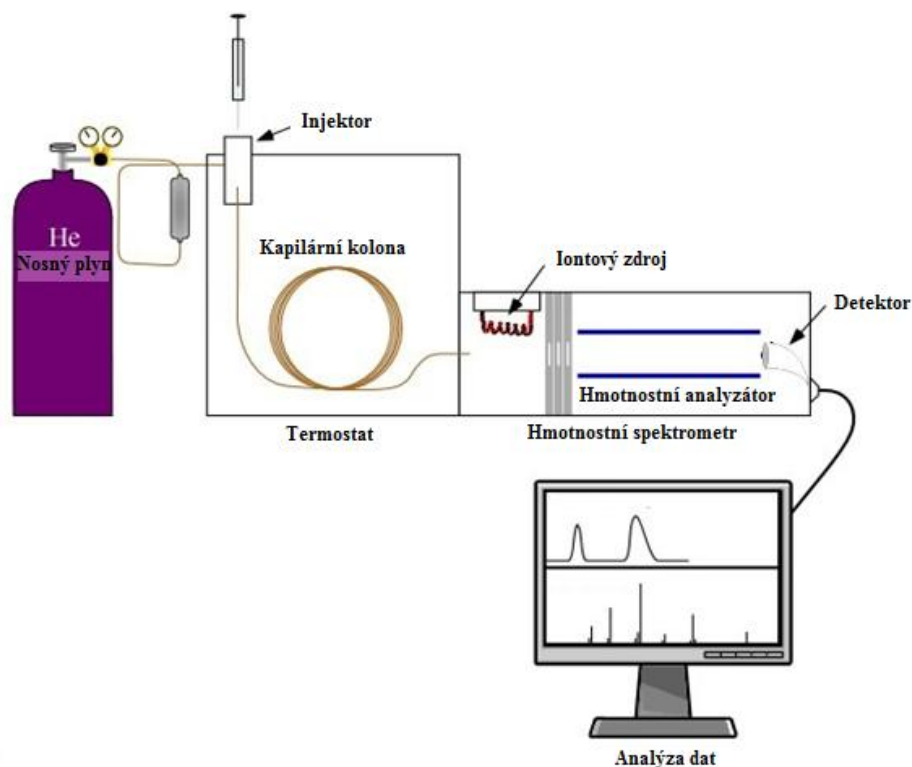
Hmotnostní spektrometr, jako detektor u separačních technik, může pracovat v režimu SCAN nebo SIM.

- SCAN – jde o snímání spekter ve zvoleném rozsahu m/z s nastavenou frekvencí. Limit detekce je řádově 10 ng/nástřík. Při tomto způsobu registrace lze získat:
 - záznam závislosti celkového iontového proudu na čase (TIC) – odpovídá nespecifická detekce všech iontů analyzovaných hmotnostním spektrometrem
 - závislost vybrané hodnoty m/z na čase – odpovídá selektivní detekci vybraných látek
 - hmotnostní spektrum v libovolném zvoleném čase – může být použito k identifikaci nebo potvrzení identity separovaných sloučenin

- SIM – Selected Ion Monitoring – analyzátor je po celou dobu nastaven na průchod vybraného fragmentu. Používá se pro cílené analýzy specifikovaných látek. Limit detekce je výrazně nižší než v režimu SCAN.

Proud oddělených iontů je směřován na detektor, kde vzniká signál úměrný počtu dopadajících iontů. Ten je převeden do počítače a pomocí softwaru zpracován do podoby hmotnostních spekter [39].

Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (viz obrázek 21) představuje kombinaci vysoce účinné separační schopnosti plynové chromatografie s identifikačními možnostmi hmotnostní spektrometrie. V současné době patří mezi rutinní metody. Používá se pro identifikaci širokého spektra látek v rámci stanovovaného vzorku. Oblast použití je velice široká - od analýzy drog, výbušnin, až po identifikaci a stanovení složek neznámých vzorků [51, 56].



Obr. 21 Schéma GC/MS [58]

V současnosti, kdy se v plynové chromatografii využívají takřka výhradně kapilární kolony, je spojení GC a MS přímé – konec kapilární kolony je zaveden přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru [50, 57].

2.2.2.3.6 Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení chromatogramu

Produktem každé GC-MS analýzy v režimu SCAN je chromatogram a hmotnostní spektrum každé složky vzniklé separací v GC. Chromatogram pak slouží ke kvantitativní analýze a hmotnostní spektra ke kvalitativní analýze analytů. Jsou-li při analýze sledovány pouze vybrané hmotnosti určitých iontů, nazývá se chromatogram fragmentogramem [46, 59, 60].

Ze získaných chromatogramů lze vyhodnotit retenční časy jednotlivých píků, plochy a výšky píku atd.

Proces separace popisuje několik veličin [61]:

- *Retenční objem V_r* : objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony
- *Retenční čas t_r* : čas od nástřiku po eluci maxima příslušného píku
- *Mrtvý objem kolony V_M* : objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony
- *Mrtvý čas kolony t_M* : retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze
- *Redukovaný retenční čas t'_r* : čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi
- Důležitou charakteristikou je tzv. *retenční faktor k_i* , který naznačuje, do jaké míry je složka i zadržována na koloně během separace (rovnice č. 3).

$$k_i = (t_r - t_m) / t_m \quad (3)$$

Nositelem kvalitativní informace jsou eluční parametry t_R a V_R . Eluční čas neznámého analytu se porovnává s elučním časem standardu za stejných podmínek [61].

Kvantitativní analýza vychází z toho, že plocha vymezená píkem nad základní linií nebo výška píku je úměrná koncentraci látky [61].

Kvalita kvantitativní analýzy je především ovlivněna přípravou vzorku, správnou funkcí přístroje a kvalitou zpracování dat, s čímž také souvisí správná volba jedné z následujících kalibračních metod:

- metoda vnitřní normalizace
- metoda absolutní kalibrace (vnějšího standardu)
- metoda vnitřního standardu
- metoda standardního přídatku

Pro tuto diplomovou práci byla zvolena metoda absolutní kalibrace. Touto metodou se určuje koncentrace nebo množství látky na základě kalibrační závislosti. Protože u této metody je kritický objem nástřiku, závisí správnost metody na dobré reprodukovatelnosti dávkovaných objemů; doporučuje se pracovat s automatickým dávkovačem [39, 48].

Experimentální část vychází z řady studií (viz tabulka č. 2) provedených k analýze BPA ve vzorcích vody na čistírnách odpadních vod metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí po přečištění pomocí extrakce tuhou fází. V rámci této práce byl také analyzován pevný podíl z těchto vzorků, získaný filtrací analyzované vody před extrakcí tuhou fází.

Tabulka č. 2 Možnosti přípravy vzorku vody pro analýzu BPA pomocí GC/TOF-MS

Instrumentální analýza	SPE kolonka	Postup SPE	Derivatizační činidlo	Derivatizační podmínky	Zdroj
GC/TOF-MS	C18, Oasis HLB	Kondicionace: 2 x 3,5 ml methanol 2 x 3 ml Milli - Q Promytí: 4 x 2,5 ml Milli - Q Sušení: 60 min Eluce: 4 x 2 ml DCM - hexan	50 µl BSTFA + 50 µl Pyridin	65 °C, 20 min	[28]
GC/TOF-MS	Oasis HLB	Kondicionace: 5 ml ethylacetát , 5 ml methanol, 5 ml Milli - Q Promytí: methanol : Milli - Q 5 : 95 Sušení: 15 min Eluce: 2 x 4 ml ethylacetát	50 µl BSTFA + 50 µl Pyridin	65 °C, 25 min	[40]
GC/TOF-MS	C18	Kondicionace: 5 ml diethylether, 5 ml methanol Promytí: 10 ml Milli - Q : methanol 9 : 1 Sušení: 90 min Eluce: 15 ml diethylether	50 µl BSTFA	45 °C, 60 min	[62]
GC/TOF-MS	C18	Kondicionace: 3 x 2 ml ethylacetát , 3 x 2 ml methanol, 3 x 2 ml Milli - Q Promytí: 2 ml Milli - Q Sušení: 60 min Eluce: 3 x 2 ml ethylacetát	50 µl BSTFA + 1% TMCS + 10 µl Pyridin	70 °C, 20 min	[41]
GC/TOF-MS	C18	Kondicionace: 5 ml methanol , 5 ml Milli - Q Sušení Eluce: 2 x 5 ml hexan - DCM, 2 x 5 ml methanol - DCM	50 µl BSTFA	60 °C, 15 min	[63]
	Oasis HLB	Kondicionace: 6 ml diethylether , 5 ml methanol, 5 ml Milli Q Sušení: 90 min Promytí: 5 ml Milli - Q : methanol 40 : 60 Eluce: 10 ml methanol - diethylether	50 µl BSTFA	60 °C, 15 min	

2.2.2.4 *Kompletní dvoudimenzionální plynová chromatografie (GCxGC)*

Pro příliš složité vzorky může být obtížné dosáhnout separace všech složek GC metodou, protože píková kapacita kolony je limitována. Píková kapacita je množství píků, které je daná kolona schopná rozdělit v rámci jedné analýzy. Výsledný počet látek, které mohou být plně odseparovány, je tedy omezený. Jediné řešení tohoto problému je podrobit vzorek separaci na druhé GC koloně s odlišným mechanismem separace (orthogonální separační podmínky) při zachování chromatografického rozlišení z první dimenze. Výhoda použití vícedimenzionálních separací spočívá v násobení píkových kapacit jednotlivých po sobě jdoucích kroků. Správným seřazením separačních kroků je možné zvýšit hodnotu píkové kapacity o několik řádů a teoreticky tak umožnit separaci velmi složitých směsí. Toto představuje maximalistický odhad. V reálných situacích bývá zvýšení píkové kapacity menší, přesto však významné, jak dokazuje například využití GC×GC/TOF-MS pro analýzu metabolitů v savčí tkáni. Zde se ve srovnání s metodou GC/TOF-MS rozšířil rozsah detekovatelných látek z 538 na více než 1 200 a byly tak zjištěny látky neočekávané a dokonce neznámé [50, 64, 65].

Kompletní dvoudimenzionální plynová chromatografie GC×GC umožňuje analýzu komplexních vzorků.

Dvě kolony s odlišným separačním mechanismem jsou umístěny v samostatných termostatech. Primární kolona je obvykle delší a nepolární, separace zde probíhá na základě bodu varu. Sekundární kolona je obvykle krátká a polární, separuje látky na základě polarit. Obě kolony jsou spojeny tzv. modulátorem, který pomocí studených (plynný dusík chlazený kapalným dusíkem) a horkých (vzduch, 300 °C) pulzů nejdříve zachycuje a koncentruje sloučeniny eluované z první dimenze a následně jej reinjektuje do dimenze druhé [66].

Používají se následující typy modulátorů:

Ventilový modulátor s dávkovací smyčkou – Dávkovací smyčka je plněna eluátem z primární kolony. V pravidelných intervalech je eluát dávkován na sekundární kolonu. Stlačeným pomocným nosným plynem přitom dochází k zakoncentrování [50].

Termální modulátor – Jde o krátkou kapilární kolonu se silným filmem stacionární fáze, na kterém dochází k zachycení analytu. Následně jsou analyty uvolňovány ohřevem otáčejícím se ramínkem [50].

Kryogenní modulátor – Modulaci zajišťuje pohyb kryopasti, která je chlazená kapalným CO₂ [50].

Dvoustupňový kryogenní modulátor – Modulace je realizována střídavým chlazením úseků kolony a jejich zahříváním vzduchem z kolony [50].

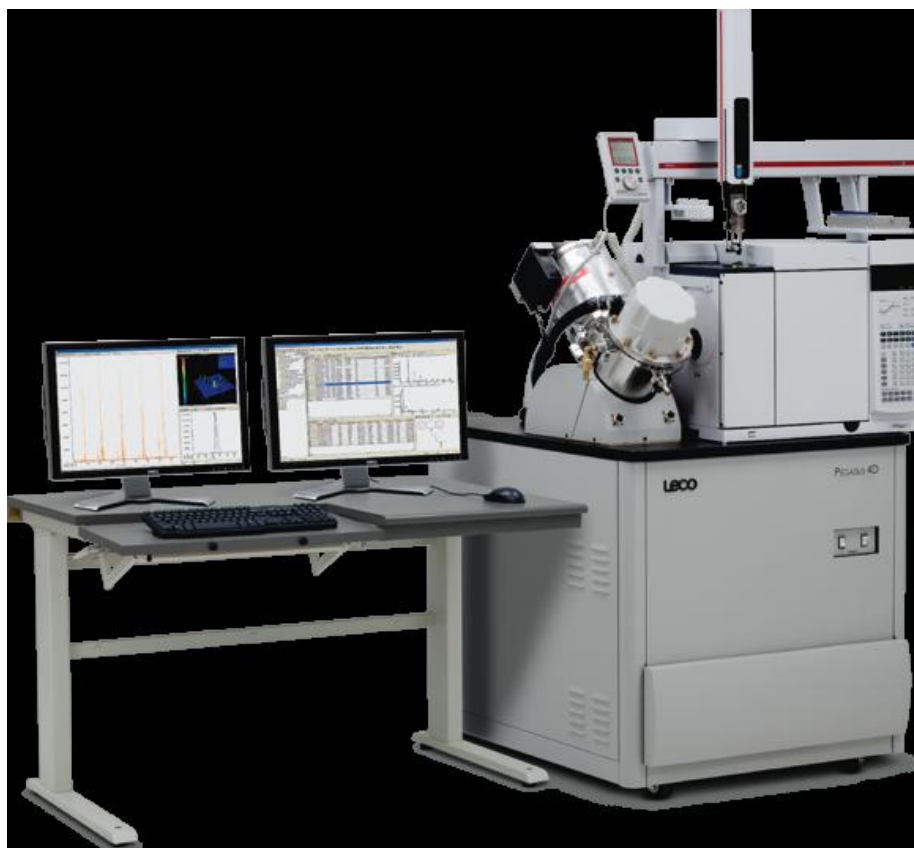
Dvoustupňový kryogenní modulátor se 4 tryskami - Modulátor tvoří dva páry trysek umístěných na koloně. Každý pár obsahuje trysku pro chlazení a pro zahřívání. Jako chladící medium slouží plynný dusík, který je ochlazován kapalným dusíkem a k ohřevu slouží proud vzduchu zahřátý na 300 °C. Na začátku separace jsou látky prostupující z primární kolony vymrazovány pod první tryskou. Následně se v nastaveném čase zapne ohřívací tryska a látky jsou zachytávány pod druhou tryskou. První stupeň automaticky přechází na chlazení. Ve druhém stupni postupují zahřáté analyty na sekundární kolonu. Zde dochází k jejich separaci a celý postup se opakuje [50].

Pro GC×GC je nejvhodnějším hmotnostně spektrometrickým analyzátozem TOF. Na modulátoru dochází k velmi rychlému uvolňování eluentu, píky vycházející ze sekundární kolony jsou velmi ostré a je tedy zapotřebí rychlý sběr dat. TOF je v současnosti jediný analyzátoz, který je schopen tuto podmínku uspokojivě splnit, neboť jeho frekvence snímání je až 500 spekter za sekundu. Spojení těchto dvou technik tedy přináší značné výhody při analýze [50, 67].

Výsledkem analýzy je buď dvourozměrný diagram „contour plot“, případně „colour plot“. Speciální software nejprve spočítá základní linii, signál dekonvoluuje, vytvoří jednotlivé píky v první dimenzi a ty kombinuje. Vzniká 2D chromatogram. Tento 2D chromatogram převede software do podoby contour plotu, kdy na osách X a Y jsou retenční časy v obou dimenzích a výška píky je znázorněna vrstevnicemi, případně do podoby colour plotu, kde výška píky je reprezentována vybarvením skvrny. Následuje zpracování charakteristik píků a spektrální identifikace podle knihovny spekter [50, 66]. Další možností je trojrozměrné (prostorové) zobrazení chromatogramu.

2.2.2.4.1 Pegasus® 4D GCxGC/TOF-MS [68]

Přístroj Pegasus® 4D GCxGC TOFMS, který je zobrazen na obrázku 22, je komplexním řešením pro nejnáročnější analýzy. Je výrobkem firmy LECO Corporation, U.S.A.

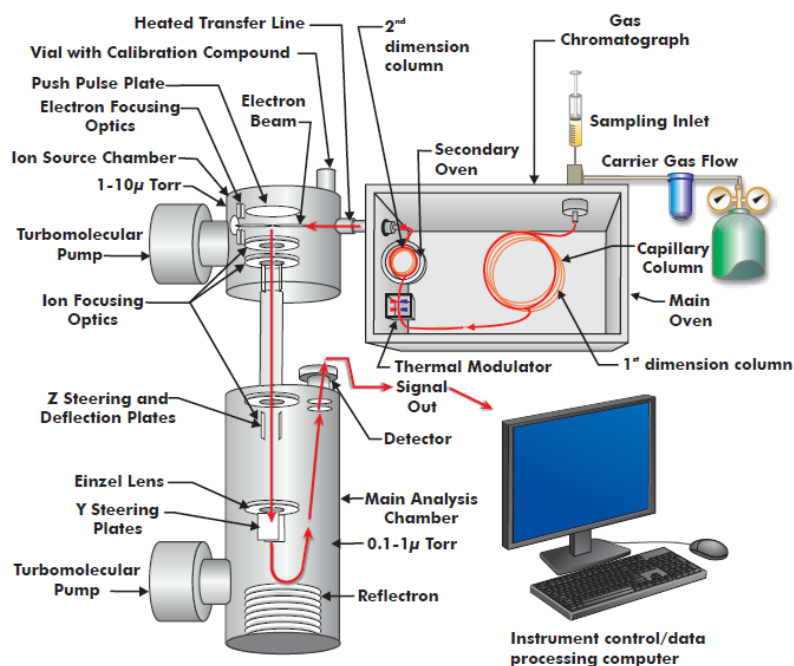


Obr. 22 Přístroj Pegasus® 4D GCxGC/TOF-SM, LECO Corporation, U.S.A. [68]

Technická konstrukce LECO GCxGC/TOF-MS se skládá z dvoustupňového kryomodulátoru se 4 tryskami (Dual Stage - Quad Jet Modulator) a sekundárního termostatu s programovatelnou teplotou, které jsou umístěny v termostatu plynového chromatografu (viz obrázek 23).

K ovládání LECO Pegasus 4D GCxGC TOFMS slouží program ChromaTOF®, vyvinutý speciálně pro GCxGC-TOF MS technologii. Nabízí plnou kontrolu přístroje včetně ladění, sběru dat, jejich procesování a prohlížení včetně možností vytváření reportů. Je možno plně kontrolovat parametry modulace, procesování dat včetně vyhledávání píků a dekonvoluce spekter. Dalšími možnostmi jsou automatická kombinace modulovaných píků, kombinace plochy píků pro kvantifikaci, automatické kalibrace a kvantifikace pro GCxGC data, porovnání vzorků, klasifikace, skripty, statistické porovnání vzorků a retenční indexy [68].

Diagram of GCxGC-TOFMS Instrument



Obr. 23 Schéma přístroje pro kompletní dvoudimenzionální plynovou chromatografii s hmotnostně spektrometrickou detekcí [68]

Přístroj Pegasus® 4D GCxGC/TOF-MS umožňuje získání velkého množství informací z jediného nástřiku, umožněné zvýšenou píkovou kapacitou při použití LECO GCxGC technologie. Mezi kolonami je pouze jedna spojka. Pegasus 4D umožňuje použití libovolných parametrů sekundární kolony [68].

Kompletní dvourozměrná plynová chromatografie nabízí výhody pro široké spektrum aplikací, jako například metabolomika, petrochemie, analýza reziduí pesticidů, analýza forenzních vzorků, vzorků pitné a odpadní vody a v mnoha dalších oblastech. Výrobce LECO uvádí využití GCxGC-TOFMS jako prostředek pro analýzu širokého spektra endokrinních disruptorů ve vodních nádržích, produktů osobní hygieny a jiných kontaminantů ve vodních nádržích [68].

2.2.2.5 ELISA

Citlivou metodou stanovení BPA je ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

ELISA je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod. Slouží především k detekci protilátek, přičemž funguje na bázi imunoenzymatické reakce. Díky vývoji této metody se začala ELISA využívat také pro detekci toxinů a bioaktivních látek, k nimž lze zařadit i alkylfenoly a BPA [37].

Ke stanovení BPA metodou ELISA je určena například souprava ELISA-VIDTEST BPA od firmy VIDIA spol. s r.o. Slouží k detekci BPA ve vodách, v půdách a k detekci BPA uvolňovaného z obalového materiálu určeného pro potraviny [69].

Ve vzorku přítomný BPA se váže na specifickou protilátku v průběhu prvního inkubačního kroku. Protilátky, které nebyly zachyceny v komplexu s antigenem ze vzorku, reagují s BPA imobilizovaným v jamkách mikrotitrační destičky. Následuje aplikace sekundární enzymově značené protilátky. Intenzita barevné reakce je nepřímě úměrná množství BPA ve vzorku. Pokles signálu určuje přítomnost BPA v testovaném prostředí.

Detekční limit je 10 ng/ml, doba stanovení 2,25 hodiny. Ke kvantitativnímu stanovení slouží kalibrační křivka [69].

2.3 Čistírny odpadních vod vybrané pro analýzu

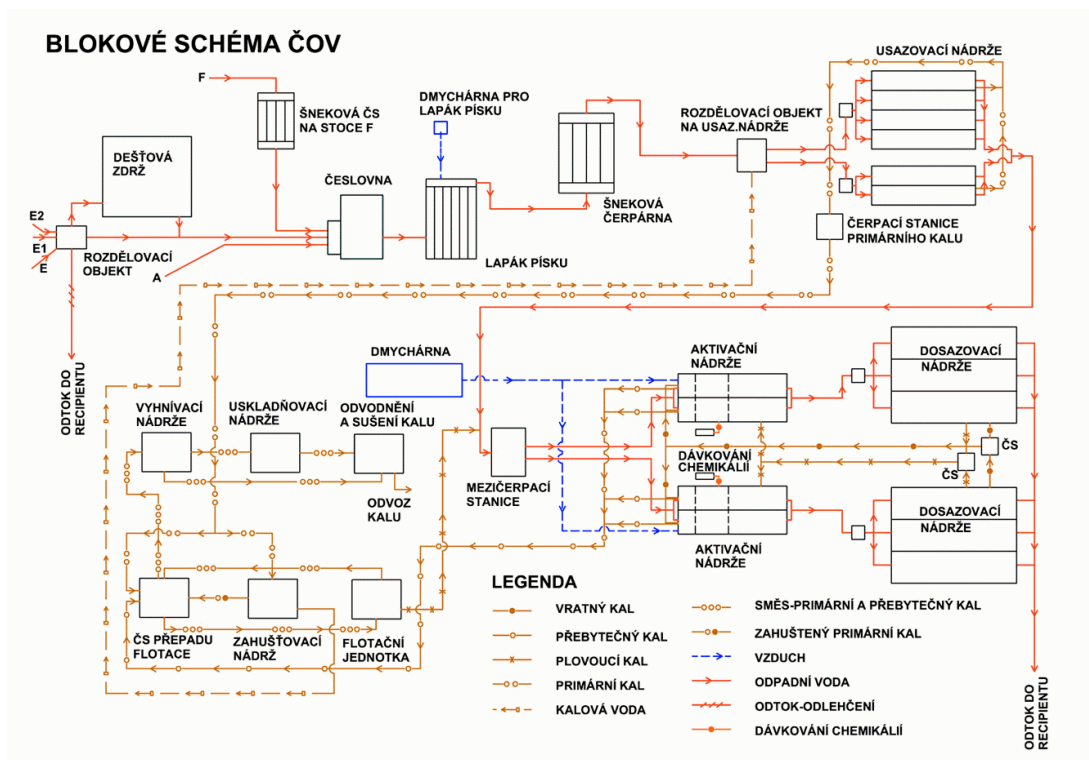
2.3.1 Čistírna odpadních vod Modřice

Čistírna odpadních vod v Modřicích (obrázek 24) slouží k čištění odpadních vod přiváděných systémem kanalizačních stok z města Brna a prostřednictvím soustavy čerpacích stanic i z širokého okolí Brna (města Kuřim, Modřice, obce Želešice, Česká u Brna., Šlapanice, Šlapanice - Bedřichovice, Ostopovice, Moravské Knínice, Lipůvku, Podolí, Ponětovice a Rozdrojovice). V současné době je zajištěna dostatečná kapacita ČOV i pro očekávaný rozvoj Brna a blízkého okolí a čistírna odpadních vod splňuje podmínky české i evropské legislativy. Blokové schéma znázorňuje obrázek 25.

Její přípustné množství vypouštěných odpadních vod je 4 222 l/s (61 520 m³/rok) [70].



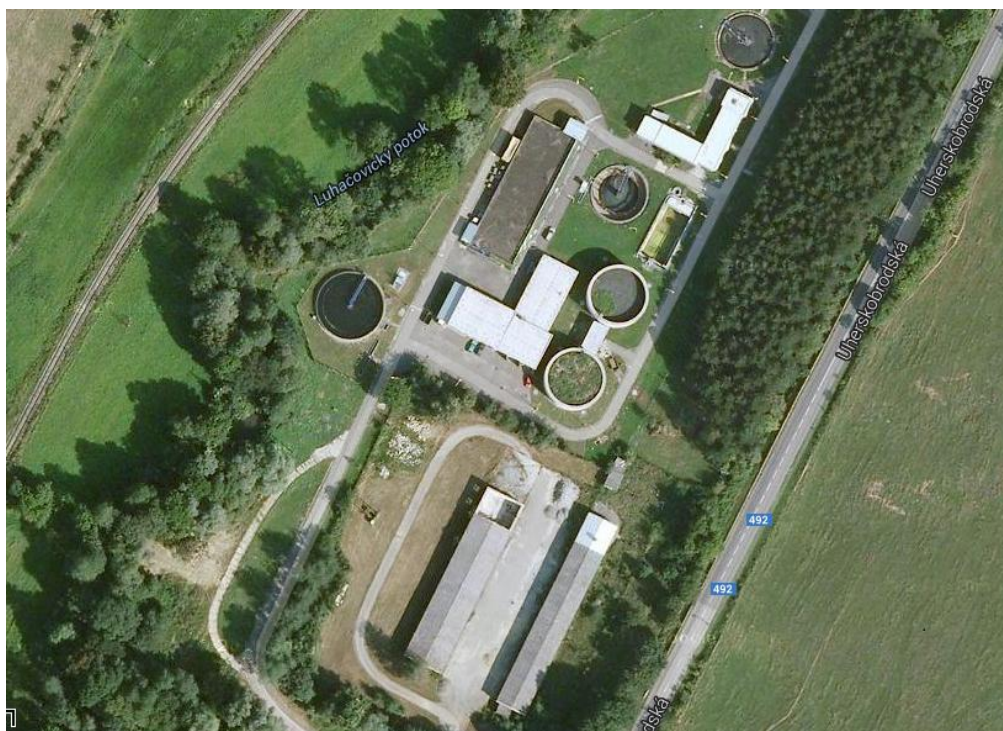
Obr. 24 Čistírna odpadních vod Modřice [70]



Obr. 25 Čistírna odpadních vod Modřice - blokové schéma [70]

2.3.2 Čistírna odpadních vod Luhačovice

Čistírna odpadních vod v Luhačovicích (obrázek 26) slouží k čištění odpadních vod přiváděných systémem kanalizačních stok z města Luhačovice.



Obr. 26 Čistírna odpadních vod Luhačovice [71]

Srovnání kapacit obou čistíren odpadních vod je v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 Parametry ČOV Modřice a ČOV Luhačovice [72]

Název ČOV	Vlastník	Počet obyvatel připojených na ČOV	Počet ekvivalentních obyvatel připojených na ČOV	Projektovaná kapacita, Qd [m ³ /den]	Projektovaná kapacita [ekvivalentní obyvatelé]
ČOV Modřice	Brněnské vodárny a kanalizace, a.s.	406 174	397 945	137 000	513 000
ČOV Luhačovice	Vodovody a kanalizace Zlín, a.s.	5 815	7 265	8 000	16 170

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- Ethylacetát pro HPLC $\geq 99,7\%$, Sigma-Aldrich Co., USA
- Bisfenol A $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich Co., USA
- Methanol pro HPLC, Sigma-Aldrich Co., USA
- Milli-Q voda
- Pyridin puriss. p.a. pro titrace, Sigma-Aldrich Co., USA
- BSTFA + 1 %TMC 99:1, Supelco Analytical, USA

3.2 Přístroje a zařízení

- Filtry ze skleněných mikrovláken, typ MN GF - 1, průměr 55 mm, Macharey – Nagel GmbH & Co, Německo
- SPE kolonka typu Oasis® HLB Cartridge 6 ml (0,5 g), Waters, Irsko a Supelclean™ ENVI™ – 18 SPE 6 ml (0,5 g)
- SPE extraktor Baker, model spe - 12G, s vakuovou pumpou KNF Laboport
- Přístroj EVATERM pro sušení dusíkem a zahřívání vzorků, LABICOM, ČR
- Ultrazvuk KRAINTEK
- Běžné laboratorní vybavení + skleněné inszerty 0,25 ml do vialek, Supelco Analytical, USA
- Plynový chromatograf Pegasus IV D, LECO®, USA (viz obrázek 27)



Obr. 27 Pegasus IV D, LECO®, USA

3.3 Optimalizace rozpouštědla a derivatizace

Analýza kalibračních a reálných vzorků při optimalizaci byla provedena pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s analyzátozem doby letu (GC/TOF-MS). Pro ovládání systému a sběr a zpracování dat byl použit Software ChromaTOF 2.32 (LECO Co., St. Joseph, USA).

Jako primární kolona byla použita SLB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Supelco, USA) a jako sekundární BPX - 50 (1,29 m x 0,1 mm x 0,1 µm, SGE Analytical Science, Austrálie).

3.3.1 Podmínky analýzy

Plynový chromatograf

- Objem dávkovaného vzorku: 1 µl
- Teplota injektoru: 280 °C
- Metoda nástřiku: bezděličová, doba zavření ventilu děliče 1 min.
- Nosný plyn: helium 6.0 (SIAD Czech, s.r.o.)
- Průtok nosného plynu: 1 ml/min (konstantní průtok)
- Teplotní program: 80 °C po dobu 1 min, 15 °C/min do 220 °C, 5 °C/min do 280 °C, finální izoterma 2 minuty
- Teplota Transfer Line: 280 °C

Hmotnostní spektrometr

- Rozsah skenu: 50 – 500 u
- Frekvence snímání spekter: 20 spekter/s
- Napětí na detektoru: 1850 V
- Teplota iontového zdroje: 250 °C

3.3.2 Analýza vzorku o známé koncentraci BPA bez derivatizace

K optimalizaci derivatizace byly použity kalibrační roztoky. 10 mg BPA bylo rozpuštěno v methanolu na konečný objem 100 ml. Ze zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada roztoků o koncentracích 1 000, 500, 200, 50, 10 a 5 ng/ml.

Nejprve byl použit kalibrační roztok 1 000 ng/ml a byla provedena analýza bez odpaření do sucha a bez derivatizace pomocí GC/TOF-MS. BPA nebyl ve vzorku touto metodou nalezen.

3.3.3 Analýza roztoku vzorku o známé koncentraci BPA po derivatizaci

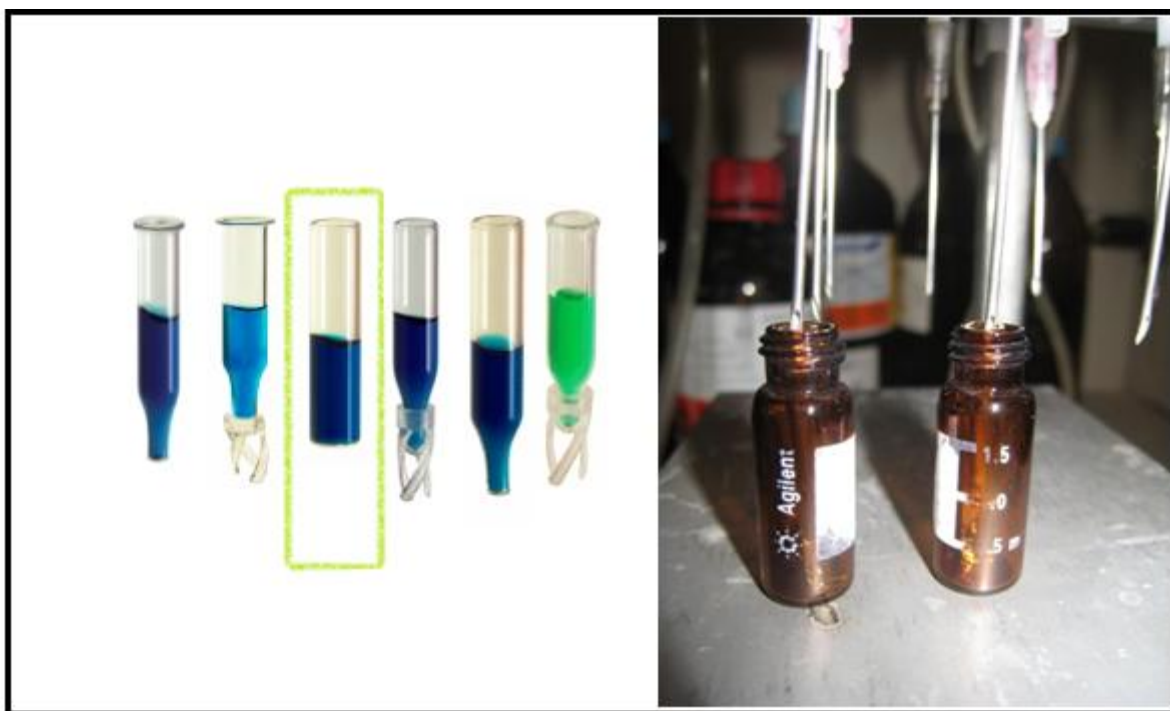
Derivatizace byla provedena N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamidem (BSTFA) s 1 % trimethylchlorsilanem (TMCS). Trimethylsilylová skupina BSTFA reaguje s hydroxylovou skupinou BPA za vzniku 2,2-bis[(4-trimethylsilyloxy)fenyl]propanu.

100 µl kalibračního roztoku o známé koncentraci 1 000 ng/ml bylo převedeno do skleněné vialky, bylo přidáno 100 µl pyridinu a 100 µl derivatizačního činidla BSTFA + 1 % TMCS a po dobu jedné minuty mícháno. Poté byla vialka se vzorkem inkubována po dobu 25 minut při teplotě 65 °C. Vzorek byl ihned po vychladnutí analyzován pomocí GC/TOF-MS. Derivát 2,2-bis[(4-trimethylsilyloxy)fenyl]propan nebyl touto metodou ve vzorku nalezen.

3.3.4 Analýza odparku vzorku o známé koncentraci BPA po derivatizaci

100 µl kalibračního roztoku o známé koncentraci 1 000 ng/ml bylo kvantitativně převedeno do 0,25 ml insertu (viz obrázek 33) 2 ml skleněné vialky, vzorek byl vysušen

do sucha pod proudem dusíku. Bylo přidáno 50 μ l pyridinu a 50 μ l derivatizačního činidla BSTFA + 1 % TMCS a po dobu jedné minuty mícháno. Poté byla vialka se vzorkem inkubována po dobu 25 minut při teplotě 65 °C.



Obr. 28 Použitý typ insertu a odpaření jeho objemu pod proudem dusíku

Vzorek byl ihned po vychladnutí analyzován pomocí GC/TOF-MS. Derivát 2,2-bis[(4-trimethylsilyloxy)fenyl]propan byl touto metodou ve vzorku nalezen.

Byla proměřena celá kalibrační řada a vzhledem k tomu, že ke stanovení derivátu 2,2-bis[(4 - trimethylsilyloxy)fenyl]propanu došlo v pouze v roztocích 1 000 – 200 ng/ml, bylo změněno rozpouštědlo z methanolu na ethylacetát. S tímto rozpouštědlem byla naměřena celá kalibrační řada.

V rámci této metody byl také optimalizován maximální čas pro analýzu po derivatizaci. Kalibrační roztok 500 ng/ml byl analyzován 0,5; 2 a 4 hodiny po derivatizaci.

3.3.5 Odpaření vzorku o známé koncentraci BPA a derivatizace a analýza po 24 hodinách.

Vzhledem k časové náročnosti pro výše uvedený způsob jednotlivé přípravy a analýzy každého vzorku zvlášť byla provedena další optimalizace v rámci sjednocení přípravy více vzorků najednou.

100 μ l kalibračního roztoku o známé koncentraci 1 000 ng/ml bylo kvantitativně převedeno do 0,25 ml insertu 2 ml skleněné vialky, vzorek byl vysušen do sucha pod proudem dusíku a uzavřen. Byl ponechán po dobu 24 hodin ve tmě a 4 °C. Poté bylo přidáno 50 μ l pyridinu a 50 μ l derivatizačního činidla BSTFA + 1 % TMCS a po dobu jedné minuty mícháno. Poté byla vialka se vzorkem inkubována po dobu 25 minut

při teplotě 65 °C. Vzorek byl ihned po vychladnutí analyzován pomocí GC/TOF-MS. Derivát 2,2-bis[(4-trimethylsilyloxy)fenyl]propan nebyl touto metodou ve vzorku nalezen.

3.3.6 Odpaření vzorku o známé koncentraci BPA a aplikace 50 µl pyridinu, derivatizace BSTFA a analýza po 24 hodinách.

100 µl kalibračního roztoku o známé koncentraci 1 000 ng/ml bylo kvantitativně převedeno do 0,25 ml insertu 2 ml skleněné vialky, vzorek byl vysušen do sucha pod proudem dusíku, bylo přidáno 50 µl pyridinu a vialka byla uzavřena. Vzorek byl ponechán po dobu 24 hodin ve tmě při 4 °C. Poté bylo přidáno 50 µl derivatizačního činidla BSTFA + 1 % TMCS a po dobu jedné minuty mícháno. Vialka se vzorkem byla inkubována po dobu 25 minut při teplotě 65 °C. Vzorek byl ihned po vychladnutí analyzován pomocí GC/TOF-MS. Derivát 2,2-bis[(4-trimethylsilyloxy)fenyl]propan byl touto metodou ve vzorku nalezen v obdobném množství jako v případě derivatizace a analýzy bezprostředně po odpaření.

3.4 Kalibrace GC/TOF-MS

3.4.1 Podmínky analýzy

Plynový chromatograf

- Objem dávkovaného vzorku: 1 µl
- Teplota injektoru: 280 °C
- Metoda nástřiku: bezděličová, doba zavření ventilu děliče 1 min.
- Nosný plyn: helium 6.0 (SIAD Czech, s.r.o.)
- Průtok nosného plynu: 1 ml/min (konstantní průtok)
- Teplotní program: 80 °C po dobu 1 min, 15 °C/min do 220 °C, 5 °C/min do 280 °C, finální izoterma 2 minuty
- Teplota Transfer Line: 280 °C

Hmotnostní spektrometr

- Rozsah skenu: 50 – 500 u
- Frekvence snímání spekter: 20 spekter/s
- Napětí na detektoru: 1850 V
- Teplota iontového zdroje: 250 °C

3.4.2 Určení kalibrační závislosti

10 mg BPA bylo rozpuštěno v methanolu na konečný objem 100 ml. Ze zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada roztoků o koncentracích 1 000, 500, 200, 50, 10 a 5 ng/ml.

100 µl každého kalibračního roztoku bylo kvantitativně převedeno do 0,25 ml insertu 2 ml skleněné vialky, vzorek byl vysušen do sucha pod proudem dusíku. Bylo přidáno 50 µl pyridinu a 50 µl derivatizačního činidla BSTFA + 1 % TMCS a po dobu jedné minuty mícháno. Poté byla vialka se vzorkem inkubována po dobu 25 minut při teplotě 65 °C. Po vychladnutí byl vzorek podroben analýze pomocí GC/TOF-MS.

3.5 Kalibrace GCxGC/TOF-MS

3.5.1 Podmínky analýzy

Jako kolona pro první dimenzi byla použita SLB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Supelco, USA) a kolona pro druhou dimenzi BPX-50 (1,29 m x 0,1 mm x 0,1 µm, SGE Analytical Science, Austrálie)

Plynový chromatograf

- Objem nastříknutého vzorku: 1 ml
- Teplota injektoru: 280 °C
- Metoda nástřiku: bezděličová, doba uzavření ventilu děliče 1 minuta
- Nosný plyn: helium 6.0 (SIAD Czech, s.r.o.)
- Průtok nosného plynu: 1 ml/min (konstantní průtok)
- Teplotní program:

primární kolona: 80 °C po 1 min, 15 °C/min do 220 °C, 5 °C/min do 280 °C, finální izoterma 2 min

sekundární kolona: 90 °C po 1 min, 15 °C/min do 230 °C, 5 °C/min do 290 °C, finální izoterma 2 min

Modulátor: +15 °C nad primární kolonou

- Hot pulse: 0,4 s
- Cool time: 1,1 s

Hmotnostní spektrometr

- Rozsah skenu: 50 – 500 u
- Frekvence snímání spekter: 100 spekter/s
- Napětí na detektoru: 1850 V
- Teplota iontového zdroje: 250 °C

3.5.2 Určení kalibrační závislosti

10 mg BPA bylo rozpuštěno v methanolu na konečný objem 100 ml. Ze zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada roztoků o koncentracích 2 000, 1 000, 500, 200, 50 ng/ml.

100 µl každého kalibračního roztoku bylo kvantitativně převedeno do 0,25 ml insertu 2 ml skleněné vialky, vzorek byl vysušen do sucha pod proudem dusíku. Bylo přidáno 50 µl pyridinu a 50 µl derivatizačního činidla BSTFA + 1 % TMCS a po dobu jedné minuty mícháno. Poté byla vialka se vzorkem inkubována po dobu 25 minut při teplotě 65 °C. Po vychladnutí byl vzorek podroben analýze pomocí GCxGC/TOF-MS.

3.6 Optimalizace SPE

3.6.1 Optimalizace rozpouštědla

Vzhledem k již dříve zmiňované skutečnosti, že v případě methanolu nebylo možné analyzovat menší koncentraci kalibračních roztoků než 100 ng/ml, byl zvolen ethylacetát jako eluční činidlo.

3.6.2 Optimalizace typu SPE kolonky

Pro výběr typu SPE kolonky byla provedena extrakce tuhou fází na vzorcích 2 x 100 ml Milli-Q vody s přídavkem 1 ng/ml BPA pro Oasis® HLB 6 ml (0,5 g) a 2 x 100 ml pro kolonky Supelclean™ ENVI™ – 18 SPE 6 ml (0,5 g).

Podmínky SPE:

Typ SPE kolonky:	Oasis® HLB Cartridge 6 ml (0,5 g), Waters, Irsko a Supelclean™ ENVI™ - 18 SPE 6 ml (0,5 g)
Kondicionace kolonky:	5 ml ethylacetátu, 5 ml methanolu, 5 ml Milli-Q vody
Aplikace vzorku:	100 ml vzorku vody
Promytí:	5 ml methanol – voda (5:95)
Sušení:	vakuum 30 minut
Eluce:	2 x 4 ml ethylacetát samospádem do 10 ml skleněné vialky

3.6.3 Stanovení výtěžnosti metody

Pro stanovení výtěžnosti metody byla provedena extrakce tuhou fází na vzorcích 2 x 100 ml odpadní vody v přítoku a 2 x 100 ml v odtoku z čistírny odpadních vod a do další sady těchto vzorků byl aplikován BPA rozpuštěný v ethylacetátu na konečnou koncentraci 0,1 ng/ml vzorku.

3.7 Odběr vzorků

Vzorky odpadní vody byly odebírány z ČOV Modřice a ČOV Luhačovice.

Z ČOV Modřice byly odebírány 24 hodinové slévané vzorky odpadní vody v přítoku a odtoku. Vzorky odpadních vod se odebíraly po dobu pěti dní.

Z ČOV Luhačovice byly odebírány 24 hodinové slévané vzorky odpadní vody v přítoku a odtoku.

Vzorky vody byly uchovávány v plastových jednolitrových nádobách v teplotě 4 °C po dobu max. 24 hodin do zpracování.

3.8 Příprava, extrakce a derivatizace vzorku

Z každého vzorku vody v přítoku a odtoku byl odebrán podíl 2 x 100 ml a filtrován nejprve přes filtrační papír a znovu vakuově zfiltrován přes filtr se skleněnými vlákny.

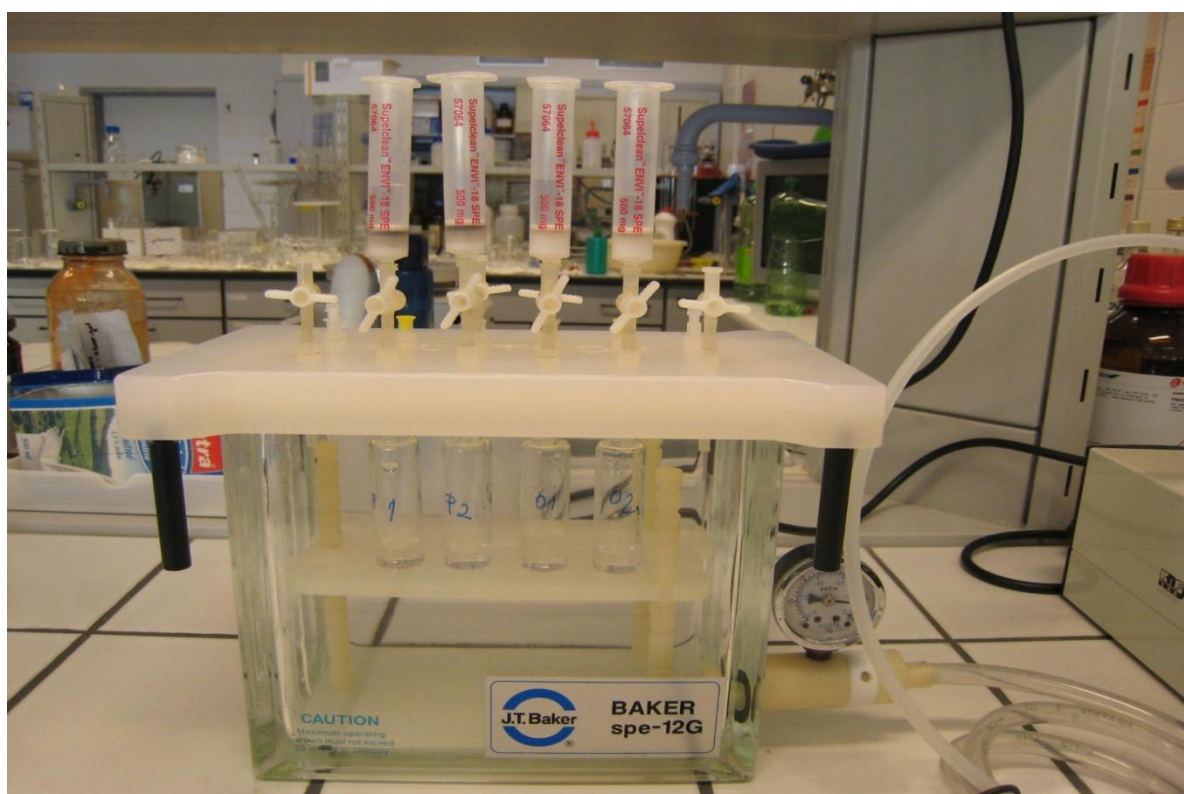
Filtry z každého vzorku (200 ml voda z přítoku, 200 ml voda z odtoku) byly vloženy do 10 ml vialky, bylo přidáno 8 ml ethylacetátu a vialka byla vložena na 30 minut do ultrazvukové lázně, zahřáté na 50 °C. Filtry byly odstraněny a nerozpuštěný pevný podíl byl odfiltrován přes skládaný filtr. Vzorek byl umístěn do proudu dusíku. Během odpařování byl kvantitativně dvoukrokově převeden do 0,25 ml insertu 2 ml skleněné vialky a odpařen do sucha. Bylo přidáno 50 µl pyridinu a vzorek byl takto uložen do tmy a do 4 °C do analýzy. Před analýzou bylo přidáno 50 µl derivatizačního činidla BSTFA + 1 % TMCS a vzorek byl po dobu jedné minuty míchán. Poté byla vialka se vzorkem inkubována 25 minut při teplotě 65 °C.

Ve filtrované odpadní vodě (vždy 2 x 100 ml odpadní vody z přítoku a 2 x 100 ml z odtoku) byla provedena izolace analytů pomocí extrakce tuhou fází (SPE):

- Typ SPE kolonky: Supelclean™ ENVI™ - 18 SPE 6 ml (0,5 g)
- Kondicionace kolonky: 5 ml ethylacetátu, 5 ml methanolu, 5 ml Milli-Q vody

- Aplikace vzorku: 100 ml vzorku vody
- Promytí: 5 ml methanol – voda (5:95)
- Sušení: vakuum 30 minut
- Eluce: 2 x 4 ml ethylacetát samospádem do 10 ml skleněné vialky

Na obrázku 29 je eluce dvou vzorků odpadní vody v přítoku a dvou vzorků odpadní vody v odtoku z čistírny odpadních vod.



Obr. 29 Eluce při SPE

Vzorek byl umístěn do proudu dusíku. Během odpařování byl kvantitativně dvoukrokově převeden do 0,25 ml insertu 2 ml skleněné vialky a odpařen do sucha. Bylo přidáno 50 μ l pyridinu a vzorek byl takto uložen do tmy a do 4 °C do analýzy. Před analýzou bylo přidáno 50 μ l derivatizačního činidla BSTFA + 1 % TMCS a vzorek byl po dobu jedné minuty míchán. Poté byla vialka se vzorkem inkubována 25 minut při teplotě 65 °C.

3.9 Analýza vzorků

Kompletní dvoudimenzionální (2D) plynová chromatografie s hmotnostní detekcí GCxGC/TOF-MS byla využita k analýze všech vzorků přítoku i odtoku na ČOV Modřice a Luhačovice.

3.9.1 Podmínky analýzy

Jako kolona pro první dimenzi byla použita SLB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Supelco, USA) a kolona pro druhou dimenzi BPX-50 (1,29 m × 0,1 mm × 0,1 µm, SGE Analytical Science, Austrálie)

Plynový chromatograf

- Objem dávkovaného vzorku: 1 ml
- Teplota injektoru: 280 °C
- Metoda nástřiku: bezděličová, doba otevření ventilu děliče 1 minuta
- Nosný plyn: helium 6.0 (SIAD Czech, s.r.o.)
- Průtok nosného plynu: 1 ml/min (konstantní průtok)
- Teplotní program:
primární kolona: 80 °C po 1 min, 15 °C/min do 220 °C, 5 °C/min do 280 °C, finální izoterma 2 min
sekundární kolona: +10 ° nad primární kolonou
Modulátor: +15 °C nad primární kolonou
- Hot pulse: 0,4 s
- Cool time: 1,1 s

Hmotnostní spektrometr

- Rozsah skenu: 50 – 500 u
- Frekvence snímání spekter: 100 spekter/s
- Napětí na detektoru: 1850 V
- Teplota iontového zdroje: 250 °C

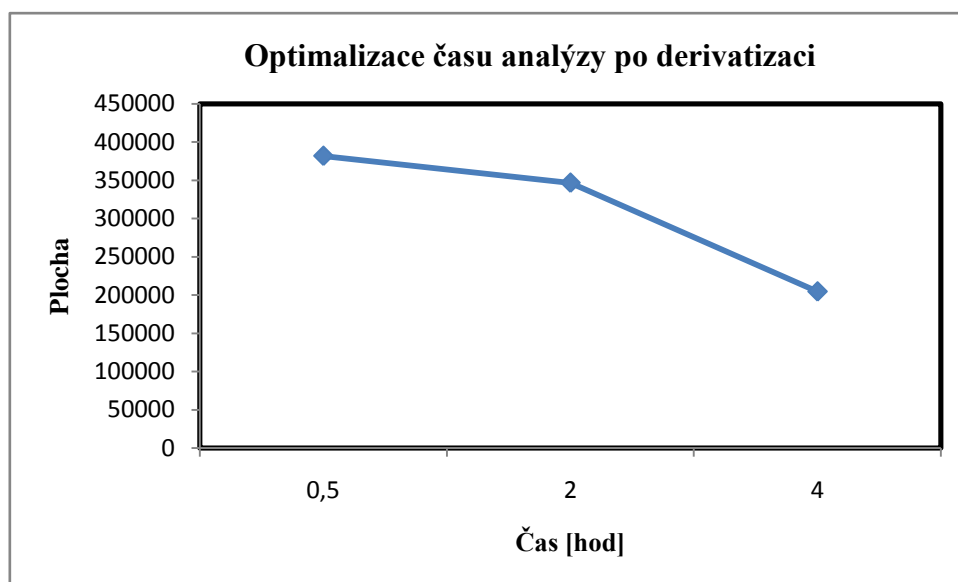
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace rozpouštědla a derivatizace

Optimalizací podmínek derivatizace byla jako nejvhodnější metoda vybrána derivatizace ihned po vysušení vzorku a inkubace po dobu 25 minut při teplotě 65 °C.

V rámci této metody byl také optimalizován maximální čas pro analýzu po derivatizaci. Intenzita signálu vyjádřená jako plocha píků měla snižující se charakter, jak je uvedeno na obrázku 30. Na základě této skutečnosti byly analýzy kalibračních roztoků prováděny do půl hodiny po derivatizaci.

Vzhledem k tomu, že ke stanovení derivátu 2,2-bis[(4-trimethylsilyloxy)fenyl]propanu došlo pouze v roztocích 1 000 – 200 ng/ml BPA v methanolu (v nižších koncentracích nebyl BPA nalezen), bylo změněno rozpouštědlo z methanolu na ethylacetát. S tímto rozpouštědlem byla naměřena celá kalibrační řada.



Obr. 30 Graf závislosti plochy píku na čase analýzy po derivatizaci pro kalibrační roztok 500 ng/ml .

Pro další analýzu reálných vzorků byla optimalizována metoda aplikace 50 µl pyridinu a uchování vzorku ve tmě při 4 °C do analýzy. Před analýzou bylo aplikováno 50 µl derivatizačního činidla BSTFA + 1 % TMCS a po promíchání byl vzorek inkubován po dobu 25 minut při teplotě 65 °C. Do půl hodiny po derivatizaci byl vzorek analyzován. Derivát 2,2-bis[(4-trimethylsilyloxy)fenyl]propan byl touto metodou ve vzorku nalezen v obdobném množství (viz tabulka č. 4) jako v případě derivatizace a analýzy bezprostředně po odpaření.

Výpočet relativního rozpětí byl zde (a v celé diplomové práci) proveden podle rovnice č. 4:

$$R = \frac{(c_{\max} - c_{\min})}{c} \cdot 100 [\%] \quad (4)$$

Tabulka č. 4 Porovnání výsledků při analýze a derivatizaci bezprostředně po odpaření a při analýze 24 hodin po odpaření a aplikaci pyridinu

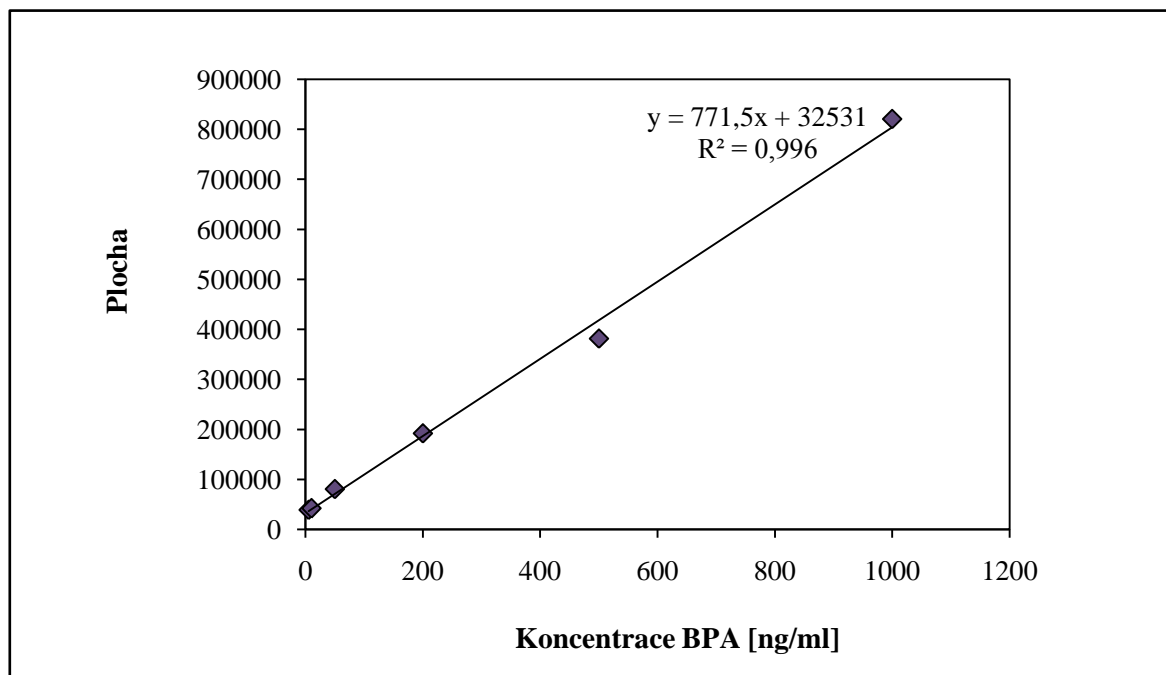
Vzorek	Plocha	Koncentrace BPA [ng/ml]	Průměrná koncentrace BPA [ng/ml]	Relativní rozpětí R [%]
1 000 ng/ml BPA analýza po odpaření a derivatizaci	795445	988,87	1001,58	2,54
	815054	1014,29		
1 000 ng/ml BPA + pyridin, BSTFA po 24 hodinách	781733	971,10	989,21	3,66
	809678	1007,32		

4.2 Kalibrace GC/TOF-MS

Vyhodnocení kalibrační závislosti je v tabulce č. 5 a kalibrační přímka na obrázku 31.

Tabulka č. 5 Vyhodnocení kalibrační závislosti GC/TOF-MS

Koncentrace BPA [ng/ml]	Plocha	Výška h	Poměr S/N	Šum N
5	39251	3408	145,02	23,50
10	42280	6638	198,15	33,50
50	80701	23883	723,73	33,00
200	192185	1483	40,08	37,00
500	381788	1071	37,58	28,50
1000	820733	656	20,825	31,50



Obr. 31 Kalibrační přímka GC/TOF-MS

4.2.1 Výpočet LOD a LOQ [73]

Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítané z kalibrační přímky vyhodnocené pomocí lineární regrese:

$$y = 771,5 \cdot x + 3253$$

Mez detekce LOD (Limit of Detection) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu (rovnice č. 5) – je vyšší než trojnásobek šumu.

$$LOD = (3 \cdot h_n) / m \quad (5)$$

kde h_n je šum na základní linii a m je směrnice kalibrační křivky.

h_n = průměrný šum z kalibrační křivky = 32,50

$$LOD = (3 \cdot 32,5) / 771,5 = 0,1257 \text{ ng/ml}$$

Přepočet na 100 ml vzorku:

$$LOD = 0,1257 / 1000 = 1,26 \cdot 10^{-4} \text{ ng/ml}$$

Mez kvantifikace LOQ (Limit of Quantification) je nejnižší relevantní stanovitelné množství (rovnice č. 6) - signál desetinásobně převyšuje úroveň šumu.

$$LOQ = (10 \cdot h_n) / m \quad (6)$$

$$LOQ = (10 \cdot 32,5) / 771,5 = 0,4191 \text{ ng/ml}$$

Přepočet na 100 ml vzorku:

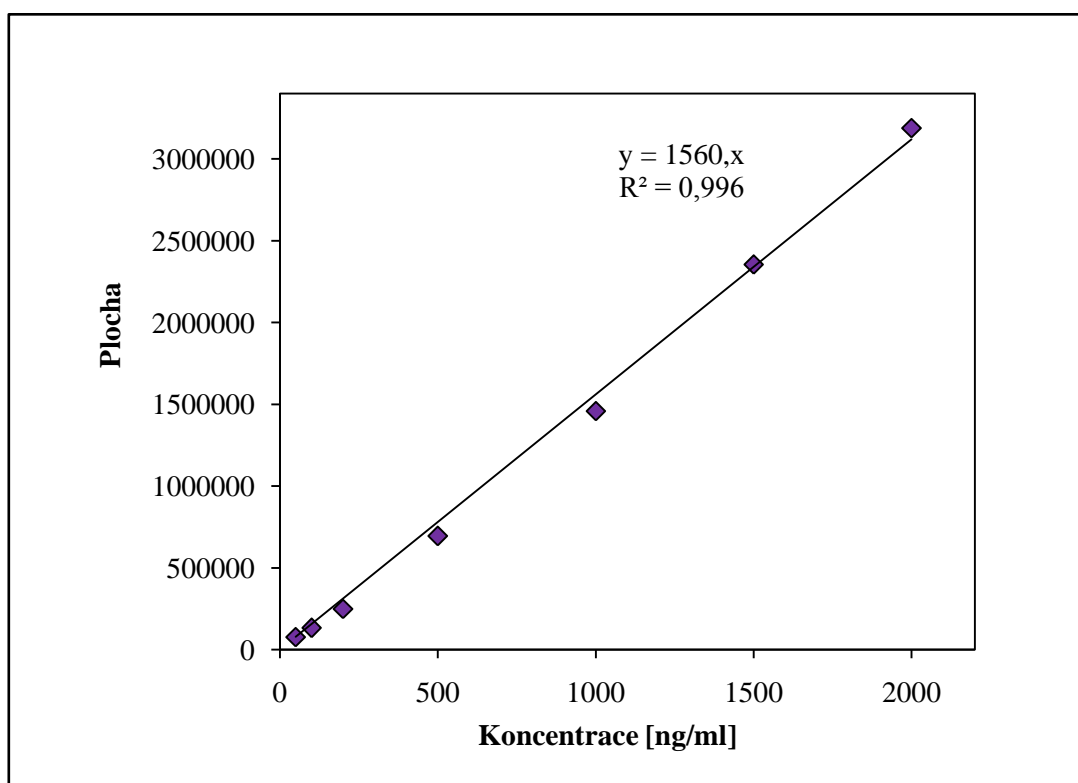
$$LOQ = 0,4191 / 1000 = 4,19 \cdot 10^{-4} \text{ ng/ml}$$

4.3 Kalibrace GCxGC/TOF-MS

Vyhodnocení kalibrační závislosti je v tabulce č. 6 a kalibrační přímka na obrázku 32.

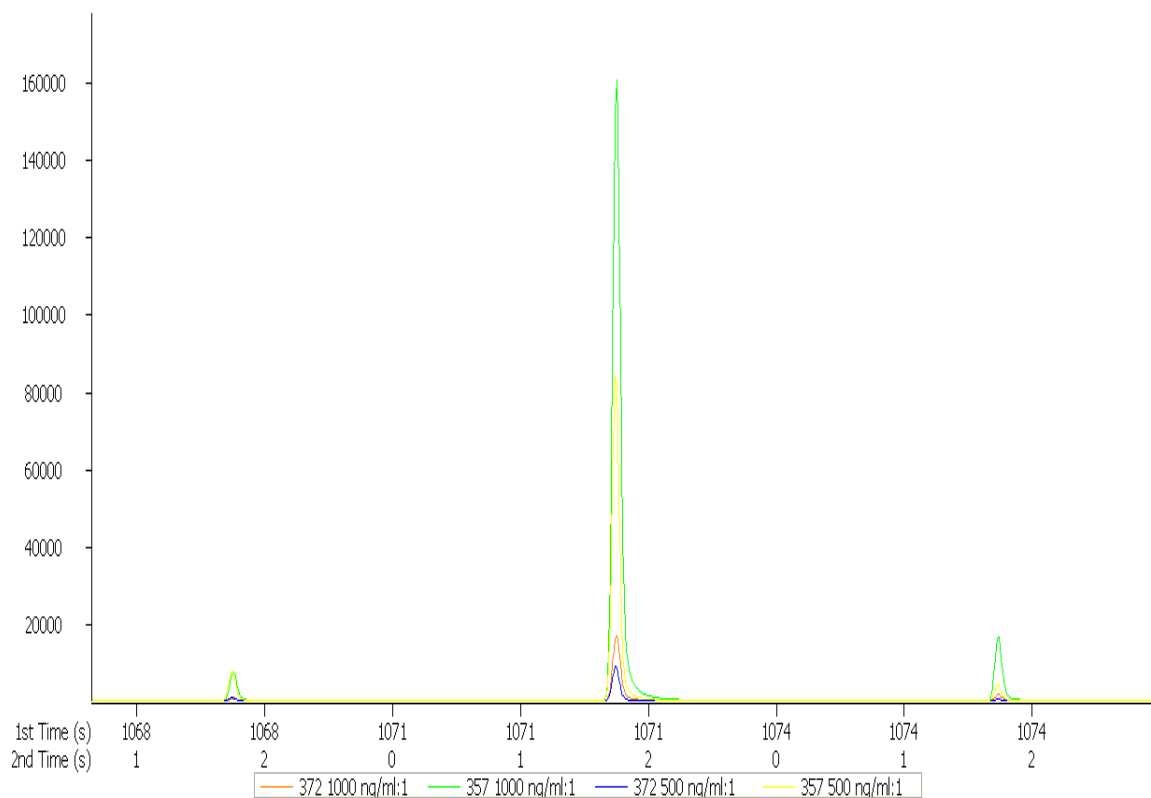
Tabulka č. 6 Vyhodnocení kalibrační závislosti GCxGC/TOF-MS

Koncentrace BPA [ng/ml]	Plocha	Výška	Poměr S/N	Šum N
50	76822	10683	916,00	11,66
100	132238	18140	1756,00	10,33
200	248595	35674	3171,40	11,25
500	694166	96270	7637,20	12,61
1000	1458459	185256	16074,00	11,53
1500	2355402	239131	17020,00	14,05
2000	3189382	310469	17847,00	17,40

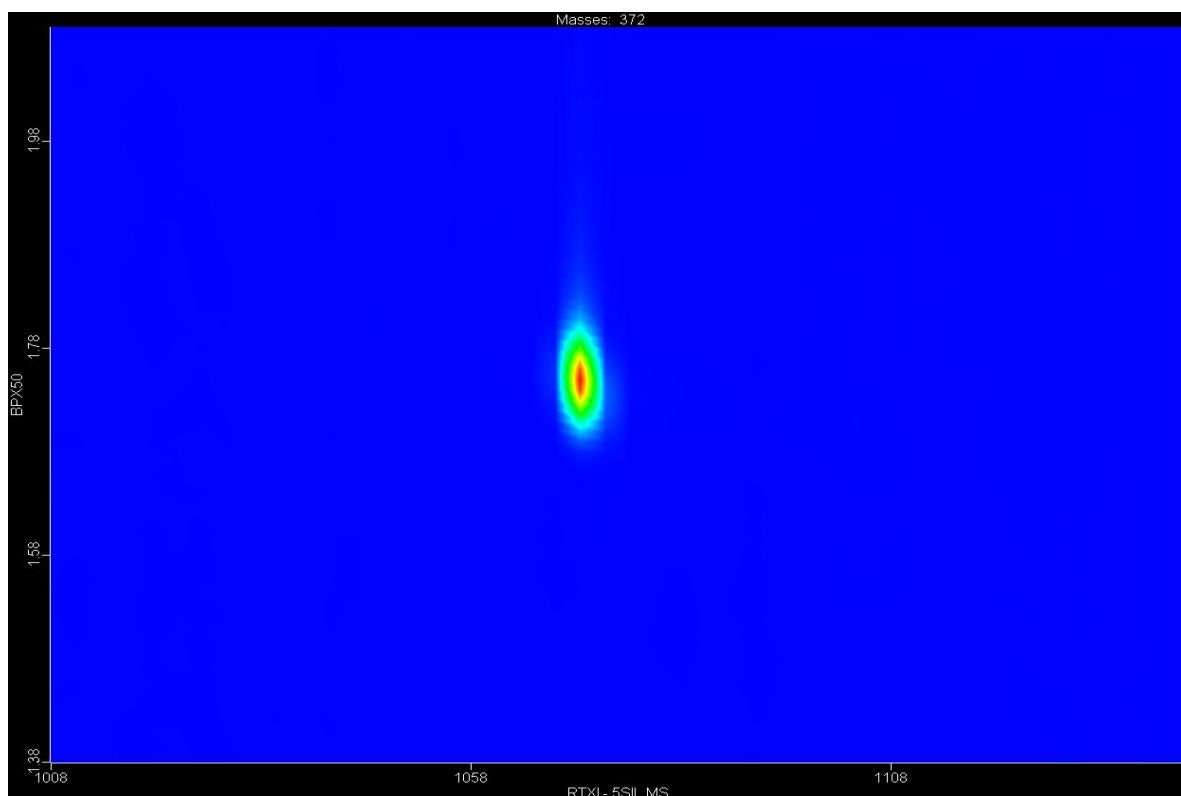


Obr. 32 Kalibrační přímka GCxGC/TOF-MS

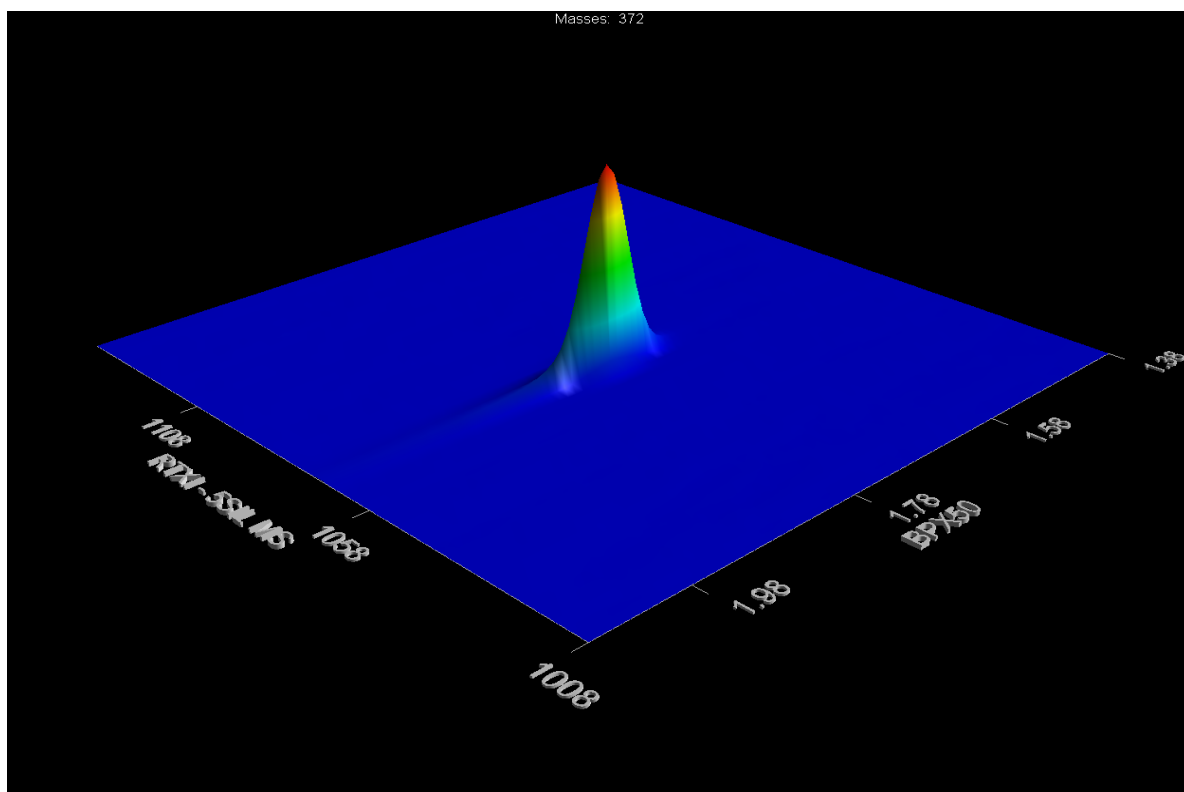
Na následujícím obrázku 33 je výsledný 1D chromatogram kalibračních roztoků 500 a 1 000 ng/ml a na obrázcích 34 – 35 je zobrazení colour plot a 3D chromatogram kalibračního roztoku 1 000 ng/ml.



Obr. 33 1D modulovaný chromatogram kalibračních roztoků 500 a 1 000 ng/ml, zobrazen poměr m/z 357 a 372



Obr. 34 Colour plot pro kalibrační roztok 1 000 ng/ml, zobrazen ion m/z 372



Obr. 35 3D chromatogram kalibračního roztoku 1 000 ng/ml, zobrazen ion m/z 372

4.3.1 Výpočet LOD a LOQ

Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítané z rovnice kalibrační přímky vyhodnocené pomocí lineární regrese:

$$y = 1560 \cdot x$$

Mez detekce LOD (Limit of Detection)

hn = průměrný šum z kalibrační křivky = 12,93

$$LOD = (3 \cdot 12,93) / 1560 = 0,0249 \text{ ng/ml}$$

Přepočet na 100 ml vzorku:

$$LOD = 0,0249 / 1000 = 2,49 \cdot 10^{-5} \text{ ng/ml}$$

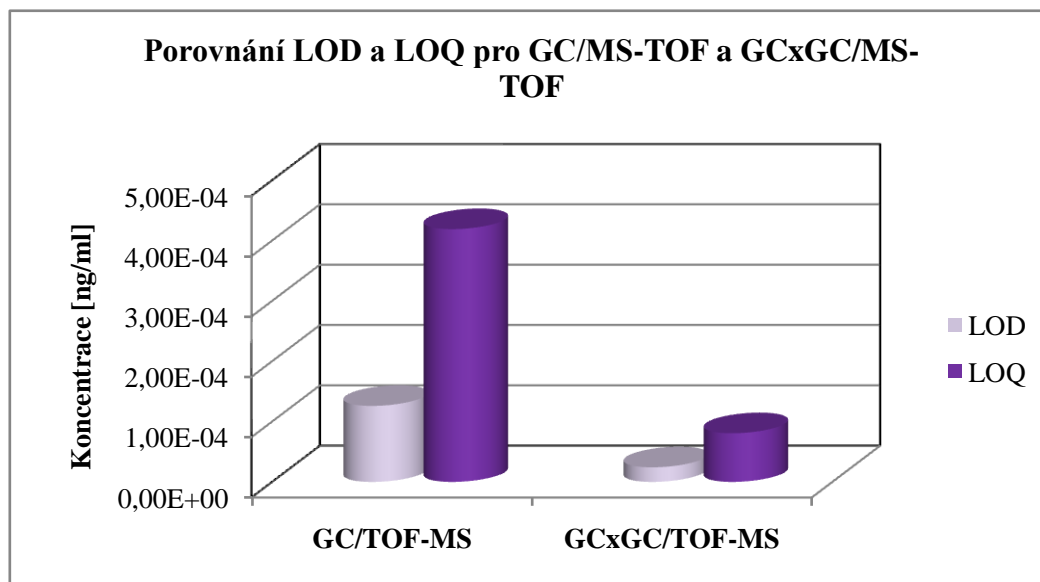
Mez kvantifikace LOQ (Limit of Quantification)

$$LOQ = (10 \cdot 12,93) / 1560 = 0,0829 \text{ ng/ml}$$

Přepočet na 100 ml vzorku:

$$LOQ = 0,0829 / 1000 = 8,29 \cdot 10^{-5} \text{ ng/ml}$$

Meze detekce a kvantifikace jsou nižší pro GCxGC/TOF–MS než pro GC/TOF–MS, což je znázorněno v grafu na obrázku 36. Vzhledem k této skutečnosti byla všechna následující měření prováděna pomocí GCxGC/TOF–MS.



Obr. 36 orovnání meze detekce a kvantifikace pro metody GC/TOF-MS a GCxGC/TOF-MS

4.4 Optimalizace SPE

Vzhledem k již dříve zmiňované skutečnosti, že v případě methanolu nebylo možné analyzovat menší koncentraci kalibračních roztoků než 100 ng/ml, byl zvolen ethylacetát jako eluční činidlo.

4.4.1 Optimalizace typu SPE kolonky

Průměrné hodnoty koncentrace a výtěžnosti pro Oasis® HLB 6 ml (0,5 g) a 2 x 100 ml pro kolonky Supelclean™ ENVI™ – 18 SPE 6 ml (0,5 g) jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7 Průměrné hodnoty koncentrace a výtěžnosti při optimalizaci SPE kolonky

Typ kolonky	Koncentrace BPA [ng/ml]	Koncentrace BPA ve vzorku vody [ng/ml]	Koncentrace BPA v přídávku [ng/ml]	Výtěžnost [%]
Oasis® HLB 6 ml (0,5 g)	714,775	0,7148	1	71,48
Supelclean™ ENVI™ – 18 SPE 6 ml (0,5 g)	834,5878	0,8346	1	83,46

Vzhledem k výše uvedeným výsledkům byl vybrán pro další zpracování reálných vzorků typ kolonky ENVI™ – 18 SPE 6 ml (0,5 g).

4.4.2 Stanovení výtěžnosti metody

Průměrné hodnoty koncentrace BPA a výtěžnosti jsou uvedeny v tabulkách č. 8 a 9.

Tabulka č. 8 Průměrné hodnoty koncentrace BPA ve vzorcích určených ke zjištění výtěžnosti metody

Vzorek	Plocha	Koncentrace BPA [ng/ml]	Koncentrace BPA ve vzorku [ng/ml]	Průměrná koncentrace BPA ve vzorku [ng/ml]
Vzorek 1 přítoku s přídavkem 0,1 ng/ml	2061491	1321,4686	1,3215	1,3053
Vzorek 2 přítoku s přídavkem 0,1 ng/ml	2011182	1289,2192	1,2892	
přítok 1	1922716	1232,5103	1,2325	1,2250
přítok 2	1899214	1217,4449	1,2174	
Vzorek 1 odtoku s přídavkem 0,1 ng/ml	1162270	745,0449	0,7450	0,7546
Vzorek 2 odtoku s přídavkem 0,1 ng/ml	1191998	764,1013	0,7641	
Odtok 1	1058932	678,8026	0,6788	0,6705
Odtok 2	1033067	662,2224	0,6622	

Tabulka č. 9 Hodnoty výtěžnosti metody pro vzorky vody v přítoku a odtoku z čistírny odpadních vod

Vzorek	Průměr koncentrace ve vzorku [ng/ml]	Koncentrace BPA v přídavku [ng/ml]	Rozdíl koncentrace BPA ve vzorku a v přídavku [ng/ml]	Výtěžnost metody [%]
Vzorek přítoku s přídavkem 0,1 ng/ml BPA	1,3053	0,10	0,0804	80,37
Přítok	1,2250			
Vzorek odtoku s přídavkem 0,1 ng/ml BPA	0,7546	0,10	0,0841	84,06
Odtok	0,6705			

4.5 Analýza reálných vzorků

Pro obě testované čistírny odpadních vod (ČOV Luhačovice a ČOV Modřice) byly z naměřených ploch píků vypočteny koncentrace BPA v daném vzorku. Pro každý den byl dvakrát analyzován vzorek přítoku a dvakrát vzorek odtoku z čistírny odpadních vod. Obě získané hodnoty byly zprůměrovány, přepočteny na výslednou koncentraci ve vzorku

na základě zjištěné výtěžnosti metody a byla stanovena účinnost čistícího procesu v ČOV Luhačovice a Modřice pro daný den a následně pro ČOV Modřice také průměrná účinnost.

4.5.1 ČOV Luhačovice

V tabulce č. 10 jsou znázorněny výsledky koncentrací BPA ve vzorcích vody z ČOV Luhačovice.

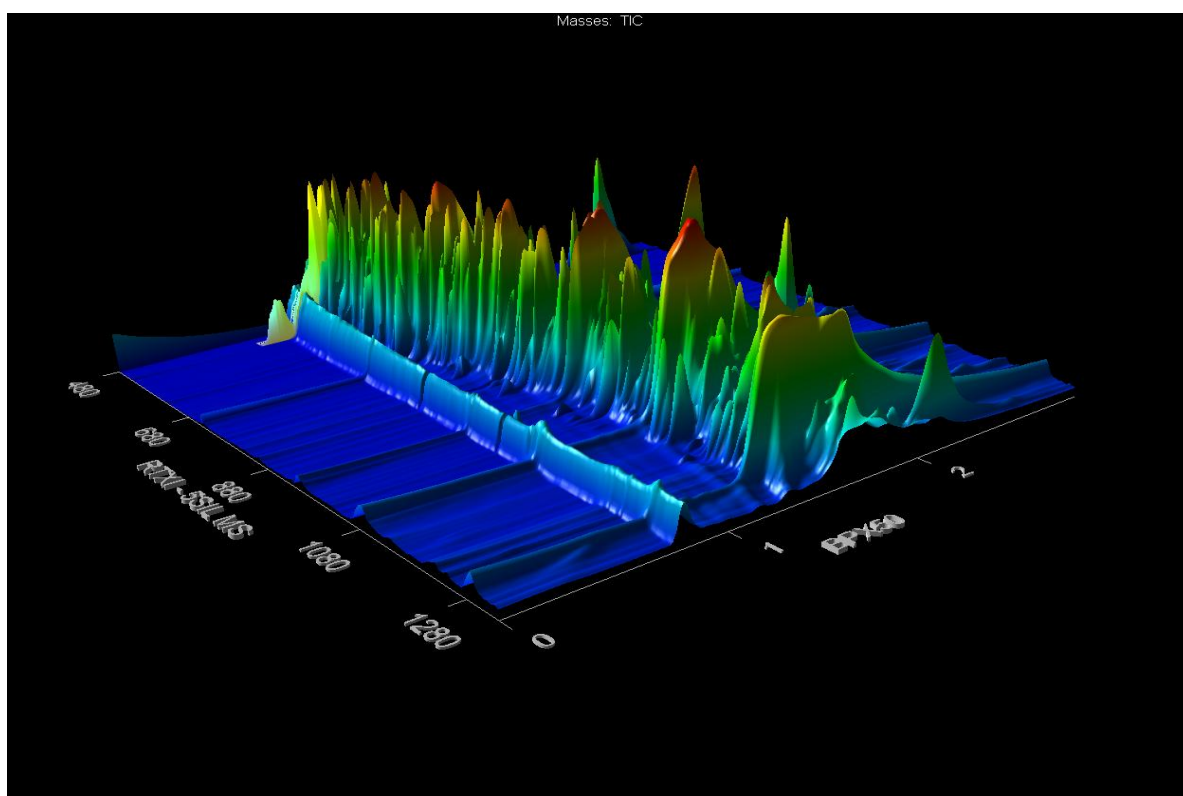
Tabulka č. 10 Koncentrace BPA ve vzorku vody a účinnost čistícího procesu v ČOV Luhačovice

Datum	Vzorek	Průměrná koncentrace BPA ve vzorku [ng/ml]	Relativní rozpětí R [%]	Výtěžnost metody	Koncentrace BPA ve vzorku přepočtená na 100 % výtěžnosti [ng/ml]	Účinnost čistícího procesu v ČOV [%]
5.4.2014	Přítok	0,9144	23,22	80,37	1,1545	82,19
	Odtok	0,1703	45,26	84,06	0,2418	
	Pevný podíl přítok	x	x	x	x	x
	Pevný podíl odtok	x	x	x	x	

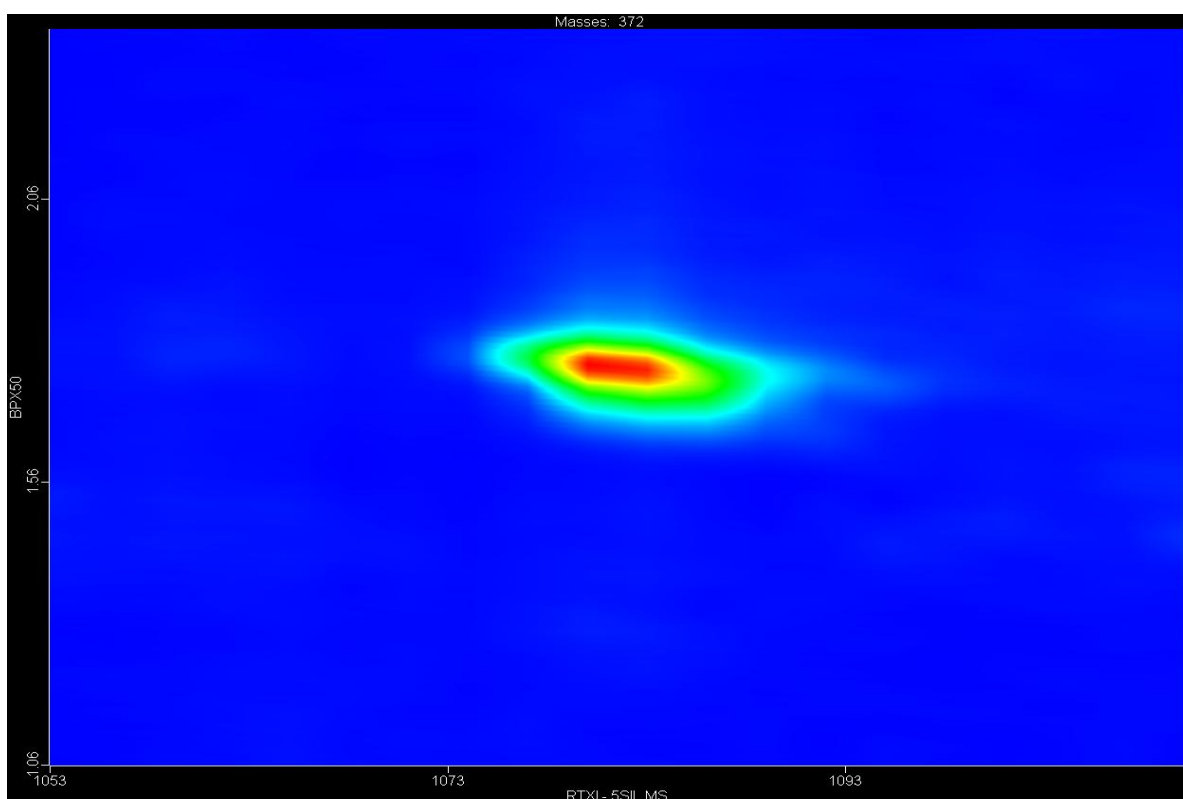
Účinnost čistícího procesu v ČOV Luhačovice byla sledována pouze jeden den. Její hodnota toho dne dosáhla 82,19 %.

Výsledné 3D chromatogramy a zobrazení colour plot vzorků vody z ČOV Luhačovice analyzované metodou GCxGC/TOF-MS jsou znázorněny v následujících obrázcích (obrázek 37 - 42).

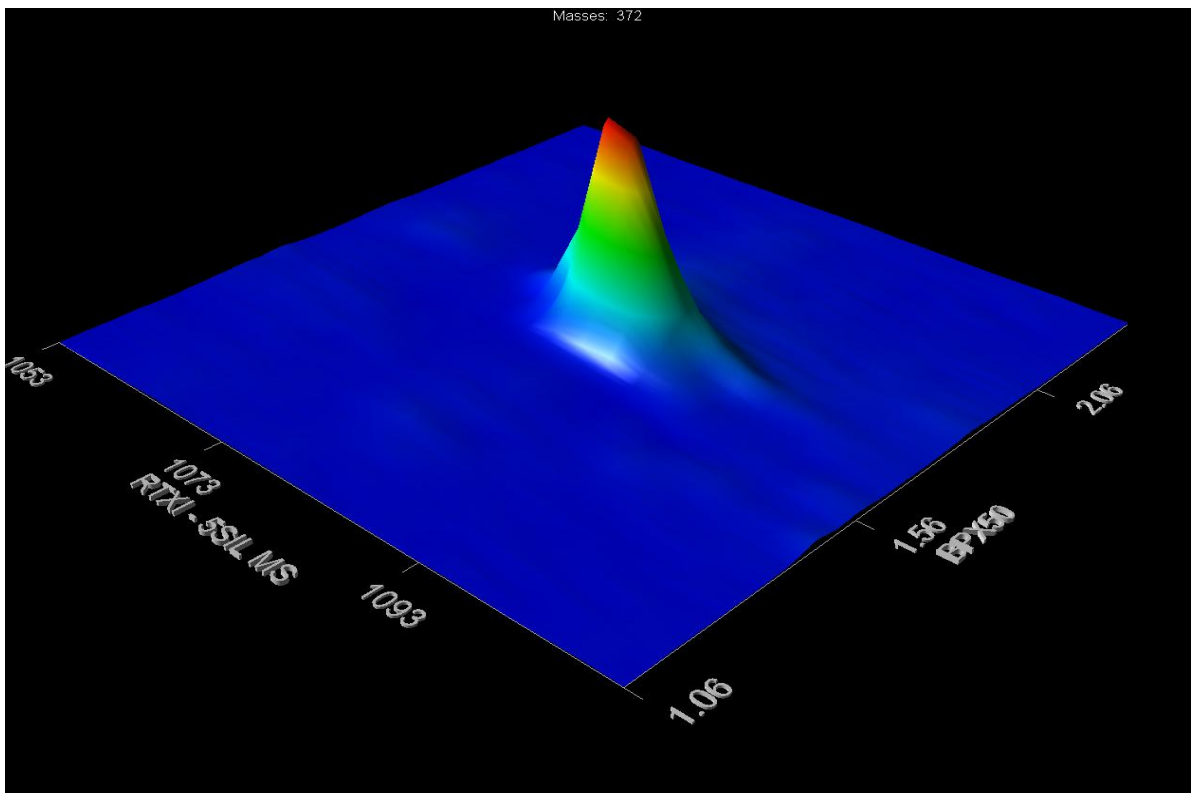
4.5.1.1 Příklad na ČOV Luhačovice



Obr. 37 3D chromatogram vzorku přítoku na ČOV Luhačovice (TIC – celkový iontový proud)

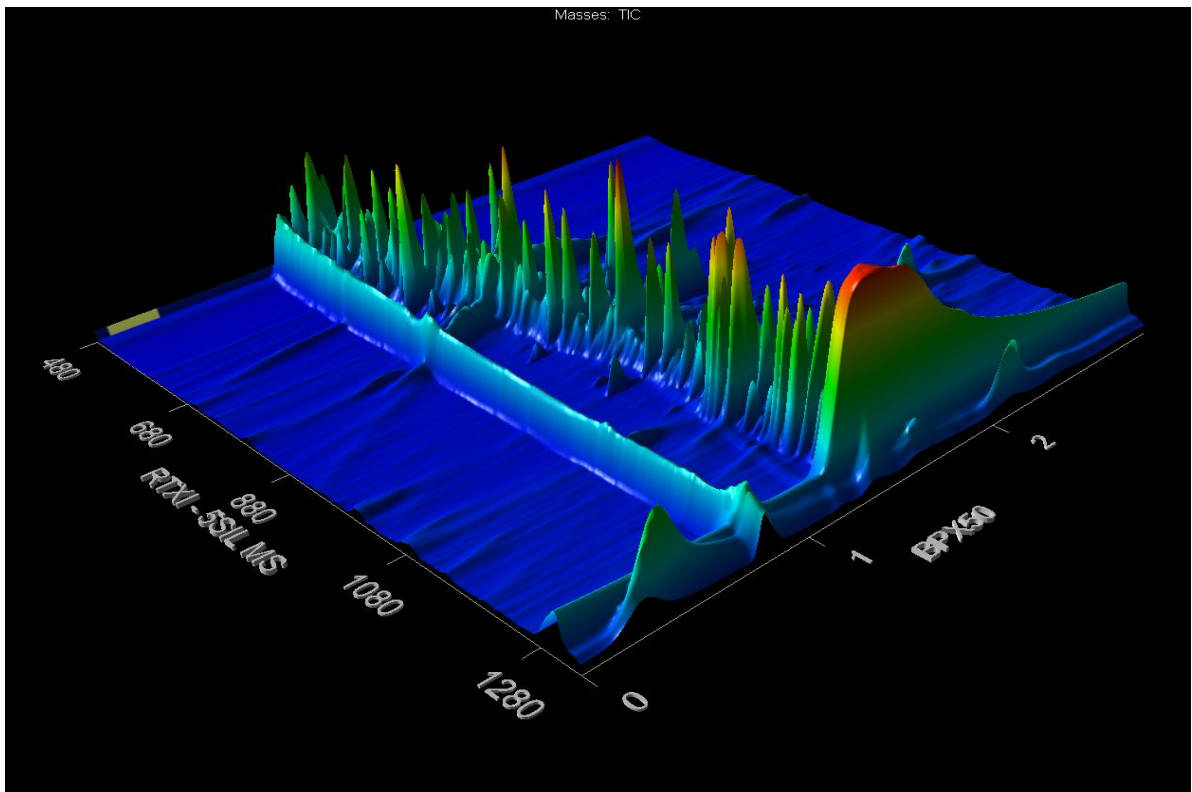


Obr. 38 Colour plot vzorku přítoku na ČOV Luhačovice, zobrazen ion m/z 372

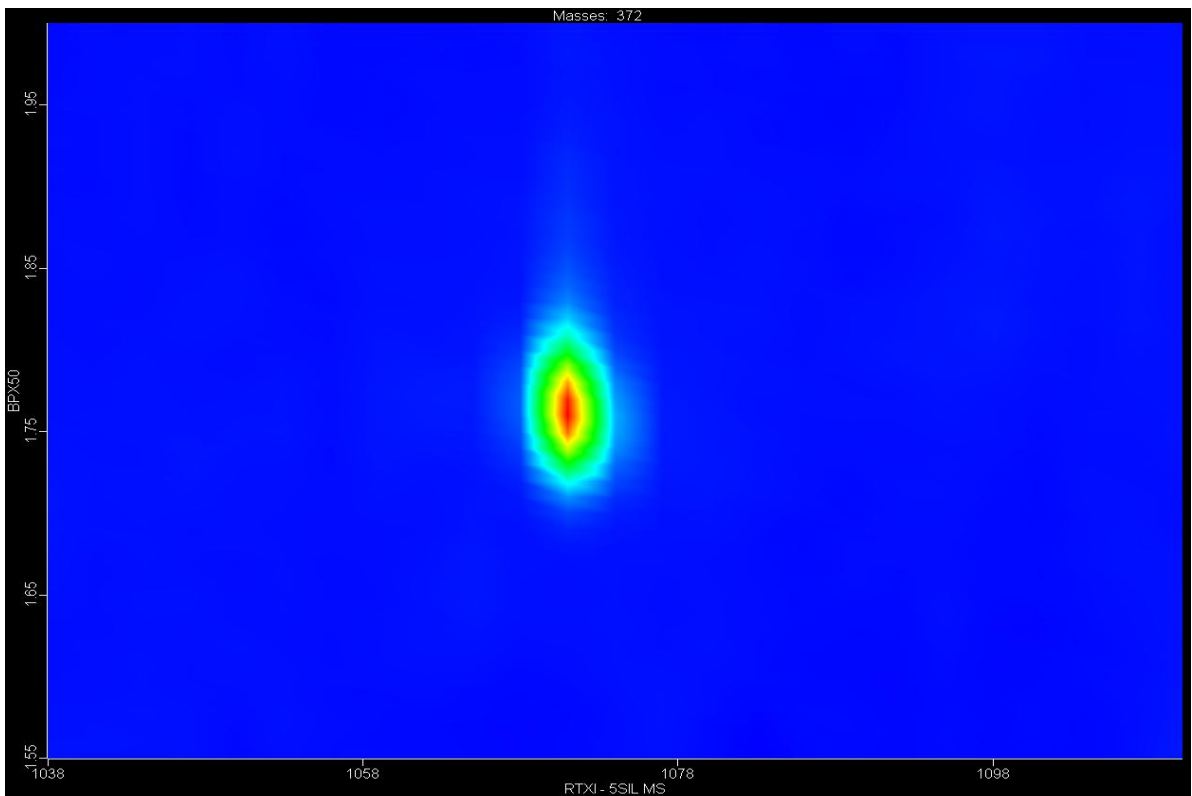


Obr. 39 3D chromatogram vzorku přítoku na ČOV Luhačovice, zobrazen ion m/z 372

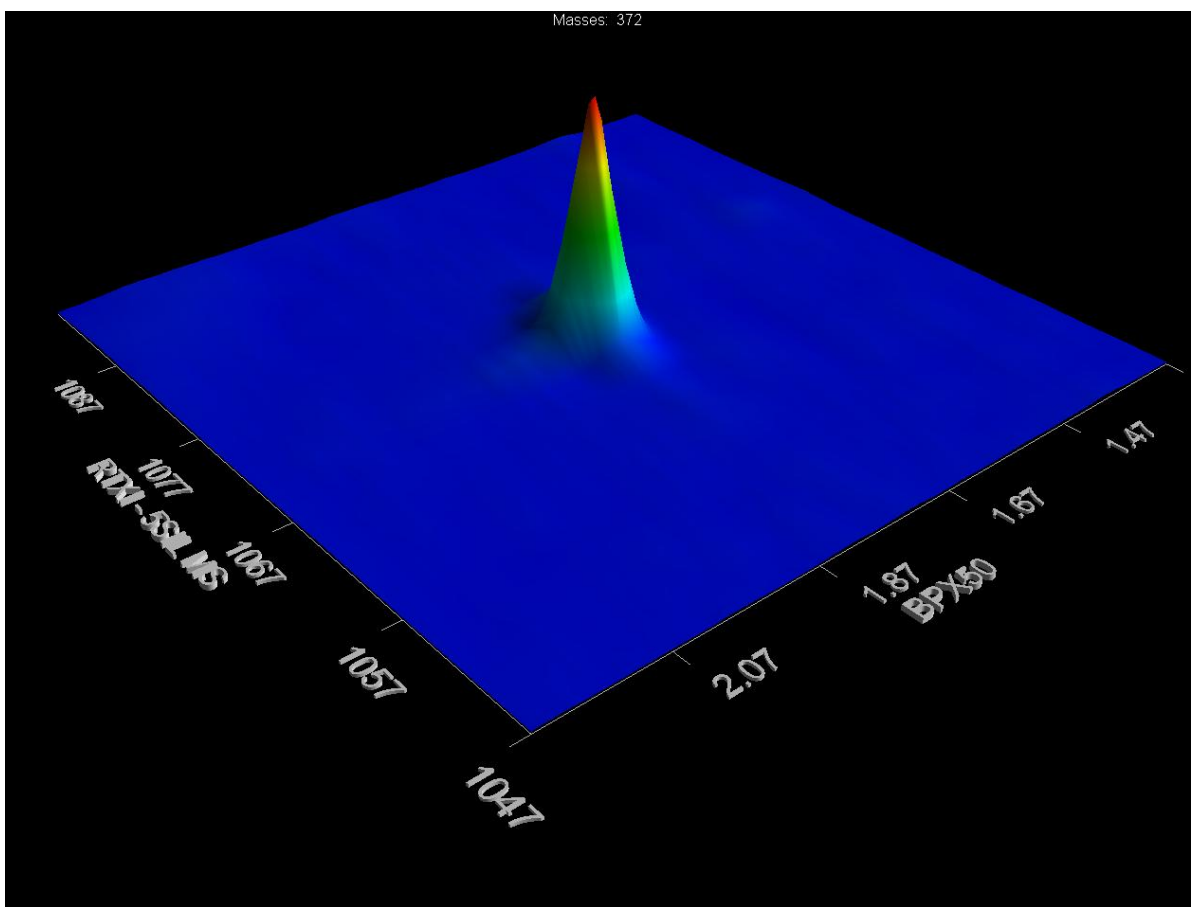
4.5.1.2 Odtok z ČOV Luhačovice



Obr. 40 3D chromatogram vzorku odtoku z ČOV Luhačovice (TIC – celkový iontový proud)



Obr. 41 Colour plot vzorku odtoku z ČOV Luhačovice, zobrazen ion m/z 372



Obr. 42 3D chromatogram vzorku odtoku z ČOV Luhačovice, zobrazen ion m/z 372

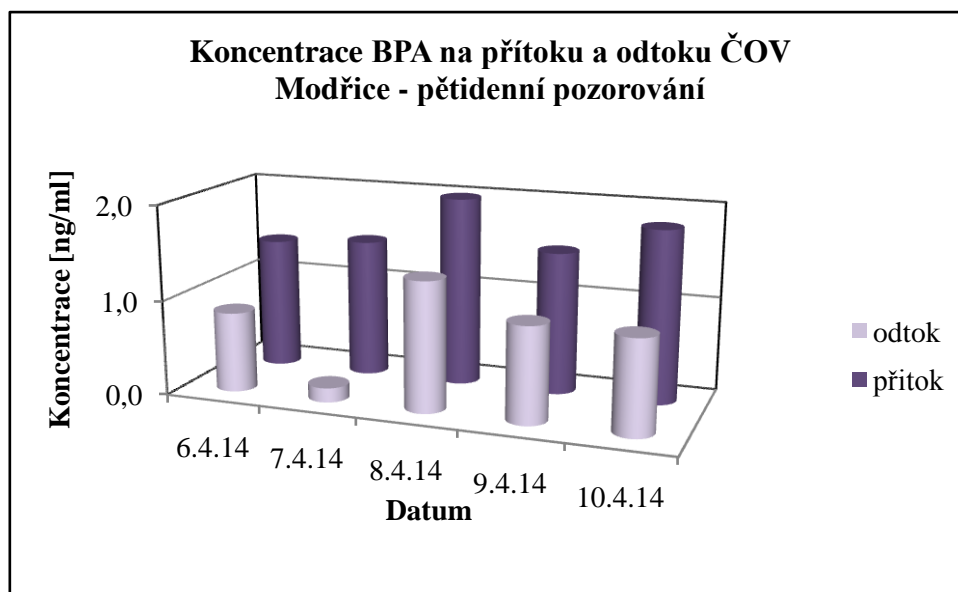
4.5.2 ČOV Modřice

V tabulce č. 11 jsou znázorněny výsledky koncentrací BPA ve vzorcích vody z ČOV Modřice a zjištěná účinnost čistícího procesu.

Tabulka č. 11 Koncentrace BPA ve vzorku vody a účinnost čistícího procesu v ČOV Modřice

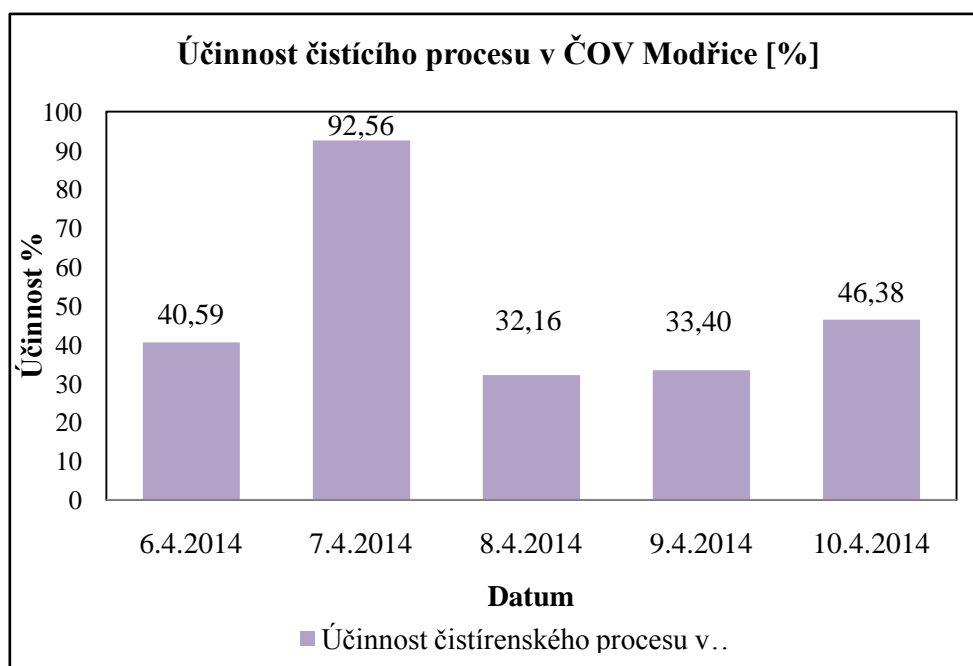
Datum	Vzorek	Průměrná koncentrace ve vzorku [ng/ml]	Relativní rozpětí R [%]	Výtěžnost metody [%]	Koncentrace BPA ve vzorku přepočtená na 100 % výtěžnosti [ng/ml]	Účinnost čistícího procesu [%]
6.4.2014	Přítok	1,0792	4,73	78,26	1,3427	40,59
	Odtok	0,6705	2,47	81,86	0,7977	
	Pevný podíl přítok	x	x	x	x	x
	Pevný podíl odtok	x	x	x	x	
7.4.2014	Přítok	1,1328	27,57	78,26	1,4095	92,56
	Odtok	0,0881	16,90	81,86	0,1048	
	Pevný podíl přítok	x	x	x	x	x
	Pevný podíl odtok	x	x	x	x	
8.4.2014	Přítok	1,5600	10,48	78,26	1,9410	32,16
	Odtok	1,1069	4,75	81,86	1,3168	
	Pevný podíl přítok	x	x	x	x	x
	Pevný podíl odtok	0,0463	x	x	x	
9.4.2014	Přítok	1,1636	9,86	78,26	1,4478	33,40
	Odtok	0,8106	7,91	81,86	0,9643	
	Pevný podíl přítok	x	x	x	x	x
	Pevný podíl odtok	0,0070	x	x	x	
10.4.2014	Přítok	1,4204	11,28	78,26	1,7673	46,38
	Odtok	0,7966	24,51	81,86	0,9477	
	Pevný podíl přítok	x	x	x	x	x
	Pevný podíl odtok	x	x	x	x	

Na obrázku 43 je grafické znázornění poměru koncentrace BPA v přítoku a odtoku ČOV Modřice.



Obr. 43 Znárodnění pětidenního poměru koncentrace BPA ve vzorku vody v přítoku a odtoku čistírny odpadních vod Modřice

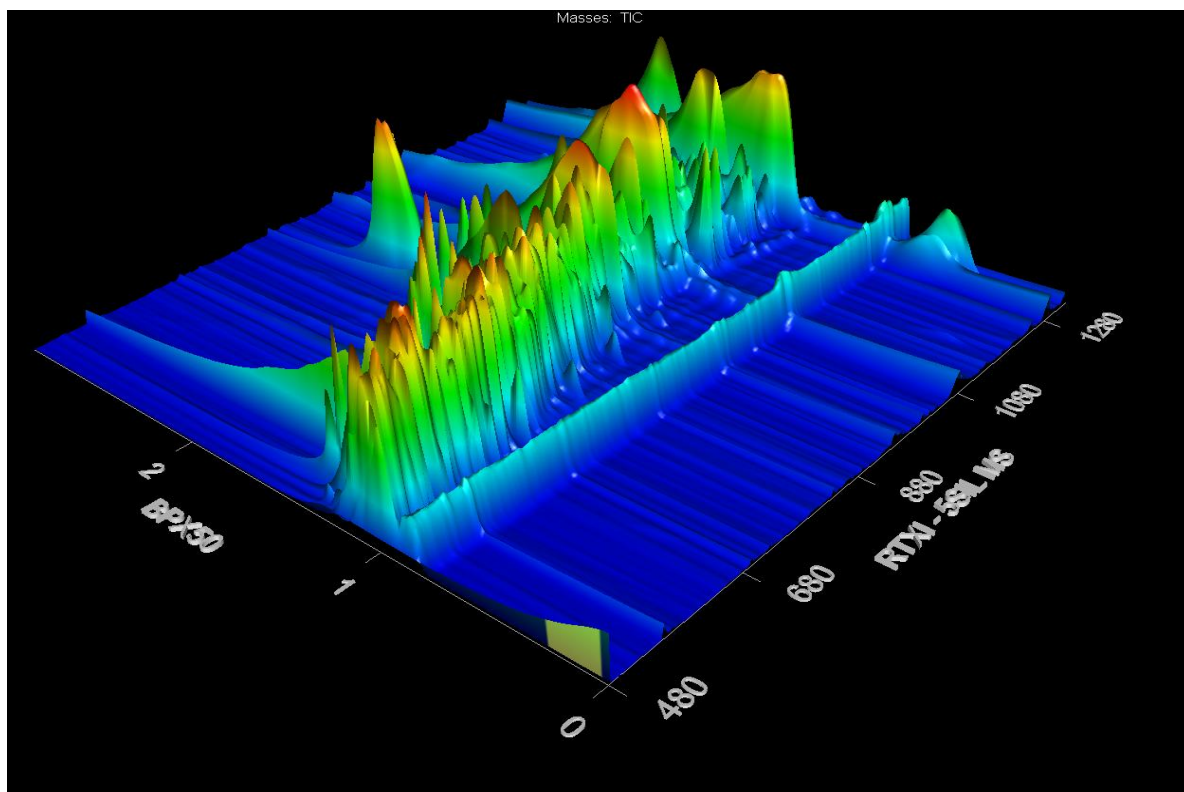
Účinnost čistícího procesu v ČOV Modřice byla sledována pět dní (viz obrázek 44). Z této pětidenní charakteristiky byla stanovena průměrná účinnost čistícího procesu v ČOV Modřice 49,02 %.



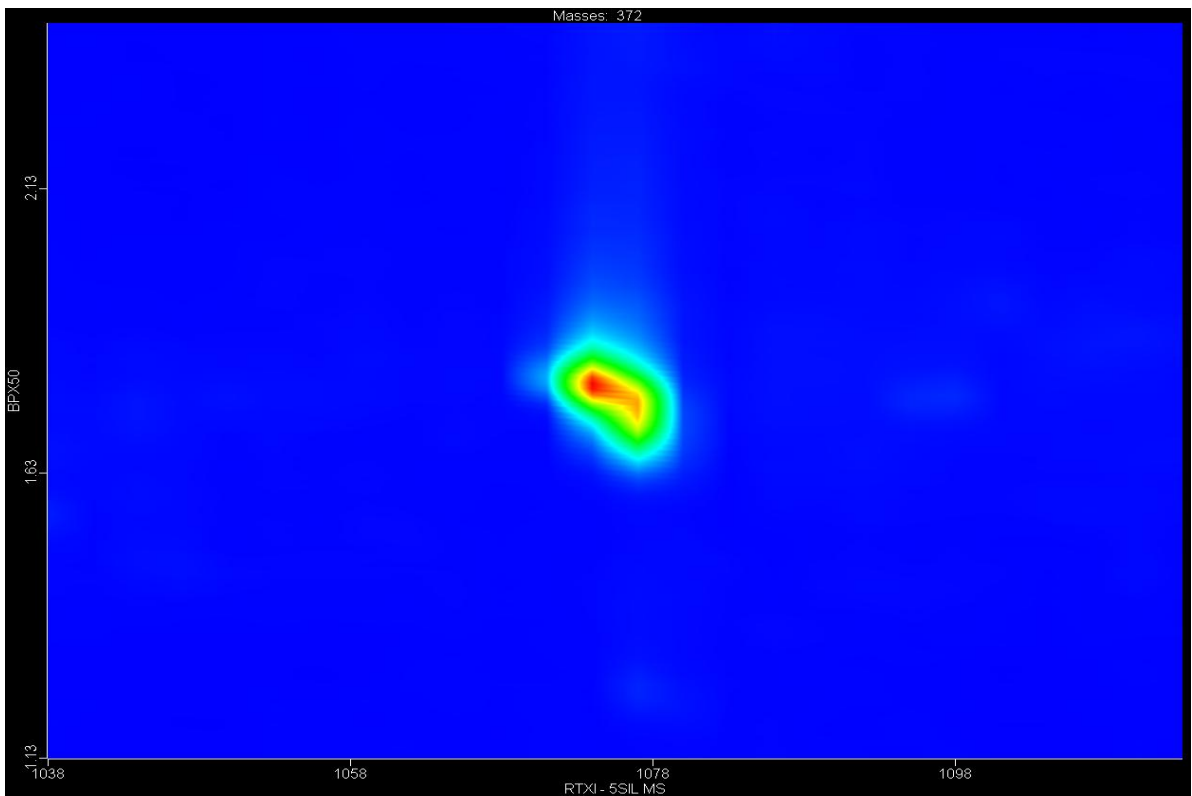
Obr. 44 Účinnost čistícího procesu v ČOV Modřice – pětidenní pozorování

3D chromatogramy a zobrazení colour plot vzorků vody z ČOV Modřice analyzované metodou GCxGC/TOF-MS jsou znázorněny na obrázcích 45 – 54.

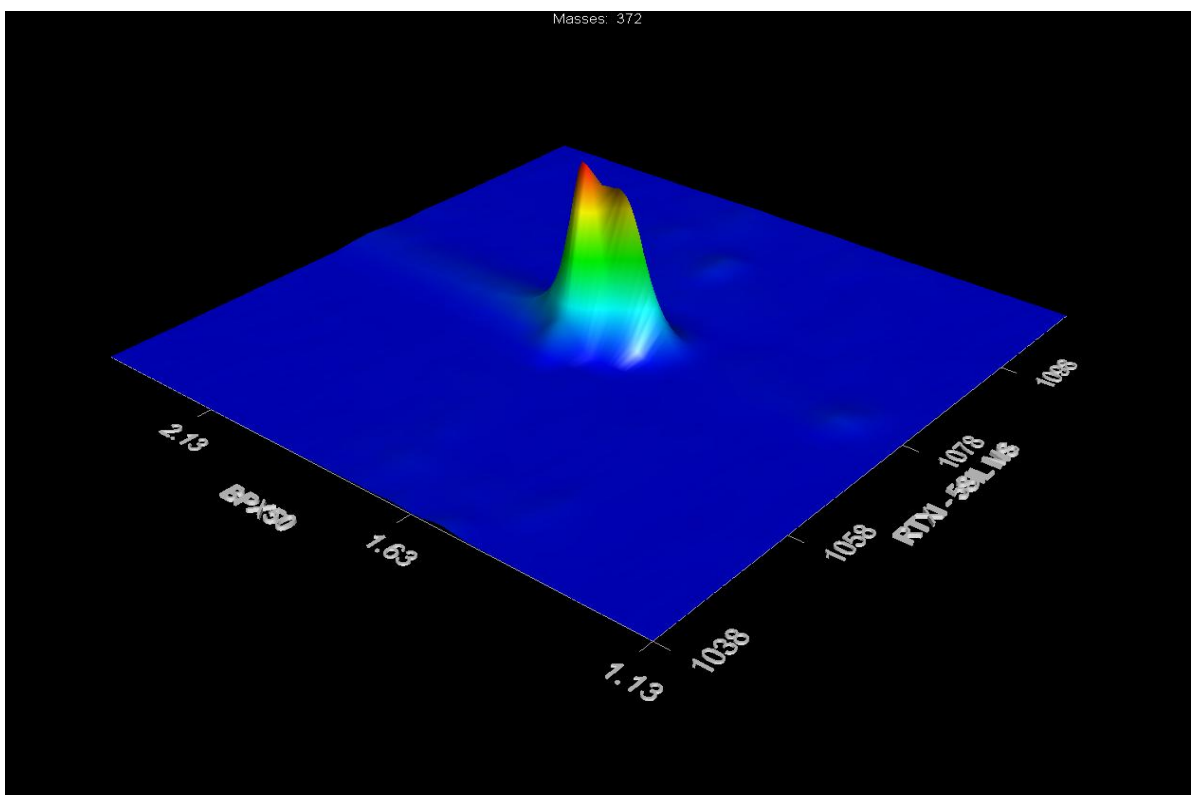
4.5.2.1 Přítok na ČOV Modřice



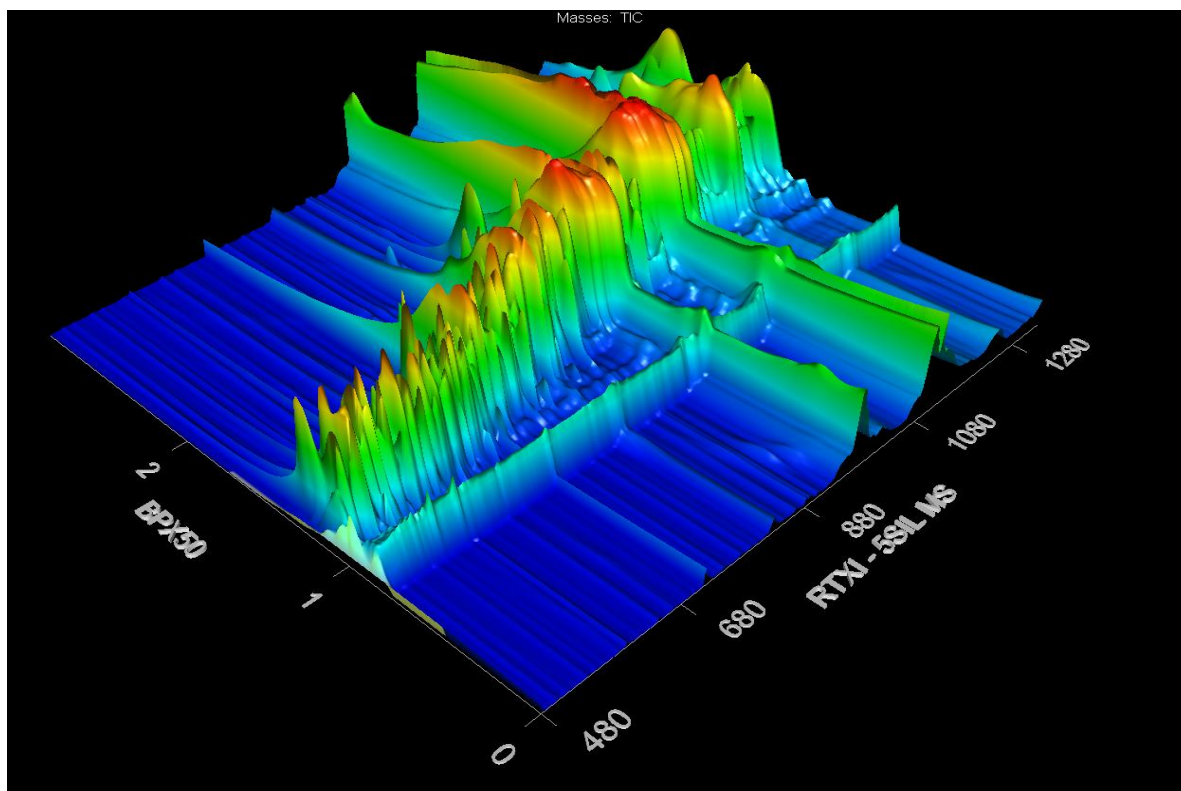
Obr. 45 3D chromatogram vzorku přítoku na ČOV Modřice (TIC – celkový iontový proud)



Obr. 46 Colour plot vzorku přítoku na ČOV Modřice, zobrazen ion m/z 372

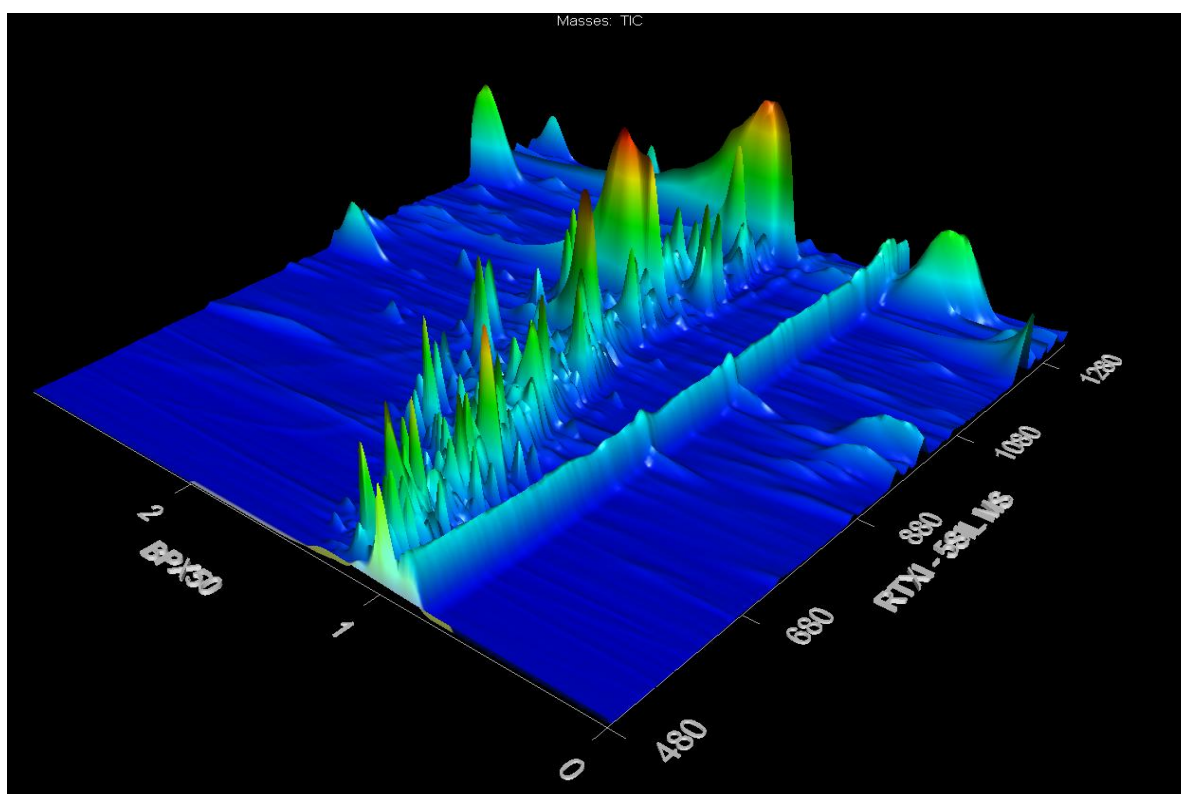


Obr. 47 3D chromatogram vzorku přítoku na ČOV Modřice, zobrazen ion m/z 372

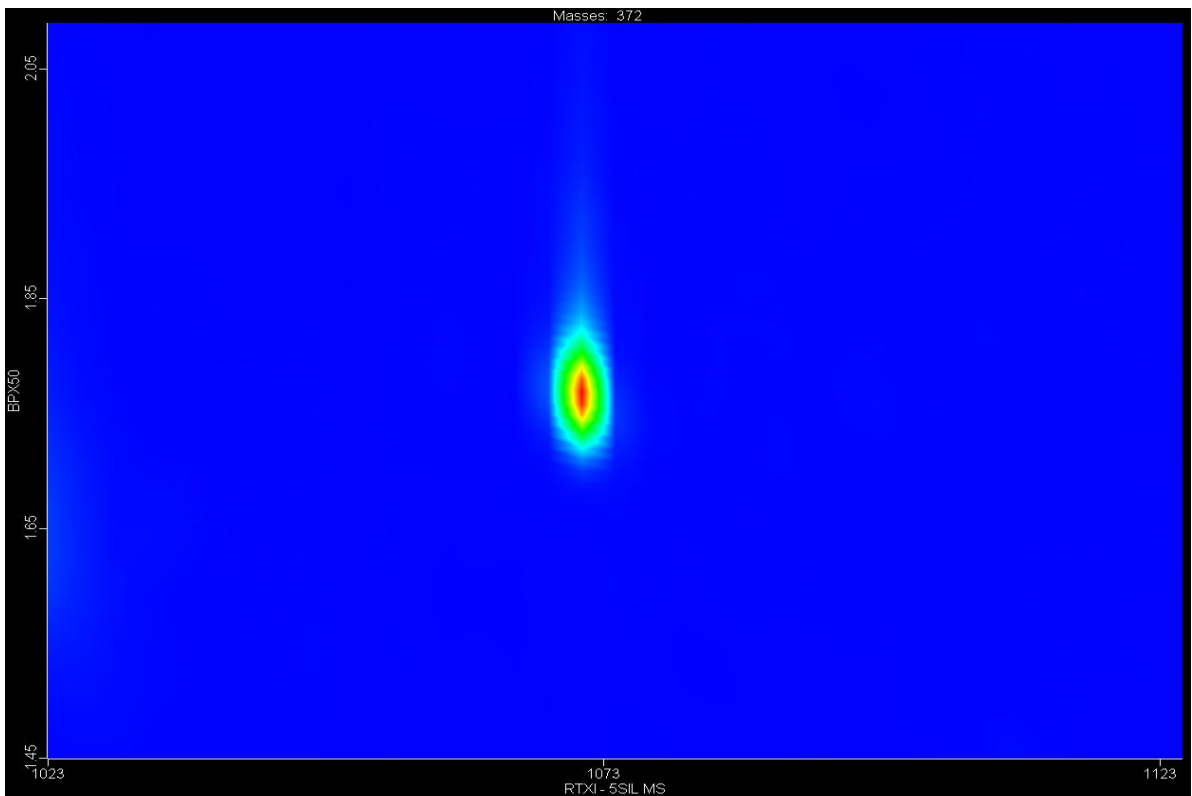


Obr. 48 3D chromatogram extraktu pevného podílu přítoku na ČOV Modřice (TIC – celkový iontový proud)

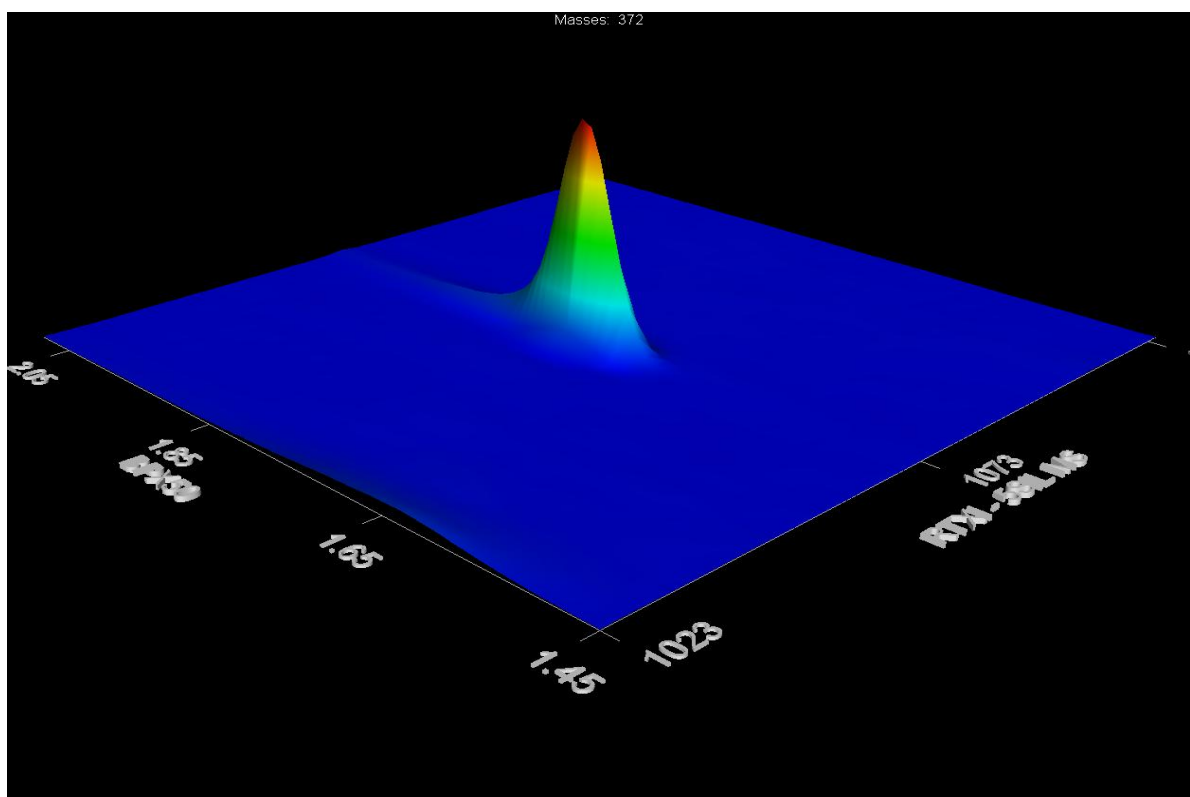
4.5.2.2 Odtok z ČOV Modřice



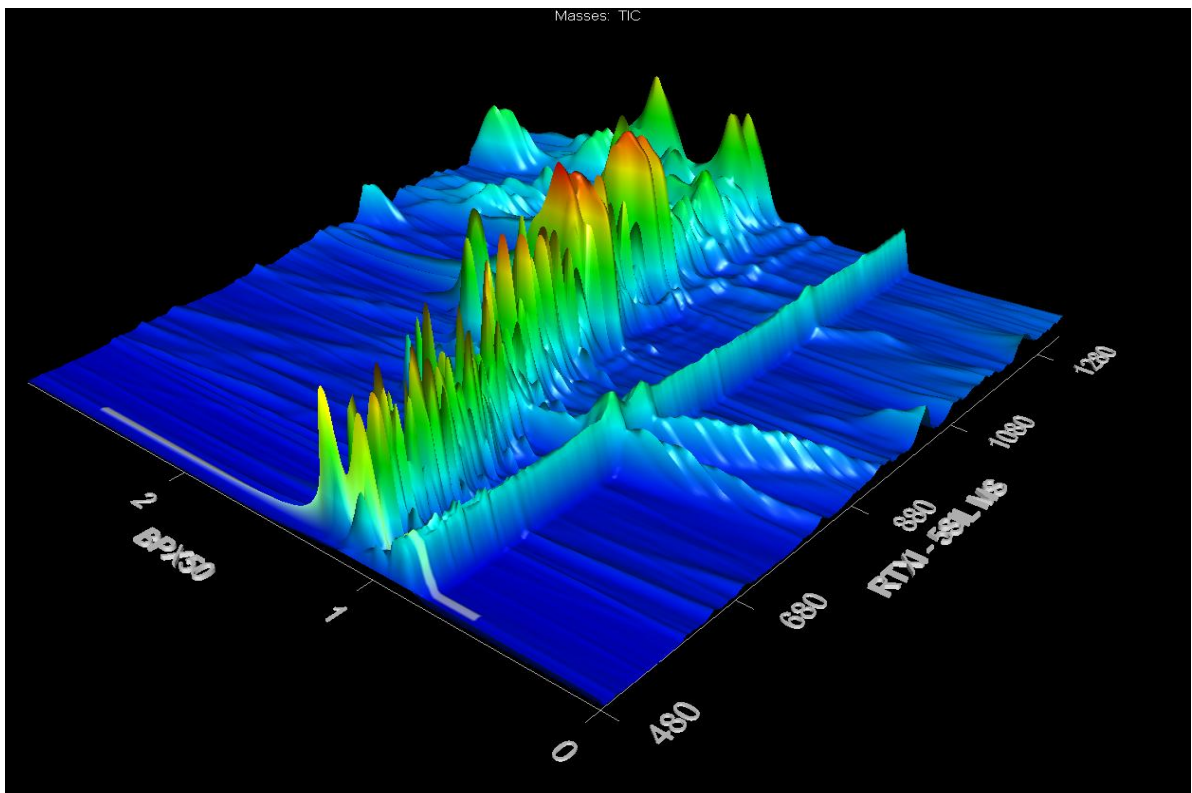
Obr. 49 3D chromatogram vzorku odtoku z ČOV Modřice (TIC – celkový iontový proud)



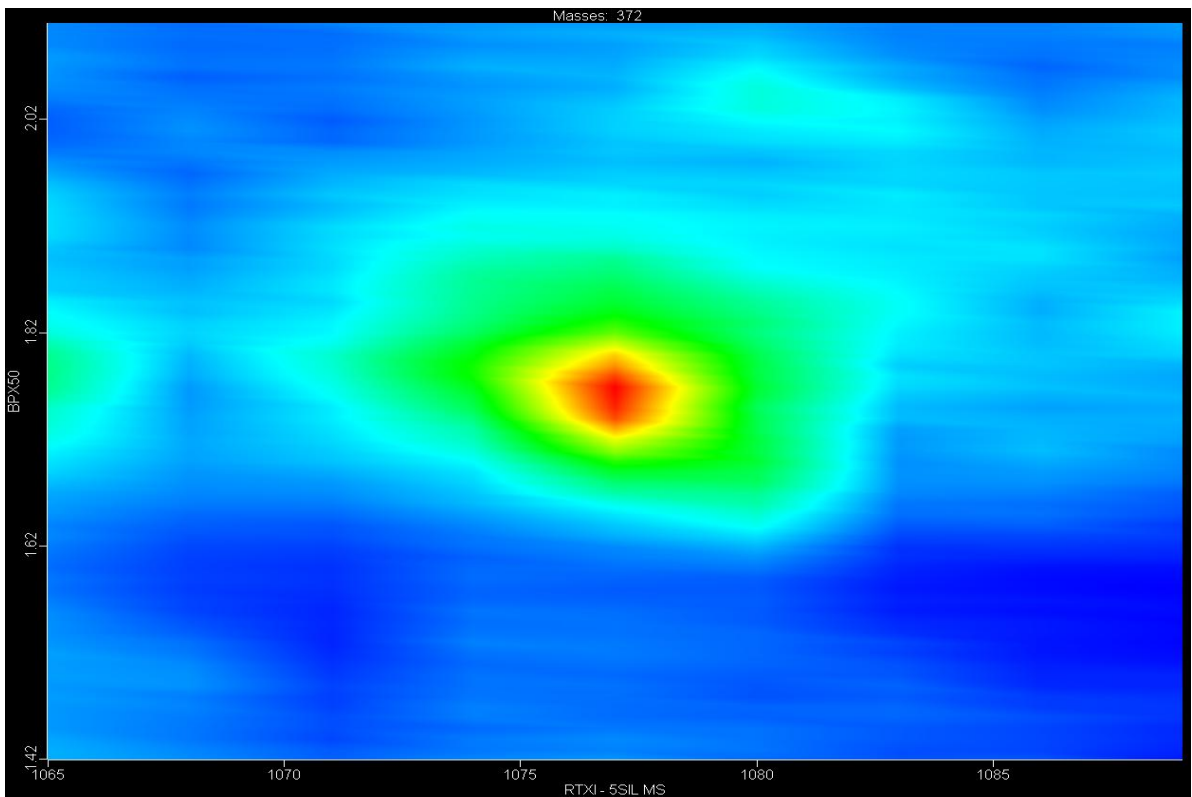
Obr. 50 Colour plot vzorku odtoku z ČOV Modřice, zobrazen ion m/z 372



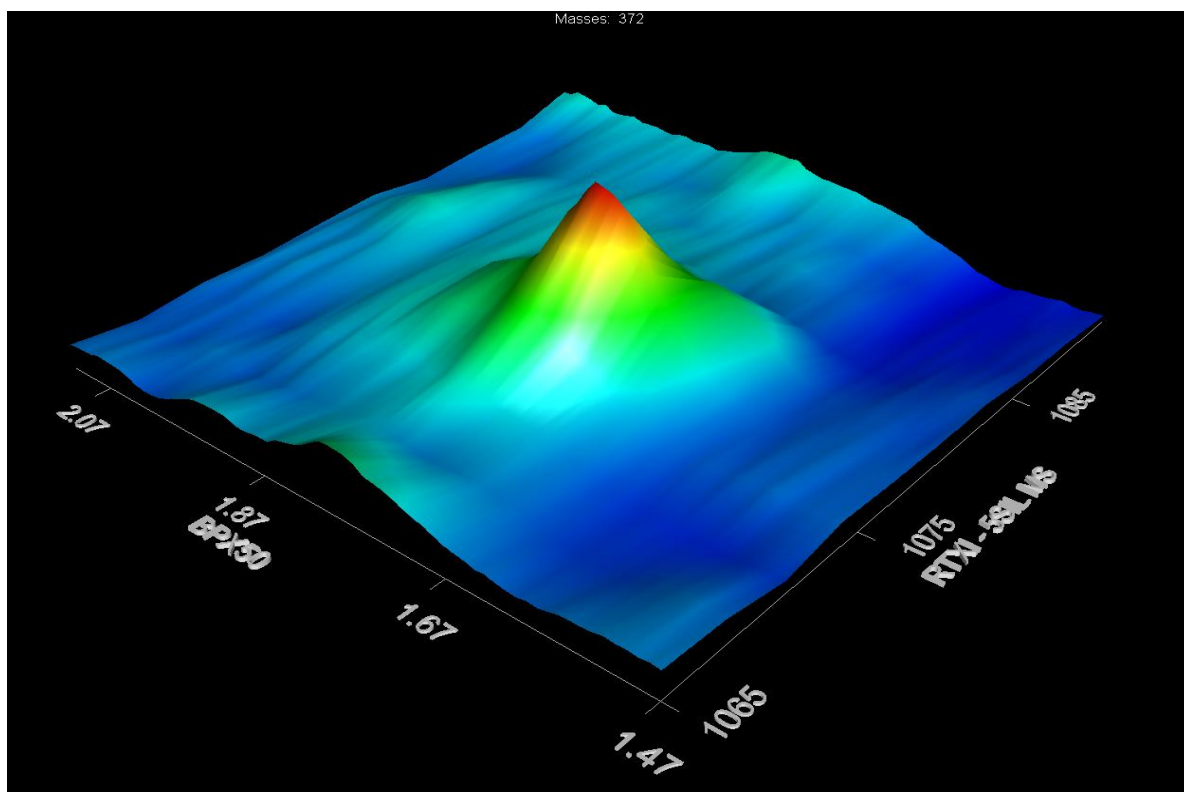
Obr. 51 3D chromatogram vzorku odtoku z ČOV Modřice, zobrazen ion m/z 372



Obr. 52 3D chromatogram extraktu vzorku pevného podílu v odtoku z ČOV Modřice (TIC – celkový iontový proud)



Obr. 53 Colour plot extraktu vzorku pevného podílu v odtoku z ČOV Modřice, zobrazen ion m/z 372



Obr. 54 3D chromatogram extraktu vzorku pevného podílu v odtoku z ČOV Modřice, zobrazen ion m/z 372

Z uvedených výsledků je patrné, že pro analýzu BPA v pevném podílu, zvláště v přítoku na ČOV, by bylo zapotřebí před analýzou provést také izolaci analytu například pomocí SPE.

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zpracování souhrnných informací o vlivu BPA na vodní ekosystém a nalezení vhodné metody pro stanovení BPA ve vzorcích odpadní vody.

Analýza koncentrace BPA na vstupu a výstupu z čistírny odpadních vod proběhla na základě optimalizace a zjištěné nižší limity detekce a kvantifikace metodou kompletní dvoudimenzionální plynové chromatografie s hmotnostní detekcí GCxGC/TOF-MS (v porovnání s GC/TOF-MS) po extrakci SPE a derivatizaci. Pro tento účel byly analyzovány v pětidenním období 24-hodinové slévané vzorky z přítoku a odtoku ČOV Modřice a jeden 24-hodinový slévaný vzorek přítoku a odtoku z ČOV Luhačovice. Limit detekce pro tuto metodu byla $2,42 \cdot 10^{-5}$ ng/ml a limit kvantifikace $8,29 \cdot 10^{-5}$ ng/ml.

V odpadní vodě v přítoku ČOV Modřice se koncentrace BPA pohybovaly v rozmezí 1,34 - 1,94 ng/ml, v odtoku 0,11 – 1,32 ng/ml. Pro ČOV Luhačovice byla hodnota koncentrace BPA řádově srovnatelná - v přítoku 1,15 ng/ml a v odtoku 0,24 ng/ml. Hodnoty v odtoku odpovídají v literatuře udávaným hodnotám koncentrace BPA v řekách (0,1 ng/ml až 1 ng/ml) [15].

Během čistících procesů v ČOV tedy k výrazné eliminaci dochází, přítomnost reziduí v odtoku ale ukazuje na vstup BPA do povrchových vod. Ve sledovaném období byla zaznamenána průměrná účinnost čistícího procesu na ČOV Modřice 49 % a v jednodenním pozorování účinnost čistícího procesu na ČOV Luhačovice 82 %. Pevný podíl se bohužel v přítoku nepodařilo analyzovat, bylo by nutné jeho přečištění. Hodnoty analyzované v odtoku tedy nebylo možno s ničím porovnat pro zjištění účinnosti pro pevný podíl.

Protože je BPA akutně toxický pro vodní živočichy a je považován za vysoce nebezpečnou látku pro vodní prostředí, je zapotřebí věnovat této látce i nadále pozornost.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Welcome to the Bisphenol-A Website. *BisphenolA* [online]. ©2003-2014 [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <http://www.bisphenol-a.org/>
- [2] DEKANT, Wolfgang a Wolfgang VÖLKEL. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2008, vol. 228, issue 1, s. 114-134.
- [3] ERLER, Cheryl a Julie NOVAK. Bisphenol A Exposure: Human Risk and Health Policy. *Journal of Pediatric Nursing*. 2010, vol. 25, issue 5, s. 400-407.
- [4] Bisfenol A: je opravdu nebezpečný?. PATOČKA, Jiří. *Toxicology* [online]. 19.9.2010 [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=355>
- [5] IZZOTTI, Alberto, Stefano KANITZ, Francesco D'AGOSTINI, Anna CAMOIRANO a Silvio De FLORA. Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2009, vol. 679, 1-2, s. 28-32.
- [6] Pubchem Compound: Bisphenol A. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, U.S. National Library of Medicine. [online]. [cit. 2014-05-07]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6623>
- [7] FROMME, Hermann, Thomas KÜCHLER, Thomas OTTO, Konstanze PILZ, Josef MÜLLER a Andrea WENZEL. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*. 2002, vol. 36, issue 6, s. 1429-1438.
- [8] DUCHÁČEK, Vratislav. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2006, 278 s. ISBN 80-708-0617-6.
- [9] *Making Epoxy Resins* [online]. ©1995-1996 [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <http://www.pslc.ws/spanish/eposyn.htm>
- [10] Bisfenol-A afeta fertilidade masculina. *Zona de Risco* [online]. 29.10.2010 [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <http://zonaderisco.blogspot.cz/2010/10/bisfenol-afeta-fertilidade-masculina.html>
- [11] EMNET, Philipp, Rai S. KOOKANA, Ali SHAREEF, Sally GAW, Mike WILLIAMS, Deborah CRITTENDEN a Grant L. NORTHCOTT. The effect of irradiance and temperature on the role of photolysis in the removal of organic micropollutants under Antarctic conditions. *Environmental Chemistry*. 2013, vol. 10, issue 5, s. 417-423
- [12] Bisphenol A (BPA): Questions and Answers about Bisphenol A. NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES. *National Institute of Environmental Health Sciences: Your environment. Your Health* [online]. 18.7.2013 [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-bpa/>
- [13] Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A. World Health Organization [online]. @2011 [cit. 2012-03-01]. 60 s. ISBN 978-92-14-156427-4. Dostupné z:

- http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44624/1/97892141564274_eng.pdf. - See more at: <http://nutriweb.cz/cs/clanky/ostatni/bisfenol-skryta-hrozba-plastu#sthash.I83Xsmu3.dpuf>
- [14] LOCHOVSKÝ, Petr a POSPÍCHALOVÁ. Některé zdroje kontaminace vodního prostředí alkylfenolovými látkami a bisfenolem A. In: *VTEI: Vodohospodářské technicko-ekonomické informace* [online]. Praha: Vodní hospodářství, 2011 [cit. 2014-04-24]. ISSN 0322-8916. Dostupné z: http://www.vuv.cz/fileadmin/user_upload/pdf/vtei/2011/vtei_5-2011.pdf
- [15] CRAIN, D. Andrew, Marcus ERIKSEN, Taisen IGUCHI, Susan JOBLING, Hans LAUFER, Gerald A. LEBLANC a Louis J. GUILLETTE. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*. 2007, vol. 24, issue 2, s. 225-239.
- [16] ZHAO, Jian-Liang, Guang-Guo YING, Li WANG, Ji-Feng YANG, Xiao-Bing YANG, Li-Hua YANG a Xu LI. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry. *Science of The Total Environment*. 2009, vol. 407, issue 2, s. 962-974.
- [17] KŘESINOVÁ, Z. Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek. *Chemické Listy*, 2009, vol. 103, p. 200–207.
- [18] YANG, Yuyin, Zhao WANG a Shuguang XIE. Aerobic biodegradation of bisphenol A in river sediment and associated bacterial community change. *Science of The Total Environment*. 2014, 470-471, s. 1184-1188.
- [19] RONEN, Z. a A. ABELIOVICH. Anaerobic-Aerobic Process for Microbial Degradation of Tetrabromobisphenol A. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000-06-01, vol. 66, issue 6, s. 2372-2377.
- [20] *Zákony pro lidi: Předpis č. 61/2003 Sb.* [online]. 2003 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-61>
- [21] *Státní zdravotní ústav: Aktuální situace v problematice Bisfenolu A* [online]. [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/aktualni-situace-v-problematice-bisfenolu-a>
- [22] *Blog Respekt: Bisfenol A: Švédsko oznámilo zákaz v obalech potravin pro děti* [online]. Respekt Publishing a.s., 2012 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://suta.blog.respekt.ihned.cz/c1-55430190-bisfenol-a-svedsko-oznamilo-zakaz-v-obalech-potravin-pro-deti>
- [23] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *FCH VUT Brno: Analytické metody technické praxe (přednáška)*. 2012.
- [24] RYKOWSKA, I a W WASIAK. PROPERTIES, THREATS, AND METHODS. *ACTA CHROMATOGRAPHICA*. roč. 2006, NO. 16. Dostupné z:

http://www.us.edu.pl/universytet/jednostki/wydzialy/chemia/acta/ac16/zrodla/01_AC16.pdf

- [25] VÍLCHEZ, José Luis, Alberto ZAFRA, Antonio GONZÁLEZ-CASADO, E. HONTORIA a Monsalud DEL OLMO. Determination of trace amounts of bisphenol F, bisphenol A and their diglycidyl ethers in wastewater by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2001, vol. 431, issue 1, s. 31-40.
- [26] PROCHÁZKOVÁ, Dana. Extrakce na tuhou fázi: Extrakce na tuhou fázi. *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>
- [27] COUFAL, Petr. *EXTRAKCE, GPC, IEC a AC* [online]. 1996 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
- [28] GATIDOU, Georgia, Nikolaos S. THOMAIDIS, Athanasios S. STASINAKIS a Themistokles D. LEKKAS. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, vol. 1138, 1-2, s. 32-41.
- [29] LUCCI, Paolo, Deborah PACETTI, Oscar NÚÑEZ a Natale G. FREGA. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. *Intech: Analytical chemistry* [online]. 24.10.2012, 2014 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/current-trends-in-sample-treatment-techniques-for-environmental-and-food-analysis>
- [30] Mikroextrakce na tuhou fázi SPME. *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/15720/11.pdf>
- [31] MUDIAM, Mohana Krishna Reddy, Rajeev JAIN, Virendra K. DUA, Amit Kumar SINGH, V. P. SHARMA a R. C. MURTHY. Application of ethyl chloroformate derivatization for solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometric determination of bisphenol-A in water and milk samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, vol. 401, issue 5, s. 1695-1701.
- [32] CombiPAL Front End Automation for Gaschromatography. Zwingen (Switzerland): CTC Analytics AG, 2009.
- [33] NAASSNER, Markus, Magnus MERGLER, Klaus WOLF a Ingolf SCHUPHAN. Determination of the xenoestrogens 4-nonylphenol and bisphenol A by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection after derivatisation with dansyl chloride. *Journal of Chromatography A*. 2002, vol. 945, 1-2, s. 133-138.
- [34] TSUDA, Taizo, Kunio SUGA, Emiko KANEDA a Motoyuki OHSUGA. Determination of 4-nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid

- chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000, vol. 746, issue 2, s. 305-309.
- [35] RIBEIRO, Cláudia, Maria Elizabeth TIRITAN, Eduardo ROCHA a Maria João ROCHA. Development and Validation of a HPLC-DAD Method for Determination of Several Endocrine Disrupting Compounds in Estuarine Water. *Journal of Liquid Chromatography*. 2007, vol. 30, issue 18, s. 2729-2746.
- [36] WANG, Jing, Hefang PAN, Zhengzheng LIU a Fei GE. Ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of alkylphenols in soil. *Journal of Chromatography A*. 2009, vol. 1216, issue 12, s. 2499-2503.
- [37] CÉSPEDES, R., K. SKRYJOVÁ, M RAKOVÁ, J. ZERAVIK, M. FRÁNEK, S. LACORTE a D. BARCELÓ. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of 4-nonylphenol and octylphenol in surface water samples by LC-ESI-MS. *Talanta*. 2006, vol. 70, issue 4, s. 745-751. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914006004863>
- [38] ŘEZNÍČEK, Jiří. ČSN EN ISO 18857-2 (757568). *Technor: Technické normy ČNS* [online]. 2008 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: http://www.technicke-normy-csn.cz/757568-csn-en-iso-18857-2_4_91159.html
- [39] BALÍKOVÁ, M. Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC - MS): GC - MS aplikace v toxikologii. In: [online]. Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VNF Praha. [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: http://soudni.lf1.cuni.cz/file/5700/11_AT_GC-MS%20aplikace%20%20v%20
- [40] HERNANDO, M.D., M. MEZCUA, M.J. GÓMEZ, O. MALATO, A. AGÜERA a A.R. FERNÁNDEZ-ALBA. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1047, issue 1, s. 129-135
- [41] SAMARAS, Vasilios G., Nikolaos S. THOMAIDIS, Athanasios S. STASINAKIS a Themistokles D. LEKKAS. An analytical method for the simultaneous trace determination of acidic pharmaceuticals and phenolic endocrine disrupting chemicals in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, vol. 399, issue 7, s. 2549-2561.
- [42] Information from the InChI. *National Institute of Standards and Technology* [online]. U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. 2011 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://webbook.nist.gov/cgi/inchi/InChI%3D1S/C21H32O2Si2/c1-21%282,17-9-13-19%2814-10-17%2922-24%283,4%295%2918-11-15-20%2816-12-18%2923-25%286,7%298/h9-16H,1>

- [43] Phenol, 4,4'-(1-methylethylidene)bis-. *National Institute of Standards and Technology* [online]. U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. 2011 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C80057&Units=SI&Mask=80#IR-Spec>
- [44] 2,2-Bis[(4-trimethylsiloxy)phenyl]propane. *National Institute of Standards and Technology* [online]. U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America. 2011 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C4387160&Units=SI&Mask=2000>
- [45] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 1998, 199 s. ISBN 80-214-1300-X.
- [46] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [47] JULÁK, Jaroslav. *Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998, 195 s. ISBN 80-718-4451-9.
- [48] Materiály o GC k předmětu C7300: Metody chemického výzkumu. [online]. [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf
- [49] POLÍVKOVÁ, Jana. Seznámení s plynovou chromatografií. *ELDIAG s.r.o.* [online]. 2013, 2014 [cit. 2014-05-07]. Dostupné z: <http://www.eldiag.cz/cz/texty/seznameni-s-plynovou-chromatografií>
- [50] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *FCH VUT Brno: Chromatografie (přednáška)*. 2013.
- [51] DOUGLAS, Frederic. GC/MS Analysis. *Scientific Testimony: An Online Journal* [online]. [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html>
- [52] COUFAL, Petr. *Separáční metody* [online]. 1996 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/sepmet.html>
- [53] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *FCH VUT Brno: Instrumentální a strukturní analýza (přednáška)*. 2012.
- [54] MOTYKA, Kamil a Jan HLAVÁČ. *Stručný přehled separačních metod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3.
- [55] ČÁSLAVSKÝ, Josef. *FCH VUT Brno: Hmotnostní spektrometrie*. 2014.
- [56] Mikšík, Ivan. *Fyziologický ústav AV ČR Praha : Detekce a detektory (přednáška)*. 2014. Dostupné z: <http://analyt.wz.cz/detektory/detekce2.pdf>
- [57] Holčapek, Michal. *Univerzita Pardubice: Hmotnostní analyzátory (přednáška)*. 2014. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/03_HmotnostniAnalyzatory.pdf

- [58] DUNNIVANT, Frank M. The Gas Chromatograph. [online]. Dunnivant & Ginsbach, 2008 [cit. 2014-05-08]. Dostupné z: http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C_MS_Ebook/CH2/2_3.html
- [59] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2007, 281 s. ISBN 978-80-246-1453-3.
- [60] PERTILE, Eva a Vladimír ČABLÍK. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006, 238 s. ISBN 80-248-1049-2.
- [61] JANČÁŘOVÁ, Irena a Luděk JANČÁŘ. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 195 s. ISBN 978-80-7157-647-12008.
- [62] YANG, Lihua, Tiangang LUAN a Chongyu LAN. Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2006, vol. 1104, 1-2, s. 23-32.
- [63] JEANNOT, Roger, Hassan SABIK, Emmanuel SAUVARD, Thierry DAGNAC a Katja DOHRENDORF. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2002, vol. 974, 1-2, s. 143-159.
- [64] JANČA, Josef. *Field-flow fractionation: analysis of macromolecules and particles*. New York: M. Dekker, c1988, vi, 336 p. ISBN 08-247-7792-1.
- [65] OLDIGES, Marco, Stephan LÜTZ, Simon PFLUG, Kirsten SCHROER, Nadine STEIN a Christiane WIENDAHL. Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007-8-17, vol. 76, issue 3, s. 495-511.
- [66] ADAHCHOUR, M., J. BEENS a U.A.Th. BRINKMAN. Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2008, vol. 1186, 1-2, s. 67-108.
- [67] WANG, Bing, Aiqin FANG, John HEIM, Bogdan BOGDANOV, Scott PUGH, Mark LIBARDONI a Xiang ZHANG. DISCO: Distance and Spectrum Correlation Optimization Alignment for Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Analytical Chemistry*. 2010, vol. 82, issue 12, s. 5069-5081.
- [68] Pegasus 4D: Komprehenzivní dvoudimenzionální plynový chromatograf s hmotnostním detektorem (TOF). *Leco European Portal: Separation Science* [online]. 2012 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://cz.leco-europe.com/product/pegasus-4d/>
- [69] Bisfenol A v životním prostředí: Elissa - Viditest. *Vidia* [online]. 2014 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: http://www.vidia.cz/images/stories/letaky/bisfenol_cz_k02.pdf
- [70] ČOV Brno Modřice. *Brněnské vodárny a kanalizace* [online]. 25.4.2014 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: <http://www.bvk.cz/o-spolecnosti/odvadeni-a-cisteni-odpadnich-vod/cov-brno-modrice/>

- [71] Mapy Google. *Https://www.google.cz/maps/@49.1973281,16.5992135,14z* [online]. 2014 [cit. 2014-04-26].
- [72] VUME: Čistírny odpadních vod. *EAGRI: Ministerstvo zemědělství* [online]. 2014 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/130552/VUME_cistirny_odpadnich_vod.pdf
- [73] DOUŠA, Michal. Mez detekce a mez stanovitelnosti. *HPLC* [online]. 2013 [cit. 2014-04-26]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

1D	jednorozměrný
2D	dvourozměrný
3D	trojrozměrný
BPA	Bisfenol A
BTSFA	N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CD	kompaktní disk
ČOV	čistírna odpadních vod
ČSN	Česká technická norma
DAD	detektor s diodovým polem
DVD	digitální víceúčelový disk
ECD	detektor elektronového záchytu
EFSA	Evropská agentura pro bezpečnost potravin
ELISA	Enzyme - linked immunosorbent assay
EU	Evropská Unie
FID	plamenový ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GCxGC	kompletní dvoudimenzionální chromatografie
GCxGC-TOFMS	kompletní dvoudimenzionální plynová chromatografie s hmotnostní detekcí na bázi analyzátoru doby letu
GC/TOF-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí na bázi analyzátoru doby letu
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
H	výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
K_D	distribuční konstanta
LC	kapalinová chromatografie
LD50	střední smrtelná dávka
LLE	extrakce kapalina – kapalina
LOD	limit detekce (Limit of Detection)
LOQ	limit kvantifikace (Limit of Quantification)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
MSTFA	N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
PVC	polyvinylchlorid
SCAN	registrace hmotnostních spekter v nastaveném rozsahu m/z s nastavenou frekvencí
SFE	superkritická fluidní extrakce
SIM	detekce jednoho vybraného iontu
SPME	mikroextrakce tuhou fází
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TCD	tepelně vodivostní detektor
TMCS	trimethylchlorsilan

TOF analyzátor doby letu
UPLC..... ultra účinná kapalinová chromatografie
UPLC-MS/MS..... ultra účinná kapalinová chromatografie s tandemovou
hmotnostní detekcí

8. PŘÍLOHY

8.1 Příloha 1

8.1.1 Obecné vlastnosti BPA [4, 6, 7]

- **Systematický název:** 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan
- **Sumární vzorec:** C₁₅H₁₆O₂
- **Molekulová hmotnost:** 228,2863 g.mol⁻¹
- **CAS registrační číslo:** 80-05-7



Obr. 55 Chemická struktura BPA

- **Další názvy:**

Phenol, 4,4'-isopropylidenedi-; p,p'-Isopropylidenebisphenol; Biphenol A; Bisphenol A; p,p'-Isopropylidenediphenol; Dian; Diano; Diphenylolpropane; Parabis A; Phenol, (1-methylethylidene)bis-; Pluracol 245; 2,2-Bis(hydroxyphenyl)propane; 2,2-Bis(p-hydroxyphenyl)propane; Bisferol A, 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane; 4,4'-Isopropylidenebis[phenol]; 4,4'-Isopropylidenediphenol; Bis(4-hydroxyphenyl)dimethylmethane; Parabis; Ipognox 88, p,p'-Dihydroxydiphenyldimethylmethane; 4,4'-Dihydroxydiphenyldimethylmethane; 4,4'-(1-Methylethylidene)bisphenol; p,p'-Dihydroxydiphenylpropane; 4,4'-Dihydroxydiphenylpropane; p,p'-Bisphenol A; 2,2-(4,4'-Dihydroxydiphenyl)propane; 4,4'-Dihydroxy-2,2-phenylpropane; 4,4'-Dihydroxydiphenyl-2,2-propane; 4,4-Isopropylidenediphenol, 4,4'-Bisphenol A; β-di-p-hydroxyphenylpropane; 2,2-Di(4-hydroxyphenyl)propane; Dimethyl bis(p-hydroxyphenyl)methane; Rikabanol; Dimethylmethylenep,p'-diphenol; 2,2-Di(4-phenylol)propane; di-2,2-(4-Hydroxyphenyl)propane; BPA 157, 4,4'-Dihydroxydiphenylpropane; NCI-C50635; 2,2-di-(4'-Hydroxyphenyl)-propane; β,β'-Bis(p-hydroxyphenyl)propane; p,p'-Bisphenol A; Bis(p-hydroxyphenyl)propane; Bisphenol; Isopropylidenebis(4-hydroxybenzene); Phenol, 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-; 2,2-Bis-4'-hydroxyfenylpropan; Phenol; 2,2-(4,4-Dihydroxydiphenyl)propane; 2,2-Bis(4-hydroxyphenol) propane; 2,2 Bis(4,4'-hydroxyphenyl)propane; 2,2-Bis(4'-hydroxyphenyl)propane, 4,4'-dimethylmethylenedi-;Propane

8.1.2 Fyzikální a chemické vlastnosti [4, 6, 7]

- **Barva:** bílá až světle hnědá
- **Skupenství:** pevné, ve formě granulí, vloček nebo prachu
- **Hygroskopicitata:** slabá
- **Rozpustnost:** rozpustný ve vodných alkalických roztocích, v ethanolu a v acetonu, málo rozpustný v tetrachloru, prakticky nerozpustný ve vodě

- Teplota tání: 155 – 156 °C
- Teplota varu: 220 °C
- Hustota: 1,195 g.cm⁻³
- Minimální teplota vznícení: 532 °C
- Chemické symboly nebezpečí (obrázek 56):



Obr. 56 Zdraví škodlivý (Xn)

- Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemikálií (obrázek 57 - 59):



Obr. 57 GHS05 – korozivní a žíravé látky



Obr. 58 GHS08 – látky nebezpečné pro zdraví



Obr. 59 GHS07 – dráždivé látky

R-věty:

- 37 dráždí dýchací orgány
- 41 nebezpečí vážného poškození očí
- 43 může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží
- 52 škodlivý pro vodní organismy

S-věty:

- 26 při zasažení očí důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékaře

- 36/37 používejte vhodný ochranný oděv a rukavice
39 používejte osobní ochranné prostředky pro oči a obličej
46 při požití okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc a ukažte tento obal
nebo označení

H-věty

- 361 podezření na poškození reprodukční schopnosti nebo plodu v těle matky
335 může způsobit podráždění dýchacích cest
317 může vyvolat alergickou kožní reakci
318 způsobuje vážné poškození očí