

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ SYNTETICKÝCH VONNÝCH LÁTEK V ODPADNÍCH
VODÁCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE

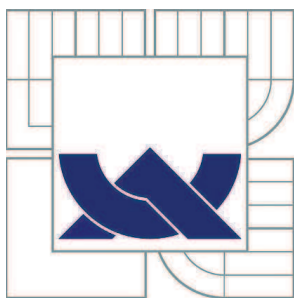
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

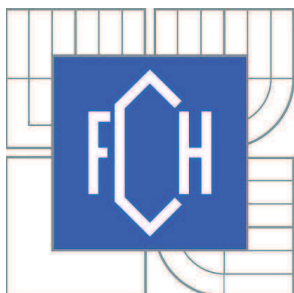
Bc. MICHAL ŠTEFKA

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ SYNTETICKÝCH VONNÝCH LÁTEK V ODPADNÍCH VODÁCH

ASSESSMENT OF SYNTHETIC MUSK COMPOUNDS IN WASTE WATERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

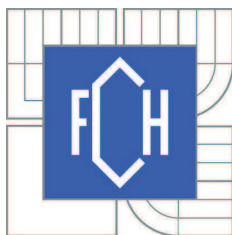
Bc. MICHAL ŠTEFKA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0667/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Bc. Michal Štefka	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D. Ing. Libor Zouhar	

Název diplomové práce:

Stanovení syntetických vonných látek v odpadních vodách

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování rešerše na zadané téma
2. Výběr analytů ze skupiny lineárních syntetických vonných látek
3. Optimalizace metody pro jejich izolaci z odpadní vody a pro stanovení pomocí GC-MS
4. Využití optimalizované metody pro stanovení analytů v reálných vzorcích odpadních vod
5. Zpracování výsledků, jejich zhodnocení a interpretace

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Michal Štefka
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 25.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Syntetické vonné látky jsou přítomny v produktech osobní hygieny, čistících prostředcích, kosmetice apod. Po použití se tyto sloučeniny dostávají do odpadních vod. Technologický proces na ČOV však není schopen látky zcela eliminovat a ty se pak dostávají do jednotlivých složek životního prostředí.

Cílem diplomové práce je stanovení čtyř vybraných zástupců lineárních musk sloučenin (2-cyklohexylethanol, Fresco Menthe, Citronellol a Isobornyl acetát) v odpadní vodě. Reálné vzorky byly odebírány na přítoku a odtoku čistírny odpadních vod na VFU Brno. Na základě měření a následného vyhodnocení získaných dat bylo možné vyjádřit míru účinnosti eliminace přítomných musk sloučenin.

V prvním kroku bylo nezbytně nutné přizpůsobit vybranou analytickou metodu fyzikálně chemickým vlastnostem stanovovaných analytů. Analyty byly extrahovány ze vzorků metodou mikroextrakce na tuhou fázi, tzv. SPME. K identifikaci a kvantifikaci posloužila plynová chromatografie v tandemovém spojení s hmotnostní spektrometrií.

ABSTRACT

The synthetic aromatic substances are present in the products of personal hygiene, detergents and cosmetics. After the application these compounds are drained away into the waste water. But the technological process used in sewage works is not able to eliminate these substances and these ones influence the particular items of the environment.

The aim of the degree work is the determination of four selected items of the linear musk compounds (2-cyclohexylethanol, Fresco Menthe, Citronellol and Isobornyl acetate) in the wastewater. The real patterns were taken on the place of affluent of the sewage discharge and on the place of the draining off in the sewage plant in VFU Brno. On the basis of measurements and subsequent evaluation on of obtaining data it was possible to express the measurement of efficiency of the elimination of the present musk compounds.

Firstly it was necessary to adapt the selected analytical method to the physical and chemical qualities of the prescribed analytes. The analytes were extracted from the patterns by the method of the micro extraction for the consistent phase so called solid phase microextraction (SPME). The gas chromatography in the tandem connection with the mass spectrometry makes the identification and quantification possible.

KLÍČOVÁ SLOVA

Musk sloučeniny, odpadní voda, GC/MS, SPME

KEYWORDS

Musk compounds, waste water, GC/MS, SPME

ŠTEFKA, M. *Stanovení syntetických vonných látek v odpadních vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 83 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

Prohlášení

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

V Brně dne 11. 05. 2012

.....
Michal Štefka

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za cenné připomínky a odborné rady, kterými přispěla k vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat svému konzultantovi Ing. Liboru Zouharovi za vstřícnost a odbornou pomoc a Mgr. Petře Komárkové z VFU v Brně za spolupráci v laboratoři. V neposlední řadě své rodině a svým nejbližším za podporu při studiu.

OBSAH

OBSAH	5
1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 VNÍMÁNÍ	9
2.1.1 Smyslové orgány	9
2.1.2 Čich	9
2.1.3 Čichové ústrojí	9
2.2 HISTORIE VONNÝCH LÁTEK	10
2.2.1 Egypt	10
2.2.2 Antický Řím	11
2.2.3 Řecko	11
2.2.4 Evropa	12
2.2.5 Chanel No. 5	13
2.2.6 Dermacol	13
2.2.7 Výroba vonných látek v České republice	13
2.3 ROZDĚLENÍ VONNÝCH LÁTEK	14
2.3.1 Rozdělení vonných látek podle obsahu alkoholu	14
2.3.2 Rozdělení vonných látek podle původu	15
2.3.2.1 Rostlinné vonné látky	15
2.3.2.2 Živočišné vonné látky	15
2.3.2.3 Syntetické vonné látky	16
2.4 ROZDĚLENÍ MUSK SLOUČENIN DO SKUPIN	16
2.4.1 Nitromusk sloučeniny	16
2.4.2 Polycyklické musk sloučeniny	17
2.4.3 Makrocyklické musk sloučeniny	18
2.4.4 Lineární musk sloučeniny	19
2.4.5 Sledování zástupci musk sloučenin	19
2.4.5.1 Souhrnný přehled fyzikálních a chemických vlastností	19
2.4.5.2 2-cyklohexylethanol	20
2.4.5.3 Citronellol	21
2.4.5.4 Fresco Menthe	21
2.4.5.5 Isobornylacetát	22
2.5 ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD	22
2.5.1 Mechanicko-biologická čistírna odpadních vod	23
2.5.1.1 Mechanický stupeň	23
2.5.1.2 Biologický stupeň	23
2.5.1.3 Čistírna odpadních vod Brno-Modřice	24
2.5.1.4 Čistírna odpadních vod Veterinární a farmaceutická univerzita Brno	24
2.5.2 Kořenová čistírna odpadních vod	25
2.5.2.1 Princip čištění odpadních vod na KČOV	25
2.6 ZÁKLADNÍ FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI MUSK SLOUČENIN	26
2.7 MUSK SLOUČENINY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ	26
2.7.1 Hydrosféra	27

2.7.2	Atmosféra	28
2.7.3	Pedosféra	28
2.7.4	Člověk a musk sloučeniny.....	28
2.8	TOXICITA MUSK SLOUČENIN.....	29
2.9	METABOLIZACE MUSK SLOUČENIN.....	30
2.10	STANOVENÍ MUSK SLOUČENIN.....	32
2.10.1	Odběr vzorku.....	32
2.10.2	Transport vzorku	33
2.10.3	Uchování vzorku	33
2.10.4	Izolace analytů z matrice	33
2.10.4.1	SPME – mikroextrakce tuhou fází	33
2.10.5	Metody detekce, identifikace a kvantifikace	36
2.10.5.1	Plynová chromatografie	36
2.10.5.2	Hmotnostní spektrometrie	39
2.10.5.3	Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.....	42
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
3.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	43
3.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	43
3.3	PRACOVNÍ POSTUP.....	44
3.3.1	Příprava roztoků	44
3.3.1.1	Příprava roztoku pro optimalizaci SPME.....	44
3.3.1.2	Příprava roztoku pro kalibraci.....	45
3.3.1.3	Příprava roztoku standardního přídatku	45
3.3.2	Zjištění charakteristik analytů (retenční čas, MS spektrum).....	45
3.3.3	Optimalizace teplotního programu.....	46
3.3.4	Optimalizace mikroextrakce tuhou fází (SPME)	46
3.3.4.1	Výchozí podmínky SPME.....	46
3.3.4.2	Výběr vhodného vlákna	47
3.3.4.3	Extrakční mód	47
3.3.4.4	Vysolování	47
3.3.4.5	Teplota sorpce	47
3.3.4.6	Čas sorpce	48
3.3.5	Stanovení analytů v reálných vzorcích.....	48
3.3.5.1	Identifikace a kvantifikace analytů	48
3.3.6	Stanovení analytických parametrů – meze detekce a stanovitelnosti	49
3.3.7	Opakovatelnost.....	50
3.3.8	Vzorkování	50
3.3.8.1	Specifikace vzorků	51
3.3.9	Čištění laboratorního skla.....	51
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	52
4.1	ZJIŠTĚNÍ CHARAKTERISTIK ANALYTŮ (RETENČNÍ ČAS, MS SPEKTRUM).....	52
4.2	OPTIMALIZACE TEPLITNÍHO PROGRAMU.....	54
4.3	OPTIMALIZACE SPME.....	57
4.3.1	Aktivace vláken.....	58
4.3.2	Výběr vlákna	59

4.3.3	Mód extrakce	59
4.3.4	Vysolování	60
4.3.5	Teplota sorpce	60
4.3.6	Čas sorpce	61
4.3.7	Optimalizovaná metoda SPME	62
4.4	GC/MS ANALÝZA	62
4.5	STANOVENÍ ANALYTICKÝCH PARAMETRŮ – LOD A LOQ	63
4.6	NEJISTOTY ANALYTICKÝCH VÝSLEDKŮ	66
4.6.1	Opakovatelnost měření	66
4.7	VYHODNOCENÍ REÁLNÝCH VZORKŮ ODPADNÍ VODY	67
4.7.1	Účinnost čistícího procesu	71
5.	ZÁVĚR	72
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	74
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	79
8.	SEZNAM PŘÍLOH	81
9.	PŘÍLOHY	82

1. ÚVOD

Snahou člověka odnepaměti bylo zkrášlovat své tělo a působit některými přírodními látkami na obdiv opačného pohlaví. Ale nejen to. Různými látkami si zpříjemňovali život především bohatí obyvatelé starověkých zemí, balzám a oleje se užívaly k náboženským i pohřebním účelům.

Již staří Etruskové dávali svým zemřelým karafy s vonnými mastmi do hrobů. Svědčí o tom například nalezení schránky ze zelené egyptské fajánse v hrobě etruské šlechtičny ze 7. století před naším letopočtem. Vonné látky se dovážely do Etrurie z Orientu, kadidlo z Arábie a parfémy z Koryntu a Atén [1].

V minulosti byly vonné látky získávány čistě z přírodních zdrojů. Z rostlin se nejčastěji extrahovaly, destilovaly nebo lisovaly. Vonné látky živočišného původu našly uplatnění jako ustalovače. Jednalo se zejména o žlázy v oblasti pohlavních orgánů a řada zvířat proto byla lovena a zabíjena. Později však tyto zdroje nebyly schopny dostatečně uspokojovat potřeby trhu a tak, přibližně v polovině minulého století, byla pozornost věnována zdrojům syntetickým. Dnes má průmyslová výroba uměle připravovaných vonných látek na trhu nezastupitelné místo. Přesto se výrobci některých dražších a renomovaných parfémů honosí tím, že vonná kompozice je čistě přírodního původu. Je nutné upozornit na to, že zvířata již nejsou bezhlavě zabíjena jako v minulosti, nýbrž pěstována na farmách a případný odběr je prováděn pod dohledem odborníků.

Musk sloučeniny představují novou skupinu perzistentních organických polutantů. Látky jako takové nacházejí široké uplatnění v oblasti kosmetických přípravků, parfémů, pracích a čistících prostředků apod. Nedávno provedené studie v Německu, USA, Japonsku si všímají jejich výskytu ve všech složkách životního prostředí. Za hlavní zdroj znečištění jsou považovány odpadní vody vypouštěné z ČOV do recipientu. Ty obsahují zbytky musk sloučenin, které se dále šíří do půdního obalu země a do vodních organismů. Ryby následně představují zdroj syntetických vonných látek pro člověka. Látky vzhledem ke svému lipofilnímu charakteru nacházíme také v lidském tuku, mateřském mléce, krevní plazmě apod.

Cílem této diplomové práce je stanovení čtyř vybraných zástupců lineárních musk sloučenin ve vzorcích odpadní vody. Čistírna odpadních vod při vypouštění vody do recipientu je vázána vyhláškou, kde jsou uvedeny jednak sledované ukazatele a jednak jejich přípustné limitní hodnoty. Při překročení těchto hodnot je provozovatel ČOV finančně postihován a musí neprodleně sjednat nápravu změnou technologického procesu. Lineární musk sloučeniny však tato právní úprava nijak neřeší. Nejsou zmíněny v zákoně 185/2001 Sb. o odpadech a ani ve vyhlášce MŽP č. 382/2001 Sb. o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě. Jedná se o látky ze skupiny PCP (Personal Care Products) jako jsou mýdla, parfémy apod. a tedy sloučeniny, které po užití v domácnosti jsou v odpadní vodě zastoupeny.

Práce sleduje koncentrace cyklohexylethanolu, Fresco Menthe, Citronellolu a Isobornyl acetátu jak na přítoku, tak na odtoku z čistírny odpadních vod v Brně Modřicích. Pro extrakci vybraných analytů je zvolena technika SPME. Pro separaci a kvantifikaci je zvolena tandemová technika GC/MS. V závěru je vyhodnocena míra účinnosti odstraňování těchto látek na dané ČOV.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vnímání

2.1.1 Smyslové orgány

Schopnost přijímat podněty z vnějšího prostředí byla vyvinuta už u jednobuněčných organismů. Všechny živé buňky, i když jsou součástí mnohobuněčného organismu, si v různé míře tuto schopnost zachovaly. Ve vybraných případech došlo k buněčné diferenciaci a vznikly tak specializované smyslové buňky s funkcí receptorů, které mohou společně vytvářet smyslové orgány. Stupeň rozvinutí receptorů v daném biologickém druhu souvisí především se způsobem jejich života. Například u nevidomých se poměrně frekventovaně setkáváme s tzv. absolutním sluchem, jenž je u zdravého jedince přítomen zcela výjimečně. Jedná se o situaci, kdy ostatní smyslové orgány jsou u daného organismu posíleny oproti absentujícímu zraku.

U člověka rozlišujeme pět základních smyslů. Jde konkrétně o chuť, čich, sluch, hmat a zrak. Uvedené receptory, které jsou odpovědné za vnímání vnějšího okolí, označujeme termínem exteroceptory. Podle povahy vjemu, který vyhodnocují, rozlišujeme smysly chemoreceptorové, zastoupené chutí a čichem a smysly mechanoreceptorové, ke kterým řadíme sluch a hmat. Zrakové vjemy jsou pak zprostředkovávány prostřednictvím fotoreceptorů [2].

2.1.2 Čich

Člověk dokáže pomocí čichu vnímat nejrozličnější vůně a pachy rozptýlené ve vzduchu a ve velmi malých koncentracích i ve vodě. Díky tomu se lépe orientuje v okolním prostředí. Nepříjemným dojmům se totiž snaží každý tvor vyvarovat, naopak ty příjemné hodnotí pozitivně a může je i vyhledávat [3].

Existuje poměrně úzká souvislost mezi vnímáním čichu a chuti. Dojde-li u jedince ke ztrátě čichu (anosmie), je výrazně ovlivňován i chuťový vjem. Receptory jednotlivých smyslů jsou však anatomicky i funkčně zcela odlišné.

Čichová citlivost je odlišná i druhově. U každého jednotlivce jsou čichové vjemy vnímány jinak. Je to jedna z hlavních příčin, proč řadíme čich k nejméně prozkoumaným smyslovým orgánům. Mezi jedince s nejlépe vyvinutým čichem můžeme řadit šelmy. Člověk pak patří k jedincům, u kterých je čich hodnocen jako slabý. Z hlediska pohlaví jsou přibližně o dvacet procent citlivější ženy než muži. Jejich sensitivita však kolísá v průběhu menstruačního cyklu.

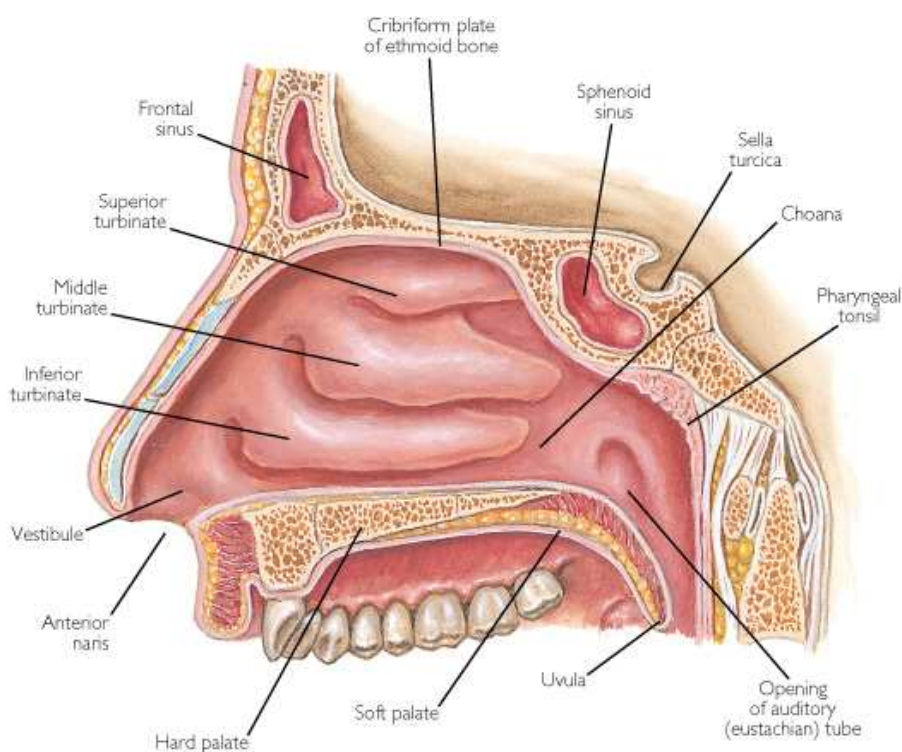
Poruchy čichu jsou ve stáří značně frekventované. U poloviny populace starší šedesáti let nastává jeho zhoršování. Jistá celosvětová shoda panuje v oblasti pozitivního nebo negativního vnímání pachů [4].

2.1.3 Čichové ústrojí

U člověka se nachází čichová sliznice v dorzální a zadní části dutiny nosní na horní skořepě. Je umístěna mimo hlavní směr proudění vzduchu. Zaujímá plochu přibližně 4 cm², což je ve srovnání s kočkou (25 cm²) nebo psem (150 cm²) malý povrch. Vlastní receptory

tvoří deset milionů bipolárních buněk, které jsou obklopeny hlenem. Jeho úkolem je udržovat sliznici zvlhčenou. Během procesu dýchání prochází vzduch přes čichové buňky, které reagují na molekuly látek rozpuštěných ve vzduchu. Vrzuchy z nich jsou vedeny I. hlavovým nervem (nervus olfactorius) do mozku, kde vzniká čichový vjem. Z praktického hlediska, probíhá-li u daného jedince dechová činnost, není možné tento smyslový orgán za normálních podmínek vyřadit z činnosti [5].

Čich se během pár vteřin dokáže zadaptovat až na padesát procent čichových podnětů, později probíhá přizpůsobování velmi pomalu a slabě. Čichové ústrojí dokáže vnímat několik tisíc různých molekul. Při hojném výskytu molekul jednoho typu se ta část receptorů, která je zachycuje, nasytí; nové impulsy již nevznikají a člověk přestává danou vůni vnímat [3].



Obrázek 1: Sagitální řez nosní dutinou [6]

2.2 Historie vonných látek

Vonné látky a masti se připravovaly v historicky známých zemích odedávna. Získávaly se z rozmanitých částí rostlin nebo výměšků různých živočichů (v současné době jsou ve značné míře připravovány synteticky). Sloužily lidem v běžném životě, významnou úlohu sehrávaly zejména při uctívání bohů, a to při různých náboženských obřadech.

2.2.1 Egypt

Starověký Egypt je jednou z nejstarších kolébek lidské civilizace, jehož nepřetržitý vývoj trval více než čtyři tisíce let. Je poznamenán uctíváním mnoha božstev, především těch, která

ztělesňovala přírodní síly (Slunce – bůh Re) nebo posmrtný život (Anúpev a jeho manželka Eset).

Víra v nekonečnost lidského života vyvolávala u Egyptanů snahu uchovat identitu zemřelého co nejvěrohodněji. Proto byl od třetího tisíciletí užíván pohřební rituál balzamování, tzv. mumifikace. K tomu bylo zapotřebí celé spousty různých bylin, aromatických olejů, také asfaltu a v neposlední míře vonné pryskyřice. Ty se užívaly i k vykuřování při obětování bohům. Už čtyři tisíce let je známa myrha. Je to klejopryskyřice, která se získává z kmene myrhovníku, který roste v Africe a jihovýchodní Asii. Myrha patří mezi nejstarší drogy a i dnes se uplatňuje v parfumerii a lékařství [7].

V kombinaci s myrhou se užívaly kadidlo a balzám. Kadidlo (olibanum) vytéká z poraněných částí kmene kadidlovníku. Směs se dávala do kadidelnice, která měla jímku ve tvaru ručky na dlouhém držátku, zapálila se a vzduchem se šířil vonný dým.

Některé vonné látky bývaly připravovány z pižma, ambry, cibetu, což jsou látky živočišného původu.

Faraonové používali vonné látky k natírání různých částí těla při koupelích i k vykuřování prostoru.

Slavná Kleopatra (69 – 30 př. n. l.) užívala spousty parfémů složených z různých druhů olejů (skořicového, mátového, pistáciového), kořene kosatců, květu šafránu a lotosu, plodů kardamonu a také myrhy.

2.2.2 Antický Řím

Již ve druhé polovině 3. století př. n. l. byly známy a rozšířeny vonné látky, masti a oleje na vlasy. Oblíbená byla, především u žen, světle plavá a načervenalá barva vlasů, které se dosahovalo používáním zvláštního mýdla (sapo) připravovaného z kozího loje a bukového popele [8].

Užívaly se vonné masti a voňavky, jež byly dováženy z Řecka a Orientu a rovněž spousta dalších jiných kosmetických přípravků.

Pudr a líčidla, jako krášlící prostředky, byly známy velmi brzy. V oblibě byly rozmanité druhy červeně na tvář a nehty (fucus, purpuriscum, rubrica), líčidlo bílé (oreta), sinavé (cerussa) k podmalování očí a zdůraznění cév, čern na obočí a řasy (fuligo). Zuby a nehty se čistily práškem rozmanitého složení. K natírání těla po koupeli se užívalo olejů. Mýdlo se objevuje až ve 4. století n. l., do té doby se používaly na mytí rozličné látky rostlinné a minerální (hlinky, prášky s draslem a sodou aj.) [8].

Za zmínku stojí i to, že odcházeli-li člověk z tohoto světa, byla jeho mrtvola omyta a kolem lehátka, na němž ležel, byla zapálena pryskyřice nebo jiné vonné látky.

2.2.3 Řecko

Rovněž Řecko bylo proslulé používáním vonných látek při různých činnostech života řeckých občanů. Život Řeků byl spojen s uctíváním spousty bohů a bohyň, kterým se obětovalo, a bylo nemyslitelné, aby se jakýkoliv obřad konal bez vonných olejů. Macerovaly se ze spousty květů (fialky, růže, lilie, levandule, mateřídouška) nebo listů různých keřů (myrta, majoránka, máta). Vonné látky a oleje se používaly rovněž po koupelích, kdy otroci

natírali svým pánům různé části těla rozličnými výluhy rostlin. Zajímavostí bylo i poprašování zdí domů parfémů, stejně jako zástav vítězných vojsk [9].

2.2.4 Evropa

K rozvoji voňavkářství – parfumerie – přispěla v raném středověku v Evropě tažení křížáků do Svaté země. Vojska, vracející se domů z vítězných nebo méně úspěšných tažení, přinášela s sebou exotické voňavé směsi a do té doby na západě zcela neznámé produkty, tj. voňavky, mýdla, přípravky na ošetření pleti, přísady do koupelí aj..

Arabové ve svých dílnách míchali okvětní plátky různých květů s rozdrcenými semínky obsahujícími olej, v němž se rozpouštěly vonné silice. Vznikaly tak nádherné vůně, jimiž byla šlechtická a později i měšťanská Evropa zcela uchválena. V 16. století založila Kateřina Medicejská, francouzská královna, ve městě Grasse v Provence, laboratoř zabývající se výrobou parfémů. Za Ludvíka XV. byly za parfémů vydávány ročně obrovské finanční prostředky. Voňavky milovala i Marie Antoinetta a ve velké oblibě je měl i Napoleon Bonaparte. Ten užíval především lehké citrusové vůně, které měly jeho smysly nejen podněcovat, ale měly také zmírňovat jeho časté bolesti hlavy nebo přehlušit zápach vojenských bot [10].

Dnes je Francie ve výrobě voňavek první na světě, a to zásluhou města Grasse z departmanu Alpes Maritimes, odkud pochází značkový parfém Galimard. K získání jednoho kilogramu esence tohoto parfému je nutné zpracovat tunu květinových citrusových lístků [7].



Obrázek 2: Světová značka parfému Galimard z města Grasse

Vonné látky se nepoužívaly jen ke zkrášlování, ale sehrály také důležitou roli v období černého moru, který se rozšířil po celé Evropě v polovině 17. století. V té době byly vonné látky užívány především k desinfekci a vykuřování. Ve velkých městech se několikrát denně zapalovaly hranice z borového dřeva. Hořící pryskyřice měla desinfikovat vzduch. Kostely a katedrály, kde se shromažďovalo větší množství lidí, byly vykuřovány sirou a kadidlem [10].

2.2.5 Chanel No. 5

Jedná se patrně o nejslavnější parfém na světě. Vznikl spoluprací chemika Ernesta Beauxe, potomka alchymisty pracujícího na carském dvoře a módní návrhářky Coco Chanel, která se rozhodla expandovat v oblasti obchodu s parfémů. Prvních sto flakonů chtěla věnovat svým nejlepším zákazníkům jako vánoční dárek. Na trhu se výrobek objevil v zimě roku 1921.

Název parfému je odvozen ze slepé zkoušky. Při prezentaci výsledků testů byl náhodně vybrán vzorek s číslem pět. Označení „5“ mělo pro Coco Chanel symbolickou hodnotu; cesta do kostela, kam chodila, byla vydlážděna dlaždicemi, kde se opakovala pětka.

Rovněž flakon se od dobové vizáže značně liší. Původně byla lahvička kulovitá a vyrobená z tenkostěnného skla. To se negativně projevovalo hlavně při dopravě. V roce 1924 byl tvar nádoby pozměněn na hranatý. Pro zachování aktuálnosti jsou drobné úpravy vzhledu prováděny periodicky přibližně každých dvacet let [11].

2.2.6 Dermacol

Na počátku 60. let 20. století byl v České republice připraven jeden z prvních krycích make-upů v Evropě a vzhledem ke svým vynikajícím vlastnostem neměl konkurenci ve světě. V roce 1969 odkoupily filmové ateliéry Hollywood v USA licenci pro užití tohoto přípravku značky Dermacol. Kosmetický přípravek vznikl společnou prací maskérů z filmových studií Barrandov a lékařů z Ústavu lékařské kosmetiky v Praze. Tuto úzkou spolupráci s odborníky si společnost Dermacol zachovala i dnes. Výrobky jsou hypoalergenní, nedráždí pokožku, nezpůsobují akné a nejsou testovány na zvířatech. V současnosti je společnost ze 70 % ve vlastnictví zahraničního investora. Kromě evropských států je tato kosmetika na trhu také v USA, Kanadě a Austrálii [12].

2.2.7 Výroba vonných látek v České republice

Vonné látky byly v našich zemích poprvé průmyslově připraveny na konci 19. století. Nejprve se jednalo o drobné provozovny (Odol, Bratři Janouškové, Židlický) a až v květnu roku 1898 založila německá firma Schimmel & Co. v dnešním Děčíně pobočku na výrobu éterických olejů, chuťových a vonných látek [13].

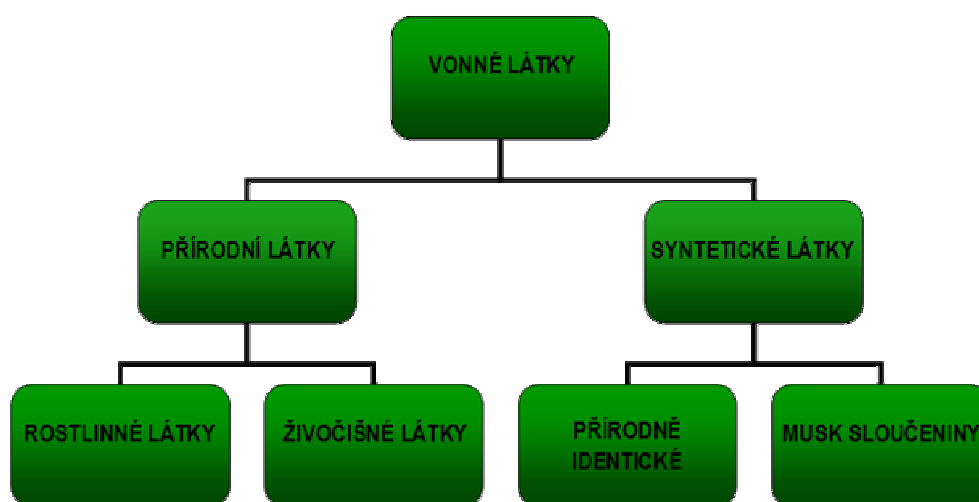
Po II. světové válce, v roce 1946, došlo ke sdružení menších provozoven a byl založen národní podnik Aroma. O pět let později došlo k odloučení závodu Fruta Brno a ředitelství původní společnosti se stěhovalo do Prahy [13].

V roce 1996 byla založena výrobní skupina AROCO-AROMA, která dnes sídlí v Židovicích u Roudnice nad Labem. Společnost s přibližně 80 zaměstnanci se výhradně specializuje na výrobu parfémových kompozic, syntetických vonných látek a dále na přípravu kořenitých tekutých a práškových potravinářských aromat, spolu s možností sprejového sušení, extraktů a barviv [14].

2.3 Rozdělení vonných látek

Na klasifikaci vonných látek lze nahlížet několika způsoby. Z vědeckého hlediska rozeznáváme dvě velké skupiny látek – přírodní a syntetické. Přírodní látky lze dále rozdělit na látky živočišného původu a látky rostlinného původu. Rovněž syntetické látky jsou diferencovány do dvou podskupin – přírodně identické a umělé. Pro větší přehlednost je klasifikace znázorněna na obrázku č.3 níže [15].

Pro práci parfumérů má vědecké dělení vonných látek nižší výpovědní hodnotu. Ve svém oboru proto upřednostňují dělení dle charakteristické vůně a jejich následné zařazení do příslušných tříd.



Obrázek 3: Schéma rozdělení vonných látek

2.3.1 Rozdělení vonných látek podle obsahu alkoholu

Základní látkou nezbytnou pro výrobu vonných přípravků je alkohol. Konkrétně se jedná o dobře rafinovaný, koncentrovaný 96% ethanol, který se ředí destilovanou vodou podle potřeby. Důležitou složkou je pak přítomnost vonných látek, podle jejichž obsahu se výrobky klasifikují.

Klasifikace:

Parfémy – obsahují 20 až 30 % vonných látek v 90–95% alkoholu; patří proto k nejkoncentrovanějším. Jejich vůně má trvání na vzduchu i déle než 6 hodin.

Vody – jsou směsi s nižším obsahem alkoholu.

Kolínské vody (Eu de cologne) – byly vyrobeny v 17. století v Kolíně nad Rýnem a užívaly se v lékařství pro své antibakteriální účinky; od 19. století se využívají jako vonný prostředek. Koncentrace vonných látek se pohybuje v rozmezí 3 až 5 % ve zředěném 70 % alkoholu.

Toaletní vody (Eu de toilette) – mají intenzivnější vůni a delší dobu účinku. Nejsou určeny na pokožku, ale na oblečení, kde jejich vůně má mnohem delší trvání. Koncentrace vonných složek dosahuje 10 %.

Parfémové vody (Eu de parfum) – vyznačují se intenzivní vůní, která má trvání až 5 hodin. Obsah vonných látek se pohybuje v intervalu 8 až 15 %. Lze je aplikovat na oděv i na pokožku [16].

2.3.2 Rozdělení vonných látek podle původu

2.3.2.1 Rostlinné vonné látky

Přírodní vůně jsou obtížněji vyrobitelné a vyžadují pro získání příslušných olejů velké množství rostlin.¹ Lze je naleznout v olejových a siličných žlázách. Z květin se používají okvětní lístky, např. růží, jasmínu, fialky, z ovoce se používají jablka, pomeranče a jahody. Dále jsou macerovány listy z rozmarýnu a levandule, kořen skýtá zázvor, kosatec, semínka poskytuje kakaovník, kardamon a anýz. Dřevitá vůně se získává z borovice, cedru a santalu. Aromatické látky rostlinného původu jsou obvykle sekundárním produktem látkové výměny, který slouží rostlině buď jako obrana vůči býložravci, nebo jako lákadlo pro opylující hmyz. Dokonce lišejníky, které rostou na dubech a dalších stromech v jižní Evropě, Toskánsku a jižní Francii, se využívají v parfémtech jako stabilizátory.

Z hlediska konzistence se jedná buď o řídké kapaliny nazývané éterické nebo vonné oleje, případně o silice; pokud jsou husté, označují se jako balzámy. Tuhým skupenstvím rozumíme kafry a pryskyřice [17].

2.3.2.2 Živočišné vonné látky

Živočišná říše poskytuje v poměru k říši rostlinné celkem malé množství vonných látek. Používají se jako fixátory k vázání jemných rostlinných vůní. Jsou proto schopné prodloužit stabilitu a vůni celé kompozice. Samostatně se při výrobě parfémů nepoužívají, vzhledem k jejich příliš silné vůni. Mohou se prakticky využít teprve po izolaci a čištění. Zdrojem vonných látek mohou být výměšky pachových žláz zvířat, dále včelí vosky, včelí med a feromony některých druhů hmyzu.

K nejpoužívanějším patří ambra, což je voskovitá vonná látka, patologicky vznikající ve střevě vorvaně obrovského z řádu kytovců. Spolu s jeho výkaly přechází na mořskou hladinu, obsahuje ambrit $C_{30}H_{52}O$, triterpenický alkohol, který je základem kosmetických výrobků. Další užívanou látkou je mošus (pižmo), který je produkován zejména přežvýkavcem kabarem pižmovým, ale také ondatrou nebo vydrou. Mošus je výměšek z pižmového vaku nacházejícího se na břiše blízko pohlavních útvarů. Pro intenzivní, někdy až nepříjemně páchnoucí vůni, je používán ve voňavkářství, ale rovněž je součástí léků v orientální medicíně. Hlavní vonnou součástí je keton muskon – methylcyklopentadekanon. V minulosti se pižmové vaky, které mají podobu asi poloviny vlašského ořechu, uloveným zvířatům odřezávaly. Lov těchto živočichů je dnes zakázán a látka je nahrazena syntetickou náhražkou.

Kunovitá šelma cibetka africká z čeledi cibetkovitých, žijící hlavně v jižní Asii, produkuje v oblasti svých pohlavních žláz výměšek cibet. Ten byl získáván z jejího

¹ Z 1000 liber plátek růže (1 libra = 0,453592 kg) se vyprodukuje jedna unce (1 unce = 0,027 kg) esenciálního oleje. Její cena činí až 1500 dolarů (k 12.02. 20012 je 1USD =19.143 Kč), zatímco cena unce syntetického řešení může stát 35 dolarů.

organismu již v 10. století před naším letopočtem [18]. Podobnými látkami je kastoreum, což je výměšek bobra evropského, nebo hyraceum získávané z jezevce skalního. Hyraceum bylo také používáno v lidovém léčitelství v jižní Africe při léčbě epilepsie. Na zjištění účinnosti a použitelnosti této látky byla provedena studie, která potvrdila výše uvedený způsob použití.

2.3.2.3 Syntetické vonné látky

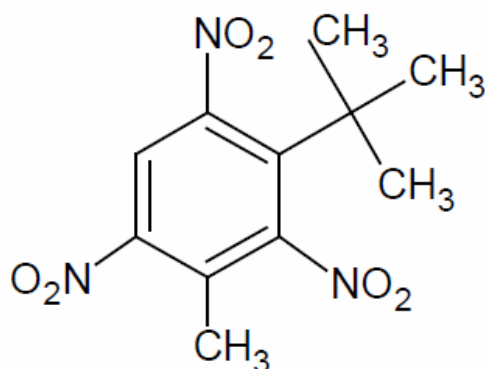
Přírodní zdroje vonných látek nedostačovaly k uspokojení poptávky na trhu. Vznikající propad byl proto doplňován uměle připravenými analogy. I dnes řada moderních parfémů obsahuje směsi vonných látek pocházejících z chemického průmyslu. Chemickými syntézami lze získat vůně, které není možné v přírodě objevit. Existuje však řada látek, jako je například linalool nebo kumarin, které jsou sice přirozeně zastoupeny, avšak náklady vynaložené na jejich syntézu z terpenů vycházejí levněji. Podobně jsou nahrazovány orchidejové vůně (salicyláty).

Syntetické vonné látky lze rozdělit na dvě velké skupiny. První skupinu tvoří látky, které jsou chemicky identické s látkami přirozeně zastoupenými v rostlinách nebo živočišných matricích. Umělými syntetickými vonnými látkami se potom rozumí takové látky, které vznikají chemickou syntézou, avšak v přírodě jejich zástupce nenalezneme. Specifickou skupinou syntetických vonných látek jsou tzv. musk sloučeniny; řada odborných publikací však dává přednost označení syntetické analogy pižma [19].

2.4 Rozdělení musk sloučenin do skupin

2.4.1 Nitromusk sloučeniny

Období nitromusk sloučenin začíná koncem 19. století objevem tzv. Bauerova pižma. To připravil zcela náhodně v roce 1888 Albert Bauer² při pokusech zaměřených na zvýšení účinnosti trinitrotoluenu. Syntéza spočívala ve Friedl-Craftsově alkylaci tritolu s *tert*-butyl halogenem. Konkrétně se jednalo o kondenzaci toluenu s isobutyl chloridem v přítomnosti chloridu hlinitého a následnou nitraci produktu [20].



Obrázek 4: Bauerovo pižmo

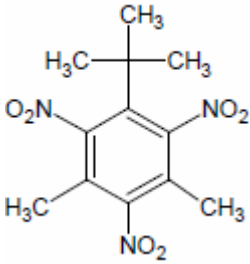
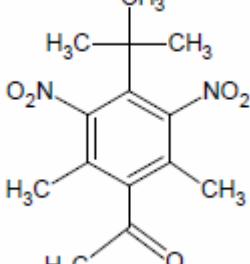
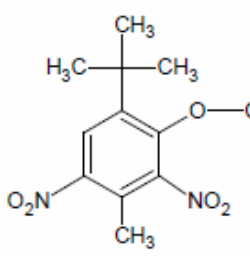
² Literární prameny [21] uvádějí jméno Albert Baur

Z chemického hlediska se jedná o syntetické dinitro- a trinitro- substituované benzenové deriváty s alkylovou, keto- nebo methoxy- skupinou.

K hlavním zástupcům této početné skupiny patří musk keton (MK), musk xylen (MX), musk ambrette a musk tibeten. Uvedené sloučeniny byly rozsáhle používány především díky nízkým výrobním nákladům [22]. V roce 1981 však byly v Japonsku tyto látky detekovány ve vodním prostředí a v tělech ryb. O dva roky později byl musk xylen objeven opět ve tkáních ryb ve Spojených státech amerických; to byl signál k poklesu celosvětové produkce. Objevily se zprávy o fotoalergických reakcích způsobených musk ambrette a také karcinogenním efektem u musk xyleny [22]. Protože některé nitromusk sloučeniny tvořily základ parfému Chanel No. 5 nebo L'Air du Temps, byli jejich výrobci postaveni před nelehký úkol nahradit tyto látky jinými, avšak takovými, aby nedošlo ke změně charakteristických vůní.

Množství nitromusk sloučenin je v životním prostředí monitorováno. V roce 1994 se průmyslová produkce přibližovala k hodnotě 1000 tun za rok. Hlavní část tvoří musk xylen (67 %), musk keton (21 %) a musk ambrette (12 %). Od roku 1995 do roku 2000 klesla kombinovaná spotřeba MX a MK ze 300 tun na 200 tun za totožné kalendářní období [23].

Tabulka 1: Přehled zástupců nitromusk sloučenin

Strukturní vzorec			
Molekulový vzorec	$C_{12}H_{15}N_3O_6$	$C_{13}H_{18}N_2O_5$	$C_{12}H_{16}N_2O_5$
Triviální název	Musk xylen	Musk keton	Musk ambrette

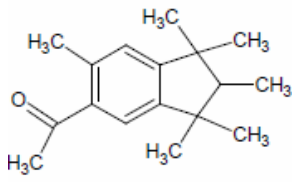
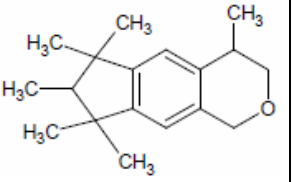
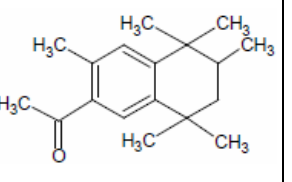
2.4.2 Polycyklické musk sloučeniny

Polycyklické musk sloučeniny představují další velkou skupinu syntetických vonných látek. Jejich produkce vzrostla po roce 1950, kdy na trhu nahradily skupinu potencionálně toxických nitromusk sloučenin. Objevují se zejména v řadě kosmetických přípravků, ale také v jiných produktech, zejména produktech osobní hygieny a domácí péče. Svojí délkou výdrže vonné kompozice a vyvážením mezi počáteční a zbytkovou vůní jsou u výrobců velmi oblíbené [22].

Polycyklické musk sloučeniny byly také, a to díky svým chemickým vlastnostem, také navrženy jako vhodné ukazatele pro monitorování kontaminace pitné vody vodou odpadní Noser et al. (1999) a Fromme et al. (2000). K nejvýznamnějším zástupcům řadíme galaxolid (HHCB), tonalid (AHTN), phantolid (AHDI), celestolid (ADBI) a traseolid (ATI). Všechny tyto látky mají relativně vysoké hodnoty $\log K_{ow}$ (cca od 5 do 8), a proto mají převážně lipofilní vlastnosti, což je příčinou jejich sorpční schopnosti [28].

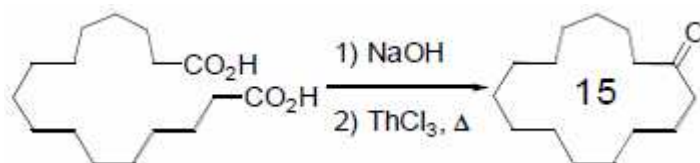
Roční produkce se v roce 1996 pohybovala kolem 5600 tun [21], údaje z roku 2000 hovoří přibližně o 4000 tunách za stejné kalendářní období. V roce 1994 se objevily první zmínky o přítomnosti těchto látek v těle ryb. O rok později byly tyto sloučeniny prokázány také u člověka ve vzorcích mateřského mléka a tuku [22].

Tabulka 2: Přehled zástupců polycyklických musk sloučenin

Strukturní vzorec			
Molekulový vzorec	$C_{17}H_{24}O$	$C_{18}H_{26}O$	$C_{18}H_{26}O$
Triviální název	Phantolid	Galaxolid	Tonalid

2.4.3 Makrocyclické musk sloučeniny

Makrocyclické musk sloučeniny byly v malých množstvích poprvé syntetizovány v roce 1926 Leopoldem Růžičkou³ (nositel Nobelovy ceny za chemii v roce 1939) [22]. Ten jako první připravil Exaltone, avšak výtěžnost reakce byla pouhá 2 %. Syntéza spočívala v pyrolyze hexadekandiové kyseliny v přítomnosti thorité soli.



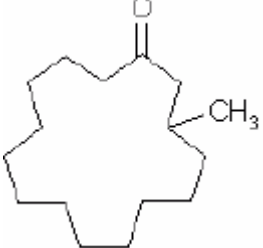
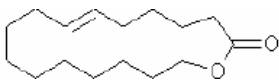
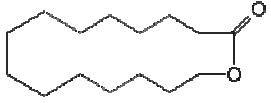
Později byl proces přípravy optimalizován a bylo dosaženo výtěžnosti mezi 60 – 70 %, avšak komerčně nebyly makrocyclické musk sloučeniny vyráběny až do devadesátých let minulého století, především vzhledem k vysokým výrobním nákladům a ke složitosti výrobního procesu. Dnes jsou vlivem zdokonalené výroby dostupné na trhu ve větším množství, i když cena za kilogram, a to v porovnání s ostatními syntetickými vonnými látkami, je stále vyšší. Rostoucí míra zastoupení na trhu je do značné míry ovlivňována poklesem výroby ostatních zástupců musk sloučenin. V roce 1998 činil podíl světové produkce přibližně 25 % a do roku 2008 se předpokládal nárůst v rozmezí 60 až 65 %.

Makrocyclické musk sloučeniny se nejvíce podobají přírodním vonným látkám a jsou proto považovány za snadněji biodegradovatelné. Charakterizovat je lze dobrými fixačními vlastnostmi a výbornou stabilitou a kvalitou vůně. Přesto zhruba polovina populace, patrně vlivem velké molekulové hmotnosti, není schopna tyto látky cítit [19].

Podle původu mají makrocyclické musk sloučeniny povahu ketonu (živočišný zdroj) nebo laktonu (rostlinný zdroj). Jedná se o 15-ti až 17-ti četné cykly, jejichž vůně je ovlivněna velikostí kruhů. Pokud má sloučenina 14 uhlíkových atomů, její odér je pouze slabý; 15-ti až 16-ti uhlíkové kruhy vykazují velmi silnou vůni [22]. K nejznámějším zástupcům skupiny patří Muscone, Ambrettolid, Thibetolid (Exaltolid) a Globalid.

³ Lavoslav (Leopold) Růžička (13. září 1887 – 26. září 1976), člen Československé společnosti chemické, působil jako asistent na ETH (Eidgenössische Technische Hochschule) v Curychu. Svoji vědeckou činnost zaměřil na oblast terpenů a steroidních hormonů.

Tabulka 3: Přehled zástupců makrocyclických musk sloučenin

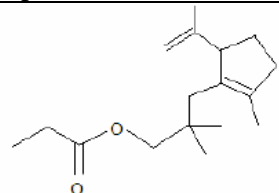
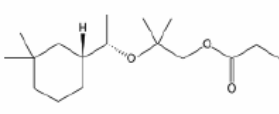
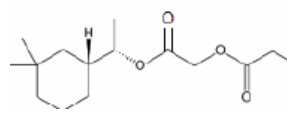
Strukturní vzorec			
Molekulový vzorec	$C_{16}H_{30}O$	$C_{16}H_{30}O$	$C_{15}H_{28}O_2$
Triviální název	Muscone	Ambrettolid	Thibetolid

2.4.4 Lineární musk sloučeniny

Lineární musk sloučeniny představují poměrně mladou skupinu syntetických vonných látek, která se od ostatních, tj. nitromusk, polycyklických a makrocyclických musk sloučenin, odlišuje především svojí strukturou. Cyklopentenyl ester, derivát cyklopentenu, který náleží k alicyklickým musk sloučeninám, jak jsou tyto syntetické mošusové látky také někdy označovány, byl poprvé připraven v roce 1975 W. Hoffmanem a K. von Fraunbergem. Na trh byla tato sloučenina uvedena pod komerčním označením cyclomusk. Jedná se o bezbarvou, světle žlutou kapalinu s ovocnou vůní připomínající jahodové aroma. V roce 1990 z ní byl syntetizován derivát cyklohexanu Helvetolid, který je charakterizován květinovou, ovocnou až hruškovou vůní. O deset let později se podařilo připravit Romandolid. Nedávno byl objeven citronelyl oxalát, čirá žlutá kapalina. Ten, ačkoliv má charakteristickou květinovou vůni růží, není ve vonném průmyslu používán. Důvodem je jeho vysoký práh citlivosti vnímání v nose [20].

V současné době známe více než 114 zástupců této nové skupiny musk sloučenin. Většina látek, která sem náleží, vytváří různé enantiomery, přičemž v nosních receptorech jsou aktivní pouze vybrané prostorové izomery.

Tabulka 4: Přehled zástupců lineárních musk sloučenin

Strukturní vzorec			
Molekulový vzorec	$C_{17}H_{28}O_2$	$C_{17}H_{32}O_3$	$C_{15}H_{26}O_4$
Triviální název	Cyklomusk	Helvetolid	Romandolid

2.4.5 Sledování zástupci musk sloučenin

2.4.5.1 Souhrnný přehled fyzikálních a chemických vlastností

Lineární syntetické musk sloučeniny jsou semivolatilní organické sloučeniny. Mají lipofilní charakter a snadno se rozpouštějí v organických rozpouštědlech. Vlivem nepolárního charakteru se špatně rozpouštějí ve vodě. Relativní molekulové hmotnosti se pohybují mezi 154,0 až 196,0.

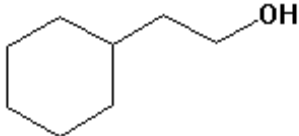
Citronellol je frekventovaně používán v parfémeh a přípravcích sloužících k odpuzování hmyzu. Pro osoby, u kterých v minulosti byla prokázána alergie na parfémy, je však vydáno doporučení nevystavovat se kontaktu s přípravky, které ho obsahují. Ve Spojených státech amerických je také schválen agenturou FDA (Food and Drug Administration) jako látka použitelná v potravinovém průmyslu.

Isobornyl acetát rovněž patří ke skupině chemických látek frekventovaně používaných v parfumerii. Obsažen je v toaletních mýdlech, dochucovacích přísadách a antiseptících. Je jedním z meziproduktů vznikajících při výrobě kafru. Institut farmaceutické chemie Univerzity ve Vídni provedl v roce 1992 studii zaměřenou na aromaterapeutický účinek vybraných vonných látek. Vědci zkoumali isobornyl acetát a bornyl acetát obsažený v oleji z kořene kozlíku lékařského. U laboratorních myší, které byly vystaveny přímé inhalaci těchto látek, byly pozorovány uklidňující účinky a látka byla vyhodnocena jako sedativum.

Látka 2-cyklohexylethanol rovněž patří do skupiny průmyslově připravovaných vonných látek, které se objevují v parfémeh. V přírodě se běžně vyskytuje v listech čerstvé čajové růže. Fresco Menthe se přidává k řadě vonných látek, včetně levandule, citrusů, muškátů apod. Zde, stejně jako v pracích prostředcích, její přítomnost podtrhuje svěží a chladivý charakter. Látka je velice stabilní ve všech možných aplikacích, včetně přípravků s obsahem bělidla.

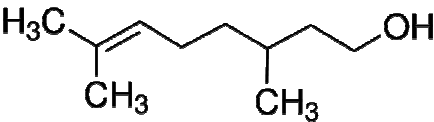
2.4.5.2 2-cyklohexylethanol

Tabulka 5: Fyzikálně-chemické vlastnosti 2-cyklohexylethanolu [24]

Systematický název	2-cyklohexylethanol
CAS	4442-79-9
Molekulový vzorec	C ₈ H ₁₆ O
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost	128,21 g.mol ⁻¹
Hustota	0,920 g.cm ⁻³
Tlak par	0,05080 mm Hg při 25 °C
Log Kow	2,62
Rozpustnost ve vodě (při 25 °C)	-----

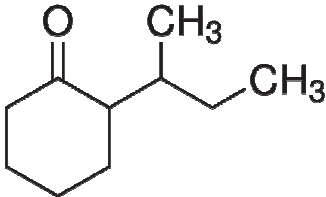
2.4.5.3 Citronellol

Tabulka 6: Fyzikálně-chemické vlastnosti Citronellolu [25]

Systematický název	3,7-dimethyloct-6-en-1-ol
CAS	106-22-9
Molekulový vzorec	C ₁₀ H ₂₀ O
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost	156,27 g.mol ⁻¹
Hustota	0,855 g.cm ⁻³
Tlak par	0.01800 mm Hg při 25°C
Log Kow	3,91
Rozpustnost ve vodě (při 25 °C)	105,5 mg.l ⁻¹

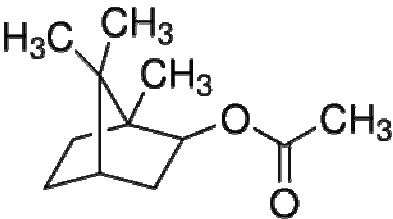
2.4.5.4 Fresco Menthe

Tabulka 7: Fyzikálně-chemické vlastnosti Fresco Menthe [26]

Systematický název	2-sec-butylcyklohexanon
CAS	14765-30-1
Molekulový vzorec	C ₁₀ H ₁₈ O
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost	154,25 g.mol ⁻¹
Hustota	0,912 g.cm ⁻³
Tlak par	0,16300 mm Hg při 25 °C
Log Kow	2,94
Rozpustnost ve vodě (při 25 °C)	222,7 mg.l ⁻¹

2.4.5.5 Isobornylacetát

Tabulka 8: Fyzikálně-chemické vlastnosti Isobornylacetátu [27]

Systematický název	[(1R,4S,6R)-1,7,7-trimethyl-6-bicyclo[2.2.1]heptanyl] acetát
CAS	125-12-2
Molekulový vzorec	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost	196,29 g.mol ⁻¹
Hustota	0,983 g.cm ⁻³
Tlak par	0,09600 mm Hg při 25 °C
Log Kow	3,86
Rozpustnost ve vodě (při 25 °C)	9,721 mg.l ⁻¹

2.5 Čištění odpadních vod

Přítomnost musk sloučenin byla prokázána ve všech složkách životního prostředí. Můžeme je proto detekovat především v hydrosféře, atmosféře i v půdním obalu země. Vzhledem ke svým fyzikálně chemickým vlastnostem a především lipofilní povaze, převažuje schopnost bioakumulace v živých organismech. U člověka dochází ke vstupu musk sloučeniny do organismu prostřednictvím pokožky a dýchacího systému. Po použití nejrozličnějších přípravků osobní hygieny a domácí péče se dostávají tyto sloučeniny do odpadních vod. Čistírny odpadních vod svými technologickými procesy nedosahují absolutní účinnosti čištění. Voda se zbývajícím obsahem musk sloučenin se tak dostává do recipientu, odkud se zpravidla distribuuje do dalších složek životního prostředí. Z čistíren odpadních vod se musk sloučeniny dostávají do životního prostředí také prostřednictvím kalů, ve kterých jsou kumulovány. Kompostování kalů představuje kromě spalování další z možných způsobů likvidace. Prokázána byla přítomnost musk sloučenin v sedimentech a v různé míře v tělech ryb. Tímto způsobem pak mohou vstupovat až do potravního řetězce. U člověka však zatím tento způsob kontaminace nebyl prokázán.

V roce 2008 byla v Pekingu provedena studie zabývající se účinností eliminace musk sloučenin z odpadní vody čištěné prostřednictvím čistíren odpadních vod. V sedmi vybraných čistírnách bylo odebráno celkem 45 vzorků, z toho 17 vzorků zastupovala odpadní voda na přítoku, 16 voda na odtoku a ve 12-ti vzorcích byl zahrnut také kal. Jednorázový odběr směsných 24 hodinových vzorků proběhl v lednu, květnu a září. Sledováno bylo sedm analytů, konkrétně AHTN, HHCB, MK, MX, celestolid, phantolid a traseolid. První dva

uvedené přípravky byly detekovány vždy. Naměřené koncentrace musk sloučenin se pohybovaly v podobných hmotnostních množstvích jako u analogických studiích prováděných v Číně, Rakousku a Nizozemí. Účinnost čistícího procesu kolísala u galaxolidu mezi 14,3 – 98,0 % a u tonalidu mezi 18,5 – 98,7 %⁴ [29].

2.5.1 Mechanicko-biologická čistírna odpadních vod

Za hlavní zdroj znečištění hydrosféry jsou považovány odpadní vody z průmyslových podniků, měst a obcí. Ačkoliv se procesy čištění vypouštěných vod neustále zdokonalují, přesto nejsme schopni zajistit stoprocentní účinnost těchto procesů. Čistírny odpadních vod lze klasifikovat podle velikosti a typu čistírenského procesu. Technologická linka malých čistíren (do 500 EO) se liší především v tom, že v porovnání s velkými čistírnami je vynechána primární sedimentace a v biologickém stupni anaerobní stabilizace kalu [30].

2.5.1.1 Mechanický stupeň

Odpadní voda je přiváděna do ČOV hlavní stokou ze stokové sítě. První krok zahrnuje hrubé předčištění pomocí lapáků šterku. To spočívá v odstranění velkých a vodou sunutých předmětů (dlažební kostky, cihly, dlaždice), které by mohly dále způsobovat poruchy strojních zařízení a narušovat čistící procesy. Voda potom protéká přes česle, které odstraňují hrubé plovoucí nečistoty (hadry, větve, peněženky, mrtvá zvířata). Shrabky jsou hygienicky závadné, proto se spalují nebo skládkují. Následuje lapák písku kombinovaný s lapákem tuku. Jejich účelem je oddělení organické fáze a minerálních suspenzí. Zařízení pracuje na principu rozdílné hustoty obou uvedených materiálů. Posledním krokem mechanického čištění jsou usazovací nádrže. Na hladině těchto nádrží jsou zachytávány plovoucí látky, na dně potom probíhá usazování jemných nerozpuštěných látek [30].

2.5.1.2 Biologický stupeň

V tomto stupni je znečištění odstraňováno z odpadní vody za pomoci mikroorganismů, nazývaných aktivovaný kal. Ten je v biologickém reaktoru kultivován buď jako suspenze (aktivační systémy), nebo na pevném nosiči (biofilmové reaktory). Přítomné aerobní bakterie pomocí svého metabolismu odbourají 99 % organického znečištění. K hlavním procesům patří mineralizace, tj. proces odbourání uhlíkatých organických látek až na oxid uhličitý a vodu, a dále amonifikace, při které jsou přítomné dusíkaté látky odbourány za vzniku amonného iontu. Procesem nitrifikace je vzniklý amonný iont přeměněn na dusičnany. K dalším procesům patří imobilizace a hygienické ošetření vody (detoxikace).

Voda následně putuje do dosazovací nádrže, která pracuje na stejném principu jako nádrže usazovací, a proto je jejím úkolem oddělení aktivovaného kalu od vyčištěné vody.

⁴ V roce 2007 provedlo Wastewater Technology Centre v Kanadě ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí studii poukazující na souvislost mezi účinností eliminace musk sloučenin v kanadských komunálních odpadních vodách a okolní teplotou, kdy v zimních měsících účinnosti čistícího procesu klesá až na jednotky procent.

Čistá voda je potom vypouštěna zpět do recipientu; dodržování tohoto postupu je v souladu se zákonem o vodách a zákonem o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu. Kvalita vypouštěné vody je průběžně kontrolována; k základním ukazatelům patří CHSK, BSK₅, N_{Celk}, P_{Celk}, NL. Limity jsou stanoveny uvedenými aktuálně platnými zákony České republiky a liší se podle velikosti příslušné čistírny odpadních vod [31].

Část aktivovaného kalu je dále využita v anaerobním stupni (přebytečný aktivovaný kal), kde je využíváno přítomných živin pro anaerobní bakterie. Ty jsou schopny vyprodukovat řadu plynů, který po vyčištění tvoří bioplyn. Ten je možné použít u větších ČOV jako zdroj ohřevu vyhřívacích nádrží, případně jako alternativní zdroj energie. Anaerobně stabilizovaný kal je pak možno dále zpracovávat nebo spalovat. Druhá část kalu je navracena zpět k zaočkování biologického stupně (vratný aktivovaný kal). U malých ČOV byla prokázána neekonomičnost zařazení anaerobního stupně stabilizace kalu do technologického procesu. Smíšený kal se proto u těchto čistíren stabilizuje aerobně. Je-li přesto prováděna anaerobní stabilizace kalu, probíhá v nevyhřívaných Imhoffových nádržích [30].

2.5.1.3 Čistírna odpadních vod Brno-Modřice

Čistírna odpadních vod Brno-Modřice slouží k čištění odpadních vod přiváděných systémem kanalizačních stok z města Brna a ve stále větší míře prostřednictvím soustavy čerpacích stanic i z širokého okolí Brna. V současné době jsou kromě Brna napojeny na ČOV ještě města Kuřim a Modřice, obce Želešice, Česká u Brna, Šlapanice, Šlapanice-Bedřichovice, Ostopovice, Moravské Knínice, Lipůvka, Podolí, Ponětovice a Rozdrojovice.

Původní ČOV byla uvedena do provozu v roce 1961. S rozvojem města Brna a nárůstem počtu obyvatel došlo v 80. letech k řadě úprav. Přetížení čistírny a poptávka obcí po napojení na stávající kanalizační systém vyústila v roce 2001 v celkovou rekonstrukci a rozšíření. Kapacita ČOV byla navýšena z 373 800 EO využívaných před modernizací na 630 000 EO. Vyčištěná odpadní voda je odváděna zpět do vodního toku Svratka [32].

Údaje o množství vypouštěných odpadních vod:

- $Q_{\text{prům.}} = 1\,950 \text{ l/s}$
- $Q_{\text{max.}} = 4\,222 \text{ l/s}$
- $Q_{\text{bil/mes}} = 5\,127 \text{ tis. m}^3/\text{měsíc}$
- $Q_{\text{bil/rok}} = 61\,520 \text{ tis. m}^3/\text{rok}$

2.5.1.4 Čistírna odpadních vod Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Čistírna odpadních vod v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity obstarává čištění odpadních vod vyprodukovaných univerzitou. Čistící proces je obstaráván jednou biologickou a dvěma chemickými jednotkami. V rámci přestavby Kliniky chorob prasat v roce 2010 byla provedena rekonstrukce objektu ČOV tak, aby odpovídala současným potřebám. Vyčištěná odpadní voda je vypouštěna do městské kanalizace.

Údaje o množství vypouštěných odpadních vod:

- $Q_{\text{prům.}} = 3,4 \text{ l/s}$
- $Q_{\text{bil/den}} = 120 \text{ m}^3/\text{den}$

2.5.2 Kořenová čistírna odpadních vod

Kořenové čistírny vod jsou velice populární u rodinných domů, letních rekreačních středisek, sezónních letních táborů apod. Např. v Pardubickém kraji je jediná větší čistírna pro část obce Moravany (asi 100 EO). O další výstavbě v rámci kraje se neuvažuje, což koresponduje s celorepublikovým trendem, tj. omezení výstavby KČOV⁵.

Výhoda zařízení spočívá v nezávislosti na elektrické energii, výhodou je i estetický vzhled a možnost nenásilného začlenění do přírodního rázu krajiny. S provozem čistírny se však objevuje řada problémů, některé z nich mohou mít i ekonomický dopad. Prvním nedostatkem je velká náročnost na záběr plochy. Čistírna vyžaduje 10m³/EO, což může být rovněž důvodem omezení výstavby. Čistící efekt kolísá v jednotlivých ročních obdobích. Zvláště pak v mimovegetační fázi rostlin dochází k značnému poklesu čistícího efektu.

Z legislativního hlediska je nedostatkem také to, že dobře fungující kořenová čistírna sice umí odstraňovat z odpadní vody organické znečištění a nerozpuštěné látky (NL), nedokáže však odstraňovat ani přítomné formy dusíku, ani regulovat celkový obsah fosforu.

Přibližně po šesti letech provozu dochází vlivem přitékajících nerozpuštěných látek a biochemických reakcí k zanášení filtračního lože, které je tvořeno štěrkem o příslušné zrnitosti. V periodicky se opakujících cyklech je proto nutné provést výměnu filtračního média. V tomto okamžiku však vzrůstají i finanční nároky na provoz. Podle zákona o odpadech 185/2001 Sb. je takovýto štěrk klasifikován jako nebezpečný odpad z důvodu obsahu patogenních organismů. Uvažujeme-li KČOV pro 300 EO na ploše 3000 m², filtrační lože se umísťuje do výšky 0,8 m, což představuje objem 2 400 m³ a váží přibližně 5 520 tun. Bez nákladů na dopravu se při aktuálně platné ceně (5000 Kč/t nebezpečného odpadu) přibližujeme částce 27 600 000 Kč [34].

2.5.2.1 Princip čištění odpadních vod na KČOV

Princip čištění odpadních vod na kořenové čistírně je poměrně starý a dlouhodobě prověřený. V podstatě se jedná o kopírování přírodního samovolného čistícího procesu. Při gravitačním průtoku vhodně konfigurovaným terénem, který disponuje značným atmosféricky provzdušněným objemem (štěrkové sutě, silniční příkopy, lesní terén atd.) a vhodnou vegetací, dochází k samovolnému nárůstu kultury čistících aerobních mikroorganismů. Nastane-li optimální rovnováha v množství přitékajících odpadních vod, živin v nich obsažených, v patřičném provzdušnění a potřebném časovém zdržení v uvedeném systému, dochází k výraznému čistícímu, resp. v přírodních podmínkách samočistícímu efektu. Kořenová čistírna má na svém vstupu vždy velkokapacitní septik nebo šterbinovou nádrž, vlastní kořenová pole plní dočišťující funkci. Z hlediska vegetace se osazuje zpravidla rákosem obecným a chrsticí rákosovitou. Uvedené bahenní rostliny rostou nad vodní hladinou, zatímco jejich kořeny vyžadují trvalé ponoření ve vodě. Nadzemní část rostlin dopravuje kyslík do kořenové části, kde se kyslík uvolňuje. Nebyly však publikovány studie zabývající se stanovením účinnosti čistícího procesu ve vztahu k eliminaci přítomných syntetických vonných látek v odpadní vodě na KČOV [34].

⁵ V České republice jsou KČOV projektovány od roku 1989, dnes je jich v provozu asi 225. Největší KČOV u nás jsou ve Spáleném Poříčí (pro 1400 obyvatel), v Osové Bítýšce (pro 1000 obyvatel) a v Čisté u Rakovníka (pro 800 obyvatel). Nejvíce KČOV je však navrženo jako domovní čistírny pro méně než 10 obyvatel [33].

2.6 Základní fyzikální a chemické vlastnosti musk sloučenin

Syntetické musk sloučeniny jsou organické látky, které vzhledem ke svým fyzikálně chemickým vlastnostem patří do skupiny persistentních organických polutantů (POPs). Látky, které zařazujeme do této velké skupiny, se vyznačují snadnou bioakumulací v ekosystému a omezenou schopností degradace v jednotlivých složkách životního prostředí. Někteří zástupci musk sloučenin odolávají hydrolýze, biodegradaci a fotodegradaci.

Musk sloučeniny mají nepolární charakter a jsou proto špatně rozpustné ve vodě. Naopak velmi dobře se rozpouštějí v organických rozpouštědlech. Rozdělovací koeficient K_{ow} (n-oktanol/voda) nabývá poměrně vysokých hodnot. Díky své lipofilitě mohou procházet i buněčnými membránami a bioakumulovat se v tukové tkáni. Jsou to semivolatilní organické látky a jejich těkavost i stabilita jsou závislé na chemické struktuře. Relativní molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 200 až 300.

2.7 Musk sloučeniny v životním prostředí

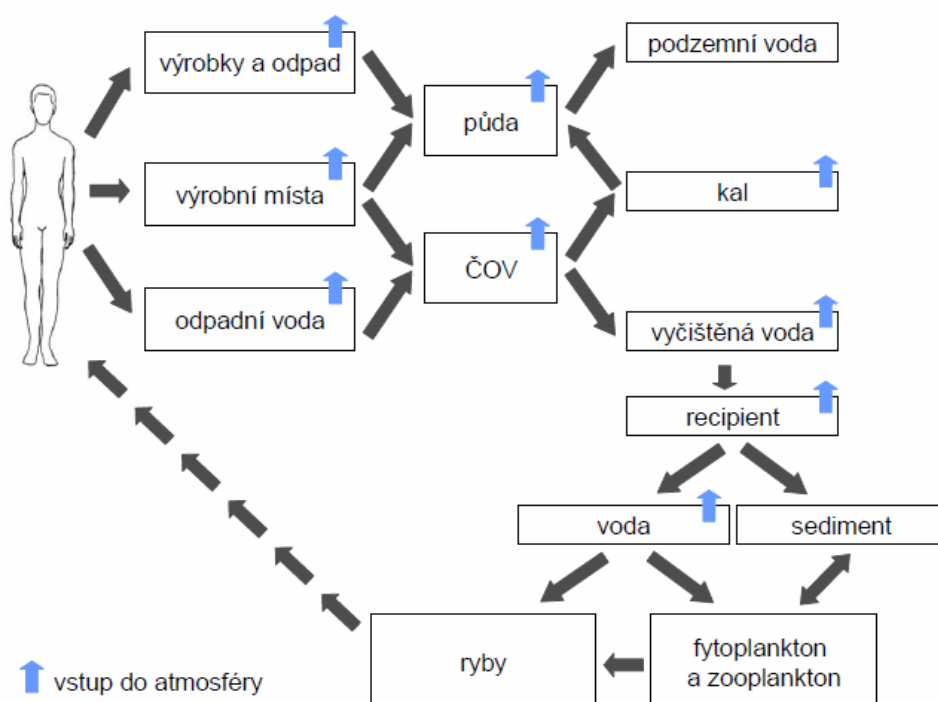
Chování syntetických musk sloučenin v environmentálním prostředí je odvozeno od jejich chemických a fyzikálních vlastností. Patří mezi semivolatilní organické sloučeniny, které jsou všudypřítomně rozšířené v jednotlivých složkách životního prostředí.

Přestože v dnešní době již existuje množství studií zaměřených na chování a osud syntetických vonných látek v okolním prostředí, nejsou získané informace zcela kompletní. U některých zástupců nitromusk a polycyklických musk sloučenin informace chybí nebo si musíme vystačit se softwarovými modely. Ty ovšem nedokáží plně simulovat jejich reálné chování.

Dosud provedené studie se vesměs shodují na základních fyzikálně-chemických a ekotoxikologických parametrech musk sloučenin, na základě kterých lze fundovaně zhodnotit nebezpečnost dané látky.

Ve stopových koncentracích jsou syntetické vonné látky přítomny ve všech složkách životního prostředí a rovněž byla jejich přítomnost prokázána v potravním řetězci. Dlouhodobě jsou musk sloučeniny studovány v hydrosféře, v menší míře je výzkum zaměřen na problematiku pedosféry a atmosféry.

Za primární zdroj kontaminace je považována odpadní voda z čistíren odpadních vod. Nejvyšší koncentrace syntetických vonných látek byla prokazatelně naměřena u výpustí čistíren odpadních vod, kterými se přečištěná odpadní voda dostává do recipientu. Toto tvrzení je doloženo také zjištěním, že kontaminace klesá ve směru po proudu od městských aglomerací. Konkrétní problematika těchto látek v jednotlivých složkách životního prostředí je popsána níže.



Obrázek 5: Schéma distribuce musk sloučenin do jednotlivých složek životního prostředí [19]

2.7.1 Hydrosféra

Přestože účinnost čistícího procesu v čistírně odpadních vod je pro mnoho látek vysoká, nemusí to platit pro syntetické vonné látky. Účinnost čištění závisí nejen na použité technologii, ale také na struktuře dané látky. Pro nitromusk sloučeniny se hodnoty eliminace z odpadní vody pohybují v rozmezí 34 – 87 % a pro polycyklické syntetické látky mezi 60 – 86 %.

Průměrná koncentrace syntetických vonných látek na vstupu do čistíren odpadních vod v České republice je asi $650 \mu\text{g.l}^{-1}$, na výstupu hodnota klesá cca na $40 \mu\text{g.l}^{-1}$, což představuje účinnost biologického procesu čištění přibližně 94 %. Většina kontaminantů však mohla být zadržena sorpcí na kalu, což vychází z povahy sledovaných látek. I v tomto případě je zdůrazněno, že je vždy nezbytné posoudit závislost struktury dané látky na míře eliminace z odpadní vody [35].

Takto vyčištěná voda potom putuje přímo do recipientu, tj. do povrchových vodních toků. Za účelem posouzení přítomnosti syntetických vonných látek bylo provedeno několik studií [36]. V roce 1996 byla v ČR provedena předběžná analýza ryb odchycených v Labi v Hřensku. Výsledky tohoto testování naznačovaly značnou kontaminaci ichtyofauny. V následujících letech potom proběhla na území České republiky rozsáhlá studie zaměřená na nejvýznamnější zástupce syntetických musk sloučenin, v rámci které bylo vyšetřeno 650 vzorků ryb a sedimentů. Vzorky byly odebírány z 11 míst na toku Labe, Vltavy a Tiché Orlice. Výsledky prokázaly, že jsou tyto polutanty přítomny prakticky ve všech našich vodních tocích.

2.7.2 Atmosféra

Musk sloučeniny patří mezi semivolatilní organické sloučeniny a do atmosféry se uvolňují z různých matric. I tak se však atmosféra nepovažuje za významný zdroj kontaminace a případné znečištění má spíše lokální charakter. V atmosféře probíhají především radikálové reakce (fotolýza) a většina sloučenin zde setrvává v řádech desítek hodin (galaxolid, tonalid). Musk keton a musk xylen se v atmosféře rozkládá; pro tento rozklad je uváděna doba 12,5 dne [35].

Ve druhé polovině roku 2002 byla provedena pilotní studie syntetických musk sloučenin severovýchodních zemí (Norsko, Švédsko, Finsko, Dánsko, Island a Špicberky). Vzorkovací plán zahrnoval mimo jiné odběr 23 vzorků dešťové vody z různých oblastí vymezeného území.

Každá země byla zodpovědná za sběr vzorků, které následně odesílala do NERI (Národní výzkumný ústav pro životní prostředí), kde byly analyzovány. Galaxolid byl zjištěn ve 4 z celkového počtu 23 vzorků, a to v koncentracích v rozmezí 12 až 29 ng.l⁻¹. V jednom vzorku byl přítomen tonalid v koncentraci 35 ng.l⁻¹. Nitro musk sloučeniny byly ve vzorcích prokazovány zcela výjimečně.

Celosvětová ekologická organizace Greenpeace si nechala prostřednictvím nizozemské laboratoře TNO (Netherlands Organization for Applied Scientific Research) vypracovat v roce 2003 novou studii. Ta analyzovala musk sloučeniny v dešťové vodě na 47 místech v Nizozemí, 2 místech v Německu a jednom místě v Belgii. Musk xylen nebyl zjištěn v žádném vzorku (< 2 ng.l⁻¹), musk ambrette pak ve 36 % vzorků s koncentrací pohybující se okolo 14 ng.l⁻¹. Ve vzorcích byl ve 4 % rovněž prokázán musk keton, s maximální koncentrací 3,4 ng.l⁻¹. Obě studie však dokazují, že atmosféra není zdrojem kontaminace musk sloučeninami [37].

2.7.3 Pedosféra

Hlavní zdroje kontaminace půdy představují kaly z čistíren odpadních vod, které jsou v zemědělství používány jako hnojivo. Nakládání s čistírenskými kaly je legislativně ošetřeno ve vyhlášce 382/2001 Sb. „O podmínkách použití upravených kalů v zemědělské půdě“. Ta stanovuje přípustné limity pro těžké kovy, polychlorované bifenylly (PCBs) a některé patogenní organismy. Komplexní problematika musk sloučenin není dosud předmětem právní úpravy, ačkoliv jsou tyto látky také zčásti zadržovány sorpcí právě v kalu.

Další možný způsob kontaminace představují samotné znečištěné vodní toky a technologické havárie a úniky při výrobě. Ty jsou však spíše lokálního charakteru. Celkové procento znečištění pedosféry těmito způsoby je proto zanedbatelné.

Podobné jsou také výsledky studie zaměřené na znečištění půdy prostřednictvím dešťové vody. Studie komise OSPAR prokázala přítomnost HHCB a AHTN v koncentracích ng.l⁻¹. Naopak musk xylen se pohyboval pod mezí detekce [38].

2.7.4 Člověk a musk sloučeniny

Hlavní cestou, jakou může být člověk kontaminován musk sloučeninami, představuje pokožka a dýchací cesty. Syntetické vonné látky jsou obsaženy v celé řadě produktů denní potřeby jako jsou mýdla, přípravky na ošetření pokožky, parfémy, čistící a prací prostředky

apod. Další zdroj musk sloučenin představují osvěžovače vzduchu používané na sociálních zařízeních i v běžných místnostech domů a kanceláří. Ještě horší je situace ve vnitřním prostoru osobních automobilů, kde v důsledku relativně malého prostoru interiéru je koncentrace syntetických vonných látek větší. Z výše uvedeného proto vyplývá, že člověk je exponován syntetickými vonnými sloučeninami prakticky každý den. Proto není zarážející, že v souvislosti s danou problematikou byla vypracována řada studií. Ty všeobecně potvrzují přítomnost musk sloučenin v těle člověka, konkrétně se jedná o mateřské mléko, krevní sérum a tukovou tkáň. Poprvé byly nitromusk sloučeniny prokázány v mateřském mléku již v roce 1993.

Ve Švédsku byla provedena analýza dvou nitromusk sloučenin (musk xylen a musk keton) a pěti polycyklických musk sloučenin (HHCB, AHTN, ADBI, ATII a AHDI) v mateřském mléku 101 prvorodiček. Během výzkumu bylo přihlédnuto také ke zdravotnímu stavu, životnímu stylu a používání syntetických vonných látek během těhotenství. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u HHCB, kde byl obsah $63,9 \text{ ng.g}^{-1}$ tuku, dále následoval AHTN ($10,4 \text{ ng.g}^{-1}$) a musk xylen ($9,5 \text{ ng.g}^{-1}$). Koncentrace ostatních látek byly ve většině případů pod mezí detekce ($2,0$ až $3,0 \text{ ng.g}^{-1}$). U žen, které ve větší míře používaly během těhotenství parfémů, byla naměřena zvýšená koncentrace HHCB. U žen, které poukázaly na nedávné použití pracího prostředku, byla zvýšená hladina AHTN. Lze proto konstatovat, že v tomto případě byla prokázána spojitost mezi expozicí musk sloučeninami a jejich detekcí ve tkáni. Na druhou stranu koncentrace AHTN a MX, zjišťované mezi léty 1996 až 2003 v mateřském mléce výrazně poklesly, což může představovat buď pokles použití látek ve spotřebitelských produktech, případně změny v používání parfémovaných výrobků uživateli [39]. Podobně zaměřené studie byly zpracovány rovněž v USA ve státě Massachusetts [40], dále v Německu nebo také v Japonsku.

2.8 Toxicita musk sloučenin

Toxicita neboli jedovatost (poisonousness) představuje míru vlivu, jakým působí jedovaté látky na živé organizmy. Toxicita může být hodnocena jako akutní, kdy se posuzuje škodlivý účinek, ke kterému dochází po jednorázové expozici chemické látky, nebo chronická, která bývá způsobena opakovanou expozicí chemickou látkou. Podle místa vniku nebezpečné chemické látky do organismu se expozice dělí na inhalační, perorální, perkutánní a jiné [41].

U musk sloučenin lze uvažovat rovněž expozici přes kůži, kde v místě aplikace dochází ke vstřebání látky do tkání a k jejímu následnému přechodu do krve. Do organismu se zástupci musk sloučenin mohou dostat také s vdechovaným vzduchem nebo prostřednictvím konzumované potravy.

Musk sloučeniny jsou početnou skupinou chemicky různorodých látek. Za účelem posouzení toxicity musk sloučenin bylo zpracováno mnoho experimentálních toxikologických i ekotoxikologických studií. Rovněž v současnosti probíhají v této oblasti další výzkumy. Zcela známy nejsou například procesy, které mají za následek toxický efekt v organismech. Doposud naměřené údaje jsou v řadě případů neúplné.

Základním údajem o akutní toxicitě dané látky je smrtelná dávka (LD – lethal dose). Nejčastěji je určována tzv. LD_{50} , tj. dávka, při které uhynie 50 % pokusných zvířat⁶. Je však třeba zdůraznit, že srovnávat lze pouze údaje pocházející z experimentů, které lze srovnávat

⁶ Jen v USA je ročně usmrceno více než 5 milionů psů, králíků, krys, opic a dalších zvířat při určování LD. Testování kosmetiky a čistících prostředků pro domácnost na zvířatech není vyžadováno zákonem.

[41]. Důležité jsou především údaje o koncentraci zkoumané látky, testovaném organismu, pohlaví, způsobu aplikace, době expozice apod.

Musk xylen (MX) a musk keton (MK), tj. zástupci skupiny nitromusk sloučenin, vykazují nízkou akutní a subchronickou toxicitu. Rovněž nebyla prokázána teratogenita, reprodukční toxicita nebo mutagenita. Musk xylen je však již dle legislativy Evropské unie považován za karcinogen 3. kategorie. Naopak u musk ketonu karcinogenita prokázána nebyla. Předpokládá se souvislost mezi zvýšenou koncentrací těchto látek v krvi těhotných žen a nárůstem potratů.

Galaxolid a tonalid ze skupiny polycyklických musk sloučenin jsou považovány za pravděpodobné endokrinní disruptory, což se projevuje jejich působením na hormonální regulaci organismu. Bylo již prokázáno, že polycyklické musk sloučeniny podmiňují v těle vznik karcinomu prsu a rovněž se podílejí na celkovém potlačení imunity (imunosupresiva) daného jedince [42].

Tabulka 9: Toxicita sledovaných zástupců musk sloučenin

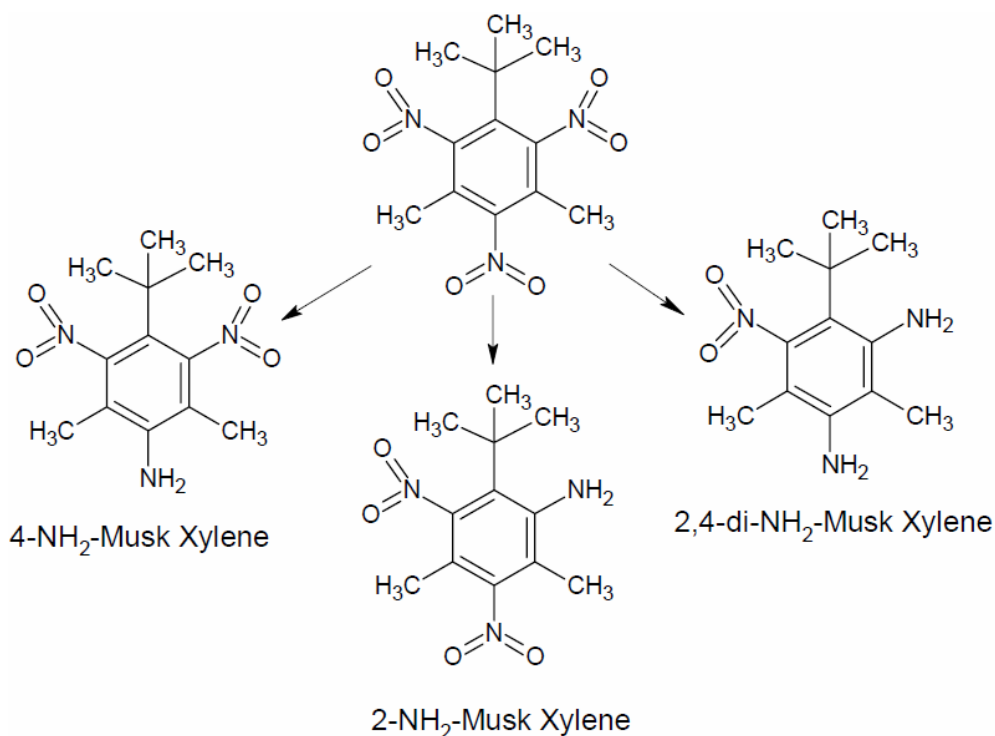
Analyt	Orální toxicita LD₅₀	Dermální toxicita LD₅₀
Cyklohexylethanol	Potkan 940 mg.kg ⁻¹	Králík 1220 mg.kg ⁻¹
Citronellol	Potkan 3450 mg.kg ⁻¹	Králík 2650 mg.kg ⁻¹
Fresco Menthe	Potkan 2400 mg.kg ⁻¹	Králík >5000 mg.kg ⁻¹
Isobornyl Acetát	Potkan >10000 mg.kg ⁻¹	Králík >20000 mg.kg ⁻¹

2.9 Metabolizace musk sloučenin

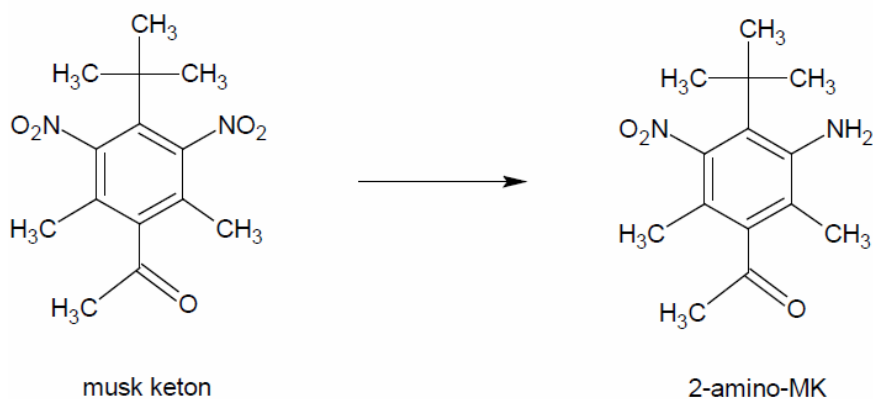
Bylo potvrzeno, že musk sloučeniny mohou v různé míře podléhat metabolizaci [3]. Metabolity a metabolické dráhy syntetických mošusových látek jsou v současnosti předmětem intenzivního výzkumu, protože doposud bylo na totot téma publikováno jen omezené množství informací [43].

Nejvíce prozkoumány jsou nitromusk sloučeniny a polycyklické musk sloučeniny, které se v životním prostředí vyskytují nejdéle. V roce 1998 byly poprvé publikovány informace o nálezů metabolitů musk xyleny a musk ketonu ve vodním prostředí. V tomto případě byly zjišťovanými konkrétními metabolity 4-amino-MX, 2-amino-MX a 2-amino-MK. Obecně je principem metabolizace nitromusk sloučenin redukce přítomné nitro skupiny na amino skupinu.

V rámci další studie byly odebírány vzorky z čistírny odpadních vod v Hamburku na řece Labi. Na přítoku byly naměřeny koncentrace MX 150 ng.l⁻¹ a MK 550 ng.l⁻¹, na odtoku koncentrace poklesla na 10 ng.l⁻¹ a 6 ng.l⁻¹. Aminoderiváty nitromusk sloučenin nebyly na přítoku detekovány vůbec, avšak na odtoku byl kvantifikován 2-amino-MX v koncentraci 10 ng.l⁻¹, 4-amino-MX v koncentraci 34 ng.l⁻¹ a 2 - amino-MK v koncentraci 250 ng.l⁻¹ [44].



Obrázek 6: Metabolizace musk xylenu [45]



Obrázek 7: Metabolizace musk ketonu [43]

U polycyklických musk sloučenin je známá metabolizace HHCB, při které dochází nejčastěji k oxidaci na příslušný HHCB-lakton, který může být dále hydrolyzován na příslušnou kyselinu v závislosti na hodnotě pH (rovnovážná reakce). Příslušné metabolity polycyklických musk sloučenin jsou v přírodě rychle degradovány za pomoci sladkovodních hub a bakterií. Informace o metabolizaci AHTN nejsou vesměs dostupné.

ČSN EN ISO 5667-3 je prezentován minimální objem odebraného vzorku v mililitrech. Toto množství představuje pro odpadní vodu odběr do dvou vzorkovnic po 40 ml.

2.10.2 Transport vzorku

Po odběru vzorků je nutné zajistit transport do laboratoře v co nejkratším čase. Při samotné přepravě je nutné dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci z vnějšího prostředí (těsnost víček vzorkovnic). Také je nutné zajistit takové podmínky transportu, které vycházejí z povahy analytu. U musk sloučenin se jedná především o zamezení vystavení vzorkovnic nevhodné teplotě a zamezení fotodegradace. Norma ČSN EN ISO 5667-3 stanovuje v případě vzorkování odpadních vod transportní teplotu v rozmezí 1 – 4 °C, což se zpravidla zajišťuje přepravou v transportní chladničce.

2.10.3 Uchování vzorku

V ideálním případě je analýza prováděna okamžitě po přijetí vzorku do laboratoře. Pokud není možné takto postupovat, může být vzorek, a to při splnění určitých podmínek, uchováván až do doby analýzy v chladničce. Aby nedošlo k sekundární kontaminaci a možným ztrátám, uchovávají se vzorky v nádobách, do kterých byly odebírány a ve kterých byly následně transportovány. Vzorky se musí skladovat v temnu, aby nedocházelo k fotodegradaci, a také v chladu, čímž se zajišťuje omezení biodegradace a omezení ztrát vypařováním. Doporučené teplotní rozmezí v chladicím zařízení pro uchovávání vzorků se pohybuje v rozmezí +4 °C až -20 °C.

2.10.4 Izolace analytů z matrice

Analyty jsou izolovány z matrice prostřednictvím nejrozličnějších extrakčních technik. Společným znakem těchto technik je získání analytu neobsahujícího žádné nežádoucí příměsi. Konkrétní izolační metoda je vybrána na základě vysoké účinnosti izolace analytu a jednoduché proveditelnosti celého postupu. Důležitým rozhodujícím faktorem je rovněž finanční stránka celé prováděné analýzy, tj. nízká realizační cena.

Pro izolaci musk sloučenin ze vzorku vody je nejvhodnější metodou, která splňuje všechna výše uvedená kritéria, mikroextrakce tuhou fází (SPME).

2.10.4.1 SPME – mikroextrakce tuhou fází

Separační metodu SPME (solid phase microextraction) navrhl v polovině 90. let profesor Janusz B. Pawliszyn⁷ z Univerzity Waterloo Ontario v Kanadě. Jedná se o velmi jednoduchou a účinnou adsorpčně desorpční techniku zakoncentrování analytu, která má širokou oblast

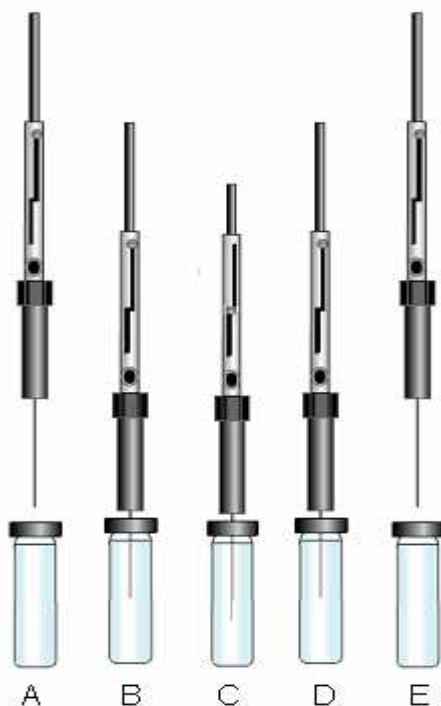
⁷ Profesor Janusz B. Pawliszyn se narodil v Gdaňsku v Polsku v roce 1954. Je autorem více než 400 publikací zaměřených na metodu SPME, kterou navrhl. V roce 2006 byl vyhlášen nejvíce citovaným vědeckým pracovníkem, je držitelem řady ocenění (Jubilejní medaile od Chromatografické společnosti, Humboldt Research Award).

praktického použití. Uplatňuje se při sledování obsahu organických látek přítomných ve složkách životního prostředí, při analýzách prováděných ve farmaceutickém průmyslu a také v kriminalistice; rovněž je tato metoda použitelná i při sledování vonných a chuťových látek.

SPME se vyznačuje nízkou cenou (s jedním vláknem lze opakovaně provést 100 i více analýz), širokým spektrem využití, rychlým (řádově v minutách) a jednoduchým provedením. Ve většině případů nevyžaduje zkoumaný vzorek v předchozím kroku speciální úpravu. Výhodou je také možnost jejich použití i při zjišťování nízkých koncentrací analytu a také ten fakt, že při izolaci z matrice nejsou potřebná organická rozpouštědla [47].

Manipulace se SPME

Analyty jsou extrahovány z plynné fáze nebo roztoku na fázi stacionární, která je nanášena na křemenném vlákně. Podle povahy vrstvy jsou složky vzorku na vlákno buď absorbovány (polymerní vrstva) nebo adsorbovány (vrstva pevné fáze). Poté je vlákno zataženo do jehly, která pro něj představuje mimo jiné ochranu před mechanickým poškozením. Takto může být vzorek přímo transportován do chromatografického přístroje. Při použití metody plynové chromatografie jsou analyty desorbovány tepelně v jeho nástřikovém prostoru (injektoru). Je-li však zvolena kapalinová chromatografie, probíhá desorbce pomocí interface příslušnou mobilní fází. Analyty jsou potom separovány na koloně a detekovány s použitím jednoho nebo více detektorů.



Obrázek 9: Manipulace se SPME vláknem

Princip metody SPME

Jakmile je vlákno exponováno do rovnovážné fáze vzorku (rovnovážná plynná fáze nad vzorkem nebo rovnovážná kapalná fáze), začíná na něm sorpce analytů. Zatímco vlákno může mít charakter pouze kapalně nebo tuhé fáze, vzorek se může vyskytovat ve všech třech skupenstvích.

Nikdy však nedochází k úplné extrakci analytů z matrice. Extrakci lze považovat za ukončenou, jakmile je dosaženo distribuční rovnováhy mezi matricí vzorku a vláknem. Prakticky tento stav nastane, když je extrahované množství analytů konstantní. Z fyzikálně-chemického hlediska je rovnovážný stav SPME techniky závislý na koncentraci analytu ve vzorku a na typu a šířce vrstvy sorpčního materiálu na vlákně [46].

Pro dvoufázové systémy tuhá fáze – plyn nebo tuhá fáze – kapalina je množství analytu absorbované při extrakci v kapalně vrstvě vyjádřeno pomocí rovnice:

$$n = \frac{K_{fs} V_s V_f C_0}{V_s + K_{fs} V_f}, \quad (1)$$

kde n je množství analytu extrahované vláknem, K_{fs} je distribuční koeficient – vlákno/vzorek, V_f je objem na povrchu vlákna, V_s je objem vzorku a C_0 je počáteční koncentrace analytu ve vzorku.

Z výše uvedené rovnice vyplývá lineární vztah mezi počáteční koncentrací analytu ve vzorku a množstvím analytu, které se sorbuje vláknem [47].

Optimalizace SMPE

Pro dosažení reprodukovatelných výsledků i při nízkých koncentracích analytů je důležité při procesu optimalizace zohlednit níže uvedené faktory:

- Volba stacionární fáze vlákna (typ, tloušťka)
- Podmínky sorpce (extrakční mód, teplota, doba, míchání, hodnota pH, vysolování)

Volba stacionární fáze

Volba vhodného polymeru stacionární fáze vlákna vychází především z povahy stanovaných analytů. K hlavním faktorům ovlivňujícím extrakci patří charakter molekuly, molekulová hmotnost, polarita a přítomnost významných funkčních skupin. Také se přihlíží k očekávanému detekčnímu limitu a lineárnímu rozsahu vlastního stanovení. Nepolární analyty jsou účinněji sorbovány vlákny s nepolárním charakterem a naopak.

Rovněž tloušťka polymeru je jedním z limitních faktorů. Silnější vrstva polymeru je schopna extrahovat větší množství analytu. Proto je tento typ vlákna využíván pro zachycení těkavějších látek. Obráceně platí, že tenká vrstva zajišťuje rychlou difuzi a uvolnění během tepelné desorpce [47].

Extrakční mód

Pro expozici vlákna mohou být použity dvě metody:

- DI-SPME (*direct immersion* – přímé ponoření)
- HS-SPME (*headspace*)

Při přímé extrakci dochází k ponoření vlákna do vzorku. Tato metoda se spíše uplatňuje u látek, které se vyznačují omezenou těkavostí. U metody head-space je vlákno exponováno v prostoru rovnovážné plynné fáze, který se ustálil nad hladinou analyzovaného vzorku. Druhá popsaná metoda kladně přispívá k prodloužení životnosti vlákna, protože nedochází k jeho poškození vlivem opakovaného ponořování (např. v odpadní vodě) [47].

Extrakční čas

Délka extrakce se pohybuje zpravidla mezi 15-30 minutami, v některých případech však postačuje i pouhých 30 sekund. Je však nezbytně nutné dodržet konstantní délku extrakce z důvodu reprodukovatelnosti naměřených výsledků.

Míchání vzorku

Míchání analyzovaného vzorku kladně přispívá ke zkrácení a zlepšení účinnosti extrakce. Důležité je dodržet konstantní podmínky, což znamená zajistit neměnné míchání během celého procesu stanovení tak, aby nedošlo ke zkreslení výsledků.

Zahřívání vzorku

Zahříváním vzorku dochází ke zvýšení energie molekul; v důsledku toho se zkracuje čas potřebný k dosažení rovnováhy, což zaručuje i kratší dobu sorpce. U vzorků, ve kterých jsou analyzovány méně těkavé sloučeniny, je zahřívání zvláště výhodné. Koncentrace analytu v prostoru head-space se zvyšuje a extrakce je proto rychlejší a účinnější.

Hodnota pH a vysolování

Přídavek 25-30 % (hmotnostních) chloridu sodného do vzorku, případně úprava hodnoty pH před extrakcí, se může projevit jako zvýšení iontové síly roztoku. Následkem toho dochází ke snížení rozpustnosti analytů. U řady látek lze dosáhnout přídavkem soli (iontová síla roste) vyšší účinnosti extrakce.

Naopak u vysokomolekulárních látek dochází k interferenci píků, a proto se zde vysolování nedoporučuje. Změna pH také ovlivňuje rozpustnost analytů. I v tomto případě platí, že kyselé složky se snadněji extrahují v kyselém prostředí, zásadité v zásaditém. Vhodnou kombinací vysolování a změny pH roztoků lze celkově dosáhnout vyšší účinnosti extrakce analytu v prostoru head-space [47].

2.10.5 Metody detekce, identifikace a kvantifikace

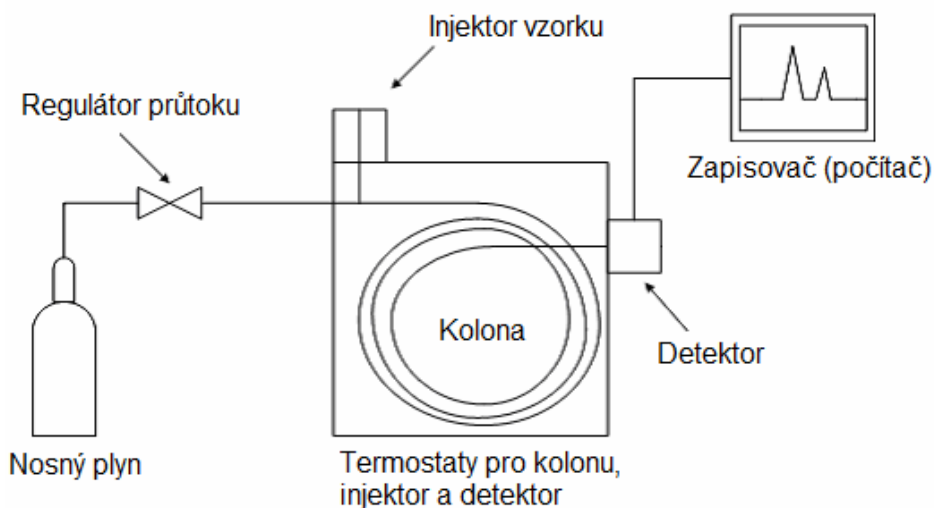
Ke konečné separaci volatilních a semivolatilních látek, mezi které patří také musk sloučeniny, lze s výhodou použít plynovou chromatografii. Jako vhodný detektor je v tomto případě použita hmotnostní spektrometrie, která se vyznačuje detekčním limitem v řádech až jednotek pikogramů. Je zapotřebí si uvědomit, že u reálných vzorků se musk sloučeniny vyskytují v stopových až ultrastopových množstvích.

2.10.5.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační analytická metoda, která se vyznačuje jednoduchým provedením a vysokou účinností separace. Metoda je založena na rovnovážném dělení složek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá).

Vzorek je převeden do plynného skupenství a jednorázově dávkován do proudu nosného plynu. Na vnitřním povrchu kapilární kolony je nanášena vrstva předem vhodně zvolené stacionární fáze. Při separaci kolonu nejprve opouštějí analyty, které svojí povahou interagují se stacionární fází minimálně a proto zde nejsou příliš zadržovány, později potom sloučeniny, které mají větší tendenci interagovat se stacionární fází. Čas od nástřiku vzorku po opuštění

kolony je označován jako čas retenční. Vycházející analyty jsou vyhodnocovány detektorem. Ten poskytuje odpovídající signál, a to v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech sledovaných látek. Souborem výstupů je potom chromatogram, na kterém se vyskytují chromatografické píky, které jsou charakterizované retenčním časem (kvalitativní analýza) a plochou (kvantitativní analýza) [48].



Obrázek 10: Zjednodušené schéma plynového chromatografu

Nosný plyn

Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev s heliem, dusíkem, vodíkem nebo argonem. Nosný plyn je volen podle použité kolony a detektoru. Dalším kritériem výběru je jeho čistota (min. 99,99 %), inertnost, dále pak jeho cena, viskozita, netoxicitata a bezpečnost při práci [49].

Pro odstranění vlhkosti a případných nečistot v nosném plynu lze umístit za tlakovou láhev *čistící zařízení*. Za nečistotu lze považovat např. kyslík, který by mohl vyvolat chemickou změnu stacionární fáze tzv. stárnutí (nevratná změna). Znečištění nemusí pocházet přímo ze zásobní lahve, může se například objevit na vedení při chybné instalaci celého zařízení. Vzhledem k čistotě dodávaných nosných plynů již není většinou nutné čistící zařízení zařazovat.

Regulační systém

Regulační systém je elektronické zařízení, které řídí průtok nosného plynu kolonou. Průtok mobilní fáze může být vlivem toho konstantní po celou dobu separace, a to i s ohledem na zvolený teplotní program [48].

Injektor (dávkovač)

K zavádění vzorku do proudu nosného plynu slouží *injektor*. Vzorek lze zavádět ručně nebo pomocí autosampleru. Důraz je kladen na rychlé odpaření vzorku, což je zajištěno prostřednictvím skleněné vložky (lineru), která je součástí injektoru. Vzorek je dávkován malou injekční stříkačkou s jehlou (nejčastěji mikrostříkačky Hamilton) přes pryžové septum. Především je zapotřebí zohlednit to, aby nedošlo k narušení podmínek panujících v koloně (pokles tlaku a změna teploty). Mezi injektorem a kolonou je umístěn dělič toku (splitter), který je využíván při speciálním nástřiku s děličem toku. Kromě toho rozeznáváme ještě další dvě metody nástřiku vzorku do kolony, tj. přímý nástřik a nástřik bez děliče toku.

Přímý nástřik se používá nejčastěji u náplňových kolon, kdy se nastřikuje 1 až 10 μl vzorku. Horní část kolony má o 10 – 30 °C nižší teplotu, než je teplota varu příslušného rozpouštědla. Po vytvoření kapalného filmu na stěně kolony (30 – 60 sekund) dochází k prudkému zvýšení teploty kolony a nastává odpaření.

Nástřik s děličem toku (split injection) se používá u kolon s menší kapacitou. U koncentrovaných vzorků tak dochází prostřednictvím nosného plynu k odstranění nadbytečného množství analytu do odpadu. Do vlastní kolony se tak dostává jen zlomek z původního množství vzorku.

Nástřik bez děliče toku (splitless injection) se aplikuje nečastěji u zředěných roztoků (pro ultrastopové analýzy), kde je zapotřebí nástří v rozmezí 0,5 – 5 μl vzorku. Odváděcí smyčka je v tomto případě uzavřena a na kolonu je v tomto případě přiveden celý nástřik vzorku.

Kolony

Rozeznáváme dva druhy kolon, náplňové a kapilární. Kolony tvoří důležitý prvek celého plynového chromatografu, protože právě zde dochází k vlastní separaci sledovaných složek, přítomných ve vzorku.

Náplňové kolony jsou z nerez, niklu nebo skla a mají průměr 2 až 4 mm a délku v řádech jednotek metrů (0,6 až 10 m). Jsou koncipovány celkově na větší objem dávkovaného vzorku (až 100 μg v 1 – 10 μl rozpouštědla). Stacionární fázi tvoří grafitizované saze, silikagel nebo u rozdělovací chromatografie také křemelina.

Kapilární kolony jsou podstatně tenčí než náplňové (0,1 až 0,6 mm). Délka podle konkrétní aplikace se pohybuje mezi 10 až 200 m. Vyrobeny jsou z oceli a taveného křemene pokrytého vrstvičkou polyimidu. Stacionární fáze je nanášena na její vnitřní straně.

Termostat

Termostat odpovídá za udržení vzorku v plynném stavu. Jsou-li separovány analyty s různou teplotou varu, je možné teplotu programově měnit v teplotním rozmezí 50 °C až 400 °C. Teplotní krok lze navolit s přesností až ± 1 °C za minutu. S rostoucí teplotou dochází k růstu tlaku par příslušných složek a celkově k poklesu retenčních časů. Naopak, pokud mají separované analyty podobnou teplotu varu, je vhodné nastavit izotermní režim.

Detektor

Po opuštění kolony protéká nosný plyn *detektorem*. Ten reaguje na přítomnost složky v nosném plynu a na jeho základě vysílá signál, který je měřitelný. Při výběru vhodného detektoru se zohledňuje citlivost (nízké detekční limity) a lineární odezva na obsah analytu. Neméně důležitým parametrem je také selektivita. Podle děje probíhajícího při detekci rozeznáváme detektory nedestruktivní a destruktivní. První uvedený typ nevyvolává při detekci chemické změny látek, zatímco u druhé skupiny detektorů nastávají u analyzovaných látek nevratné změny [50].

Nedestruktivní detektory jsou tyto:

- Infračervený spektrometr
- Detektor elektrovaného zachytu (ECD)
- Tepelně-vodivostní detektor (TCD)
- Argonový a heliový detektor (ArD, HeD)

Destruktivní detektory:

- Plamenový ionizační detektor (FID)
- Plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem (AFID)
- Hmotnostní spektrometr (MS)

Vyhodnocovací zařízení

Vyhodnocovací zařízení je dnes výhradně reprezentováno počítačem, ve kterém je instalován příslušný software. Ten umožňuje snadno odečítat příslušné retenční časy, výšky píků a integrovat plochy jednotlivých chromatografických křivek.

2.10.5.2 Hmotnostní spektrometrie

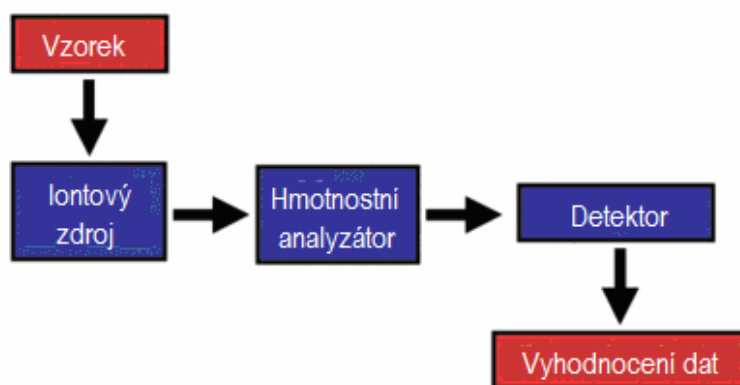
Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která využívá separace urychlených ionizovaných částic (iontů) ve vakuu, a to podle jejich hmotnosti při jejich průchodu magnetickým a elektrickým polem [51]. Uplatnění nachází jak v kvantitativní analýze, tak také v kvalitativní analýze. Vyznačuje se mimořádně širokou linearitou odezvy (až 12 řádů) a použitelností i pro velmi malá množství analytu (několik atomů nebo molekul).

Metoda byla vyvinuta počátkem 20. století a své místo našla nejprve ve fyzice při hledání stabilních izotopů prvků, později, a to od počátku 2. světové války, také v chemii při analýze organických látek. V období od 2. poloviny 60. let minulého století až do současnosti byly aplikovány především nové měkké ionizační techniky (MALDI, ESI apod.) a masivně byly využívány techniky tandemové (např. GC/MS; LC/MS, MSⁿ). Na základě možností její aplikace lze konstatovat, že hmotnostní spektrometrie je nyní využívána v mnoha vědeckých oborech. Neobejde se bez ní lékařství v diagnostických oblastech, kriminalistika při identifikaci drog nebo výbušnin, archeologie při datování stáří nalezených předmětů, biologie při kvantifikaci proteinů a při analýze nukleových kyselin, případně toxikologie při identifikaci farmaceutik.

Princip této separační techniky spočívá v převedení vzorku na ionizovanou plynnou fázi v iontovém zdroji a na následné separaci vzniklých iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje m/z [52].

Přístrojové uspořádání hmotnostního spektrometru:

- Iontový zdroj
- Hmotnostní analyzátor
- Detektor
- Vyhodnocovací zařízení
- Vakuový systém



Obrázek 11: Schéma hmotnostního spektrometru

Iontový zdroj

Účelem iontového zdroje je ionizace molekul a urychlení vzniklých částic před vstupem do analyzátoru. V současné době využíváme pro různé typy látek různé ionizační techniky. Některé z technik již byly v důsledku vývoje hmotnostní spektrometrie nahrazeny jinými, případně byly zcela omezeny. Výběr vhodného zdroje závisí na charakteru analyzovaných látek. Pro těkavé a polotěkavé sloučeniny, případně pro spojení hmotnostní spektrometrie s GC, se převážně používá elektronová ionizace (EI), případně ionizace chemická (CI). Mezi další existující typy ionizace patří: elektrosprej (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), ionizace polem (FI), ionizace urychlenými ionty (FIB) nebo atomy (FAB), ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI), indukčně vázaná plazma (ICP).

Elektronová ionizace

Vzorek je zaváděn vstupní štěrbinou do evakuované ionizační komory. Molekuly látky jsou vystaveny působení svazku elektronů urychlených na energii 70 eV, emitovaných z wolframové nebo rhéniové katody a dopadajících na trap, neboli na záchytnou elektrodu. Interakcí s neutrální molekulou dochází k vytržení elektronu z elektronového obalu a ke vzniku radikálkationtu podle rovnice:



Elektronová ionizace patří mezi tvrdé ionizační techniky, protože v průběhu ionizace získávají ionizované molekuly značný přebytek vnitřní energie. To se projevuje jejich další fragmentací:



Výhodou tvrdých ionizačních technik je dobrá reprodukovatelnost, což nám umožňuje vytváření knihoven spekter. Obslužný program hmotnostního spektrometru obsahuje zpravidla databázi nejfrekventovanějších spekter.

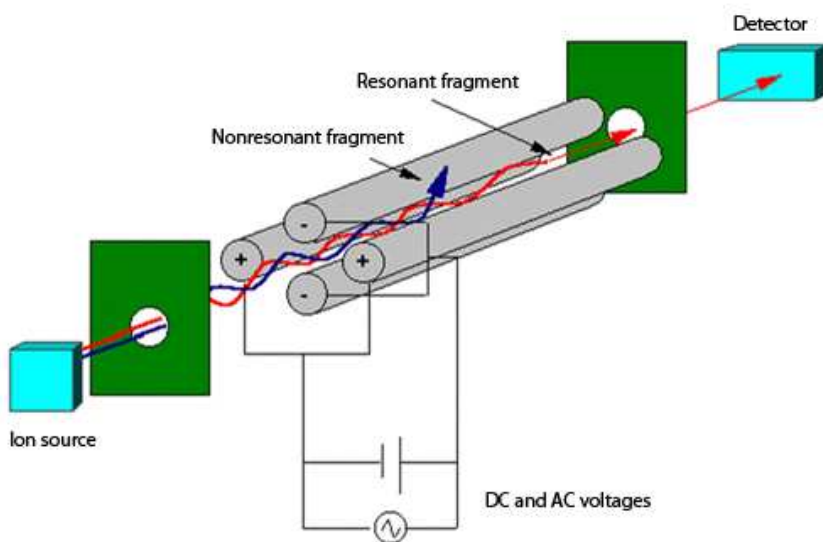
Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor je umístěn za ionizačním zdrojem a jeho funkce spočívá v separaci iontů v plynné fázi za vakua, a to podle poměru m/z . Vlastní separace vychází z různých fyzikálních principů, jakými jsou odlišná doba rychlosti letu iontů, zakřivení dráhy iontů v elektrickém nebo magnetickém poli, různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli.

V praxi je nejčastěji používán kvadrupolový analyzátor. Ten se vyznačuje především nízkou cenou oproti jiným řešením. Rovněž rozlišovací schopnost, ačkoliv je hodnocena jako nízká, obvykle postačuje v celém rozsahu měření k bezpečnému rozlišení iontů lišících se o jednotku m/z . K dalším používaným typům analyzátorů patří např. analyzátor doby letu (TOF), iontová past (IT), iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FTICR), sektorové analyzátoři, orbitrap aj.

Kvadrupolový analyzátor využívá elektrické pole mezi systémem čtyř elektrod kruhového nebo hyperbolického průřezu o délce 15 cm. Vždy dvojice tyčí (elektrod) je připojena na zdroj stejnosměrného napětí o stejné kladné nebo záporné hodnotě. Současně je na všechny čtyři elektrody připojeno střídavé vysokofrekvenční napětí v řádech MHz. Středová osa mezi tyčemi je udržována na nulovém potenciálu a v jejím směru jsou přiváděny urychlené ionty z iontové zdroje. Zde oscilují směrem k detektoru.

Pouze ionty o určitém poměru m/z nejsou vychylovány a mohou pokračovat dále až do detektoru. Ostatní ionty mají nestabilní oscilace a zachytávají se na povrchu tyčí. Pokud se postupně mění s časem střídavé i stejnosměrné napětí, a to od nuly až po maximální hodnotu, přičemž poměr obou napětí zůstává dále konstantní, propouští kvadrupolový filtr postupně ionty o vzrůstajících hodnotách m/z , které můžeme detekovat a registrovat.



Obrázek 12: Schéma kvadrupolového hmotnostního analyzátoru

Detektor

Úkolem detektoru je detekce iontů po jejich separaci podle hodnoty m/z a stanovení relativní intenzity jednotlivých iontů. Detektor převádí tok iontů na registrovatelný elektrický signál. Nejčastěji používanými typy detekce jsou elektronový násobič, případně fotonásobič.

Vakuový systém

Hmotnostní analyzátor vždy pracuje za vysokého vakua, které se liší podle příslušného typu. K jeho dosažení jsou používány jednostupňové, dvoustupňové, případně třístupňové vakuové pumpy. Pro první stupeň bývají použity pumpy rotační (výkon 80 l.s^{-1}), pro druhý stupeň se více hodí pumpy turbomolekulární nebo difúzní s výkonem až 250 l.s^{-1} . Uvedené vakuované prostředí je nutné, aby ionty udržely dostatečně dlouho střední dráhu letu a aby nedocházelo ke kolizním srážkám s neutrálními ionty. Také iontový zdroj je vakuovaný za předpokladu, že se nejedná o ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI).

Tabulka 10: *Přehled vakua v jednotlivých hmotnostních analyzátorech*

Hmotnostní Analyzátor	Vakuum [Pa]
Iontová past	cca 10^{-3}
Kvadrupol	cca 10^{-3}
Průletová trubice	cca 10^{-3}
Sektorový	$10^{-5} - 10^{-6}$
FTICR	$10^{-5} - 10^{-9}$

Řídicí systém

Hmotnostní spektrometr je v současnosti ovládán prostřednictvím počítače. V něm je nainstalován příslušný software, který umožňuje nastavení parametrů analýzy, ladění přístroje a jeho údržbu. Na pevném disku jsou ukládána naměřená a zpracovaná data. U tvrdých ionizačních technik je možné využít také obsáhlou knihovnu spekter a porovnat získaná hmotnostní spektra.

2.10.5.3 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Spojením plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie lze úspěšně kombinovat výhody obou uvedených metod. Proto je možné separovat směsi vzorku pomocí GC a následně identifikovat a kvantifikovat individuální složky prostřednictvím MS. V průběhu historického vývoje však bylo nutné odstraňovat hlavní problém, který vyplynul ze spojení uvedených metod. Konkrétně se jednalo o rozdíly tlaku mezi plynovým chromatografem a iontovým zdrojem MS. Tento rozdíl může, v závislosti na konkrétní specifikaci zařízení, představovat až 15 řádů (např. vakuum potřebné pro FTICR je 10^{-10} Pa) [53].

Při spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie se dnes nejčastěji používají kapilární kolony (průtok cca. 1 ml.min^{-1}), které vstupují přímo do iontového zdroje. V něm je konvenčně volena buď elektronová ionizace (EI) nebo ionizace chemická (CI).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje

Přístroje a zařízení

- Analytické váhy AB265-S (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Míchačka RCT basic (Kika Werke, Německo)

Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

- Držák pro SPME
- SPME vlákno (modré): 65 μm PDMS-DVB (Supelco, USA)

Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem

- GC Agilent 6890N (Agilent Technologies, USA)
- Kolona: kapilární, stacionární fáze: DB-5MS; rozměry: 20 m $\times$ 180 μm $\times$ 0,18 μm ; maximální teplota: 350 $^{\circ}\text{C}$ (Agilent Technologies, USA, katalogové číslo: 121-5522)
- Automatický dávkovač vzorků Agilent 7683 series (Agilent, USA)
- Hmotnostní detektor MSD 5973N (Agilent Technologies, USA) [elektronová ionizace, kvadrupolový analyzátor]

Programové vybavení

- Enhanced ChemStation G1701DA Version D.00.00.38 (19. 11. 2001) [MSD 5973N + Offline-MSD Data Analysis] (Agilent Technologies, USA)

3.2 Použité chemikálie

Technické plyny

- Helium 6,0 (Messer, ČR)

Standardy

- 2 - Cyklohexylethanol [100 %] (AROMA Praha, a.s., ČR)
- Fresco Menthe [100 %] (AROMA Praha, a.s., ČR)
- Citronellol [100 %] (AROMA Praha, a.s., ČR)
- Isobornyl Acetát [100 %] (AROMA Praha, a.s., ČR)

Chemikálie

- Aceton (Lach-Ner, Česká republika)
- Cyklohexan (Merck, Německo)
- Kyselina chromsírová
- NaCl p.a.

Ostatní

- Destilovaná voda

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Příprava roztoků

3.3.1.1 Příprava roztoku pro optimalizaci SPME

Standardy lineárních musk sloučenin jsou výrobky české společnosti Aroma Praha. Firma se zabývá vývojem, výrobou a prodejem nejrozličnějších látek a surovin určených pro chemický, kosmetický a částečně také potravinářský průmysl. Při přípravě pracovních roztoků a pro potřeby výpočtů bylo vycházeno z tabelovaných hodnot hustoty a příslušné standardy byly považovány za 100%.

Na počátku měření bylo nejprve nutné ověřit mísitelnost standardů v příslušných rozpouštědlech. Všechny čtyři zkoumané standardy jsou bez problémů rozpustné v nepolárním cyklohexanu, ve kterém byly připraveny zásobní roztoky I. Vzorky odpadních vod však mají polární charakter, a proto byl nařazen směsný pracovní roztok v acetonu, který tak zajišťuje s vodou neomezenou mísitelnost.

Tabulka 11: Příprava zásobních a pracovních roztoků

Název analytu	Zásobní roztok I [ng. μl^{-1}]	Směsný pracovní roztok I [ng.ml $^{-1}$]
2-cyklohexylethanol	1840	5273,3
Fresco Menthe	1824	700
Citronellol	1710	1866,7
Isobornyl acetát	1966	466,7

Příklad přípravy zásobního roztoku I:

Hustota 2-cyklohexylethanolu je 0,920 g.cm $^{-3}$.

$$\begin{array}{r} 920\,000\,\mu\text{g} \dots\dots\dots 1000\,\mu\text{l} \\ \times \mu\text{g} \dots\dots\dots 2\,\mu\text{l} \\ \hline x = 1840\,\mu\text{g} \end{array}$$

Odběrem 2 μl z příslušného standardu a následným dávkováním do 998 μl cyklohexanu byly připraveny zásobní roztoky I o koncentracích podle tabulky 11.

3.3.1.2 Příprava roztoku pro kalibraci

Tabulka 12: Příprava zásobního a pracovního roztoku pro kalibraci

Název analytu	Zásobní roztok II [ng. μl^{-1}]	Směsný pracovní roztok II [ng.ml $^{-1}$]
2-Cyklohexylethanol	1840	4900
Fresco Menthe	1824	1824
Citronellol	1710	1710
Isobornyl Acetát	1966	7864

3.3.1.3 Příprava roztoku standardního přídavku

Tabulka 13: Příprava zásobního a pracovního roztoku pro standardní přídavek

Název analytu	Zásobní roztok III [ng. μl^{-1}]	Směsný pracovní roztok III [ng.ml $^{-1}$]
2-Cyklohexylethanol	1840	10000
Fresco Menthe	182,4	500
Citronellol	1710	4200
Isobornyl Acetát	1966	1400

3.3.2 Zjištění charakteristik analytů (retenční čas, MS spektrum)

Retenční charakteristiky a hmotnostní spektra jednotlivých látek byly stanovovány z kapalného nástřiku o koncentraci 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ v cyklohexanu. Roztoky byly proměřovány v režimu SCAN, čímž bylo získáno celé spektrum. Nastavení přístroje vycházelo z již vypracovaných diplomových prací [3, 43] zaměřených na analýzu musk sloučenin technikou GC/MS.

- Kolona: DB-5MS (20 m x 180 μm x 0,18 μm)
- Nosný plyn: He 6.0
- Nástřikové množství: 1 μl
- Injektor: splitless
- Teplota injektoru: 250 °C
- Tlak nosného plynu v injektoru: 116 kPa
- Průtok nosného plynu v injektoru: 28,5 ml/min
- Průtok nosného plynu kolonou: 0,8 ml/min
- Lineární rychlost nosného plynu: 40 cm/sec
- Nastavení: konstantní průtok
- Teplota transferu GC-MS: 285 °C
- Teplota iontového zdroje: 230 °C
- Teplota kvadrupolu: 150 °C
- Doba analýzy: 34,00 minut

Tabulka 14: *Výchozí teplotní program*

Teplotní krok [°C / min]	Teplota [°C]	Držení [min]
	50	1
15	110	-
5	165	8
15	280	2

3.3.3 Optimalizace teplotního programu

Analyty ze skupiny lineárních musk sloučenin byly zjišťovány pomocí systému GC/MS ve zvoleném režimu SIM, který se vyznačuje vyšší citlivostí. Optimalizace GC/MS se zaměřuje na nastavení teplotního programu, který významně ovlivňuje vzhled výsledného chromatogramu (píků). Výchozí podmínky nastavení přístroje jsou uvedeny v kapitole 3.3.2. Správné nastavení zaručuje rozdělení sledovaných analytů přítomných ve vzorku a jejich identifikaci a kvantifikaci [1]. Pro optimalizaci teplotního programu byl používán směsný roztok standardů o koncentraci $0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (2-cyklohexylethanol, Fresco Menthe, Isobornyl acetát), respektive $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Citronellol). Výsledky jsou následně uvedeny v kapitole 4.2.

3.3.4 Optimalizace mikroextrakce tuhou fází (SPME)

3.3.4.1 Výchozí podmínky SPME

Stejně jako při optimalizaci teplotního programu i pro optimalizaci SPME byly použity výchozí hodnoty z předchozích diplomových prací, které byly orientovány na problematiku mikroextrakce syntetických vonných látek ze vzorků odpadní vody.

- Typ vlákna: $65 \mu\text{m}$ PDMS/DVB
- Provedení: head-space
- Teplota sorpce: 80°C
- Doba ustálení rovnováhy: 5 minut
- Doba expozice vlákna: 30 minut
- Objem vialky: 22 ml
- Objem vzorku: 14 ml
- Rychlost míchání: 900 ot./min.
- Dávka směsného prac. roztoku I: $30 \mu\text{l}$
- Koncentrace standardů ve vzorku:
 - o 2-Cyklohexylethanol $11,3 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$
 - o Fresco Menthe $1,5 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$
 - o Citronellol $4,0 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$
 - o Isobornyl acetát $1,0 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$

Tabulka 15: Absolutní vnášené množství jednotlivých standardů

Název analytu	Absolutní množství [ng]
2-cyklohexylethanol	158,2
Fresco Menthe	21,0
Citronellol	56,0
Isobornyl acetát	14,0

3.3.4.2 Výběr vhodného vlákna

Jedním z nejdůležitějších parametrů optimalizace metody SPME je výběr vhodného vlákna, jehož složení stacionární fáze a tloušťka ovlivňují účinnost extrakce přítomných analytů. V rámci optimalizace metody bylo testováno 5 dostupných typů vláken vhodných pro spojení s plynovou chromatografií:

- Polydimethylsiloxan (PDMS) – 100 μm (červené)
- Polydimethylsiloxan / divinylbenzen (PDMS/DVB) – 65 μm (modré)
- Polyakrylát (PA) – 85 μm (bílé)
- Divinylbenzen/ Carboex/Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS) – 50 / 30 μm (šedé)
- Polyethylenglykol (PEG) – 60 μm (fialové)

3.3.4.3 Extrakční mód

U každého typu vlákna uvedeného v kapitole 3.3.4.2 byla provedena sorpce při přímém ponoření vlákna do roztoku i metoda head-space, kdy jsou sorbovány analyty z prostoru nad hladinou. Účinnost sorpčního procesu s využitím jednotlivých extrakčních módů byla vyhodnocena graficky; viz kapitola 4.3.3.

3.3.4.4 Vysolování

Při optimalizaci metody SPME byl také uvažován vliv vysolování. Zvýšení iontové síly roztoku, a to přidavkem 25 – 30 % (hmotnostních) chloridu sodného do vzorku, může mít za následek růst účinnosti extrakce některých analytů, zvláště pak látek těžkých a polárních. Při aproximaci hustoty vody na $1\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ představuje přidavek NaCl do vialky navážku 3,75 g. S jednotlivými vlákny bylo prováděno head-space měření s přidavkem a bez přidavku soli. Výsledky a porovnání obou metod jsou uvedeny v kapitole 4.3.4.

3.3.4.5 Teplota sorpce

Teplota má rovněž významný vliv na míru sorpce syntetických musk sloučenin na vhodně zvolené vlákno. Pro optimalizaci byly vybrány teploty 20 °C, což reprezentuje laboratorní teplotu, dále 40 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C a 100 °C. Sorpce analytů probíhala

na již vybrané vlákno (po provedení optimalizace) PDMS/DVB vlákno tloušťky 65 μm , v provedení head-space s přidavkem soli. Výsledky a vyhodnocení optimalizace teploty sorpce jsou prezentovány v kapitole 4.3.5.

3.3.4.6 Čas sorpce

Doba, za kterou je dosažena rovnováha mezi vláknem a matricí vzorku, je dalším parametrem, který je nutné optimalizovat. Navrženy byly časy 10, 20, 30, 40 a 50 minut. K optimalizaci bylo zvoleno PDMS/DVB vlákno 65 μm , provedení head-space s přidavkem soli a optimalizovaná teplota 70 °C. Vyhodnocení je zpracováno v kapitole 4.3.6.

3.3.5 Stanovení analytů v reálných vzorcích

Pro mikroextrakci analytů z reálných vzorků pomocí SPME byly používány skleněné vialky o objemu 22 ml. Do nich bylo nejprve vloženo míchadlo a následně 3,75 g NaCl. Do takto připravené vialky bylo dávkováno 14 ml nefiltrovaného a neředěného vzorku odpadní vody. Samotná extrakce pak probíhala podle optimalizovaných podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.3.7. Měření každého vzorku bylo prováděno paralelně, celkem 3x.

Každý den, a to vždy před zahájením měření reálných vzorků, byl proměřován blank. Ten byl připravován z destilované vody (objem 14 ml), byl umístěn do skleněné vialky s míchadlem, kam bylo přidáno 3,75 g NaCl.

3.3.5.1 Identifikace a kvantifikace analytů

Analyty byly identifikovány a posléze kvantifikovány pomocí tandemové techniky GC/MS. Identifikace sledovaných analytů spočívala v odečítání příslušných retenčních časů na chromatogramu a v porovnávání předem určených konfirmačních iontů.

U hmotnostního spektrometru byl upřednostněn režim SIM před režimem SCAN, protože dosahuje nízkých detekčních limitů, což je zvláště vhodné pro stopové a ultrastopové analýzy. Vlastní kvantifikace spočívala v integraci příslušných vyextrahovaných píků podle hodnot m/z . Charakteristické kvantifikační a identifikační ionty jednotlivých analytů jsou uvedeny v tabulce 28 v kapitole 4.4. Získané hodnoty ploch byly potom dosazeny za neznámé do vztahu vystihujícího metodu standardního přídávku, která je běžně aplikována u mnoha instrumentálních analytických metod. Výsledky jsou přehledně prezentovány v kapitole 4.7.

Metoda standardního přídávku

Při aplikaci této metody je ke vzorku přidáváno známé množství stanovované látky. Je proto nezbytně nutné provádět vždy dvě měření. Nejprve je proměřen reálný vzorek a vzápětí vzorek s přidavkem známého standardu ke vzorku. Z plochy píku látky obsažené ve vzorku a plochy píku dané látky po přidání definovaného množství standardního přídávku ke vzorku lze určit množství látky obsažené v původním vzorku. Samotný přídavek musí však vyvolat dostatečné navýšení odezvy.

Pro stanovení neznámé koncentrace analytu ve vzorku platí rovnice:

$$c_x = \frac{A_x \cdot c_s \cdot V_s}{(A_{xs} \cdot (V_i + V_s) - A_x \cdot V_i)}, \text{ kde} \quad (6)$$

c_x	neznámá koncentrace analytu ve vzorku [ng/ml]
A_x	plocha píku analytu v reálném vzorku
c_s	koncentrace standardu [ng/ml]
V_s	objem standardu [ml]
A_{xs}	plocha píku analytu po přidání standardu do reálného vzorku
V_i	objem vzorku [ml]

Pro metodu standardního přidavku byl připraven směsný pracovní roztok III, který byl pomocí mikropipety dávkován do vzorků odpadní vody. Koncentrace jednotlivých analytů je uvedena v kapitole 3.3.1.3. Pro dosažení dostatečného zvýšení odezvy přístroje postačoval přidavek 30 µl ke vzorku odpadní vody pocházející z odtoku a 100 µl pro vzorky pocházející z přítoku čistírny odpadních vod.

Příprava kalibračních řad

Pro určení kalibračních řad jednotlivých analytů byl ze standardů připraven směsný pracovní roztok II, který zahrnoval všechny čtyři sledované zástupce lineárních musk sloučenin (2-cyklohexylethanol, Fresco Menthe, Citronellol a Isobornyl acetát).

Při přípravě kalibračních řad byly použity identické podmínky jako pro analýzu reálných vzorků. Byly použity vialky o objemu 22 ml, do kterých bylo vloženo míchadlo a navážka 3,75 g NaCl. Vialka byla naplněna 14 ml destilované vody, do níž se pomocí mikropipety přidával stanovený objem směsného pracovního roztoku II. Kalibrační křivky jsou přehledně uvedeny v kapitole 4.5.

Tabulka 16: Kalibrační řady jednotlivých standardů

Název analytu	Koncentrace [ng.ml ⁻¹]					
2-cyklohexylethanol	2,5	5	10	15	20	25
Fresco Menthe	0,1	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5
Citronellol	0,1	1	1,5	2,0	2,5	3,0
Isobornyl acetát	0,1	0,5	1	2,5	5	10

3.3.6 Stanovení analytických parametrů – meze detekce a stanovitelnosti

Mez detekce (Limit of detection LOD) a mez stanovitelnosti (Limit of quantification LOQ) jsou významné analytické parametry důležité především v oblasti stopové analýzy. Pro výpočet těchto metrologických ukazatelů existuje několik způsobů stanovení.

Mez detekce je definována jako nejmenší množství analytu, které může být detekováno, avšak nelze ho spolehlivě kvantifikovat. Mez detekce závisí na poměru signál/šum.

Mez stanovitelnosti je potom nejnižší množství analytu ve vzorku, které lze stanovit jako exaktní hodnotu s předem zadanou nejistotou. Jedná se o takovou koncentraci analytů, která může být stanovena s přijatelným stupněm správnosti a přesnosti. Citlivost (sensitivity) analytické metody se definuje jako podíl změny odezvy měřicího zařízení a odpovídající změny podnětu. Matematicky lze citlivost vyjádřit jako směrnici kalibrační křivky. V separačních metodách se mez detekce zpravidla stanovuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie. Pro stanovení LOD a LOQ potom platí tyto rovnice:

$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m}, \quad (7)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot h_n}{m}, \text{ kde} \quad (8)$$

h_n šum základní linie
 m směrnice kalibrační křivky

Pro výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti byly připraveny kalibrační řady z jednotlivých standardů. Ze získaných kalibračních křivek byly určeny regresní rovnice a příslušné směrnice. Výpočty limitů pro jednotlivé analyty jsou pro danou metodu přehledně uvedeny v tabulce 29 v kapitole 4.5.

3.3.7 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody představuje těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky analýz získanými za podmínek opakovatelnosti. Podmínkami opakovatelnosti se pak rozumí stejný měřicí postup, stejný měřicí systém, stejné místo apod.

Pro vyhodnocení opakovatelnosti bylo provedeno měření záměrně kontaminovaného vzorku destilované vody a vybraného reálného vzorku, do kterého byl rovněž přidán standard. Přidáváno bylo 100 µl směsného pracovního roztoku III o koncentracích uvedených v tabulce č. 13. Každé měření bylo opakováno vždy 5x a následně byla ze získaných údajů vypočtena opakovatelnost, a to jako relativní směrodatná odchylka.

3.3.8 Vzorkování

Vzorky odpadní vody byly odebírány z čistírny odpadních vod situované v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Odběr, který probíhá v pravidelných, přesně stanovených časových intervalech, poskytuje 24 hodinové slévané vzorky jak na přítoku, tak na odtoku. Doba zadržení jsou 2 hodiny.

Vzorky byly odebírány do vzorkovnic z hnědého skla o objemu 0,5 l, opatřených uzávěrem. Odběrové lahve byly předem umyty čistícím postupem prezentovaným v kapitole 3.3.9. Vzorkovnice byly naplněny až po okraj a pevně uzavřeny. Po odběru z ČOV byly

vzorky neprodleně analyzovány v laboratoři. V případě, že nebylo možné provádět analýzu ihned, byly tyto odběrové lahve se vzorky uchovávány při teplotě 4 °C, nejdále však 12 hodin.

3.3.8.1 Specifikace vzorků

- Typ: přítok a odtok odpadní vody z ČOV
- Původ: Čistírna odpadních vod v areálu VFU Brno
- Počet vzorků: 10x přítok a 10x odpovídající odtok
- Datum odběru: 17. dubna 2012 – 26. dubna 2012

3.3.9 Čištění laboratorního skla

Na čistotu skla, které je používáno pro stanovení syntetických vonných látek, je kladen velký důraz. Hlavním cílem tohoto čištění je zabránění kontaminace z vnějšího prostředí. Pro čištění použitého skla není možné užívat detergenty, protože by docházelo ke znečištění vonnými látkami. Pro čištění byl proto navržen speciální postup, který se skládá z několika kroků, které je nutné dodržovat.

Vzorkovnice, vialky a ostatní pomůcky je nejprve nutné opláchnout vodovodní a poté destilovanou vodou. Sklo se nechá uschnout při laboratorní teplotě a následně je naloženo do chromsírové kyseliny na dobu minimálně 24 hodin. Dalším krokem je oplachování skla vodovodní i destilovanou vodou. Sklo je potom sušeno v sušárně při teplotě 200 °C po dobu 2 hodin.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

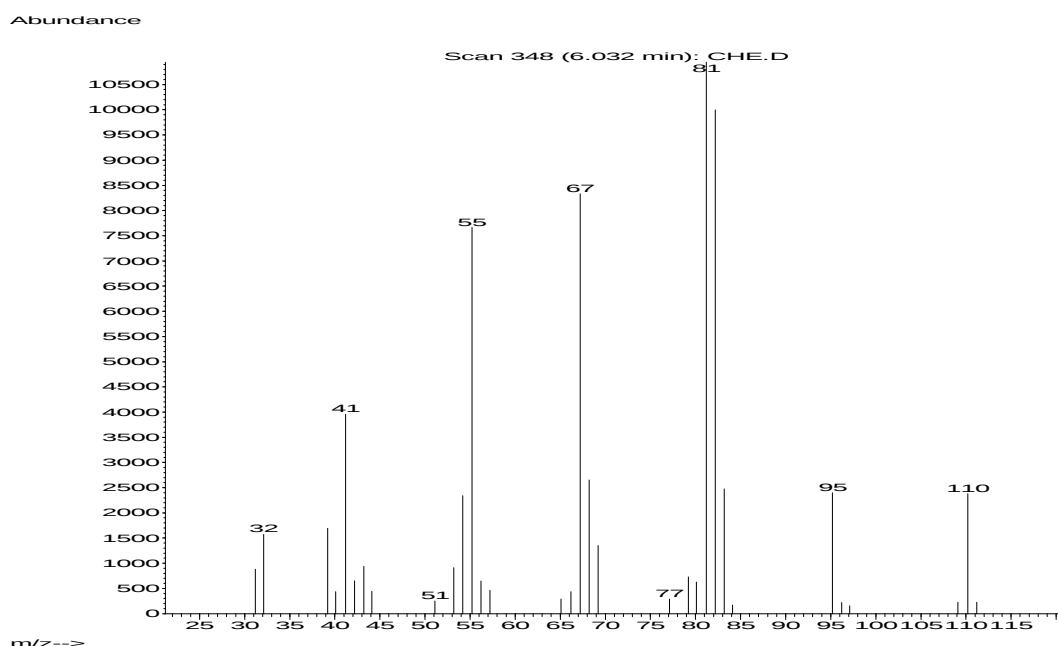
4.1 Zjištění charakteristik analytů (retenční čas, MS spektrum)

U zástupců zkoumaných analytů bylo provedeno měření podle postupu prezentovaného v kapitole 3.3.2. Byla zaznamenána hmotnostní spektra jednotlivých látek a získány příslušné chromatogramy. Z uvedených záznamů vycházejí také odečtené charakteristiky příslušných látek, jakými jsou retenční čas, charakteristický molekulový iont a zástupci významných iontů. Všechny tyto hodnoty jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 17. Syntetická vonná látka nesoucí název Fresco Menthe vytváří dva izomery, které jsou v práci dále uvažovány jako celkový součet.

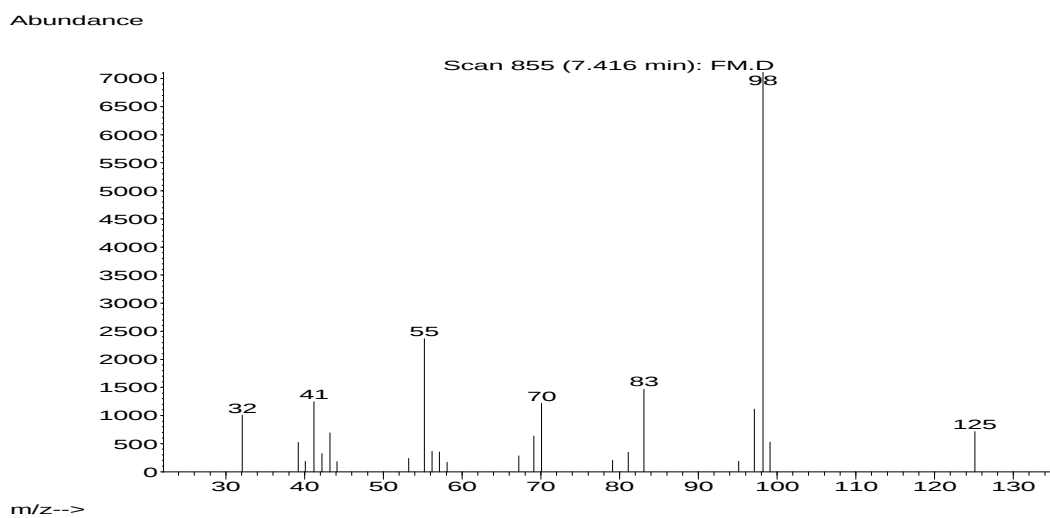
Tabulka 17: Souhrn charakteristik jednotlivých musk sloučenin

Analyt	Rt [min]		Kvantifikační iont [m/z]	Identifikační iont [m/z]
2-cyklohexylethanol	6,032		81	110
Fresco Menthe	7,416	7,446	98	125
Citronellol	7,647		69	123
Isobornyl acetát	8,728		136	121

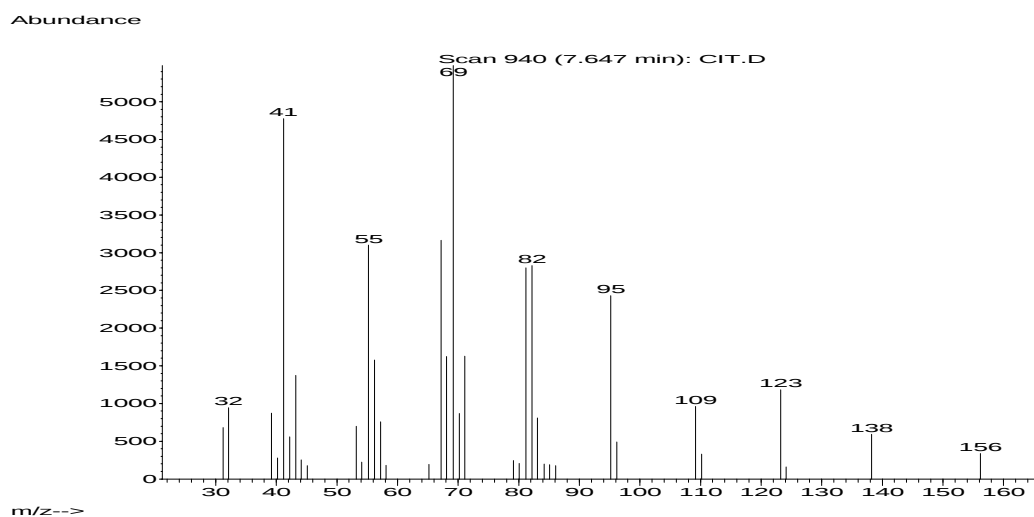
Při měření bylo použito nastavení GC/MS v režimu SCAN, který vyžaduje vyšší koncentrace analytů. Při měření skutečných vzorků je však používán režim SIM, který se vyznačuje vyšší rozlišovací schopností. Výhodou zvoleného režimu je možnost detekce jen zvolených iontů a rozdělení snímaných iontů do skupin (tzv.groups). Retenční časy zde uvedené odpovídají výchozímu zvolenému teplotnímu programu. V souvislosti s optimalizací teplotní rampy dochází k posunu retenčních časů.



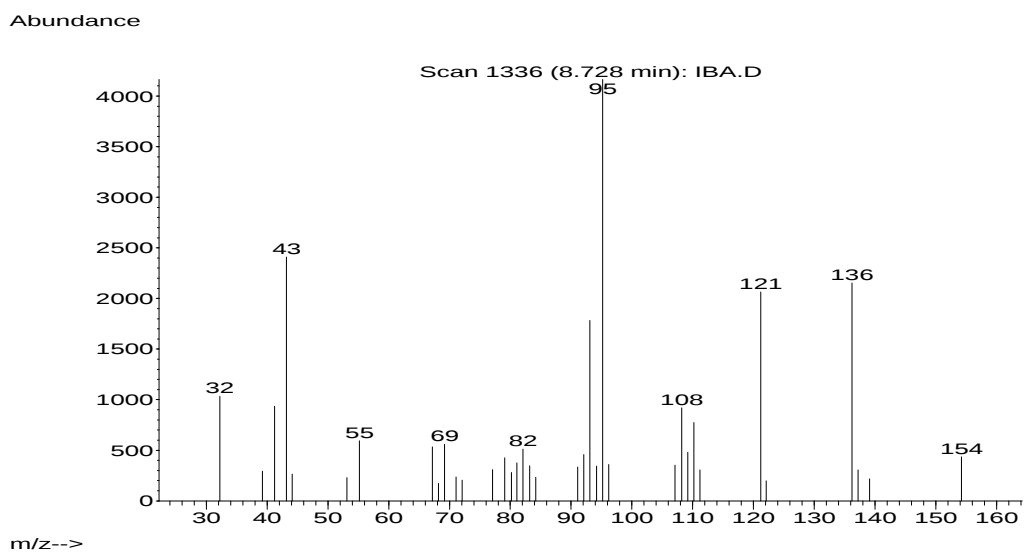
Obrázek 13: Hmotnostní spektrum 2-cyklohexylethanolu



Obrázek 14: Hmotnostní spektrum *Fresco Menthe*



Obrázek 15: Hmotnostní spektrum *Citronellolu*



Obrázek 16: Hmotnostní spektrum *Isobornyl acetátu*

4.2 Optimalizace teplotního programu

Optimalizace teplotního programu byla prováděna podle návodu prezentovaného v kapitole 3.3.3. Jako výchozí bod pro danou optimalizaci byla zvolena teplotní rampa uvedená v literatuře [43]. Kladně lze hodnotit, že byly zřetelně separovány všechny 4 píky sledovaných látek. Celkově však nejsou nastavené parametry ideální, protože píky jsou vykresleny v úzkém intervalu retenčních časů.

V rámci optimalizace byly proto sestaveny nové teplotní programy, které měly za cíl zlepšit rozdělení a rozmístění píků příslušných analytů v daném chromatogramu.

Tabulka 18: *Teplotní program 1*

Teplotní krok [°C / min]	Teplota [°C]	Držení [min]
	50	1
15	110	-
5	165	8
15	280	2
Celkový čas analýzy: 34,00 minut		

Tabulka 19: *Teplotní program 2*

Teplotní krok [°C / min]	Teplota [°C]	Držení [min]
	50	1
10	100	-
5	150	-
20	280	2
Celkový čas analýzy: 24,50 minut		

Tabulka 20: *Teplotní program 3*

Teplotní krok [°C / min]	Teplota [°C]	Držení [min]
	50	1
5	80	-
10	120	2
20	280	2
Celkový čas analýzy: 23,00 minut		

Tabulka 21: *Teplotní program 4*

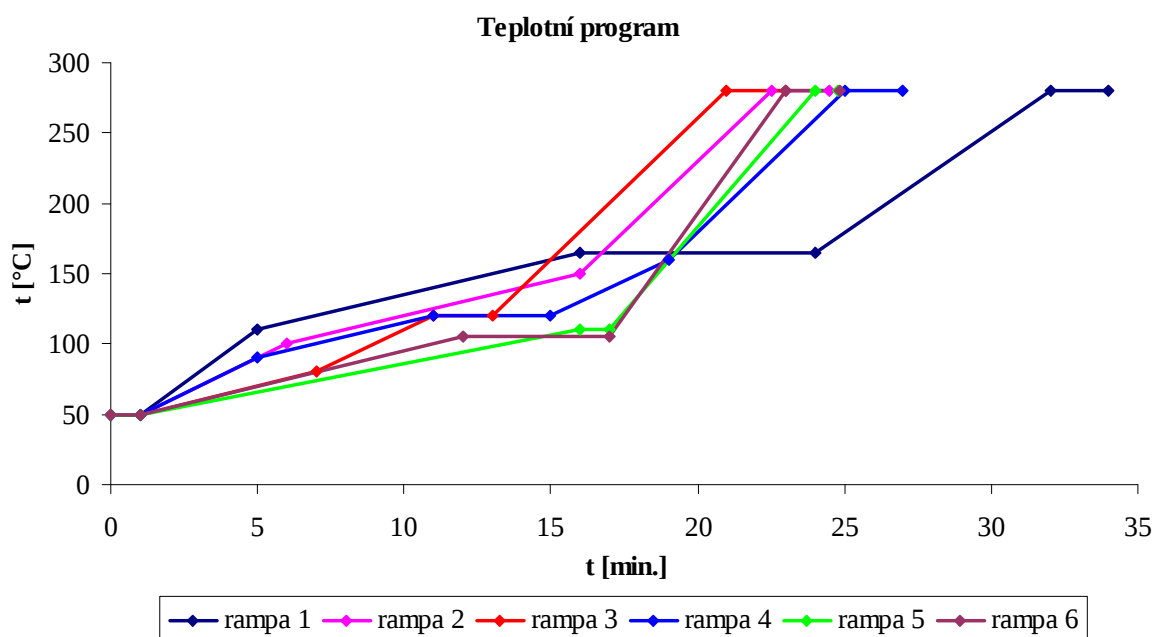
Teplotní krok [°C / min]	Teplota [°C]	Držení [min]
	50	1
10	90	-
5	120	4
10	160	-
20	280	2
Celkový čas analýzy: 27,00 minut		

Tabulka 22: *Teplotní program 5*

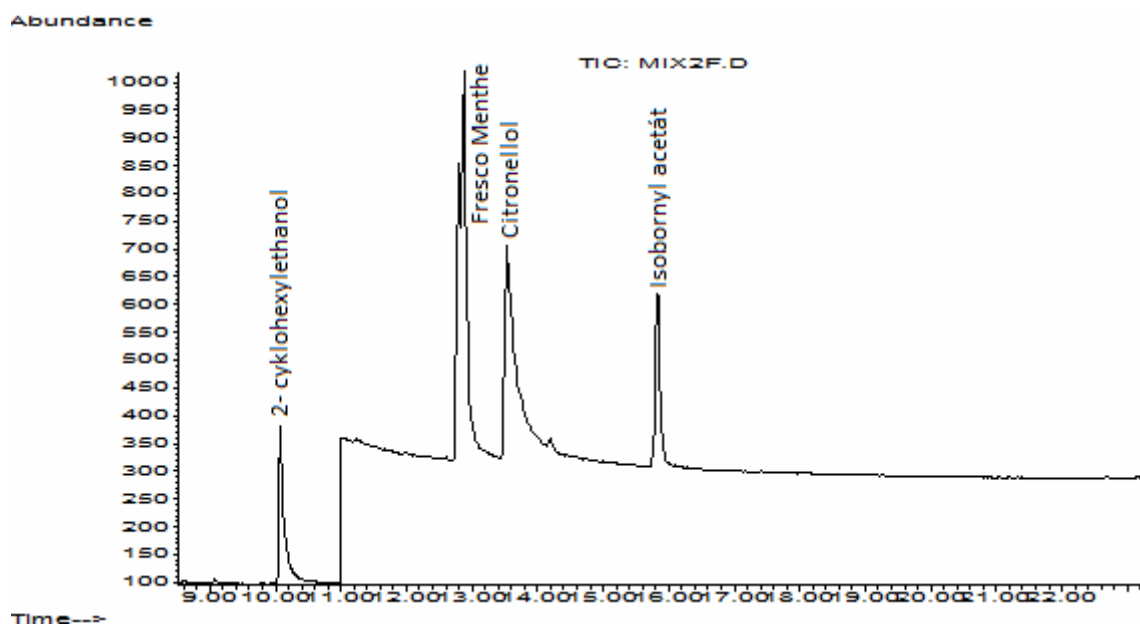
Teplotní krok [°C / min]	Teplota [°C]	Držení [min]
	50	1
4	110	1
25	280	1
Celkový čas analýzy: 24,80 minut		

Tabulka 23: Teplotní program 6

Teplotní krok [°C / min]	Teplota [°C]	Držení [min]
	50	1
5	105	5
30	280	2
Celkový čas analýzy: 24,83 minut		



Po vyhodnocení jednotlivých chromatogramů při různých teplotních programech byla jako ideální zvolena rampa číslo 6, která poskytovala nejlepší výsledky. Výsledný chromatogram získaný při použití optimalizovaného teplotního programu je znázorněn na obrázku č. 17.



Obrázek 17: Výsledný chromatogram při kapalném nástřiku a teplotní rampě č. 6

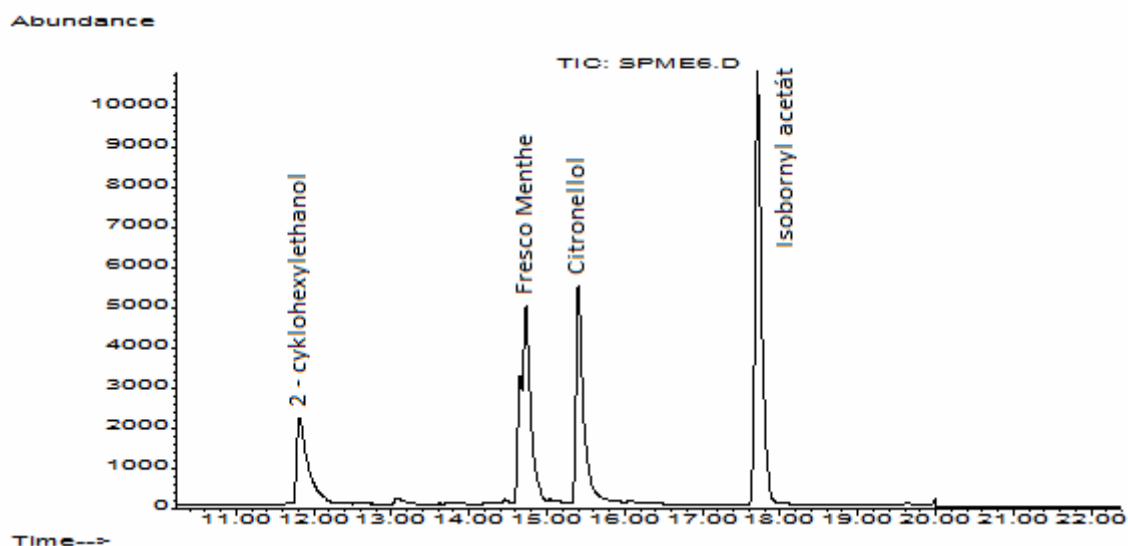
První pík odpovídá 2-cyklohexylethanolu, jehož charakteristické ionty jsou od iontů ostatních analytů odděleny do samostatné skupiny z důvodu odstínění nežádoucích píků. Další sledování zástupci lineárních musk sloučenin následují v uvedeném pořadí: Fresco Menthe, Citronellol a Isobornyl acetát. Společně rovněž vytváří samostatnou skupinu iontů. Svislá křivka v 11. minutě a celkový posun základní linie (base line) je zapříčiněn změnou citlivosti analyzátoru při přechodu mezi uvedenými „groupami“. Příslušné retenční časy (Rt) jsou uvedeny přehledně v tabulce č. 24.

Tabulka 24: Retenční časy pro kapalný nástřik při užití 6.rampy

Analyt	Rt [min]
2-cyklohexylethanol	10,060
Fresco Menthe	12,814
Citronellol	13,524
Isobornyl acetát	15,803

4.3 Optimalizace SPME

Pro optimalizaci SPME byla použita výsledná teplotní rampa z kapitoly 4.2. Ostatní parametry metody vycházejí z nastavení uvedených v kapitole 3.3.4. Z důvodu desorpce analytů ze stacionární fáze vlákna SPME bylo nezbytné opravit délku držení teploty 50 °C na počátku teplotního programu. Původní doba trvání se prodloužila na 3 minuty, což se projevilo v navýšení celkové doby analýzy o 2 minuty.



Obrázek 18: Chromatogram standardů při teplotní rampě č. 6

Tabulka 25: Retenční časy pro SPME při užití 6.rampy

Analyt	Rt [min]
2-cyklohexylethanol	11,713
Fresco Menthe	14,746
Citronellol	15,465
Isobornyl acetát	17,736

4.3.1 Aktivace vláken

Před zahájením optimalizace SPME bylo zatřebí provést aktivaci PEG a PDMS vláken, protože doposud nebyla pro extrakci použita. Aktivace spočívá v zasunutí příslušného vlákna do inletu plynového chromatografu, který je vyhříván na danou teplotu. Zde setrvá po dobu uvedenou v tabulce.

Tabulka 26: Přehled testovaných vláken a jejich parametrů

Vlákno	Tloušťka	Ph	Maximální teplota [°C]	Doporučená pracovní teplota [°C]	Teplota aktivace [°C]	Délka aktivace [hod]
PDMS (červené)	100 um	2-10	280	200-280	250	0,5
DVB/car/PDMS (šedé)	50/30 um	2-11	270	230-270	270	1
PDMS/DVB (modré)	65 um	2-11	270	200-270	250	0,5
Polyacrylate (bílé)	85 um	2-11	320	220-300	280	1
PEG (fialové)	60 um	2-9	250	200-250	240	0,5

4.3.2 Výběr vlákna

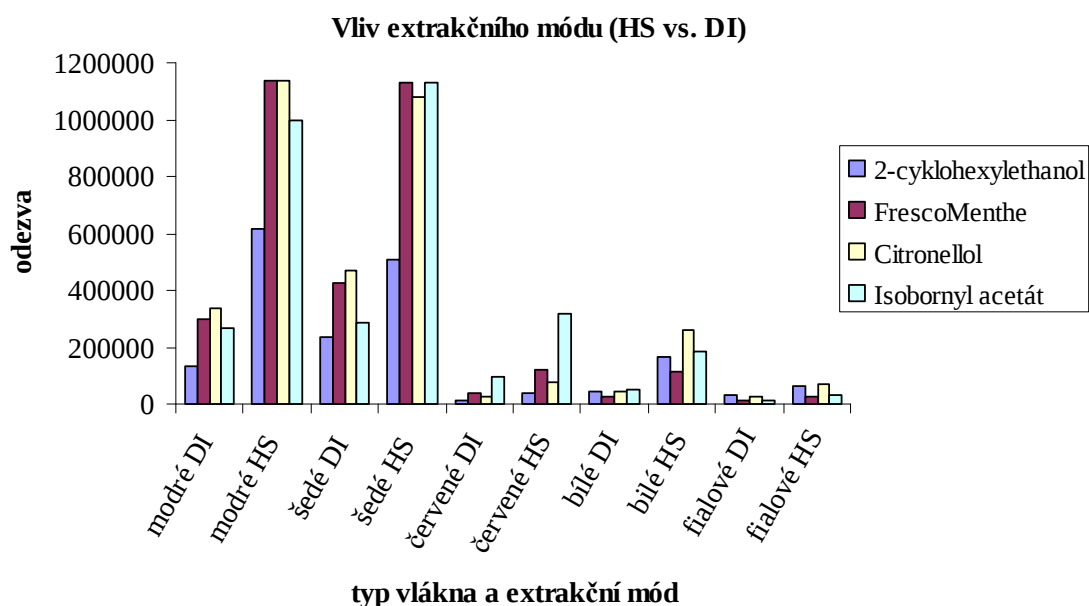
V rámci optimalizace metody bylo testováno 5 dostupných typů vláken vhodných pro spojení s plynovou chromatografií. Každé vlákno se liší složením své stacionární fáze. Níže jsou uvedena jednotlivá používaná vlákna v sestupném pořadí podle zjištěné účinnosti:

- Polydimethylsiloxan / divinylbenzen (PDMS/DVB) – 65 μm (modré)
- Divinylbenzen/ Carboex/Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS) – 50/30 μm (šedé)
- Polydimethylsiloxan (PDMS) – 100 μm (červené)
- Polyakrylát (PA) – 85 μm (bílé)
- Polyethylenglykol (PEG) – 60 μm (fialové)

Nejlepších výsledků v extrakčním módu head-space i direct immersing bylo dosaženo u vlákna PDMS/DVB – 65 μm ; velmi podobně vycházely rovněž výsledky u vlákna DVB/CAR/PDMS – 50/30 μm . Ostatní tři vlákna poskytovala ve srovnání s ostatními výrazně nižší odezvy.

4.3.3 Mód extrakce

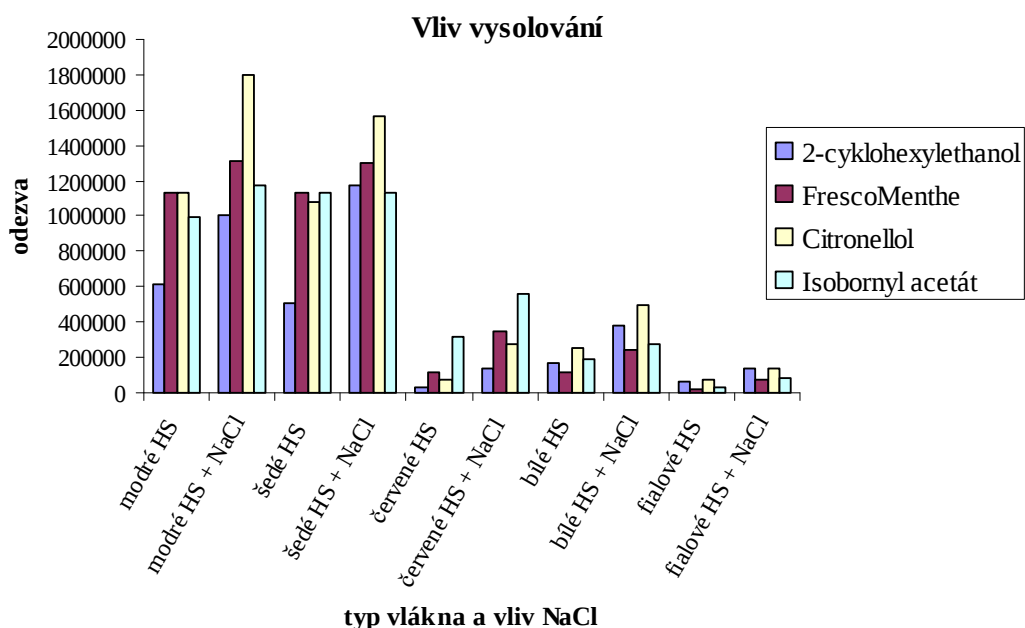
Sorpce analytu je možné provádět při přímém ponoření vlákna (DI – direct immersing) nebo ve volném prostoru nad hladinou (HS – head space). Optimalizace a výběr vhodnějšího módu probíhal po proměření všech vláken v obou výše uvedených provedeních. Na základě získaných dat byl sestaven graf číslo 2, který znázorňuje dosažení lepších výsledků při zvolení head-space analýzy oproti direct immersing u všech typů vláken. Sorpce v prostoru nad hladinou roztoku také pozitivně přispívá k prodloužení životnosti vlákna v porovnání se sorpcí v roztoku, kdy je vlákno se stacionární fází přímo ponořeno do vzorku.



Graf 2: Optimalizace extrakčního módu

4.3.4 Vysolování

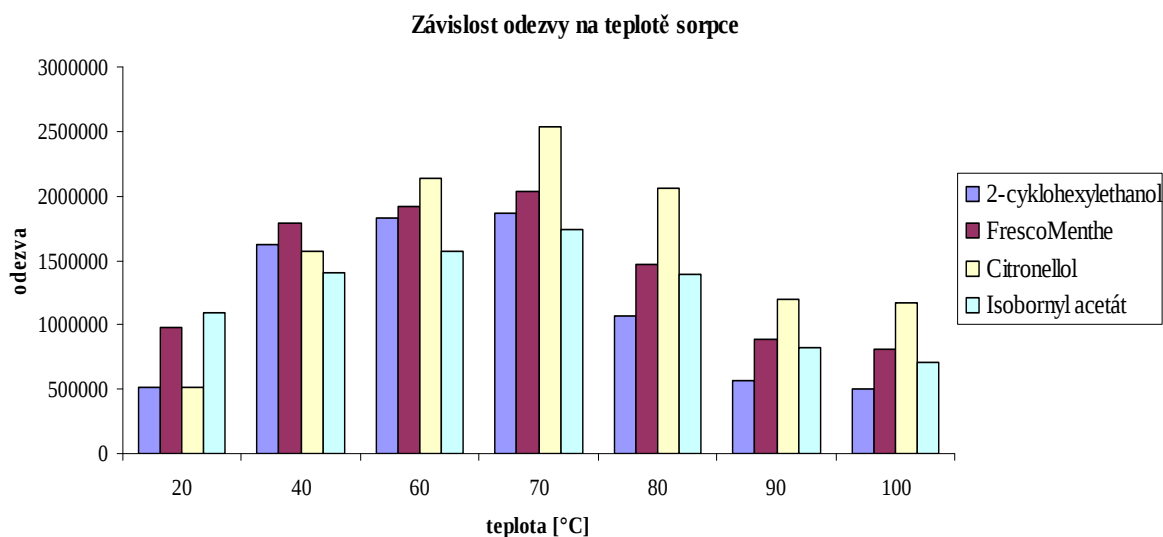
Jak již bylo řečeno, zvýšení iontové síly roztoku může pozitivně přispívat k růstu účinnosti extrakce jednotlivých analytů, především polárních a těkavých látek. U všech dostupných vláken bylo prováděno head-space měření bez přídavku a s přídavkem soli. Potřebná vypočtená navážka NaCl představovala 3,75 g, což je optimální množství, které se beze zbytku rozpouští v připravovaném objemu 14 ml roztoku. Z grafu číslo 3 vyplývá, že přídavek chloridu sodného u všech vláken vyvolal vyšší účinnost extrakce. Přídavek soli zapříčiňuje však také pokles rozpustnosti analytu a nárůst jeho koncentrace v head-space prostoru, kde je sorbován.



Graf 3: Optimalizace přídavku soli do vzorku

4.3.5 Teplota sorpce

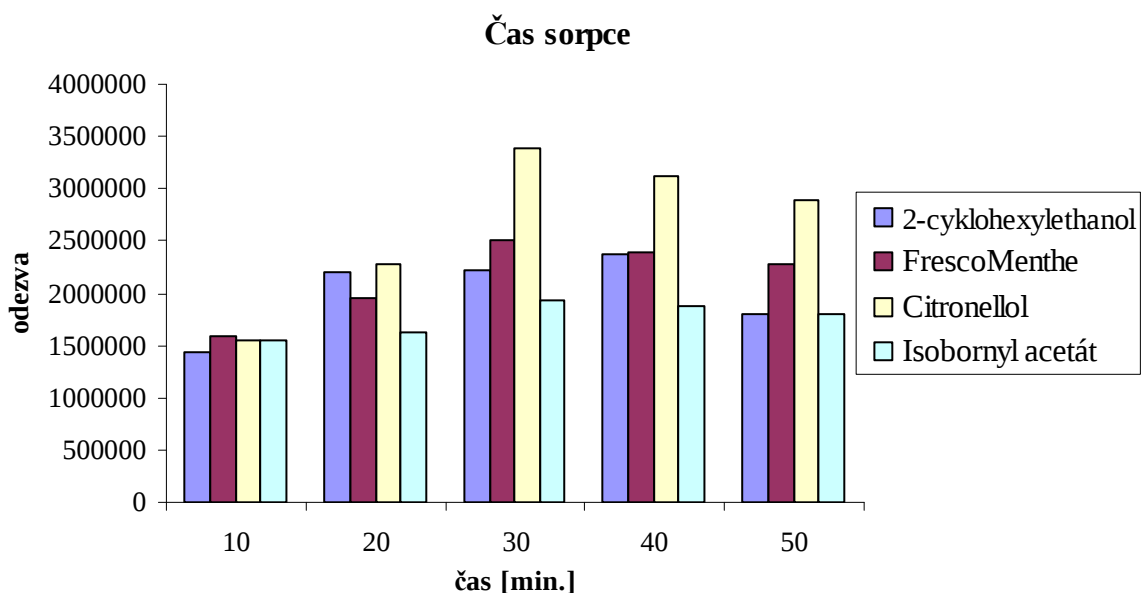
Při vyhodnocení optimální teploty pro sorpci analytů bylo prováděno měření v teplotní řadě 20 °C, 40 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C a 100 °C. Jak je patrné z grafu číslo 4, se zvyšující se teplotou vzrůstá také odezva jednotlivých analytů až do 70 °C, kdy je dosaženo prakticky maximální míry sorpce. V dalších třech teplotních bodech již dochází opětovně k poklesu odezvy. Tento jev může být pravděpodobně způsoben únikem analytu při vysokém tlaku par přes septum, a to v místě vpichu jehly. Při teplotách 90 °C a 100 °C také dochází k značnému odpařování vodní lázně, ve které je vialka s analytem umístěna, a narušuje se tak přítomná rovnováha.



Graf 4: Optimalizace teploty sorpce

4.3.6 Čas sorpce

Doba ustanovení rovnováhy mezi vláknem a složkami vzorku je posledním významným parametrem optimalizace metody SPME. Byla navržena časová řada 10, 20, 30, 40 a 50 minut. Z grafu číslo 5 je patrné, že se vzrůstajícím časem rovněž rostou odezvy jednotlivých analytů až do 30 minut, kdy se stav prakticky ustálí. Pouze u citronellolu nastává v posledních dvou časech nepatrný pokles odezev. Jako optimální čas sorpce byla proto vybrána doba 30 minut.



Graf 5: Optimalizace času sorpce

4.3.7 Optimalizovaná metoda SPME

Výsledné parametry optimalizované metody SPME, používané pro další měření, jsou:

- Typ vlákna: 65 μm PDMS/DVB
- Provedení: head-space
- Vliv vysolování: přídavek 3,75 g NaCl
- Teplota: 70 $^{\circ}\text{C}$
- Doba ustálení rovnováhy: 5 minut
- Doba expozice vlákna: 30 minut
- Objem vialky: 22 ml
- Objem vzorku: 14 ml
- Rychlost míchání: 900 ot./min.

4.4 GC/MS analýza

Pro analýzu GC/MS ve spojení se SPME byly použity níže uvedené parametry s optimalizovanou teplotní rampou:

- Kolona: DB-5MS (20 m x 180 μm x 0,18 μm)
- Nosný plyn: He 6.0
- Injektor: splitless
- Teplota injektoru: 250 $^{\circ}\text{C}$
- Tlak nosného plynu v injektoru: 116 kPa
- Průtok nosného plynu v injektoru: 28,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- Průtok nosného plynu kolonou: 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
- Lineární rychlost nosného plynu: 40 cm/sec
- Nastavení: konstantní průtok
- Teplota transferu GC-MS: 285 $^{\circ}\text{C}$
- Teplota iontového zdroje: 230 $^{\circ}\text{C}$
- Teplota kvadrupolu: 150 $^{\circ}\text{C}$
- Doba analýzy: 26,83 minut
- Režim: SIM

Tabulka 27: Teplotní program pro analýzu SPME – GC/MS

Teplotní krok [$^{\circ}\text{C}$ / min]	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Držení [min]
	50	3
5	105	5
30	280	2

Tabulka 28: Výsledné charakteristiky analytů pro analýzu SPME – GC/MS

Analyt	Rt [min]		Kvantifikační iont [m/z]	Identifikační iont [m/z]
2-cyklohexylethanol	11,809		81	110
Fresco Menthe	14,625	14,711	98	125
Citronellol	15,386		69	123
Isobornyl Acetát	17,722		136	121

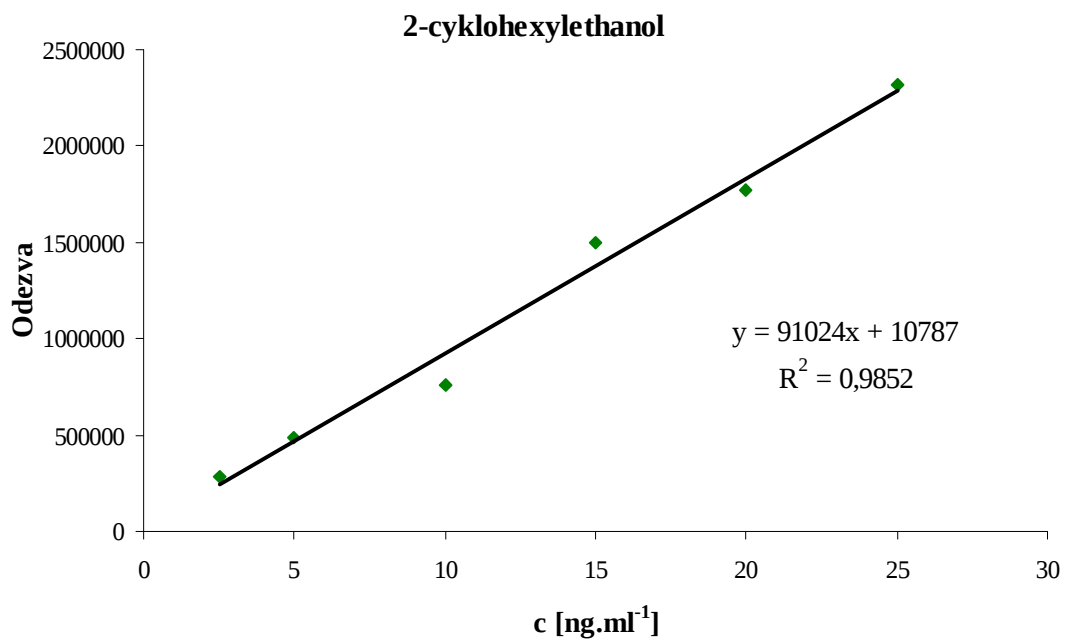
4.5 Stanovení analytických parametrů – LOD a LOQ

Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti vychází z metody popsané v kapitole 3.3.6. V tabulce číslo 29 jsou přehledně uvedeny směrnice kalibračních křivek, odečtené hodnoty šumu a vypočítané meze LOD a LOQ. Šum byl stanovován z chromatogramu, který odpovídal koncentraci nejnižšího bodu v příslušné kalibrační křivce. Výpočet analytických parametrů byl proveden dosazením do rovnic uvedených ve stejné kapitole.

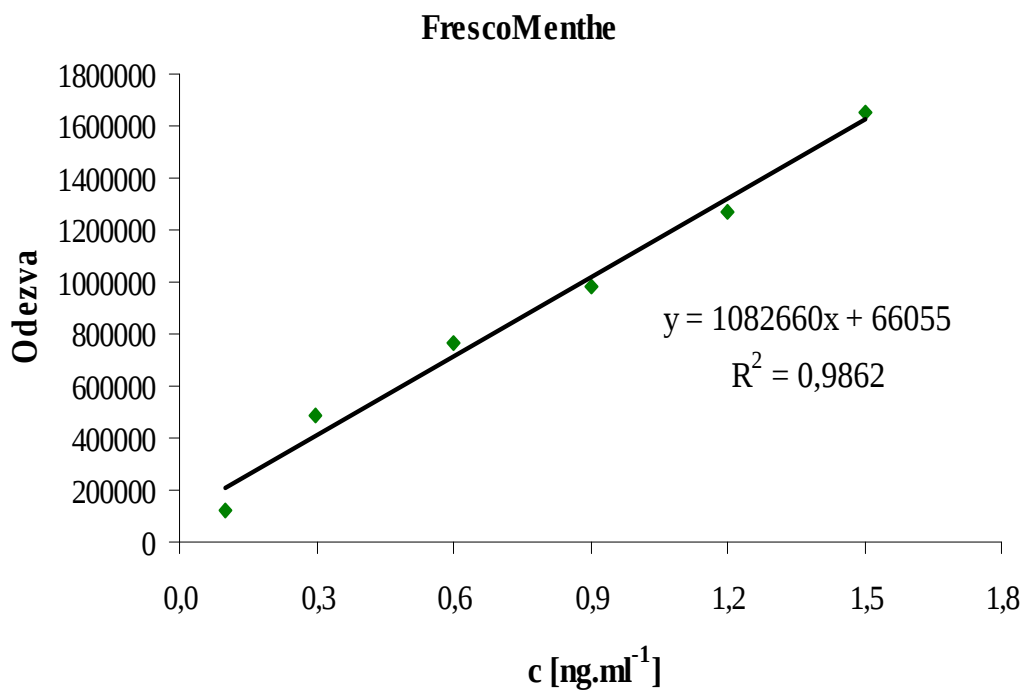
Kalibrační křivky jednotlivých standardů, které vycházejí z tabulky číslo 16 v kapitole 3.3.5.1, jsou uvedeny v grafech 6 až 9.

Tabulka 29: Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

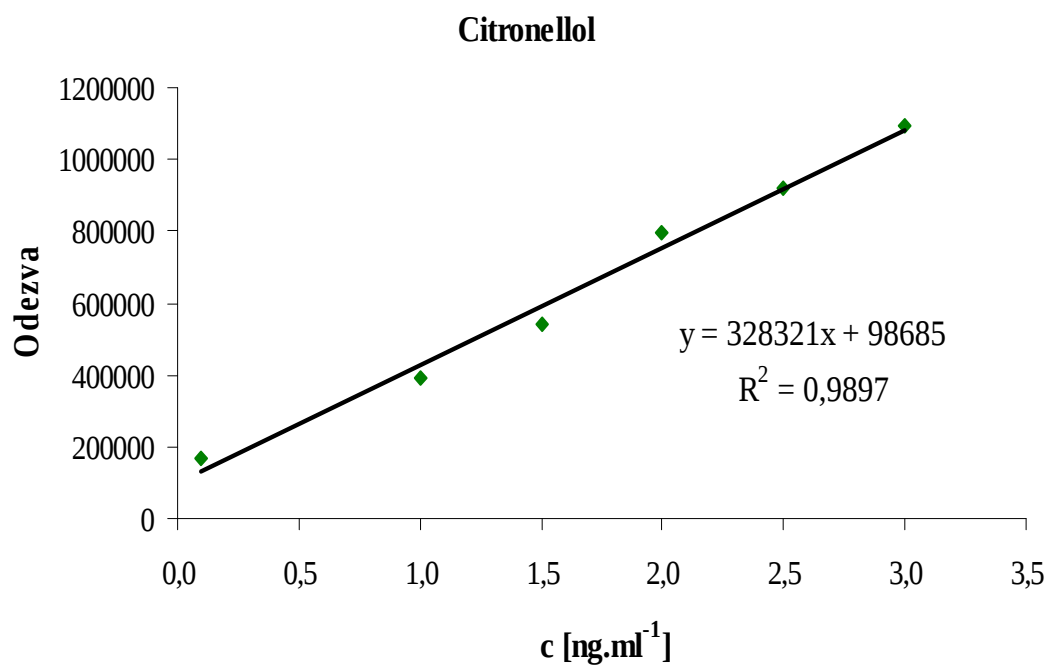
Standard	Směrnice	Šum	LOD [ng.ml ⁻¹]	LOQ [ng.ml ⁻¹]
2-cyklohexylethanol	91024	30	0,0010	0,0033
Fresco Menthe	1082660	20	0,0001	0,0002
Citronellol	328321	200	0,0018	0,0061
Isobornyl Acetát	578840	10	0,0001	0,0002



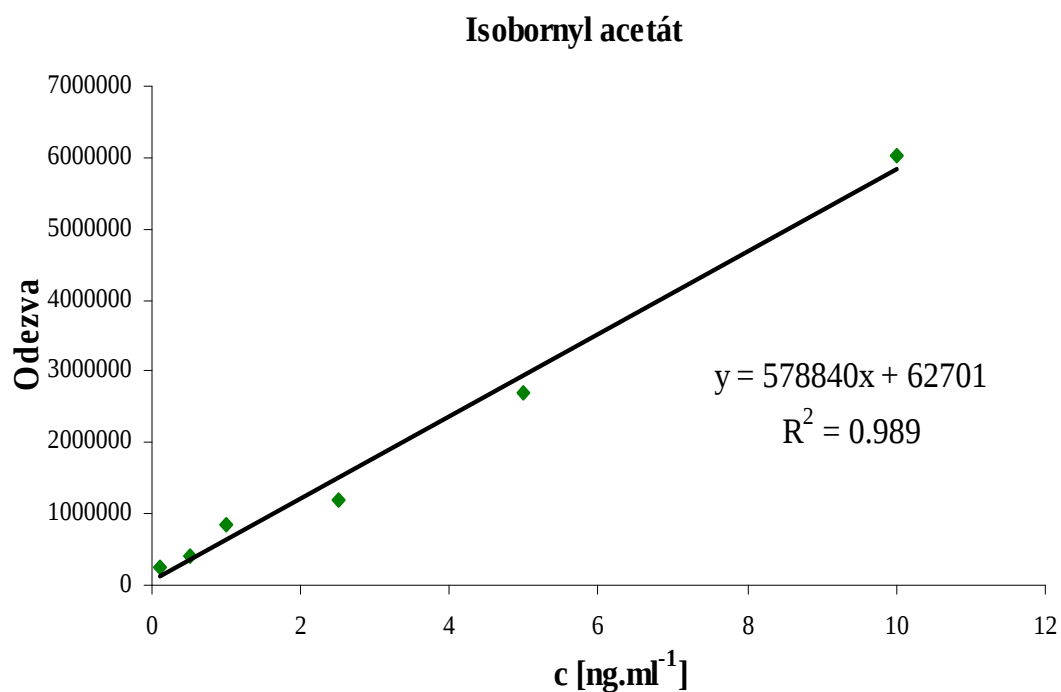
Graf 6: Kalibrační křivka 2- cyklohexylethanolu



Graf 7: Kalibrační křivka Fresco Menthe



Graf 8: Kalibrační křivka Citronellolu



Graf 9: Kalibrační křivka Isobornyl acetátu

4.6 Nejistoty analytických výsledků

Každý výsledek analytického měření dané metody by měl být doprovázen údajem označovaným jako nejistota měření. V průběhu měřicího procesu se mohou vyskytnout rozmanité vlivy, které se podílejí na odchylce mezi naměřenou a skutečnou hodnotou sledované látky. Nejistota výsledku měření představuje interval, ve kterém se nachází s deklarovanou mírou pravděpodobnosti skutečný výsledek měření. Nejistota demonstruje metrologickou kvalitu výsledků měření, zlepšuje porozumění analytickému procesu a umožňuje porovnávat výsledky měření [54].

Chyby lze podle působení rozdělit na systematické, náhodné a hrubé. Systematické chyby mají neustále stejnou příčinu, tj. například chyba metody, chyba měřicího zařízení apod. Tato chyba se projevuje soustavným nárůstem nebo poklesem měřené hodnoty.

Náhodné chyby vznikají, jak už název napovídá, zcela náhodně. Jejich příčina je neznámá a nejeví žádné známky pravidelnosti. Vyznačují se tendencí vzájemné kompenzace. Jejich vliv nelze odstranit, popsat je lze prostřednictvím statistických metod.

Hrubé chyby vznikají v důsledku omylů při provádění analýz, dále při poškození přístroje, nepozorností apod. Naměřené hodnoty, zatížené hrubými chybami, je nutné ze souboru vyloučit [55].

4.6.1 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost, jeden z významných analytických parametrů metody, byla stanovena podle kapitoly 3.3.7 jako relativní směrodatná odchylka. Pro její určení byl použit modelově připravený vzorek destilované vody s přidavkem standardu a vzorek reálný pocházející z přítoku ČOV ze dne 17. 4. 2012. Každý vzorek byl opakovaně 5x proměřen a následně byla určena RSD.

Tabulka 30: *Opakovatelnost měření jako relativní směrodatná odchylka*

Standard	RSD [%] pro dest. vodu se standardem	RSD [%] pro reálný vzorek
2-cyklohexylethanol	13,61	8,58
Fresco Menthe	6,90	6,84
Citronellol	10,92	7,49
Isobornyl acetát	3,98	5,79

Opakovatelnost použité analytické metody byla vyjádřena prostřednictvím relativní směrodatné odchylky. U modelového vzorku, získaného z destilované vody s přidavkem standardu, se RSD pohybuje v intervalu 3,98 – 13,61 %, u reálného vzorku 5,79 – 8,58 %.

4.7 Vyhodnocení reálných vzorků odpadní vody

Reálné vzorky odpadní vody pocházely z čistírny odpadních vod situované v areálu VFU Brno. Tyto vody byly odebírány jak na přítoku, tak také na odtoku, přičemž doba zadržení je podle technologických parametrů 2 hodiny. V reálných vzorcích byly, a to optimalizovanou metodou SPME prezentovanou v kapitole 4.3.7, extrahovány všechny hodnocené analyty, tj. 2-cyklohexylethanol, Fresco Menthe, Citronellol a Isobornyl acetát. Následně probíhala jejich detekce na plynovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem podle optimalizovaného nastavení, které je uvedeno v kapitole 4.4. Pro kvantifikaci posloužila metoda standardního přídatku.

Tabulka 31: Zjištěná množství sledovaných analytů ve vzorcích odpadní vody na přítoku a odtoku z ČOV v areálu VFU Brno

	2-cyklohexylethanol c [ng.ml ⁻¹]		Fresco Menthe c [ng.ml ⁻¹]		Citronellol c [ng.ml ⁻¹]		Isobornyl acetát c [ng.ml ⁻¹]	
	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok
17.04.2012	ND	ND	0,024	ND	5,314	0,019	0,166	ND
18.04.2012	ND	ND	0,086	ND	12,828	0,514	0,609	ND
19.04.2012	ND	ND	ND	ND	24,934	1,347	3,540	0,025
20.04.2012	ND	ND	2,087	0,052	1,270	0,092	0,207	0,016
21.04.2012	ND	ND	0,035	0,014	1,093	0,370	0,127	0,010
22.04.2012	ND	ND	1,068	0,041	3,840	0,397	0,375	0,060
23.04.2012	ND	ND	0,315	0,032	11,454	0,173	1,089	0,005
24.04.2012	ND	ND	0,911	0,015	6,869	0,739	2,419	0,007
25.04.2012	ND	ND	0,711	0,098	9,364	1,158	1,678	0,021
26.04.2012	ND	ND	2,159	0,012	9,420	0,182	0,847	0,005

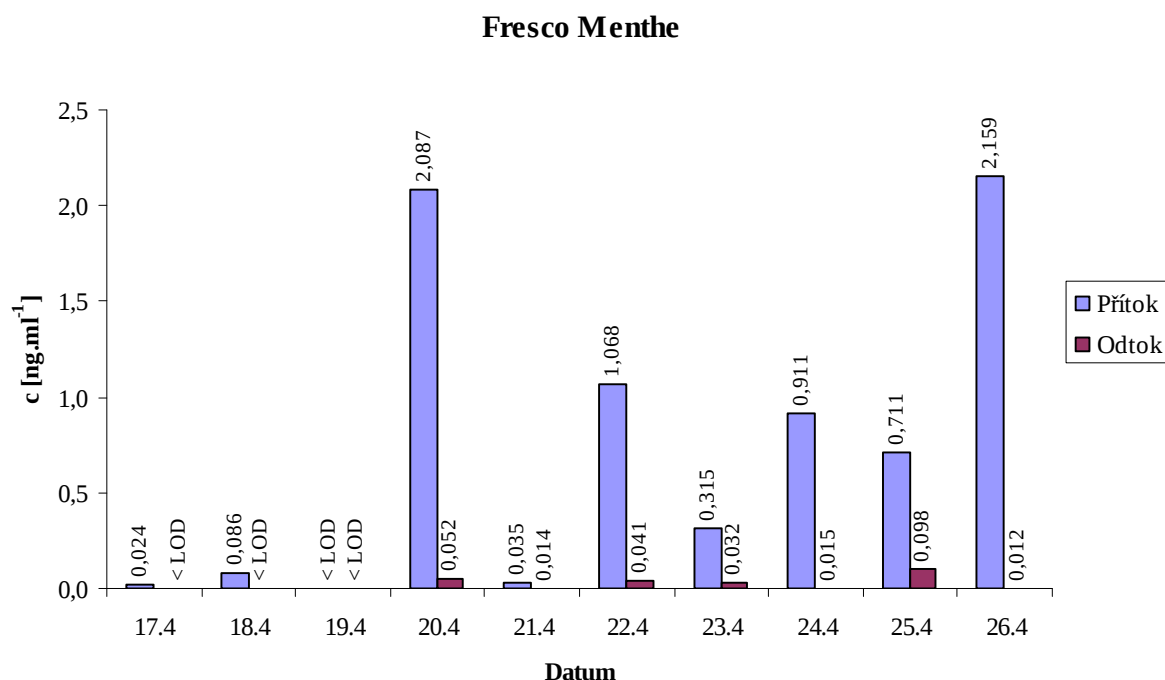
ND – nedetekováno (pod mezí detekce)

Z tabulky 31 je patrné, že na přítoku na ČOV byl po dobu desetidenního vzorkování vždy detekován Citronellol a Isobornyl acetát. S výjimkou odběru prováděného 19. 04. 2012 byl také přítomen Fresco Menthe, avšak 2-cyklohexylethanol nebyl na přítoku detekován již popsanou optimalizovanou metodou SPME.

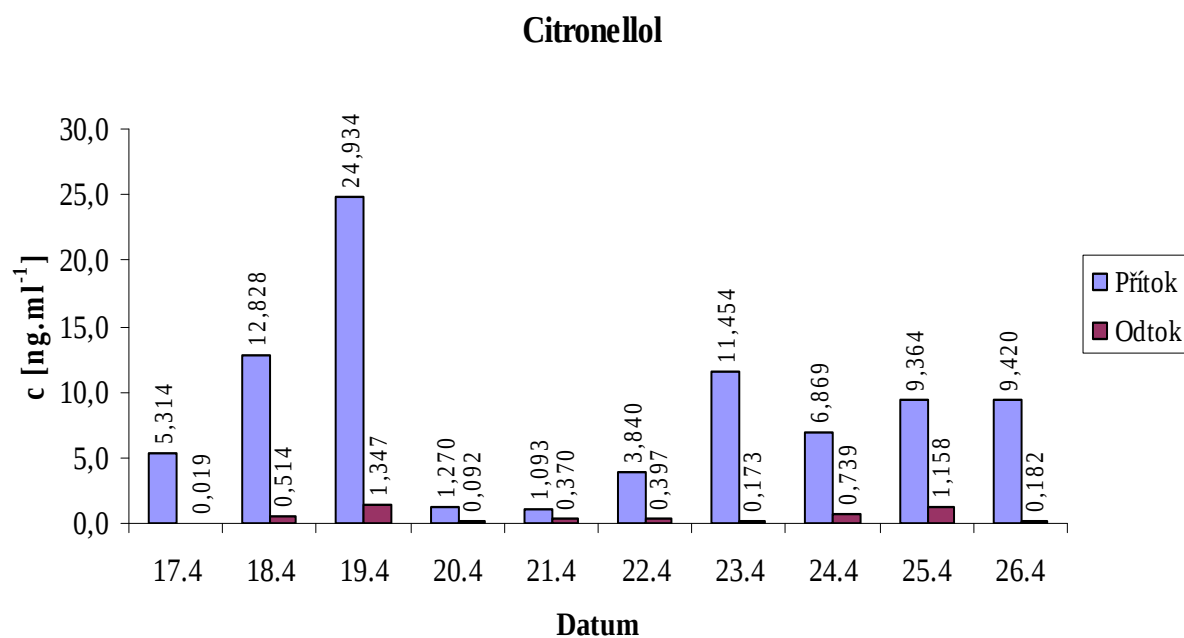
Nejvyšších koncentrací dosahoval po celou dobu vzorkování Citronellol, kde byla zjištěna hodnota absolutního maxima (19. 04. 2012), které představovalo 24,934 ng.ml⁻¹. Koncentrace Isobornyl acetátu a Fresco Menthe vykazovaly v průběhu desetidenního měření proměnlivé hodnoty.

Na odtoku byl ve všech vzorcích odpadní vody kvantifikován Citronellol, naopak i v tomto případě nebyl 2-cyklohexylethanol detekován v žádném vzorku. Zbývající analyty poskytovaly rozdílné koncentrace.

Koncentrace jednotlivých analytů na přítoku i odtoku ČOV v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně jsou přehledně zpracovány do grafů č. 10 až 12.

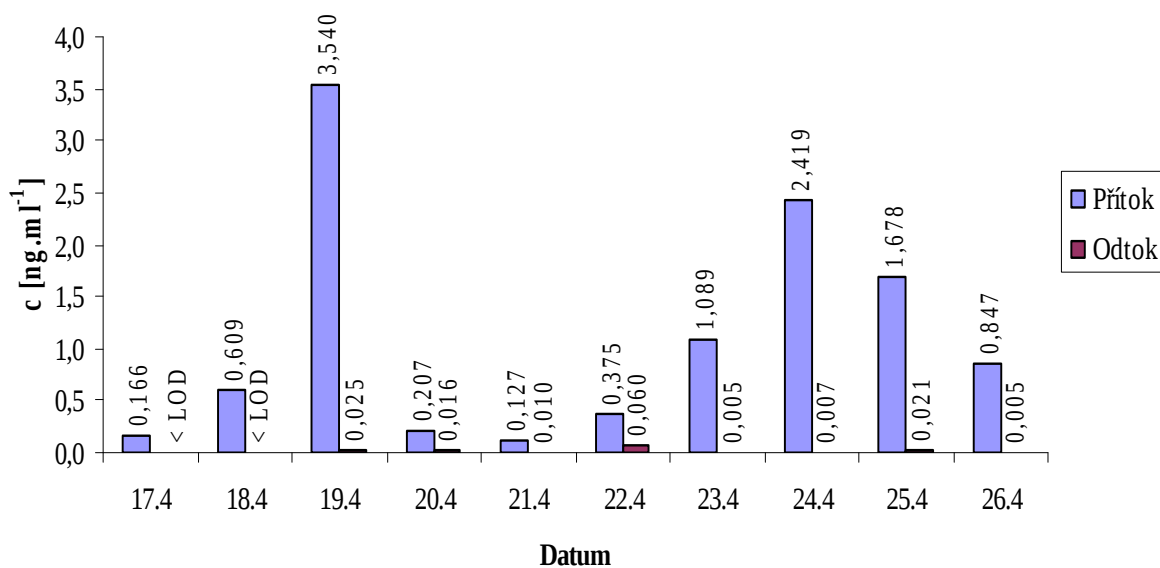


Graf 10: Koncentrace *Fresco Menthe* na přítoku a odtoku z ČOV



Graf 11: Koncentrace *Citronellolu* na přítoku a odtoku z ČOV

Isobornyl acetát



Graf 12: Koncentrace Isobornyl acetátu na přítoku a odtoku z ČOV

Tabulka 32: průměrné hodnoty naměřených koncentrací lineárních musk sloučenin

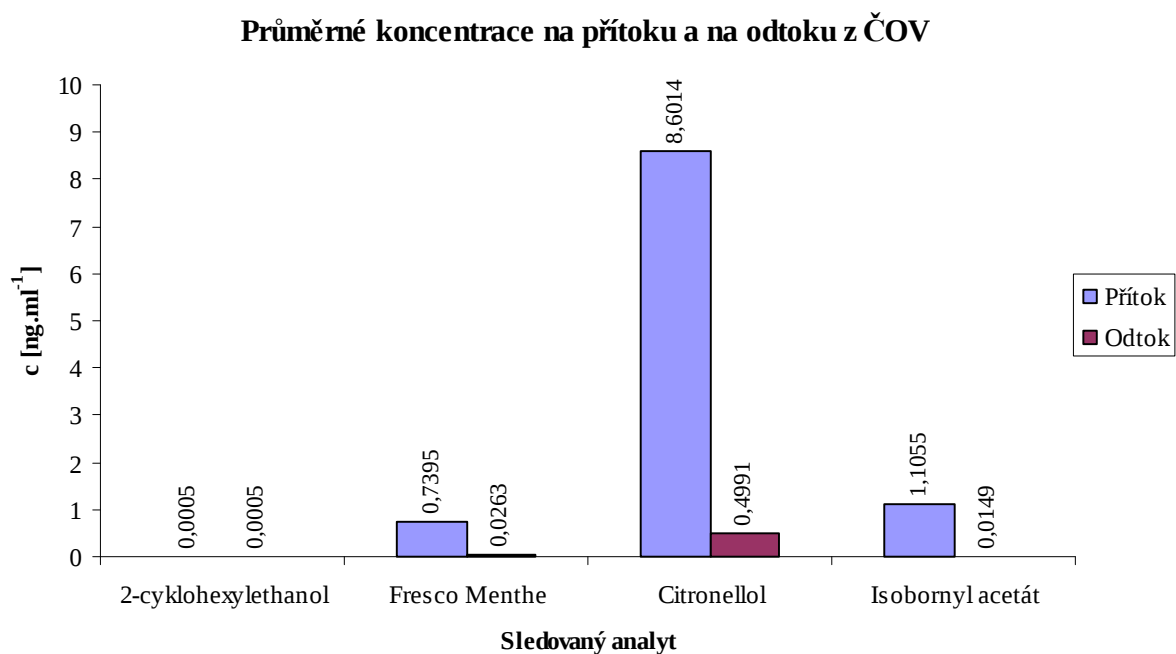
Analyt		$c_{\text{prum.}} [\text{ng.ml}^{-1}]$	$c_{\text{min}} [\text{ng.ml}^{-1}]$	$c_{\text{max}} [\text{ng.ml}^{-1}]$
2-cyklohexylethanol	Přítok	0,0005	ND	ND
	Odtok	0,0005	ND	ND
Fresco Menthe	Přítok	0,7395	ND	2,159
	Odtok	0,0263	ND	0,098
Citronellol	Přítok	8,6014	1,093	24,934
	Odtok	0,4991	0,019	1,347
Isobornyl acetát	Přítok	1,1055	0,127	3,540
	Odtok	0,0149	ND	0,060

Ve výpočtu průměrné koncentrace byly za ND doplněny následující údaje:

$$ND = 0,5 \cdot LOD \quad (9)$$

Pokud by se pro výpočet použila hodnota NQ (nekvantifikováno) výpočet by teoreticky probíhal dle vzorce:

$$NQ = \frac{LOQ - LOD}{2} + LOD \quad (10)$$



Graf 13: Průměrné koncentrace sledovaných analytů na přítoku a odtoku z ČOV

4.7.1 Účinnost čistícího procesu

Na základě naměřených údajů je možné vyhodnotit účinnost odstranění sledovaných zástupců lineárních musk sloučenin čistícím procesem prováděným na ČOV v areálu VFU v Brně. Výsledky jsou přehledně zpracovány do tabulky č. 33.

Tabulka 33: Účinnost čistícího procesu na ČOV v areálu VFU Brno

	Fresco Menthe	Citronellol	Isobornyl acetát
	Odstranění [%]	Odstranění [%]	Odstranění [%]
17.04.2012	> 99,50	99,65	> 99,50
18.04.2012	> 99,50	95,99	> 99,50
19.04.2012	----	94,60	99,30
20.04.2012	97,51	92,79	92,16
21.04.2012	60,17	66,10	92,38
22.04.2012	96,19	89,66	84,10
23.04.2012	89,95	98,44	99,58
24.04.2012	98,32	89,25	99,70
25.04.2012	86,26	87,63	98,73
26.04.2012	99,46	98,07	99,39
Průměr	91,87	91,22	96,43

Protože 2-cyklohexylethanol nebyl detekován na přítoku ani odtoku z čistírny odpadních vod, nelze proto vyhodnotit účinnost odstranění tohoto analytu. Nejvíce byl z odpadní vody eliminován Isobornyl acetát (96,43 %) a Fresco Menthe (91,87 %). Pro Citronellol dosahuje účinnost použitého čistícího procesu průměrné hodnoty 91,22 %.

5. ZÁVĚR

V předložené diplomové práci byla řešena aktuální problematika stanovení jedné skupiny syntetických vonných látek v odpadní vodě. Byly to čtyři zástupce ze skupiny lineárních musk sloučenin (2-cyklohexylethanol, Fresco Menhte, Citronellol a Isobornyl acetát), které byly zjišťovány v odpadní vodě odebrané z přítoku a odtoku čistírny odpadních vod situované v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně.

Teoretická část práce poskytuje ucelený přehled o syntetických vonných látkách. Popsáno je rozdělení do jednotlivých skupin, včetně jejich typických zástupců. Nechybí rovněž základní údaje o fyzikálně-chemických vlastnostech a osudu látek v jednotlivých složkách životního prostředí. Součástí teoretického úvodu je také kapitola pojednávající o procesu čištění odpadních vod, a to jak biologicko-chemickou cestou, tak také moderním řešením pomocí kořenových čistíren, aplikovaným v místech s menším osídlením.

V experimentální části byla nejprve řešena optimalizace celé analytické metody, kterou byly následně vybrané látky analyzovány; poté následovalo jejich vlastní stanovení v reálných vzorcích odpadních vod. Pro izolaci sledovaných látek z odpadní vody byla použita metoda SPME, pro identifikaci a kvantifikaci potom plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS).

Získané výsledky jsou přehledně shrnuty do následujících bodů:

- Byla provedena optimalizace teplotního programu metody GC/MS, která zajistila vhodnou separaci všech sledovaných analytů.
- V rámci experimentální části práce proběhla optimalizace podmínek metody mikroextrakce na tuhou fázi, tzv. SPME. Bylo optimalizováno několik parametrů, tj. typ vlákna, způsob provedení – HS a DI, teplota, délka sorpce a vliv přídavku soli do odpadní vody.
- V reálných vzorcích odpadních vod byly v rámci desetidenního vzorkování stanovovány čtyři zástupci ze skupiny lineárních musk sloučenin. Extrakce analytů probíhala optimalizovanou metodou SPME, analytickou koncovku potom představovala tandemová technika GC/MS s optimalizovanou teplotní rampou.
- Opakovatelnost použité analytické metody byla stanovena jako relativní směrodatná odchylka (RSD). Hodnoty pro vzorek destilované vody s přídavkem standardu se pohybovaly v intervalu 3,98 – 13,61 %, pro vybraný vzorek odpadní vody pocházející z přítoku odebraného dne 17. 4. 2012, se interval vyskytoval v rozmezí 5,79 – 8,58 %.
- Na přítoku do objektu ČOV byly stanoveny tři ze čtyř sledovaných analytů, 2-cyklohexylethanol nebyl v žádném ze vzorku odpadní vody detekován. U lineární musk sloučeniny s názvem Fresco Menthe byla vypočtena průměrná koncentrace $0,7395 \text{ ng.ml}^{-1}$, přičemž maximum představuje hodnotu $2,159 \text{ ng.ml}^{-1}$ a minimum bylo pod mezí detekce. Průměrná koncentrace Citronellolu byla $8,6014 \text{ ng.ml}^{-1}$, když rozpětí kvantifikovaných hodnot bylo v intervalu $1,093 - 24,934 \text{ ng.ml}^{-1}$. Isobornyl acetát měl na přítoku průměrnou koncentraci $1,1055 \text{ ng.ml}^{-1}$, přičemž rozpětí jeho individuálních koncentrací bylo $0,127 - 3,540 \text{ ng.ml}^{-1}$.
- Na odtoku z ČOV nebyl detekován 2-cyklohexylethanol, nejvyšší koncentrace dosahoval Citronellol, s průměrnou koncentrací $0,4991 \text{ ng.ml}^{-1}$. U ostatních hodnocených musk sloučenin byly naměřené hodnoty nižší. Průměrná koncentrace další lineární musk sloučeniny, tj. Isobornyl acetátu byla na odtoku $0,0149 \text{ ng. ml}^{-1}$.

U další posuzované syntetické vonné látky, Fresco Menthe, byla vypočtena nejnižší průměrná koncentrace ze všech zástupců sledovaných lineárních musk sloučenin, a to 0,0263 ng.ml⁻¹.

- Ze získaných dat byla vyhodnocena účinnost čistícího procesu vybraných zástupců lineárních musk sloučenin, které byly detekovány na čistírně odpadních vod, situované v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně. Fresco Menthe je z odpadní vody eliminováno v rozmezí 60,17 – 99,50 %, což průměrně představuje 91,87 % účinnost. Účinnost odstranění Citronellolu byla vypočtena v rozmezí 66,10 – 99,65 %, v průměru se ho tak podaří odstranit cca 91,22 %. Nejvíce se z odpadní vody podařilo eliminovat Isobornyl acetát, s intervalem odstranění 84,10 – 99,70 %, v rámci jednotlivých odběrů; v průměru byl tento analyt z vody odstraněn s účinností 96,43 %.

Lineární musk sloučeniny jsou poměrně novou skupinou syntetických vonných látek, které se stále častěji vyskytují v prostředcích osobní hygieny a domácí péče, a to zejména proto, že jsou české provenience. Snahou výrobců těchto chemických sloučenin je kromě jiného také účinná náhrada skupiny nitromusk a polycyklických musk sloučenin, u kterých byl v minulosti prokázán škodlivý účinek na lidských organismus.

Byla potvrzená vysoká míra účinnosti odstranění lineárních zástupců musk sloučenin z odpadní vody prostřednictvím čistícího procesu realizovaného ve sledované ČOV, čímž se potvrdila předpokládaná míra biodegradability, v porovnání s ostatními skupinami musk sloučenin. V souvislosti s tím se předpokládá, že lineární musk sloučeniny budou stále více nahrazovat zástupce problematických nitromusk a polycyklických musk sloučenin.

I přes shromážděné údaje zůstává skupina lineárních musk sloučenin z vědeckého hlediska skupinou dosud málo probádanou, a proto je nutné pokračovat i nadále ve výzkumu vlastností jednotlivých zástupců této skupiny. Historie již pamatuje na mnoho případů, kdy chemické látky, které nebyly dostatečně prozkoumány a byly přitom považovány za neškodné pro životní prostředí i pro člověka, způsobily rozsáhlé škody na vegetaci i na živých organismech.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KELLER, Werner. *Etruskové*. Hošek Radislav. Praha: Orbis, 1975, 392 s. Stopy, fakta, svědectví. 605-22-857.
- [2] ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2003, 797 s. ISBN 80-718-3268-5.
- [3] ZOUHAR, L. *Syntetické vonné látky ve vodní biotě*. (Diplomová práce, vedoucí práce prof. RNDr. M. Vávrová, CSc.) Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 95 s.
- [4] MAGEROVÁ, Hana, LACZÓ, Jan, VYHNÁLEK, Martin, HROT, Jakub a BOJAR, Martin. Vyšetření čichu a jeho význam pro diagnostiku neurodegenerativních onemocnění. *Neurologie pro praxi*. 2008, roč. 2008, č. 1, s. 32-34. ISSN 1803-5280. Dostupné z: <http://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-200801-0008.php>
- [5] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. přepr. a dopl. Praha: Grada Publishing, 771 s. ISBN 80-247-0512-5.
- [6] Nose anatomy. In: *eDoctor online.com* [online]. 2011 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <http://www.edoctoronline.com/medical-atlas.asp?c=4&id=21657>
- [7] *Encyklopedie Larousse pro mládež*. 1. vyd. Editor Jacques Lory. Praha: Albatros, c1994. ISBN 80-000-0022-9.
- [8] GROH, Vladimír a HEJZLAR, Gabriel. *Život v antickém Římě*. Vydání první. Praha: Statní pedagogické nakladatelství, Praha 1, 1967, 256 s. ISBN 17-405-87.
- [9] Historie parfémů. *Parfemista* [online]. 2008 [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: <http://www.parfemista.cz/historie-parfemu.htm>
- [10] JAKEŠOVÁ, Romana. Využití aromaterapie u osob s tělesným postižením [online]. 2006 [cit. 2012-02-07]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta. Vedoucí práce Dagmar Opatřilová. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/104299/pedf_b/.
- [11] Chanel No. 5. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Chanel_No._5
- [12] Svět Dermacol. *Dermacol - péče o pleť, tělo a dekorativní kosmetika* [online]. © 2011 [cit. 2012-04-01]. Dostupné z: <http://www.dermacol.cz/svet-dermacol>
- [13] ČERVENÝ, Libor. Syntetické vonné a chuťové látky. In: *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 1999, s. 412-420. ISSN 0009-2770.
- [14] *Aroma* [online]. 2010 [cit. 2012-04-03]. Výrobní skupina Aroco s.r.o. + Aroma a.s. Dostupné z: <http://www.aroma.cz/index.php?dokument=16>

- [15] Oficiální přednášky z předmětu: *Environmentální analýza* (VUT, FCH, 2011). Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/elearning/>
- [16] Parfémy a kolínské vody - parfumerie. *Ekonomikon.cz* [online]. 03. 03. 2011 [cit. 2012-04-01]. Dostupné z: <http://www.ekonomikon.cz/zbozi/drogerie/parfemy>
- [17] Rostlinné vonné látky. *Tech-info* [online]. 16.01.2010 [cit. 2012-04-01]. Dostupné z: <http://www.tech-info.cz/parfumerie/roslinne-latky.html>
- [18] *Malá československá encyklopedie*. Praha: Academia, 1984.
- [19] GURYČOVÁ, H. *Syntetické vonné látky ve vodním ekosystému*. (Diplomová práce, vedoucí práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.) Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 89 s.
- [20] ROWE, David. J. *Chemistry and technology of flavors and fragrances*. Oxford: Blackwell, 2005. ISBN 08-493-2372-X.
- [21] GEYER, H. J. ET. AL. *Bioaccumulation New Aspects and Developments: The handbook of environmental chemistry*. Bernd Beek. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2000, 284 s. ISBN 3-540-62575-5.
- [22] SOMMER, Cornelia. The Role of Musk and Musk Compounds in the Fragrance Industry. In: *The handbook of environmental chemistry*. USA: Springer, 2004, s. 1-16. Vol. 3, Part X. ISSN 1867-979X. DOI: 10.1007/b14130.
- [23] SALVITO, Daniel. Synthetic Musk Compounds and Effects on Human Health?. In: *Environmental Health Perspectives*. USA: U.S. National Institute of Environmental Health Sciences, December 2005, s. 3-4.
- [24] 2-cyklohexylethanol. In: *Merck Millipore* [online]. Darmstadt (Německo), 2012 [cit. 2012-05-01]. Dostupné z: http://www.merckmillipore.com/czech-republic/2-cyklohexylethanol/MDA_CHEM-818556/p_4gqb.s1LsdUAAAEWfOefVhTl
- [25] Citronellol. In: *Merck Millipore* [online]. Darmstadt (Německo), 2012 [cit. 2012-05-01]. Dostupné z: http://www.merckmillipore.com/czech-republic/chemicals/citronellol/MDA_CHEM-818554/p_AZWb.s1LsdCAAfOefVhTl
- [26] Fresco Menthe. In: *Chemical Book* [online]. USA, 2010 [cit. 2012-05-01]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5349890.htm
- [27] Isobornyl acetát. In: *Merck Millipore* [online]. Darmstadt (Německo), 2012 [cit. 2012-05-01]. Dostupné z: http://www.merckmillipore.com/czech-republic/chemicals/isobornylacetat/MDA_CHEM-814998/p_mzSb.s1Lc8AAAAEWiEfVhTl
- [28] BRÄNDLI, Rachel. *The Fate of Polycyclic Musks in a Waste Water Treatment Plan: Part I: Water*. Zürich, 2002. Diplomová práce. ETH Zurich.

- [29] SHI, Yali, ZHANG, Shenxiao, NIU, Hongyun a CAI, Yaqi. Assessment of Synthetic Musk Fragrances in Seven Wastewater Treatment Plants of Beijing, China. In: *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. USA: Springer 2011 [cit. 2012-04-06]. Dostupné z: url <http://rd.springer.com/article/10.1007/s00128-011-0215-1#page-1>
- [30] DOHÁNYOS, Michal, KOLLER, Jan a STRNADOVÁ, Nina. *Čištění odpadních vod*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2007, 177 s. ISBN 978-80-7080-619-7.
- [31] BINDZAR, Jan a KOLEKTIV, *Základy úpravy a čištění vod*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009. ISBN 978-807-0807-293.
- [32] ČOV Brno - Modřice. *Brněnské vodárny a kanalizace: akciová společnost* [online]. 2012 [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: <http://www.bvk.cz/o-spolecnosti/odvadeni-a-cistení-odpadnich-vod/cov-brno-modrice/>
- [33] Kořenová čistírna odpadních vod. In: *Enviwiki* [online]. 03. května 2010 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: http://www.enviwiki.cz/wiki/Kořenová_čistírna_odpadních_vod
- [34] Nevhodnost kořenových čistíren pro čištění odpadních vod v obcích. KAŠPAR, Jan. *Ekomonitor* [online]. 16. 03. 2009 [cit. 2012-04-01]. Dostupné z: <http://www.ekomonitor.cz/publikace/clanky/nevhodnost-korenovych-cistiren-pro-cistení-odpadnich-vod-v-obcích>
- [35] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 4. aktualiz. vyd. Praha: VŠCHT, 2009, 579 s. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [36] HAJŠLOVA, J., KOCOUREK, V., VOLKA, K., SUCHÁNEK, M., BOHM, S., SKÁCEL, F., TOMANIOVÁ, M., RADOVÁ, Z., HOLADOVÁ, K., POUSTKA, J., ŠETKOVÁ, L., SUCHAN, P.: Přehled aktivit realizovaných v rámci projektu MŽP "Monitoring cizorodých látek v potravních řetězcích v ČR", výstupy vybraných pilotních studií. In *Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách a ekosystémech: Sborník příspěvků ze XIV. semináře s mezinárodní účastí, Praha 12.-14. září 2001*. Praha: Ústav chemie a analýzy potravin VŠCHT, Česká společnost chemická, 2001, s. 12-33. ISBN 80-7080-472-6.
- [37] PETERS, Ruud J. B. *Netherlands Organization for Applied Scientific Research*. Amsterdam: Greenpeace Nederland, 2003, 39 s.
- [38] *Hazardous Substances Series: Musk xylene and other musks*. Norsko: OSPAR Commission, 2004, 45 s. ISBN 1-904426-36-0.
- [39] LIGNELL, Sanna, DARNER, Ola Peter, AUNE, Marie, CNATTINGIUS, Sven, HAJŠLOVÁ, Jana, ŠETKOVÁ, Lucie a GLYNN, Anders. Temporal Trends of Synthetic Musk Compounds in Mother's Milk and Associations with Personal Use of Perfumed Products. In: PORTEOUS, Andrew. *Environmental science and technology*. Washington: American Chemical Society, 2008, s. 1-6. ISSN 0013-936X.

- [40] REINER, Jessica L., WONG, Chung M., ARRCARO, Kathleen. F. a KANNAN, Kurunthachalm. Synthetic Musk Fragrances in Human Milk from the United States. In: *Environmental science and technology*. Washington: American Chemical Society, 2007, s. 3815-3820.
- [41] HORÁK, Josef, LINHART, Igor a KLUSON, Petr. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2004, 188 s. ISBN 80-708-0548-X.
- [42] Risk Evaluation of Dietary and Dermal Exposure to Musk Fragrances. In: SLANINA, Přemysl. *The Handbook of Environmental Chemistry*. USA: SpringerLink, 2004, s. 281-310. DOI: 10.1007/b14124.
- [43] TYLICOVÁ, P. *Syntetické vonné látky v odpadních vodách*. (Diplomová práce, vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc). Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 88 s.
- [44] GATERMANN, Robert, HÜHNERFUSS, Heinrich, RIMKUS, Gerhard, ATTAR, A. a KETTRU, A. Occurrence of musk xylene and musk ketone metabolites in the aquatic environment. *Chemosphere* [online]. New York: Pergamon Press, 1998, roč. 1998, Vol. 36, Issue 11 [cit. 2012-04-12]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653597102089>
- [45] BLAHOVÁ, E. Stanovení vybraných "Musk" sloučenin v biotických vzorcích. (Diplomová práce, vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc). Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 72 s.
- [46] *Lambda Life a. s.* [online]. [cit. 2012-04-04]. Příprava vzorků – SPME. Dostupné z: <http://www.lambda.sk/pdf/metodiky/SPME.pdf>
- [47] Mikroextrakce tuhou fází (SPME): teorie a optimalizace podmínek. In: *Sigma - Aldrich* [online]. Sigma-Aldrich Co., 2011 [cit. 2012-04-09]. Dostupné z: www.sigmaaldrich.com/img/assets/15720/11.pdf
- [48] ŠTEFKA, M. *Využití chemie v kriminalistickém expertizním zkoumání*. (Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta aplikované informatiky, vedoucí práce PhDr. Mgr. Stanislav Zelinka). Zlín, 2011. 59 s.
- [49] CHURÁČEK, J. a kol. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1990. 384 s. ISBN 80-03-00569-8.
- [50] Oficiální přednášky z předmětu: *Instrumentální a strukturní analýza* (VUT, FCH, 2011). Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/elearning/>
- [51] HAVLÍČEK, Vladimír. Mezinárodní konference o hmotnostní spektrometrii. In: *Věda.cz: Průvodce informacemi o vědě a výzkumu* [online]. 25. 08. 2006 [cit. 2012-04-04]. Dostupné z: <http://www.veda.cz/article.do?articleId=13256>
- [52] Oficiální přednášky z předmětu: *Hmotnostní spektrometrie* (VUT, FCH, 2012). Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/elearning/>

- [53] HOLČAPEK, M. Hmotnostní spektrometrie v organické analýze. In: *Michal Holčapek: Mass Spectrometry Group* [online]. 2012 [cit. 2012-04-04]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>
- [54] SUCHÁNEK, M., FRIEDECKÝ, B., KRATOCHVÍLA, J., BUDINA, M. a BARTOŠ, V. Klinická biochemie a metabolismus. *Doporučení pro určení odhadů nejistot výsledků měření/klinických testů v klinických laboratořích* [online]. Pardubice: STAPRO s. r. o, 2006, roč. 2006, č. 1, s. 43-53 [cit. 2012-04-26]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/kbm/kbm-2006-14-1-43-53.pdf>
- [55] BABUŠ, O. *Problematika produktů osobní péče ve složkách životního prostředí*. (Diplomová práce, vedoucí práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc). Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 80 s.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ADBI	celestolid
AHDI	phantolid
AHTN	tonalid
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
ATI	traseolid
CI	chemická ionizace
ČOV	čistírna odpadních vod
ČSN	Česká technická norma
ECD	detektor elektrovaného záchytu
EI	elektronová ionizace
EN	Evropská norma
EO	ekvivalent obyvatel
ESI	elektrosprej
FDA	Food and Drugs Administration, USA
FID	plamenový ionizační detektor
FTICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC	plynový chromatograf
HHCB	galaxolid
IT	iontová past
KČOV	kořenová čistírna odpadních vod
LC	kapalinový chromatograf
LD ₅₀	smrtelná dávka pro 50 % testovaných jedinců
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MK	musk keton
MS	hmotnostní spektrometr
MX	musk xylen
MŽP ČR	Ministerstvo životního prostředí ČR
NERI	Národní výzkumný ústav pro životní prostředí
NL	nerozpuštěné látky

OSPAR	Konvence pro ochranu mořského životního prostředí v severovýchodním Atlantiku
PCBs	polychlorované bifenyly
POPs	perzistentní organické polutanty
PPCPs	farmaka a produkty osobní péče a vody
RSD	relativní směrodatná odchylka
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TCD	tepelně-vodivostní detektor
TNO	Nizozemská organizace pro aplikovaný vědecký výzkum
TOF	analyzátor doby letu
USA	Spojené státy americké
VFU	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

8. SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha I Čistírna odpadních vod v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno
- Příloha II Aparatura pro sorpci analytů na SPME vlákno
- Příloha III Plynový chromatograf Agilent 6890N GC v tandemovém spojení s hmotnostním detektorem MSD 5973N
- Příloha IV Detail SPME držáku při probíhající desorpci analytů z vlákna do GC

9. PŘÍLOHY

Příloha I



Příloha II



Příloha III



Příloha IV

