# 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 MUSK SLOUČENIN V BIOTICKÝCH MATRICÍCH

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS


AUTOR PRÁCE Bc. ALENA SOUKUPOVÁ
AUTHOR



BRNO 2011

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 MUSK SLOUČENIN V BIOTICKÝCH MATRICÍCH

DETERMINATION OF MUSK COMPOUNDS IN BIOTIC MATRICES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS


AUTOR PRÁCE Bc. ALENA SOUKUPOVÁ

AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

SUPERVISOR



BRNO 2011

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

# Zadání diplomové práce

| | | | |
|---|---|---|---|
| Číslo diplomové práce: | **FCH-DIP0537/2010** | Akademický rok: | **2010/2011** |
| Ústav: | Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí | | |
| Student(ka): | **Bc. Alena Soukupová** | | |
| 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: | | | |

## Název diplomové práce:

Stanovení musk sloučenin v biotických matricích

## Zadání diplomové práce:

1. Zpracovat rešerši zaměřenou na vlastnosti vybraných musk sloučenin
2. Zpracovat řešerši zaměřenou na metody jejich stanovení v biotických matricích
3. Provést výběr sledovaných analytů a optimalizovat metodu pro jejich stanovení
4. Pomocí optimalizované metody provést vyšetření reálných vzorků ryb
5. Ryby budou odloveny z řeky Svratky před a za ČOV v Brně - Modřicích
6. Provést zhodnocení získaných výsledků a jejich interpretaci.

## Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

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

| - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - |
|---|---|---|
| Bc. Alena Soukupová<br>Student(ka) | prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.<br>Vedoucí práce | doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.<br>Ředitel ústavu |

V Brně, dne 15.1.2011

- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Diplomová práce vychází ze současné problematiky kontaminace životního prostředí syntetickými vonnými látkami. Musk sloučeniny se z důvodu biologické perzistence a schopnosti kumulace rozšířily do všech složek životního prostředí, především vodních ekosystémů. Tato práce je zaměřena na výběr a optimalizaci metody stanovení umělých musk sloučenin v reálných biotických vzorcích (rybách). Pro izolaci analytu ze vzorku byla použita metoda tlakem podporované extrakce (PSE), přečištění vzorku bylo realizováno metodou sloupcové kolonové chromatografie. Identifikace a kvantifikace jednotlivých musk sloučenin byla provedena pomocí vysokorozlišovací plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Na závěr byla provedena diskuze výsledků a zhodnocení kontaminace ryb z řeky Svratky odlovených na přítoku a odtoku ČOV.



## ABSTRACT

This diploma thesis deals with actual issues of the contamination in the environment with synthetic fragrances. Musk compounds are infiltrated to many environmental components (especially an aquatic ecosystem) because of their biological persistence and the ability of accumulation. This diploma thesis is focused on the selection and the optimization of method for the determination of musk compounds in real biotic matrices (fish). The isolation of analytes was realized by PSE method and the purification of extract was realized by the method of the adsorption column chromatography. Identification and quantification of individual musk compounds was carried out by GC-MS. In conclusion were results and the contamination of fish from the river Svratka disscissed and evaluated. These fish were caught at the inflow and at the outflow of the wastewater treatment plant.



## KLÍČOVÁ SLOVA

Musk sloučeniny, ryby, extrakce podporovaná tlakem, kolonová adsorpční chromatografie, plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

## KEYWORDS

Musk compounds, fish, pressurized solvent extraction, adsorption column chromatography, gas chromatography with mass spectrometry detection

SOUKUPOVÁ, A. Stanovení musk sloučenin v biotických matricích. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 105 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 využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

..............................................

podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat své vedoucí diplomové práce paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za čas věnovaný konzultacím a odbornému dohledu při vypracování této diplomové práce, za cenné rady a připomínky.

Dále bych chtěla poděkovat všem pracovnicím VFU za jejich přístup, pomoc a rady poskytnuté při práci. Velký dík patří především Mgr. Kristýně Kubíčkové z VFU Brno a Ing. Liborovi Zouharovi z FCH VUT v Brně za jejich vstřícnou spolupráci a odbornou pomoc.

Také velice děkuji své rodině, přátelům a známým za podporu při studiu, za jejich trpělivost, pomoc a lásku.

# OBSAH


1 Úvod ........ 7

2 Teoretická část ........ 8

2.1 Čich ........ 8

2.1.1 Orgán čichu ........ 8

2.2 Vůně ........ 9

2.2.1 Vnímání vůní ........ 9

2.2.2 Psychologie vůní ........ 10

2.3 Vonné látky ........ 10

2.3.1 Přírodní vonné látky ........ 11

2.3.2 Syntetické vonné látky ........ 14

2.4 Historie vůní a vonných látek ........ 15

2.4.1 Historie přírodních vůní ........ 15

2.4.2 Historie parfémů ........ 16

2.4.3 Historie umělých vonných látek ........ 16

2.5 Produkce vonných látek ........ 17

2.6 Umělé musk sloučeniny ........ 18

2.6.1 Mošusové látky ........ 18

2.6.2 Charakteristika umělých musk sloučenin ........ 18

2.6.4 Vstup do životního prostředí ........ 20

2.6.5 Výskyt musk sloučenin ve složkách ŽP ........ 21

2.6.6 Osud v životním prostředí ........ 22

2.6.7 Dělení umělých musk sloučenin ........ 24

2.7 Sledovaní zástupci ........ 32

2.8 Analytické stanovení musk sloučenin ........ 36

2.8.1 Opatření proti vnější kontaminaci vzorku ........ 36

2.8.2 Odběr vzorku ........ 37

2.8.3 Transport a uchování vzorku ........ 37

2.8.4 Úprava vzorku ........ 38

2.8.5 Biotická matrice ........ 39

2.8.6 Izolace analytu ze vzorku ........ 39

2.8.7 Přečištění ........ 43

2.8.8 Identifikace a kvantifikace analytu ........ 44

3 Experimentální část ........ 55

3.1 Používané chemikálie a standardy ........ 55

3.1.1 Chemikálie ... 55
3.1.2 Technické plyny ... 55
3.1.3 Standardy ... 55
3.2 Přístroje a zařízení, software ... 56
3.2.1 Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem ... 56
3.2.2 Zrychlená extrakce rozpouštědlem ... 56
3.2.3 Ostatní zařízení ... 56
3.2.4 Software ... 56
3.3 Biotický materiál ... 56
3.3.1 Specifikace ... 56
3.4 Pracovní postupy ... 59
3.4.1 Příprava vzorku ... 60
3.4.2 Extrakce ... 61
3.4.3 Přečištění ... 63
3.4.4 Identifikace a kvantifikace analytů pomocí GC/MS ... 64
3.4.5 Doplňující postupy ... 65
4 Výsledky a diskuze ... 66
4.1 Výběr analytů ... 66
4.2 Optimalizace metody ... 66
4.2.1 Optimalizace izolace analytů ... 66
4.2.2 Optimalizace přečištění vzorku ... 72
4.3 Identifikace a kvantifikace analytů ... 75
4.3.1 Identifikace analytů ... 75
4.3.2 Kalibrace ... 80
4.3.3 Určení meze detekce a stanovitelnosti ... 86
4.4 Obsah musk sloučenin v reálných vzorcích ... 87
4.5.1 Výsledky analýz ryb odlovených před ČOV ... 88
4.5.2 Výsledky analýz ryb odlovených za ČOV ... 90
4.5.4 Porovnání kontaminace vzorků ryb ... 91
4.5.3 Nejistoty a chyby měření ... 94
5 Závěr ... 97
6 Seznam použitých zdrojů ... 99
7 Seznam použitých zkratek a symbolů ... 104

# 1 ÚVOD

Člověk své okolí vnímá pomocí smyslů. Jedním ze základních smyslů člověka je čich. Proces smyslového vnímání je založen na vyhodnocení vnějšího podnětu zachyceného smyslovým orgánem. V případě čichu je tímto podnětem vůně.

Vůně nebo pach je organoleptická vlastnost chemických látek, kterou je člověk schopen registrovat. Zda se jedná o vůni nebo zápach rozhoduje každý člověk individuálně na základě pocitů, které v něm vnímaný vjem vyvolá. Vnímání vůní má prokazatelný vliv na psychiku člověka. S vůněmi jsou spojeny naše nálady, emoce i paměť.

Lidský mozek je schopen zapamatovat si vůni, se kterou se již někdy setkal a při opětovném vystavení této vůni si vybavit pocity, které v něm již dříve vyvolala.

Umění využívat vůni z přírodních materiálů ovládali naši předci již 4000 let před naším letopočtem. Tajemství vůní bylo přijímáno s velkou pokorou a sloužilo především při bohoslužných ceremoniích a tajemných rituálech. Lidé ovládající schopnost získávání vůní z přírodních materiálů byli uctíváni. Vůně byla spojována s bohatstvím a mocí.

Do doby, kdy byla objevena metoda destilace éterických olejů z květů rostlin, byly při výrobě parfémů používány především pryskyřice vzácných stromů, různá koření a výměšky živočichů. Po zdokonalení destilace a extrakce vůní v 17. století došlo k velkému rozmachu používání parfémů především ve Francii. Výroba parfémů byla v této době značně nákladná, vzhledem k nedostupnosti surovin a složitým postupům výroby, a proto byla určena pouze pro vysoce postavenou bohatou společnost.

K rozšíření parfémů přispěl především rozvoj analytické a organické chemie v 18. století. V této době došlo k prvním pokusům o laboratorní syntézu vonných látek, které se vyskytují v přírodě. Tak vznikly přírodně identické vonné látky. V následujících letech byly postupně syntetizovány nové vonné látky, které nemají strukturu shodnou s přírodními látkami, ale vyznačují se silným pižmovým zápachem; proto se rozšířili pod názvem musk sloučeniny.

O masové rozšíření musk sloučenin se zasloužila především jejich finančně a provozně nenáročná syntéza. Musk sloučeniny se začaly přidávat téměř do všech produktů osobní péče, čistících a pracích prostředků, parfémů, osvěžovačů vzduchu apod. Vzhledem k jejich příjemné vůni a schopnostem ovlivňovat lidské myšlení vzrostla spotřeba těchto látek, s čímž souvisí zvýšený průnik musk sloučenin do složek životního prostředí.

Musk sloučeniny pronikají do životního prostředí splachem z odpadních vod nebo přímou expozicí do ovzduší. Vzhledem ke svým chemickým vlastnostem (biologická perzistence a akumulace) se řadí do skupiny POPs (perzistentní organické polutanty). O jejich osudu v životním prostředí a toxicitě mající vliv na organismy se v současnosti ví stále velmi málo. Jejich přítomnost však byla prokázána již ve všech složkách životního prostředí, především ve vodních ekosystémech. Díky svým lipofilním vlastnostem a schopnosti bioakumulace byly tyto látky identifikovány ve vodní biotě a dokonce i v lidském mateřském mléce a tukové tkáni.

Teoretická část diplomové práce pojednává o vlastnostech a rozšíření musk sloučenin v životním prostředí a o metodách identifikace a kvantifikace těchto látek v jednotlivých složkách ekosystému. V praktické části je popsán postup stanovení musk sloučenin v reálných vzorcích vodní bioty včetně optimalizace metody. Závěr diplomové práce je věnován zhodnocení výsledků analýz a porovnání obsahu musk sloučenin v rybách odlovených před a za čistírnou odpadních vod v Brně Modřicích.

# 2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část diplomové práce pojednává o vonných látkách, jejich vnímání člověkem a jejich vlivu na lidské myšlení, emoce a paměť. Pozornost je soustředěna na syntetické musk sloučeniny, jejich rozdělení, vlastnosti a osud v životním prostředí. Dále je pozornost zaměřena na analytické metody stanovení musk sloučenin v jednotlivých složkách životního prostředí.

## *2.1 Čich*

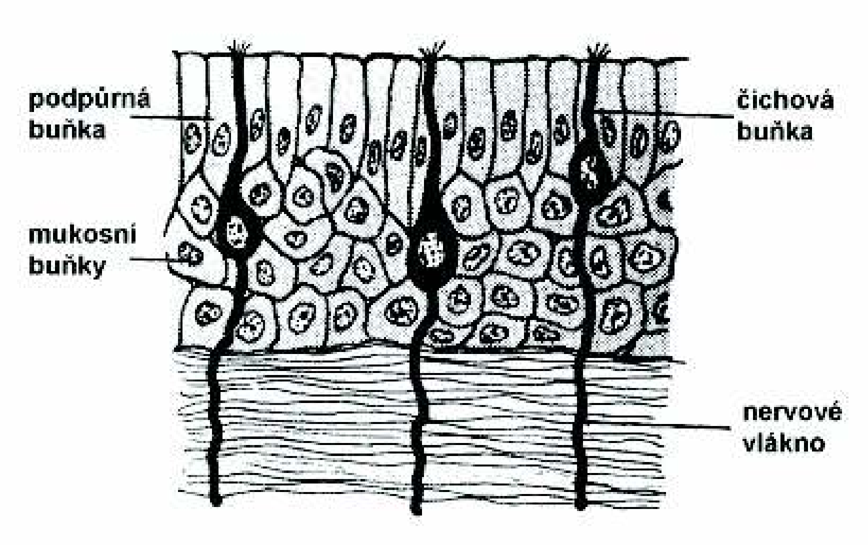
Základním kamenem pro objevení vonných látek je bezesporu čich. Čich je důležitou součástí smyslového vnímání většiny organismů. U člověka je čich vývojově nejstarší smysl a je nedílnou součástí smyslového vnímání. Dovoluje nám poznávat okolní svět na základě vůní, které nás obklopují. Pomocí čichu jsme schopni monitorovat kvalitu ovzduší, ve kterém žijeme, i rozlišit hrozbu v podobě zkažené potravy. Současně hraje čich velmi důležitou roli v sociálním chování člověka, včetně chování sexuálního [1].

### 2.1.1 Orgán čichu

Čichový orgán člověka se skládá ze dvou částí: čichových buněk a čichového centra v mozku. Čichové buňky člověka se nacházejí v nosní dutině. Člověk má až 100 miliónů čichových buněk, které pokrývají plochu asi 5 čtverečních centimetrů a obnovují se každých 60 dní. Na silně prokrvené čichové sliznici (epitelu) jsou umístěny jemné chloupky (nervová zakončení čichových buněk) pokryté vrstvou hlenu. Tato vrstva zachycuje vonné látky z plynné fáze, rozpouští je a tím zprostředkovává jejich kontakt s nervovými zakončeními. Čichové buňky pak vyšlou signál do mozku, kde je informace předána a zpracována. Přesný mechanismus vnímání vůní na molekulové úrovni je velice složitý a není ještě přesně popsán. Vlákna buněk čichového epitelu vedou přímo do mozku, čímž se odlišují od ostatních buněk smyslových orgánů obratlovců [2, 3, 4].

Signály přivedené z čichového ústrojí jsou zpracovávány v části mozku, která je nazývána čichové centrum. Toto centrum je umístěno na spodině čelního laloku koncového mozku a je spojeno s limbickým systémem. Limbický systém člověka pracuje s lidskými emocemi, náladou a pamětí. Spojení těchto částí mozku vysvětluje vliv vůní na emociální reakce člověka a schopnost pamatovat si vůně a vyhodnocovat je na základě zkušeností v případě, že jsme se s vůní již setkali [2, 5].

Citlivost čichu je pro každého člověka různá, stejně jako vnímání a rozeznávání jednotlivých vůní a pachů. V průměru je člověk schopen rozeznat a zapamatovat si přibližně 4000 rozličných vůní a pachů. K tomu, abychom byli schopni zaregistrovat určitou vůni, se musí na čichových buňkách zachytit dostatečné množství látek stejného typu (prahová koncentrace) [3, 6].




**Obr. 1:** *Stavba čichového epitelu* [4]

## *2.2 Vůně*

Vůně je organoleptická vlastnost chemických látek, kterou člověk objektivizuje a hodnotí. Je to smyslový vjem, který jsme schopni zaznamenat pomocí čichového ústrojí. Abychom mohli vůni chemické látky cítit, musí být molekuly látky uvolněny v plynné nebo kapalné fázi do prostředí a následně zachyceny hlenem na nosní sliznici [4, 6].

O tom, zda se jedná o vůni nebo zápach, rozhodujeme individuálně na základě pocitů, který v nás vnímaný vjem vyvolává. Vůně bývá spojována s něčím příjemným, pozitivním, naopak pach se používá pro označení nepříjemného, negativního požitku. Neutrální výraz pro čichový vjem se v českém jazyce neužívá [7].

V současnosti neexistuje obecně platná norma, na jejímž základě by bylo možné látky třídit, popisovat a charakterizovat na základě znalosti jejich struktury. V souvislosti s využíváním vůní v průmyslu existuje klasifikace vonných kompozic založená na senzorické charakterizaci vonných složek [6].

Využívání vůní k terapeutickým účinkům (navozování příjemné atmosféry, zlepšení duševní pohody) se zabývá obor nazývaný aromaterapie; aromachologie se zabývá zkoumáním vlivů vůní na emociální stránku člověka (změny nálady a chování) [3].

Použití vůní má v současnosti význam především v průmyslové výrobě kosmetických, čistících, pracích a jiných parfemovaných výrobků, které parfemací získávají na atraktivnosti. Hlavním důvodem přidávání vůně do těchto výrobků je upoutat zákazníka, který má o produkt zájem, a překrýt nepříjemné vůně detergentů použitých při výrobě [6].

### 2.2.1 Vnímání vůní

Čich se pravděpodobně začal vyvíjet jako první z pěti našich smyslů. Jeho prostřednictvím bylo člověku umožněno poznávat okolí a vytvářet si vztah k různým vůním a pachům. Již brzy člověk pochopil, že to co zapáchá, je s velkou pravděpodobností zkažené a může mu ublížit a naopak příjemná vůně v něm vzbuzovala příjemné pocity. Každý člověk vnímá vůni individuálně. Teprve v průběhu života dochází k hodnocení vůní na základě vychování, zvyklostí a zkušeností. S vůněmi si spojujeme osobní zážitky, emoce, nálady a každá vůně v nás může vyvolávat rozdílné pocity [1, 3].

Důležitým faktorem při vnímání a hodnocení vůní je koncentrace, v jaké látka na smyslový orgán působí. Některé látky mohou v nízké koncentraci vyvolávat příjemné pocity, avšak ve vyšší koncentraci nepříjemně zapáchat. Charakter vonných látek se s koncentrací může významně měnit. Citlivosti k vnímání vůně a schopnosti rozpoznávat jednotlivé pachy se lze naučit tréninkem [3, 6].

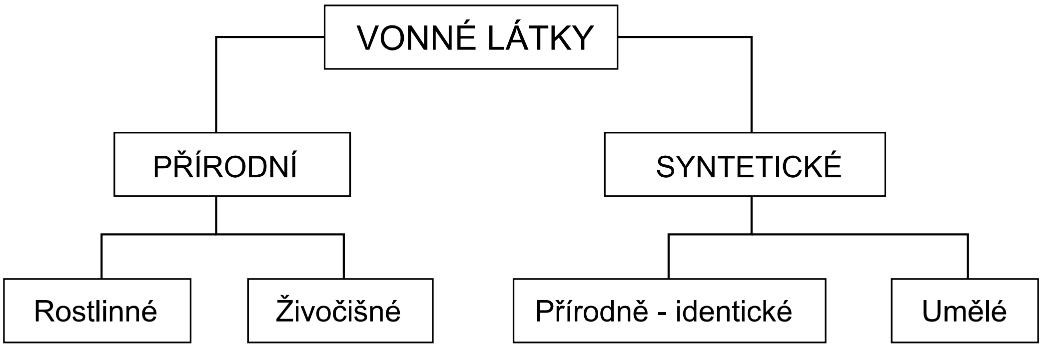
### 2.2.2 Psychologie vůní

To, že v nás dokáže vůně vyvolávat pocity, je hlavní důvod, proč se člověk začal vonnými látkami zabývat. Nepříjemná vůně v člověku probouzí nelibost až odpor. I tato vlastnost je pro člověka přínosem. Páchnoucí látky často varují před nebezpečím, například ucítíme-li kouř, uvědomíme si přítomnost ohně, pach zkažené potravy nás ochrání před otravou a dokonce můžeme vycítit nebezpečí z pachu potu druhých lidí. Naopak příjemná vůně v člověku probouzí pozitivní nálady. Známá vůně dokáže navodit pocit štěstí a uvolnění. Vůně do značné míry ovlivňují i výběr životního partnera. Pokud nám člověk při prvním setkání nevoní, jistě nás nebude přitahovat. Výběr partnera podle tělesné vůně je podmíněn evolučním vývojem a souvisí se schopností posoudit na základě feromonů produkovaných partnerem, zda bude vhodný pro zplození potomka [1, 3].

Kombinace všech těchto faktorů vedla ke zrodu parfumerie. Hlavním cílem vonných látek přidávaných do produktů osobní péče a čistících a dalších prostředků je vyvolat zájem o koupi produktu právě svojí příjemnou vůní [6].

## *2.3 Vonné látky*

Do skupiny vonných látek se řadí celá řada sloučenin různých chemických struktur a vlastností. Základním společným rysem těchto látek je specifická vůně. Vonné látky lze dělit na základě jejich původu na přírodní a syntetické. Přírodní vonné látky se dále dělí na živočišné a rostlinné a syntetické vonné látky se dělí na přírodně identické a umělé sloučeniny. Rozdělení vonných látek je znázorněno na obrázku 2 [8].




**Obr. 2:** *Rozdělení vonných látek* [9]

### 2.3.1 Přírodní vonné látky

Přírodní vonné látky vznikají biologickými pochody v živých organismech. Všechny organismy během svého života produkují mnoho chemických látek procesem zvaným metabolismus. Produkty primárního metabolismu jsou především cukry, tuky a nukleové kyseliny. Tyto látky zajišťují základní životní funkce rostlin i živočichů (zásoba energie, stavební funkce). Pokud má organismus dostatek těchto látek a vhodné podmínky (dostatek světla a sluneční energie, tepla, vláhy), začnou probíhat reakce sekundárního metabolismu. Během těchto procesů dochází k degradaci produktů primárního metabolismu a výsledkem je mimo jiné i vznik přírodních vonných látek. Podle původu lze přírodní vonné látky dělit na živočišné a rostlinné. Vonné látky mají v životě organismů nezastupitelné místo a pro mnoho živočichů i rostlin jsou často otázkou přežití. Člověk získává vonné látky z přírody především pro jejich využití v parfumerii, kosmetice, farmacii, ale také v potravinářském průmyslu [8, 10].

#### *2.3.1.1 Přírodní vonné látky rostlinného původu*

První skupinu přírodních vonných látek tvoří látky produkované rostlinami.

*Význam přírodních vonných látek:*

V rostlinné říši slouží vonné látky k vábení hmyzu, který zajišťuje opilování květů, čímž umožňuje rozmnožování rostlin, a současně odpuzuje škůdce a původce chorob [5, 11].

*Charakteristika rostlinných vonných látek:*

Přírodní vonné látky rostlinného původu jsou nazývány silice, případně také éterické, aromatické nebo esenciální oleje. Jsou to vonné, těkavé, ve vodě nerozpustné kapaliny, které jsou dobře rozpustné v tucích a v organických rozpouštědlech. Z chemického hlediska jsou silice kapalné směsi složené z chemických látek terpenického charakteru. Obsahují uhlovodíkový skelet tvořený isoprenoidními jednotkam; mohou to být kyslíkaté látky, alifatické, cyklické a aromatické sloučeniny (oxidy, fenolické ethery, alkoholy, estery, aldehydy, ketony a fenoly) [7, 10, 11].

*Silice:*

Silice se vyskytují v různých částech rostlin (květy, plody, kůra). Jsou uloženy v siličných buňkách a žlázkách, případně vyplňují mezibuněčný prostor rostlin. Jedná se o produkty sekundárního metabolismu vznikající v rostlinách dvěma různými způsoby. První proces se nazývá mevalonátový (biogenetický); takto vznikají především terpenické látky, a to kondenzací isoprenových jednotek za přítomnosti specifického enzymu. Druhá cesta se nazývá šikimátový (fenylpropanový) proces, při kterém vznikají látky s aromatickým jádrem [7, 12].

*Balzámy a pryskyřice:*

Vonné látky jsou mimo jiné součástí balzámů a pryskyřic. Tyto látky jsou konečnými produkty metabolismu některých druhů rostlin. Při poranění jsou vylučovány do pryskyřičných kanálků a dutin. Balzámy jsou směsi sirupové konzistence s vysokým obsahem aromatických balzamických kyselin. Po odpaření těkavých složek (silic a těkavých esterů) vznikají tuhé pryskyřice [11].

*Získávání vonných látek z rostlin:*

Z rostlin se vonné látky získávají destilací vodní parou, extrakcí organickými rozpouštědly nebo lisováním [13].

Jsou významné pro svoji vůni a používají se nejen v kosmetice a parfumerii, ale rovněž v potravinářském průmyslu pro výrobu vonných a chuťových látek. Mezi nejznámější zástupce patří například pinen (borovice), limonen (citron) a mentol (máta) [7].

**Obr. 3:** *Citron a máta*

#### *2.3.1.2 Přírodní vonné látky živočišného původu*

Přírodní vonné látky jsou produkovány nejen rostlinami, ale také některými živočichy.

*Význam přírodních vonných látek:*

Živočichové užívají vonné látky především v sociální komunikaci. Pomocí feromonů jsou schopni předávat si informace o nalezené potravě nebo o hrozícím nebezpečí. Vonné látky napomáhají rovněž při rozmnožování, kdy na základě feromonů dochází k výběru vhodného partnera a k označování teritória [14].

*Charakteristika živočišných vonných látek:*

Jedná se o výměšky žláz různých živočichů. Jsou to složité chemické sloučeniny vyznačující se charakteristickou silnou vůní, která v nezředěném stavu spíše zapáchá [15].

Nejznámějšími přírodními vonnými látkami živočišného původu jsou ambra, cibet, kastoreum a mošus.

*Ambra:*

Ambra je výměšek trávicího traktu vorvaně (*Physeter catodon*). Vzniká jako produkt sekundárního metabolismu v žaludku při porušení žaludeční sliznice, např. při poranění. Je to tuhá voskovitá hmota s hustotou nižší než voda. Získává se při lovu velryb z ulovených zvířat, nebo ji lze nalézt ve formě vyplavených chuchvalců na pobřeží [9, 15, 16, 17].

**Obr. 4:** *Vorvaň obrovský (Physeter catodon)* [9]

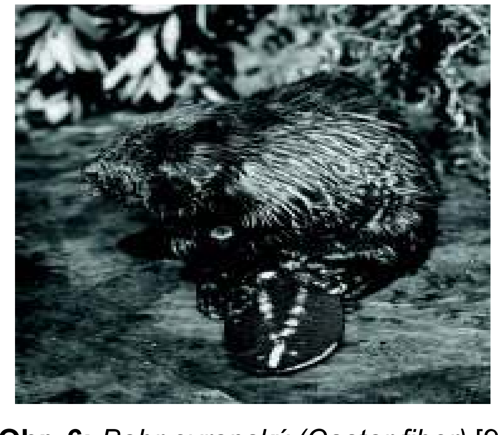
*Cibet:*

Cibet je sekret z pachových váčků cibetek (*Vivera civetta, Civettictis civetta*). Je to hnědá mazlavá hmota, která se tvoří v pachových žlázkách poblíž řitního otvoru těchto šelem. Je velice aromatická, a proto se používá ve velmi zředěném stavu [9, 15, 16, 17].

**Obr. 5:** *Cibetka africká (Civettictis civetta)* [9]

*Kastoreum:*

Kastoreum je výměšek lymfatických žláz bobra evropského (*Castor fiber*). Tento tmavohnědý sekret se získává z bobřích strůjů (váčky pod ocasem) a také je velmi silně zapáchající, a proto se musí před použitím silně ředit [9, 15, 16, 17].



**Obr. 6:** *Bobr evropský (Castor fiber)* [9]

*Mošus:*

Mošus, známý také jako pižmo, je pravděpodobně nejcennější vonná látka, získávaná z pachových váčků kabara pižmového (*Moschus moschiferus*). Je to velice aromatická, ale rovněž velmi drahá látka, která je používaná výhradně v parfumerii [9, 15, 16, 17].

**Obr. 7:** *Kabar pižmový (Moschus moschiferus)* [9]

Látku podobnou mošusu produkuje ondatra pižmová [9].

*Získávání vonných látek z těl živočichů:*

Získávání vonných látek z živočišných zdrojů je poměrně složitá záležitost a získané množství vonných látek není dostačující pro moderní společnost. V minulosti docházelo k lovům a vybíjení některých zvířat, a to právě kvůli získávání vonných látek pro potřeby parfumerie. Živočišné vonné látky je potřeba před použitím v parfumerii upravovat složitými postupy a nechat delší čas odvětrat, aby se zajistila optimální vůně. Používají se jako fixátory vůní v drahých parfémech, zaokrouhlují vonnou kompozici, zajišťují stálost vůní ve flakonku a dlouhou výdrž na kůži. Jsou cenné a velice drahé [15, 17, 18, 19].

### 2.3.2 Syntetické vonné látky

Druhou skupinou vonných látek jsou uměle syntetizované vonné sloučeniny. Tyto látky jsou připravovány antropogenní cestou. Zahrnují celou řadu složitých chemických sloučenin. Hlavním důvodem pro rozvoj chemických syntéz byla rostoucí poptávka po vonných látkách. Nově se začaly uměle syntetizovat látky obsažené v přírodních materiálech (přírodně identické vonné látky) i zcela nové sloučeniny podobných vlastností [18, 19].

#### *2.3.2.1 Přírodně identické vonné látky*

Jako přírodně identické vonné látky jsou označovány uměle syntetizované sloučeniny, které mají shodnou chemickou strukturu i vlastnosti s látkami vyskytujícími se v přírodních materiálech. Základem pro výrobu přírodně identických aromat je identifikace přírodních vonných látek a řízená chemická syntéza látek stejné struktury. Přírodně identické látky nelze od přírodních látek rozlišit, protože mají stejnou vůni i chemickou strukturu. Hlavním důvodem pro výrobu přírodně identických vonných látek zůstává poměrně nízká cena a možnost syntézy látek ve velkých objemech (nezávislost na přírodních zdrojích) [8, 14, 18].

Přírodně identické látky jsou hojně využívány v potravinářském průmyslu (aromata, příchutě) i v kosmetice. Prvním významným krokem bylo objevení a izolace vanilinu jako čisté látky v roce 1858 Nikolasem Theodorem Gobleym. V roce 1874 se podařilo německým vědcům Ferdinandu Tiemannovi a Wilhelmu Haarmannovi odvodit jeho strukturu a popsat chemickou cestu jeho syntézy. Přírodně identická aromata jsou v současnosti nejvíce využívána v potravinářském průmyslu pro dochucování a navonění potravinářských výrobků. Přírodně identické vonné látky, používané v potravinářském průmyslu, nepředstavují pro člověka zdravotní riziko. Vzhledem k jejich dlouhodobému výskytu v potravinách a široké spotřebě bez zjevného účinku na lidské zdraví jsou považovány za bezpečné [20].

#### *2.3.2.2 Umělé vonné látky*

Vedle přírodně identických vonných látek jsou dnes průmyslově vyráběny především nové umělé látky, které mají podobné vonné vlastnosti jako látky přírodní, ale odlišují se svojí chemickou strukturou. Jsou to látky, které se v přírodě přirozeně nevyskytují a jejichž existence je způsobena antropogenní činností. Zahrnují zástupce téměř všech skupin organických látek (uhlovodíky, halogenderiváty, alkoholy a fenoly, thioly, ethery, sulfidy, dusíkaté deriváty, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny a jejich deriváty – především estery a heterocyklické sloučeniny) [6, 14, 19].

Nejsledovanějšími sloučeninami ze skupiny umělých vonných látek jsou takzvané umělé musk sloučeniny - chemicky vyrobené náhražky přírodního mošusu (pižma) [8].

## *2.4 Historie vůní a vonných látek*

Přírodní vonné látky vznikají biosyntetickými reakcemi v živých organismech. Jejich historie proto souvisí s vývojem jednotlivých druhů rostlin a živočichů na planetě Zemi. Historie uměle syntetizovaných vonných látek je naproti tomu stará jen několik set let a souvisí s rozvojem vědecké činnosti člověka. Obecně lze říct, že historie vonných látek se začala psát v okamžiku, kdy člověk objevil, že chemické látky charakteristické svým aroma, se dají z přírodních materiálů izolovat; některé další vůně lze připravovat chemickými syntézami.

### 2.4.1 Historie přírodních vůní

Spíše než o vonných látkách mluvíme v souvislosti s historií o přírodních vůních. Vůněmi byli lidé obklopeni odjakživa. Už naši prapředci dokázali ocenit vůni některých bylin, lučního kvítí nebo ovoce. Zvláštností z pohledu člověka je to, že vůně dokáží ovlivňovat lidské emoce a nálady, a proto se brzy objevily snahy o podmanění kouzel, vznikajících v souvislosti s přírodními zdroji vůní [19].

Pro svoji vlastnost vzbuzovat příjemné pocity, byly vonné látky vyhledávány především při slavnostních příležitostech. Lidé získávali vůni z rostlin macerací, sušením, drcením a spalováním. Zapalováním pryskyřic stromů kadidlovníku a myrhovníku vznikaly omamné vůně, používané především k náboženským účelům (oslavování bohů, náboženské sešlosti, apod.). Odtud má původ slovo parfém (parfum), které pochází z řeckého výrazu *per fumum*, což znamená „skrz kouř" nebo kouřem [3, 8, 13].

Vůně se staly hlavní náplní obchodních cest mnohých národů. Obchodovalo se především s vonným dřevem kadidlovníku a myrhy. Spalování dřeva olibanu a myrhy se ve vyspělých kulturách (Egypťané, Řekové, Římané) začalo využívat nejen pro náboženské, ale i pro kulturní účely (vykuřování obydlí). Dalším způsobem užívání vonných látek se stala výroba mastí a olejů. Základ tvořily aromatické rostliny, jejichž vonné časti se pro prodloužení trvanlivosti svařovaly s živočišným tukem nebo s rostlinným olejem a vodou. Častým zdrojem vůní byly v minulosti květy růží, jasmínu, lilií, levandulí, z bylin potom bazalka, máta, dále koření, plody citrusů, mandlí a podobně [3, 13].

Postupně se vůně stává symbolem společenského postavení. Neslouží jen k oslavám, ale především k překrývání zápachu při špatných hygienických podmínkách. Vzhledem k vysoké ceně si parfémy mohli dovolit jen vysoce postavení, bohatí obyvatelé [3].

Důležitým krokem vedoucím k výrobě parfému, a to ve skutečném slova smyslu, bylo rozvinutí techniky destilace k výrobě čistého éterického oleje. O tento krok se zasloužil alchymista známý jako Avicenna kolem roku 1000 n. l. Od té chvíle se začal rozvíjet moderní parfumářský průmysl [3, 8].

### 2.4.2 Historie parfémů

Historie moderního parfumářství se v Evropě datuje od 12. století, kdy král Filip August zakládá cech rukavičkářů a parfumérů. Do té doby byly parfémy vzácným zbožím dováženým z Arábie, kde se vyráběly vonné vody destilací z přírodních materiálů. Od 12. století sloužily parfémy především k překrývání nepříjemných tělesných pachů. Jako suroviny pro výrobu parfémů sloužily především intenzivní animální esence jako pižmo, ambra a cibet. Vůně byly značně silné a těžké, aby překryly pachy. Obliba silných vůní končí v polovině 18. století, kdy se do módy vrací svěží přírodní vůně a dbá se na zvýšenou hygienu. Stále je hlavním problémem cena parfému, a proto si ho mohou dovolit pouze bohatí. Tato situace se mění ve 20. století, kdy dochází ke spojení parfumerského a chemického průmyslu a k objevům syntéz nových vonných látek. Výroba umělých vonných látek je levnější než a v důsledku toho se parfémy rozšiřují mezi střední i nižší vrstvy. Z luxusu se stává běžný produkt masové spotřeby [3, 8].

### 2.4.3 Historie umělých vonných látek

Přírodní zdroje vonných látek se s rozvojem kosmetického průmyslu a zejména se vzrůstající spotřebou vonných látek nejen v kosmetice, ale také v ostatních oblastech průmyslu (prací a čistící prostředky, osvěžovače, parfemované výrobky), staly nedostatečnými. Docházelo k rozsáhlým těžbám vzácných dřevin a nekontrolovatelnému lovu zvířat produkujících vonné sloučeniny. Aby se zabránilo vyhlazení těchto živočišných druhů, stala se hlavním cílem vědců a chemiků snaha o izolaci a stanovení struktur přírodních látek a vypracování postupů pro syntézu vonných látek v laboratorních podmínkách [19].

Poté, co se podařilo z přírodních materiálů izolovat vonné látky, objevily se první snahy o určení struktury těchto chemických sloučenin a snahy chemiků se upíraly k pokusům zaměřeným na umělou syntézu vonných látek chemickou cestou [14].

#### *2.4.3.1 Důležitá data v historii umělých musk sloučenin*

První výsledky bádání, související se strukturou vonných látek, jsou datovány od obdobbí 1833-1834, kdy francouzští chemici Dumas a Peligot izolovali ze skořicové silice vonný aldehyd a v roce 1856 vypracovali postup na jeho syntézu. Další významný krok představovala izolace benzaldehydu z oleje z hořkých mandlí, kterou v roce 1837 popsali chemici Liebig a Wöhler. Největším úspěchem však bylo objevení vanilinu a heliotropinu o pár let později. Zásluhu na jejich syntéze, uskutečněné a popsané v roce 1874, měli němečtí chemici Haarmann, Tiemann a Riemer [7, 8, 14, 19].

V letech 1845-1850 tak vznikají první uměle syntetizované esenciální oleje vyráběné v chemickém průmyslu. Základem těchto umělých olejů jsou estery vyšších mastných kyselin a některých alkoholů a jsou zvláště vyhledávány pro své ovocné aroma. Doposud se jedná o přírodně identické látky. Zisk těchto látek umělou cestou nese nejen snížení nákladů na výrobu, ale také zvýšení objemu výroby, protože většina látek získávaných z přírodních materiálů se vyskytuje jen ve stopových množstvích [7, 8, 14, 19].

Mezi důležitá data v historii umělých vonných látek patří bezesporu rok 1878. Právě v tomto roce došlo k syntéze první umělé vonné sloučeniny – kumarinu – chemikem Perkinem. První mošusově vonící látkou, kterou se podařilo objevit chemiku Albertu Baurovi v roce 1888, bylo tzv. Baurovo pižmo. Dalšími nitrovanými sloučeninami vydávajícími charakteristickou pižmovou vůni jako mošus, byly mošus ambret, keton a xylen (1898 - Baur, Thurgau). Pro svoje aroma a vlastnosti se mošusově vonící látky staly středem pozornosti mnoha chemiků. Roku 1957 se podařilo syntetizovat galaxolid, látku ze skupiny isochromanových mošusů. Objev učinili vědci Beets a Theimer. Dalšími výzkumy měly za následek objevení řady významných látek, jako např. deriváty indanu (celestolid) a tetrahydronaftalenu (tonalid) [7, 8, 14, 19].

## *2.5 Produkce vonných látek*

V období 19. a 20. století došlo k obrovskému pokroku v oblasti vonných látek. S vývojem postupů syntetické výroby vonných sloučenin se mnohonásobně zvýšilo množství používaných vonných látek v průmyslu. Původních 150-200 známých přírodních vonných látek používaných v parfumerii, se za posledních 200 let zvýšilo na několik tisíc nově syntetizovaných chemických sloučenin [7, 15, 21].

Dnes se průmyslově vyrábí kolem 10 000 syntetických vonných látek. Asi 2 500-3 000 sloučenin se běžně používá v praxi, z nichž asi 300 se používá ve velkém množství (produkce nad 50 t ročně). Prvními průmyslově vyráběnými musk sloučeninami byly nitromusk Isloučeniny. Brzy po prokázání jejich toxicity a negativních dopadů na životní prostředí byla výroba nitromusk sloučenin snížena na minimum (v EU zcela zastavena) a jako náhrada začaly být vyráběny látky ze skupiny polycyklických musk sloučenin. Také u těchto látek byly následně prokázány toxické vlivy na ekosystémy, a proto se hlavním trendem ve výrobě staly v současné době makrocyklické a nově alicyklické musk sloučeniny [7, 21, 22].

Díky legislativním opatřením v dalších letech produkce pomalu klesá. V současnosti je používání syntetických musk sloučenin upravováno pomocí direktiv 2002/34/ECz 15. dubna 2002 a 2003/14/EC z 19. února 2003 [10, 23].

Vývoj ve světové spotřebě musk sloučenin je uveden v tabulce 1. Tabulka 2 prezentuje údaje o spotřebě jednotlivých musk sloučenin v evropských zemích. Údaje v tabulkách jsou uvedeny v množství v tunách za příslušný rok [19, 21, 22].

**Tabulka 1:** *Světová produkce umělých musk sloučenin (t/rok)* [19, 21]

| Rok | Musk sloučeniny | Polycyklické | Nitro musk | Makrocyklické |
|---|---|---|---|---|
| **1988** | 7000 | 4300 (61%) | 2450 (35%) | 250 (3-4%) |
| **1996** | 8000 | 5600 (70%) | 700 (12%) | 250 (3-4%) |

**Tabulka 2:** *Spotřeba jednotlivých musk sloučenin v Evropě (t/rok)* [24]

| Musk sloučenina | 1992 | 1995 | 1998 | 2000 |
|---|---|---|---|---|
| **Musk xylene** | 174 | 110 | 86 | 67 |
| **Musk ketone** | 124 | 61 | 40 | 35 |
| **HHCB** | 2,400 | 1,482 | 1,473 | 1,427 |
| **AHTN** | 885 | 585 | 385 | 358 |

## *2.6 Umělé musk sloučeniny*

V současné době patří mezi nejvíce sledovanou skupinu vonných látek bezesporu syntetické musk sloučeniny.

### 2.6.1 Mošusové látky

Mošusové látky nebo také musk sloučeniny jsou přírodní i umělé vonné látky. Přírodní musk sloučeniny jsou živočišného původu (výměšky kabara pižmového), umělé musk sloučeniny zahrnují množství synteticky připravených chemických sloučenin [7].

Název byl odvozen od přírodního mošusu, a to díky typické pižmové vůni, kterou se tyto látky vyznačují. Přírodní mošusové látky jsou velmi cenné a velice drahé. Vzhledem k podstatně nížším výrobním nákladům začaly v parfumerii a v kosmetickém průmyslu umělé musk sloučeniny ve velké míře nahrazovat přírodní vonné látky. S rozšířením použití dochází k průniku těchto sloučenin do životního prostředí. Musk sloučeniny jsou perzistentní polutanty, které se kumulují ve složkách životního prostředí. Bylo zjištěno, že dochází k jejich bioakumulaci a biokoncentraci v potravních řetězcích; také byly prokázány jejich toxické účinky na organismy [8].

### 2.6.2 Charakteristika umělých musk sloučenin

Jedná se o uměle syntetizované chemické látky používané jako náhrady přírodního mošusu. Skupina syntetických musk sloučenin zahrnuje široké spektrum chemických látek různých struktur a vlastností. Zástupce lze nalézt téměř ve všech hlavních skupinách organických sloučenin (uhlovodíky, halogenderiváty, alkoholy a fenoly, thioly, ethery, sulfidy, dusíkaté deriváty, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny a jejich deriváty, především estery a laktony, heterocyklické sloučeniny a další). Charakteristickou vlastností těchto látek je příjemné pižmové aroma. Přírodní mošusové látky jsou pro moderní společnost nedostačující z hlediska objemu. S objevem syntetických musk sloučenin došlo k revoluci v parfumářském průmyslu a obrovskému rozvoji parfémování výrobků.

Získávání vonných látek z přírodních materiálů je nákladné a množství, které se získá je pro moderní společnost, je zcela nedostačující. Postupy výroby umělých musk sloučenin nejsou složité ani finančně náročné, a proto může výroba musk sloučenin probíhat ve velkém objemu. Proto v posledních letech umělé musk sloučeniny nahrazují přírodní mošusové látky, které jsou z hlediska získávání velice nákladné a málo dostupné [6, 14].

#### *2.6.2.1 Význam, použití musk sloučenin*

Musk sloučeniny jsou významnou surovinou při výrobě parfémů. Díky svému příjemnému aroma se v současnosti používá okolo 3000 vonných látek. Jejich hlavní předností je schopnost fixace a ucelení vonné kompozice. Díky fixačním schopnostem musk sloučenin dochází k postupnému pomalému uvolňování těkavých látek z vonné kompozice a také k prodloužení vonného tónu. K dalším vlastnostem musk sloučenin patří schopnost vázat vůni v textilních tkaninách, a proto se rozšířily jako složky čistících a pracích prostředků (zejména aviváže) [22, 25].

#### *2.6.2.2 Problematika umělých musk sloučenin*

S rostoucí spotřebou musk sloučenin souvisí jejich zvýšený průnik do životního prostředí. Nízká cena a možnost vyrábět téměř neomezené množství těchto látek přispělo k masovému rozšíření umělých musk sloučenin do všech složek ekosystému. Vzhledem k fyzikálně-chemickým vlastnostem syntetických musk sloučenin je jejich přítomnost ve složkách životního prostředí skutečným problémem. Musk sloučeniny a jejich bioaktivní metabolity kontinuálně pronikají do složek životního prostředí různými cestami, akumulují se zde a působí toxicky na živé organismy [25, 26].

Největší problémy způsobují musk sloučeniny v akvatickém prostředí. Vodní organismy jsou vystaveny škodlivým účinkům musk sloučenin po celou dobu svého vývoje v mnoha generacích. Možné efekty na organismech nejsou zcela odhaleny, protože kumulace musk sloučenin i jejich působení je dlouhodobé a velmi pomalé. Některé změny v chování organismů proto mohou být přisuzovány adaptaci organismů a ekologické sukcesi [25, 27].

#### *2.6.2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti musk sloučenin*

Syntetické musk sloučeniny jsou díky svým vlastnostem zařazována do skupiny POPs (perzistentní organické polutanty) a mezi takzvané PCP (personal care products), farmaka a přípravky denní spotřeby. Mezi PCP kontaminanty patří spolu s farmaceutickými výrobky a potravními doplňky také produkty osobní péče, detergenty, kosmetické prostředky a další. PCP kontaminanty jsou skupinou organických polutantů, které jsou ve velkých objemech produkovány lidskou činností a po spotřebě jsou uvolňovány do životního prostředí, a to především prostřednictvím odpadní vody [5, 23, 28].

Umělé musk sloučeniny jsou semivolatilní organické látky a jejich těkavost závisí na chemické struktuře látek. Mají lipofilní charakter, a proto jsou málo rozpustné ve vodě (nepolární charakter molekul), avšak dobře se rozpouštějí v tucích a v organických rozpouštědlech. Relativní molekulová hmotnost umělých musk sloučenin se pohybuje v rozmezí 200-300. Vlastnosti musk sloučenin jsou odvozovány od struktury jednotlivých látek. Většina umělých musk sloučenin má velmi stabilní struktury a v přírodě jsou obtížně rozložitelné. U některých musk sloučenin byla prokázána odolnost proti tepelné degradaci, fotodegradaci a biodegradaci [14, 22, 23, 25, 29].

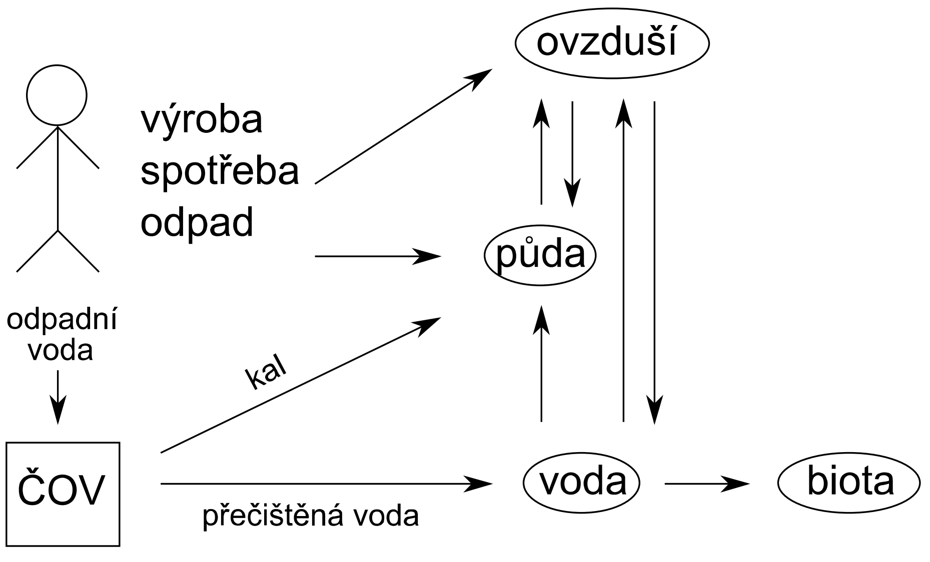
Tyto látky se velmi ochotně absorbují na organickou hmotu a snadno procházejí buněčnými membránami. Díky svým lipofilním vlastnostem mají vysokou schopnost bioakumulace. Faktory bioakumulace odpovídají hodnotám rozdělovacích koeficientů oktanol-voda [31].

## 2.6.4 Vstup do životního prostředí

Umělé musk sloučeniny vstupují do životního prostředí prostřednictvím lidské činnosti. Kontaminace prostředí je možná ve třech hlavních rovinách, a to při úniku ve výrobním procesu, z odpadů obsahujících tyto látky a především odpadní vodou po použití prostředků obsahujících vonné musk sloučeniny [28, 30].

Umělé, syntetizované musk sloučeniny se dostávají do všech složek životního prostředí. Za transportní medium je považováno především ovzduší, do kterého se díky svým semivolatilním vlastnostem uvolňují molekuly vonných látek nejen při používání voňavých výrobků, ale rovněž z odpadní vody. Z vody se tyto látky dostávají do půdy, především však do kalů z ČOV a do sedimentů v řekách. Odpadní voda je považována za největší zdroj kontaminace. Všechny čistící, mycí a prací prostředky, včetně prostředků osobní hygieny, jsou splachovány do odpadní vody. V ČOV nedochází k dostatečnému odstranění musk sloučenin z důvodu jejich nízké biodegradace a musk sloučeniny potom odcházejí z ČOV do recipientu. Díky svým vlastnostem se kumulují v organické hmotě (sedimenty, biotický materiál) a pronikají do dalších ekosystémů přes potravní řetězce [19, 21, 22, 28].

Schématické znázornění kontaminace životního prostředí umělými musk sloučeninami je uvedeno na následujícím obrázku.




**Obr. 8:** *Zjednodušené schéma průniku musk sloučenin do životního prostředí*

## 2.6.5 Výskyt musk sloučenin ve složkách ŽP

Vzhledem k masovému užívání umělých musk sloučenin v průmyslu se tyto látky rozšířily do všech složek životního prostředí. V současnosti existuje stále velmi málo informací o negativních vlivech musk sloučenin na ekosystémy, a proto se mnoho studií zaměřuje především na hodnocení toxikologických rizik a na stanovení obsahu musk sloučenin v jednotlivých matricích [28, 30].

### *2.6.5.1 Hydrosféra*

Nejvíce kontaminovanou složkou životního prostředí je voda. Jak bylo uvedeno již dříve, umělé musk sloučeniny jsou do prostředí vnášeny především prostřednictvím odpadní vody. Nejvíce kontaminované jsou městské odpadní vody z velkých aglomerací a průmyslové odpadní vody z podniků zabývajících se výrobou detergentů a vonných látek. Odpadní vody vstupují do procesu čištění v čistírnách odpadních vod, avšak 100% odstranění vonných musk sloučenin není v důsledku jejich vlastností možné. Vzhledem ke své stabilitě prochází biologickým stupněm čištění a jsou vypouštěny do recipientu. Účinnost odstranění musk sloučenin v ČOV je různé pro různé skupiny těchto látek; uvádí se v rozmezí 34-78 % pro nitro-musk a 60-86 % pro polycyklické musk sloučeniny. V řekách dochází k sorpci musk sloučenin na organickou hmotu a také k desorpci do ovzduší. Musk sloučeniny se vzhledem ke svému vysokému koeficientu Kow dobře sorbují do sedimentů řek a přes buněčné membrány vstupují do vodní bioty. Vlivem lipofility těchto látek dochází k akumulaci a biokoncentraci umělých musk sloučenin v sedimentech a vodní biotě. Potravními řetězci se šíří musk sloučeniny do vyšších trofických úrovní [19, 23, 27, 29, 30, 31, 34, 45].

Koncentrační hladiny musk sloučenin v řekách se pohybují v širokém rozpětí hodnot (HHCB: 100-400 ng/l, AHTN: 50–240 ng/l, MK: 0,5-4 ng/l, MX: 0,5-2 ng/l ). Koncentrace musk sloučenin klesá se vzdáleností od ústí ČOV z velkých aglomerací vlivem naředění, sorpce a akumulace v sedimentech a ve vodní biotě [33, 34].

### *2.6.5.2 Atmosféra*

Do atmosféry jsou musk sloučeniny uvolňovány ze všech matric díky svým semivolatilním vlastnostem. Do ovzduší se dostává přibližně 0,01-0,02 % vyprodukovaných umělých musk látek; jejich poločasy rozpadu se však pohybují v řádech několika hodin, protože dochází k jejich reakcím s volnými radikály v atmosféře, zejména k fotodegradaci. Z tohoto důvodu nepředstavují musk sloučeniny v atmosféře závažný zdroj znečištění, ačkoliv je ovzduší považováno za transportní médium těchto látek do ostatních složek životního prostředí [19, 23, 32].

### *2.6.5.3 Pedosféra*

Do půdy se umělé musk sloučeniny dostávají z atmosféry (splach deštěm), možnými úniky přímo v místě výroby nebo ze skládek (odpady obsahující musk sloučeniny). Hlavním zdrojem znečištění půd je však kal z ČOV, používaný jako hnojivo v zemědělství. Musk sloučeniny obsažené v odpadní vodě se v procesu čištění v ČOV sorbují na organickou hmotu čistírenského kalu a vzhledem k jejich chemické stabilitě nedochází k rozkladu, ale ke kumulaci. Pokud je potom kal použit v zemědělství, dochází k uvolňování musk sloučenin do půdy.

Legislativně je upraveno používání čistírenských kalů pro zemědělské účely (vyhláška č. 382/2001 Sb. „O podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě“), avšak limitní hodnoty musk sloučenin v této vyhlášce chybí [23, 30, 32, 35].

Další rizikovou skupinou jsou suspendované sedimenty. Musk sloučeniny jsou přes ČOV vypouštěny do recipientu, kde dochází k sorpci na říční sediment. Vzhledem k relativně velkému specifickému povrchu minerálních částic a vysokému obsahu organické hmoty je sediment vhodný k akumulaci musk sloučenin. Díky anaerobním procesům, které zde probíhají, vznikají často nebezpečné metabolity. Hlavním rizikem je možnost vyplavení musk sloučenin a jejich metabolitů ze sedimentů a průnik do vodní bioty a potravního řetězce [19, 32, 36].

Koncentrační hladiny musk sloučenin jsou v porovnání s koncentracemi těchto látek v říční vodě mnohonásobně vyšší (HHCB: 150–300, AHTN: 150–300 μg/kg sušiny; MK: 180-290, MX: 130-19 ng/kg sušiny), což vypovídá o jejich schopnosti sorpce na organickou hmotu a o jejich následné kumulaci [33, 34].

#### *2.6.5.4 Biosféra*

Nejvíce exponovanou biotou jsou vodní živočichové. Umělé musk sloučeniny jsou lipofilní látky, které pronikají přes buněčné membrány a kumulují se v tukové tkáni živočichů. Mají schopnost bioakumulace (příjem látek z okolního média), biokoncentrace (výsledek příjmu potravy a vylučování) a bioobohacování (zvyšování látky na trofických úrovních potravního řetězce). Cestou potravního řetězce jsou musk sloučeniny transportovány do vyšších organismů (dravé ryby, ptáci a savci živící se vodní biotou). V organismech dochází k metabolickým pochodům musk sloučenin a vznikají toxické metabolity [27, 31, 34, 40, 44].

Na vrcholu potravního řetězce stojí člověk. Kontaminace člověka musk sloučeninami byla prokázána mnoha studiemi, avšak za hlavní cestu není považována potrava, ale expozice kůží a nosní sliznicí. Při používání veškerých parfémovaných přípravků (parfémy, osvěžovače a aromatické oleje) dochází k uvolňování musk sloučenin do okolí. Ty jsou pak vdechovány a přes nosní sliznici procházejí do organismu, případně přichází přímo do styku s pokožkou (krémy, mýdla, čistící, prací a avivážní prostředky) a opět dochází k jejich průniku přes buněčné membrány do organismu [22, 30, 33].

Koncentrační hladiny musk sloučenin ve vzorcích rybí tkáně (jelec tloušť) se v letech 1997-2000 ve vybraných lokalitách ČR pohybovaly v rozmezí : MX: 0,03 – 0,53; MK: 0,03 – 0,23; AHTN: 0,6 – 2,4; HHCB: 0,4 – 2,7 mg/kg tuku [23].

Koncentrace musk sloučenin stanovené ve vzorcích lidské krve, tukové tkáně a mateřského mléka, se pohybují v rozmezí MX: 0.005 - 1.22, MK: 0.001 - 0.24, HHCB: 0.001 - 0.360, AHTN: 0.001 - 0.290 mg/kg tuku [31].

### 2.6.6 Osud v životním prostředí

Přestože jsou umělé musk sloučeniny velice stabilní látky, dochází v životním prostředí k jejich částečné degradaci a k metabolickým přeměnám. V současnosti je věnováno hodně pozornosti právě výzkumu osudu umělých musk sloučenin v životním prostředí, a to především nitromusk a polycyklických musk, a sledování vlivu případných metabolitů na ekosystémy (toxicita). Po zjištění, že se umělé musk sloučeniny rozšířily do životního prostředí a kumulují se v něm, je důležité objasnit další osud musk sloučenin v ekosystémech a zejména jejich negativní vliv na organismy [19, 22, 30].

#### 2.6.6.1 Degradace

Za příznivých podmínek (teplota, sluneční záření, přítomnost radikálů) dochází k fotolýze (fotodegradaci) umělých musk sloučenin. Jevy fotolýzy probíhají v ovzduší nebo ve vodním prostředí (podmínkou je průnik UV záření). V atmosféře reagují molekuly vonných látek s hydroxylovými radikály a ozonem. Při pokusech byly prokázány relativně krátké poločasy života (1-12 dní pro MX ve vzduchu), a proto se atmosféra nepovažuje za závažný zdroj znečištění těmito látkami. Při fotodegradačních procesech však mohou vznikat mnohem stabilnější produkty, které jsou často škodlivější než původní musk sloučeniny [19, 21, 24, 40].

#### 2.6.6.2 Metabolizace

Další možností degradace musk sloučenin je biodegradace za přispění mikroorganismů. Tyto procesy probíhají v anaerobních podmínkách, kde se například redukují nitromusk sloučeniny a vznikají aminometabolity. Vhodným prostředím pro biodegradaci je kal z ČOV a sedimenty mořského dna [19, 32].

#### 2.6.6.3 Toxicita

Významnou vlastností musk sloučenin je jejich schopnost bioakumulace. V důsledku příjímání musk sloučenin organismem z okolního prostředí dochází k jejich hromadění v organismu a ke zvyšování koncentrace. Bioakumulační vlastnosti se hodnotí na základě biokoncentračního faktoru (poměr koncentrací xenobiotika v organismu a okolním prostředí) a bioakumulačního faktoru (poměr koncentrací v potravním řetězci a okolním prostředí). Schopnost bioakumulace a biokoncentrace zvyšuje toxicitu těchto látek [19, 21, 27, 31].

Toxicita látky představuje její schopnost poškodit živý organismus a je dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi látky [30].

V posledních letech se toxicita umělých musk sloučenin stala hlavní náplní práce mnoha vědců. Expozice organismu musk sloučeninami může probíhat externí i interní cestou. Mezi externí způsoby expozice je zahrnut především vstup látek pokožkou těla. V tomto případě prochází látka v místě expozice (u vodních organismů celý povrch těla, u člověka místo aplikace musk sloučenin), dostává se přes kožní buňky do krevního oběhu a následně působí na celý organismus. Za interní cestu vstupu se pokládá inhalace musk látek a perorální příjem. Toxikologie a ekotoxikologie musk sloučenin je v současné době hlavním předmětem mnoha studií. Zkoumá se působení musk sloučenin na organismy (endokrinní disruptory, alergeny), akutní toxicita a chronická toxicita, případně karcinogenita, mutagenita a teratogenita) [19, 21, 25, 27, 31, 44].

V současnosti byla prokázána toxicita některých hlavních sledovaných musk sloučenin, především ze skupiny nitromusk a polycyklických musk látek. Musk ambrette má pro člověka prokazatelně fotoalergenní vlastnosti; musk xylen je klasifikován Evropskou unií jako karcinogen 3. třídy (informace o karcinogenitě nedostačují pro zařazení dané látky mezi prokazatelně karcinogenní, existuje podezření na karcinogenní účinky), u lidí způsobuje slabou fotoalergickou reakci [27].

Akutní toxicita nitro musk sloučenin (orální a dermální expozice) je pro laboratorní zvířata (krysy, myši) poměrně nízká $LD_{50}$: (MX, MK, MOS, TIB) > 5 g/kg, AMB: 339 mg/kg ; polycyklické musk sloučeniny mají LD50: (AHTN) > 3 g/kg, HHCB > 5 g/kg [27].

### 2.6.7 Dělení umělých musk sloučenin

Na základě chemické struktury lze umělé musk sloučeniny rozdělit do čtyř základních skupin:

- **Nitromusk sloučeniny**
- **Polycyklické musk sloučeniny**
- **Makrocyklické musk sloučeniny**
- **Alicyklické musk sloučeniny**

#### *2.6.7.1 Nitromusk sloučeniny*

*Charakterizace:*

Nejstarší skupinou umělých vonných látek jsou nitromusk sloučeniny. Nitromusk sloučeniny jsou nitroderiváty benzenu se dvěmi nebo třemi substituovanými nitroskupinami na benzenovém jádře a s alkylovou, keto nebo methoxy skupinou [26].

Jako první sloučenina bylo objeveno tzv. Baurovo pižmo, látka charakteristického pižmového zápachu, a to při syntéze výbušnin Albertem Baurem. Objevení Baurova pižma v roce 1891 odstartovalo novou etapu v oblasti průmyslu vonných látek. Do té doby byly v průmyslu užívány pouze přírodní vonné látky, s objevem syntetických musk sloučenin došlo k obrovskému zvýšení výroby parfémovaných produktů. Do roku 1980 byly nitromusk sloučeniny masově užívány při výrobě parfemovaných výrobků (kosmetika, detergenty, vonné přípravky). V roce 1980 došlo k poklesu jejich výroby a užívání z důvodů zjištění fotoalergických reakcí na zástupce této skupiny (musk ambrette). V roce 1981 byla poprvé studiemi prokázána přítomnost nitromusk sloučenin v povrchové vodě a dokonce v rybí tkáni. S tímto zjištěním došlo ke značnému zvýšení zájmu o osud nitrovaných musk sloučenin v životním prostředí a o hodnocení těchto látek z hlediska ekotoxicity. Mnoho provedených testů ekotoxicity prokázalo zřetelný vliv nitrovaných musk sloučenin na ekosystémy (bioakumulace, perzistence); také byla prokázána toxicita metabolizovaných produktů nitromusk sloučenin (aminometabolity). Především proto bylo užívání nitromusk sloučenin značně omezeno nebo dokonce zakázáno (1995 musk ambrette, 1995 musk moskene a musk tibetene) [19, 21, 23, 24, 37, 44].

Mezi nejznámější zástupce nitromusk sloučenin patří musk xylen, musk keton, musk ambrette, musk moskene a musk tibeten. Musk mosleme, který byl objevený v roce 1955, lze hodnotit jako přechod mezi nitromusk sloučeninami a polycyklickými musk sloučeninami, jejichž vývoj následoval. I přes objevení polycyklických musk sloučenin zůstaly nitromusk sloučeniny ještě dlouhou dobu hlavními vonnými látkami na poli průmyslu, a to především pro své univerzální použití v mýdlech a detergentech (musk xylen, musk keton) [19].

*Dopad na životní prostředí:*

Závažnou hrozbou pro životní prostředí nejsou přímo nitrované musk sloučeniny, ale především jejich aminoderiváty, vznikající metabolickými a degradačními pochody v přírodě. Při těchto reakcích dochází k redukci nitroskupiny za vzniku aminosloučenin. Aminometabolity jsou často detekovány v ekosystémech, a to v množství několikanásobně vyšším, než původní nemetabolizované musk sloučeniny. Rovněž toxicita těchto derivátů je prokazatelně vyšší [21, 23, 27, 25, 37, 44].

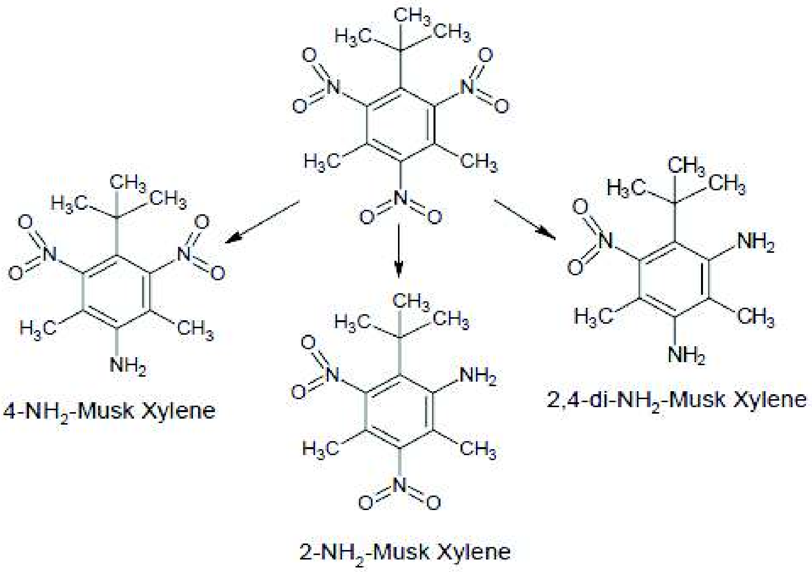
*Významní zástupci nitro musk sloučenin:*

- ***Musk Baur***

Je první uměle připravená mošusová látka; o objev se zasloužil Albert Baur, který ji náhodně syntetizoval při vývoji nových výbušnin v roce 1891 (nitrace benzenového jádra); dnes se již nepoužívá [19].

- ***Musk xylen***

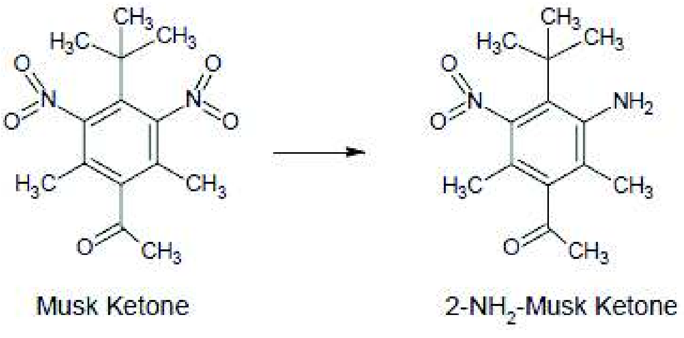
Látka dříve hojně používána v kosmetických přípravcích a detergentech. V současnosti jsou stanoveny limity na její použití, a to z důvodu akumulace v životním prostředí a tvorby toxických metabolitů. Metabolická přeměna musk xylenu je znázorněn na obrázku 9. Mnoho studií se zabývá výskytem musk xylenu a jeho metabolitů v ekosystémech [27].




**Obrázek 9:** *Metabolické přeměny musk xylenu*

- ***Musk keton***

Stejně jako musk xylen i musk keton vytváří nebezpečné aminometabolity,a proto je jeho použití v kosmetických produktech v současnosti limitováno. Metabolismus musk ketonu zachycuje obrázek 10. Jeho nadměrné užívání v minulosti způsobilo kontaminaci ŽP touto látkou a také jejími metabolickými produkty, což dokazuje spousta studií, které se zabývala osudem musk ketonu v životním prostředí [27].




**Obrázek 10:** *Metabolická přeměna musk ketonu [27]*

- ***Musk ambrette***

Používání musk ambrette v kosmetických přípravcích bylo roku 1995 zakázáno v celé EU, a to po zjištění, že tato látka vykazuje fotoalergenní účinky; do té doby byla hojně využívána v průmyslu, a proto je často detekována ve všech složkách ŽP [37].

- ***Musk mosken, musk tibeten***

Obě látky jsou od roku 1998 zahrnuty v seznamu sloučenin, které nesmí být obsaženy v kosmetických produktech [19].

#### 2.6.7.2 Polycyklické musk sloučeniny

*Charakterizace:*

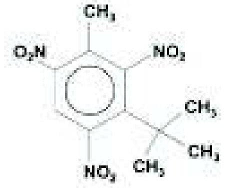
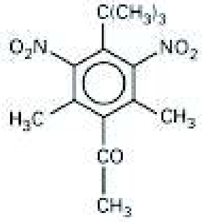
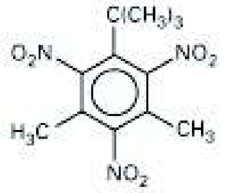
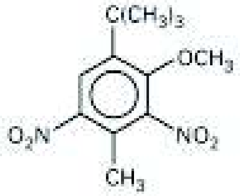
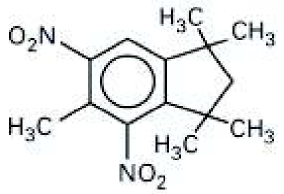
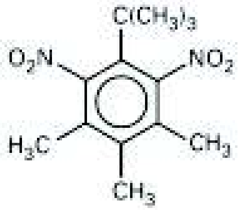
Další skupinou umělých vonných látek jsou polycyklické musk sloučeniny. Z chemického hlediska se jedná o deriváty indenu, tetralinu, tricyklické sloučeniny a deriváty kumarinu. Objev kumarinu v roce 1875 odstartoval etapu vývoje těchto látek. Vzhledem k tomu, že neobsahují nitroskupinu, jsou z ekologického hlediska menší hrozbou, než nitro musk sloučeniny. Jsou to chemické, uměle syntetizované látky, které se běžně v přírodě nevyskytují, mají však stejně jako ostatní musk sloučeniny bioakumulační schopnosti a jsou prokazatelně perzistentní (vyšší rezistence vůči světlu a zásadám). Díky svým univerzálním vonným vlastnostem a schopnosti lépe se vázat na tkaniny v průmyslu, brzy nahradily skupinu nitrovaných musk látek. Detekce polycyklickým musk sloučenin v matricích životního prostředí v roce 1994, včetně posouzení závažnosti jejich přítomnosti v životním prostředí, způsobilo pokles v užívání těchto látek při výrobě parfemovaných prostředků. Látky byly prokázány nejen ve vodních ekosystémech (voda, ryby, sedimenty), ale také v lidském tuku a v mateřském mléce, a to v koncentracích o mnoho vyšších, než nitrované musk sloučeniny [19, 23, 24, 28, 34, 40].

Mezi významné zástupce této skupiny patří Galaxolid (HHCB), Tonalid (AHTN), Phantolid, Traseolid, Crysolid a další. Po omezení užívání nitrovaných mošusových látek došlo k výraznému zvýšení spotřeby polycyklických musk sloučenin v průmyslu a k jejich následnému masovému rozšíření do všech oblastí životního prostředí [19, 28, 34].

*Dopad na životní prostředí:*

Polycyklické musk sloučeniny jsou perzistentní lipofilní látky se schopností bioakumulace. Z toxikologického hlediska jsou polycyklické musk sloučeniny potenciálně nebezpečné, protože mohou narušovat celulární metabolismus a působit jako endokrinní disruptory. Do životního prostředí se dostávají prostřednictvím odpadní vody. V ČOV dochází k akumulaci těchto látek do čistírenského kalu, odtud prostupují do půdy, zejména při použití kalu v zemědělství. Možná cesta degradace polycyklických látek je fotooxidace nebo reakce s alkylovými radikály v atmosféře [21, 23, 27, 34, 40, 41].

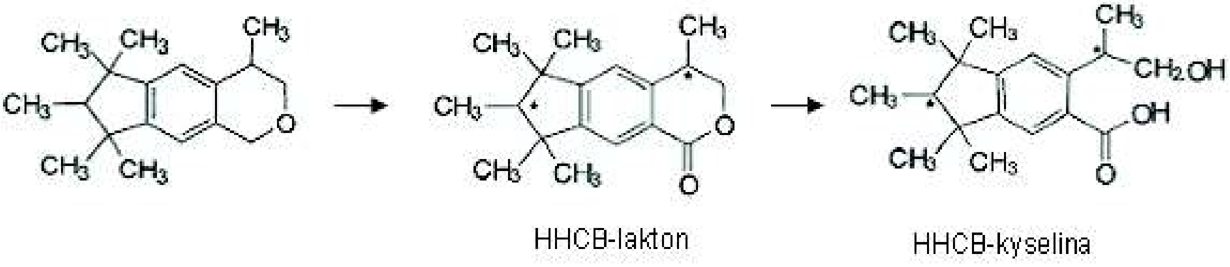
**Tabulka 3:** *Významné nitromusk sloučeniny a jejich charakteristiky* [19, 23]

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Chemický název** | 2-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-1,3,5-trinitro-benzen | | |
| **Triviální název** | Musk Baur | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{11}H_{13}N_3O_6$ | | |
| | | | |
| **Chemický název** | 4-*tert*-butyl-2,6-dimethyl-3,5-dinitroacetophenone | | |
| **Triviální název** | Musk keton | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{14}H_{18}N_2O_5$ | | |
| | | | |
| **Chemický název** | 1-*tert*-butyl-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzene | | |
| **Triviální název** | Musk xylen | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{12}H_{15}N_3O_6$ | | |
| | | | |
| **Chemický název** | 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methoxy-4-methyl-3,5-dinitro-benzene | | |
| **Triviální název** | Musk ambrette | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{12}H_{16}N_2O_5$ | | |
| | | | |
| **Chemický název** | 1,3,3,5-pentamethyl-4,6-dinitro-indan | | |
| **Triviální název** | Musk mosken | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{14}H_{18}N_2O_4$ | | |
| | | | |
| **Chemický název** | 1-*tert*-butyl-2,6,-dinitro-3,4,5-trimethyl-benzen | | |
| **Triviální název** | Musk tibeten | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{13}H_{18}N_2O$ | | |
| | | | |

*Významní zástupci polycyklických musk sloučenin*

- ***Galaxolid***

Musk sloučenina používaná ve značném množství v průmyslu. Její přítomnost ve složkách životního prostředí je zjišťována při studiích prováděných v rámci monitoringu a výzkumu zaměřeného na posouzení osudu musk sloučenin v ekosystémech. Metabolickými přeměnami vzniká HHCB-lakton, který se dále hydrolyzuje na HHCB-kyselinu. Schéma reakce je znázorněno na obrázku 11 [27].




**Obrázek 11**: *Metabolické přeměny galaxolidu*

- ***Tonalid***

Je další ze skupiny polycyklických mošusových látek. Spolu s galaxolidem patří mezi nejčastější musk kontaminanty nacházené v současnosti ve složkách vodního ekosystému [19].

- ***Phantolid, Traseolid, Celestolide***

Látky nacházené ve složkách životního prostředí. O osudu a metabolických přeměnách se ví jen velice málo informací, proto se věnuje pozornost výzkumu těchto látek [30].

### *2.6.7.3 Makrocyklické musk sloučeniny*

*Charakterizace:*

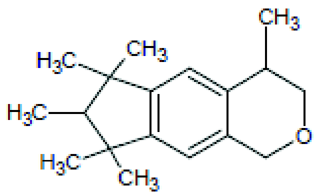
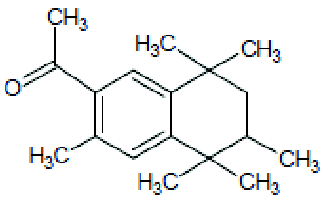
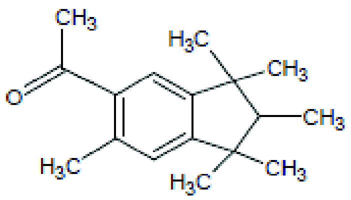
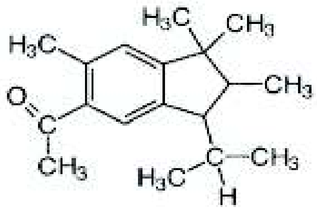
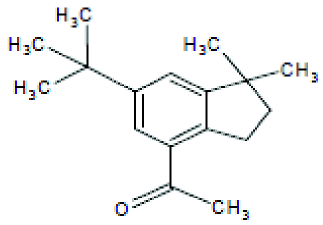
Další skupinou uměle vyráběných mošusových látek jsou makrocyklické musk sloučeniny. Molekuly látek jsou složeny z 15-ti až 17-ti uhlíkových cyklů a obsahují ketonovou nebo laktonovou skupinu (ketony, diketony, laktony, dilaktony, ketolaktony, oxalaktony a estery). Strukturně se podobají přírodním vonným látkám (ketony – živočišné, laktony – rostlinné). Byly objeveny roku 1926 ve výměšku kabara pižmového a tentýž rok uměle syntetizovány chemikem Růžičkou. V průmyslu jsou vyhledávány především proto, že mají silnější fixační účinek, jsou trvanlivější a stabilnější než nitrované a polycyklické musk sloučeniny. Díky intenzivnější vůni postačují menší množství k dosažení stejného účinku, což představuje menší zátěž pro životní prostředí. Rozšíření makrocyklických musk sloučenin brání složitý postup syntézy a vysoké výrobní náklady [19, 23, 24, 38].

Nejznámějšími látkami ze skupiny makrocyklických musk sloučenin jsou muskon, Ciceron, ethylen brassilate, dodekanediol, amberol a další. Vzhledem ke svým příznivým vlastnostem jsou makrocyklické musk sloučeniny velkou výzvou do budoucna [30].

*Dopad na životní prostředí:*

O osudu makrocyklických sloučenin v životním prostředí se ví stále velice málo. Některé uměle vyráběné sloučeniny se vyskytují v přírodě (přírodně identické látky – muskon, cyklopentadekanolid), jiné jsou jim strukturně velice blízké. Obecně jsou makrocyklické musk sloučeniny lépe degradovatelné než nitrované musk sloučeniny a mají menší estrogenní aktivitu [38].

**Tabulka 4:** *Významné polycyklické sloučeniny a jejich charakteristiky* [19, 23, 28]

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Chemický název** | 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyklopenta-γ-2-benzopyran | | |
| **Triviální název** | Galaxolid | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{18}H_{26}O$ | | |
| **Zkratka** | HHCB | | |
| **Chemický název** | 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyltetralin | | |
| **Triviální název** | Tonalid | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{18}H_{26}O$ | | |
| **Zkratka** | AHTN | | |
| **Chemický název** | 6-acetyl-1,1,2,3,3,5-hexamethyl-dihydro-inden | | |
| **Triviální název** | Phantolid | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{17}H_{24}O$ | | |
| | | | |
| **Chemický název** | 5-acetyl-1,1,2,6-tetramethyl-3-isopropylinden | | |
| **Triviální název** | Traseolid | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{18}H_{26}O$ | | |
| | | | |
| **Chemický název** | 4-acetyl-1,1-dimethyl-6-*tert*-butylinden | | |
| **Triviální název** | Celestolid | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{17}H_{24}O$ | | |
| | | | |

*Významní zástupci makrocyklických musk sloučenin*

- ***Muskon***

Jedná se o látku, která se vyskytuje v sekretu kabara pižmového. V současnosti je vyráběna uměle (přírodně identická látka) a je užívána v kosmetickém průmyslu pro svou sladkou vůni a dobré ustalovací charakteristiky [19].

- ***Civeton***

Sladce vonící makrocyklická musk sloučenina, ceněná pro svoji schopnost ustalovat jejich vůni při použití v parfémech [19].

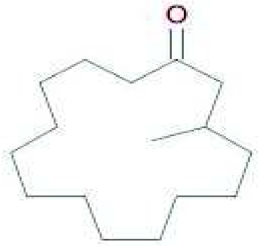
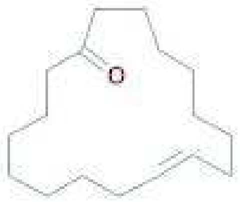
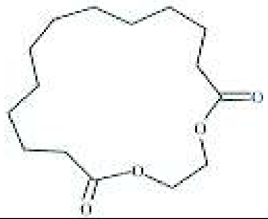
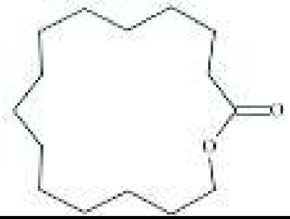
- ***Etylenbrassylat***

Sladce, květinově vonící látka, našla uplatnění v kosmetickém průmyslu i parfumerii [19].

- ***Cyclopentadecanolid***

Přírodně identická musk sloučenina, přírodně se vyskytuje v kořenu anděliky lékařské. Užívá se v parfumerii a kosmetickém průmyslu [19].

**Tabulka 5:** *Významné makrocyklické sloučeniny a jejich charakteristiky* [19, 23, 38]

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Chemický název** | 3-methylcyclopentadecan-1-one | | |
| **Triviální název** | Muskon | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{16}H_{30}O$ | | |
| **Chemický název** | (9Z)-cykloheptadek-9-en-1-on | | |
| **Triviální název** | Civeton | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{17}H_{30}O$ | | |
| **Chemický název** | 1,4-dioxacycloheptadecane-5,17-dione | | |
| **Triviální název** | Ethylenbrassylat | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{15}H_{26}O_4$ | | |
| **Chemický název** | 16-oxacyclohexadecan-1-one | | |
| **Triviální název** | Cyclopentadecanolid | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{15}H_{28}O_2$ | | |

### 2.6.7.4 Alicyklické musk sloučeniny

*Charakterizace:*

Nejméně prozkoumanou skupinou umělých vonných látek jsou alicyklické (lineární) musk sloučeniny. Po chemické stránce jsou lineární musk sloučeniny estery cyklohexanu. Alicyklické musk sloučeniny jsou poměrně nedávno objevenou skupinou látek. V roce 1975 byla syntetizována sloučenina cyklomusk a od ní byly postupně odvozeny další. Vývoj těchto látek byl iniciován potřebou nahradit nitromusk a polycyklické musk sloučeniny novými vonnými sloučeninami, které by měly menší dopad na ŽP [24, 39].

Známé alicyklické musk sloučeniny jsou například cyklomusk, helvetolid, romandolid a citronelyl oxalát. Alicyklické mošusové látky jsou v současnosti středem zájmu mnoha vědců, kteří se snaží objasnit nejen jejich osud a chování v životním prostředí, ale také vlivy na organismy [39].

*Dopad na ŽP:*

Vzhledem k tomu, že alicyklické musk sloučeniny jsou poměrně novou skupinou, je v současné době k dispozici velmi málo studií zabývajících se osudem těchto látek v životním prostředí a jejich vlivem na organismy [39].

*Významní zástupci alicyklických musk sloučenin*

- ***Cyklomusk***

První objevená musk sloučenina ze skupiny alicyklických mošusových látek, má charakteristické jahodové aroma [39].

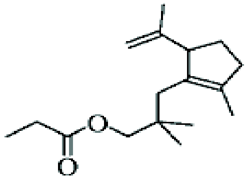
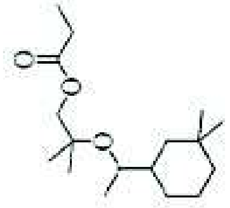
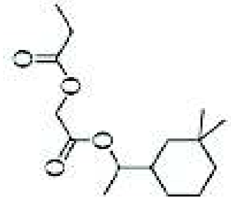
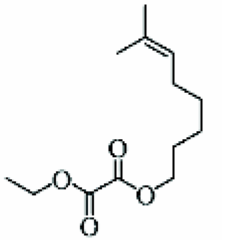
- ***Helvetolid, romandolid***

Látky s příjemnou ovocnou vůní [39].

- ***Citronelyl oxalát***

Nedávno objevená sloučenina s výraznou vůní růží, v parfumerii se nepoužívá kvůli vysokému prahu citlivosti vnímání [39].

**Tabulka 6:** *Významné alicyklické musk sloučeniny a jejich charakteristiky* [39]

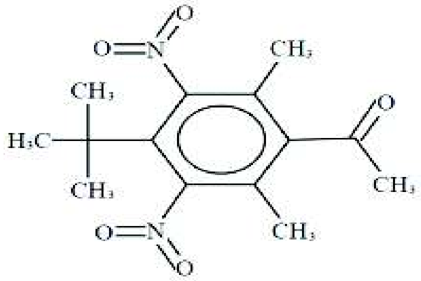
| | | | |
|---|---|---|---|
| **Chemický název** | 2,2-dimethyl-3-(2-methyl-5-prop-1-en-2-yl-1-cyklopentenyl) propyl propanoát | | |
| **Triviální název** | Cyklomusk | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{17}H_{28}O_2$ | | |
| | | | |
| **Chemický název** | 2-(1-(3',3'-dimethyl-1'-cyclohexyl)ethoxy)-2-methyl propyl propanoate | | |
| **Triviální název** | Helvetolid | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{17}H_{32}O_3$ | | |
| | | | |
| **Chemický název** | 1-[(3',3'-dimethyl-1'-cyclohexyl)-ethoxycarbonyl]methyl propanoate | | |
| **Triviální název** | Romandolid | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{15}H_{26}O_4$ | | |
| | | | |
| **Chemický název** | 1-O-(3,7-dimethylokt-6-enyl) 2-O-ethyl oxalát | | |
| **Triviální název** | Citronellyl oxalát | **Struktura** |  |
| **Vzorec** | $C_{14}H_{24}O_4$ | | |
| | | | |

## *2.7 Sledovaní zástupci*

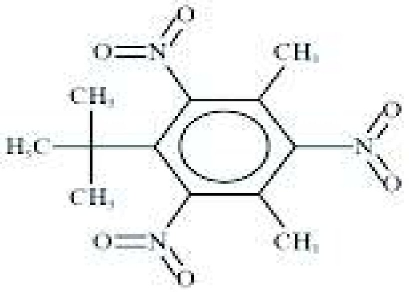
Pro zjišťování musk sloučenin v reálných vzorcích byly vybráni čtyři zástupci z polycyklických musk sloučenin (galaxolid, tonalid, traseolit a phantolid) a pět látek ze skupiny nitromusk sloučenin (musk keton, musk xylen, musk mosken, musk tibeten a musk ambrette). Tyto látky byly vybrány především proto, že jsou v ekosystémech nejčastěji detekovány, což prokázaly studie zaměřené na přítomnost musk látek v ekosystémech. Je to především vzhledem k jejich masovému a neuváženému používání v minulosti a schopnosti kumulace a perzistence v přírodním prostředí.

Základní údaje o těchto látkách jsou shrnuty v tabulkách 7-15 [19, 23, 24, 34].

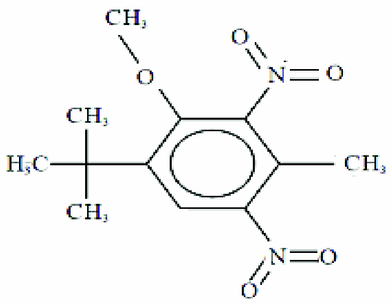
**Tabulka 7:** *Základní vlastnosti musk ketonu*

| Triviální název | Chemický název (IUPAC) | | Vzorec |
|---|---|---|---|
| Musk keton | 4-*tert*-butyl-2,6-dimethyl-3,5-dinitroacetophenone | | $C_{14}H_{18}N_2O_5$ |
| **Strukturní vzorec** |  | **Vlastnosti** | bílá až světle žlutá krystalická látka vonící po mýdle |
| **log Kow** | **Molekulová hmotnost** | **CAS** | **Tlak nasycených par** |
| 4,31 | 294,30 | 81-14-1 | 0,000 04 Pa |

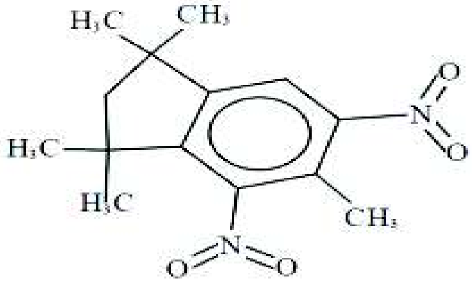
**Tabulka 8:** *Základní vlastnosti musk xylenu*

| Triviální název | Chemický název (IUPAC) | | Vzorec |
|---|---|---|---|
| Musk xylen | 1-*tert*-butyl-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzene | | $C_{12}H_{15}N_3O_6$ |
| **Strukturní vzorec** |  | **Vlastnosti** | bílý až světle žlutý jemný krystalický prášek se slabou mýdlovou vůní |
| **log Kow** | **Molekulová hmotnost** | **CAS** | **Tlak nasycených par** |
| 4,45 | 297,24 | 81-15-2 | 0,000 03 Pa |

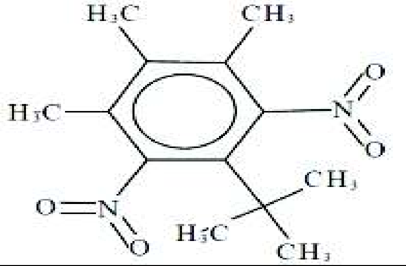
**Tabulka 9:** *Základní vlastnosti musk ambrette*

| Triviální název | Chemický název (IUPAC) | | Vzorec |
|---|---|---|---|
| Ambrette | 1-(1,1-Dimethylethyl)-2-methoxy-4-methyl-3,5-dinitro-benzene | | $C_{12}H_{16}N_2O_5$ |
| **Strukturní vzorec** |  | **Vlastnosti** | světležlutý prášek nasládlé až zatuchlé vůně po semenech ibišku jedlého |
| **log Kow** | **Molekulová hmotnost** | **CAS** | **Tlak nasycených par** |
| 4,17 | 268,27 | 83-66-9 | --- mbar |

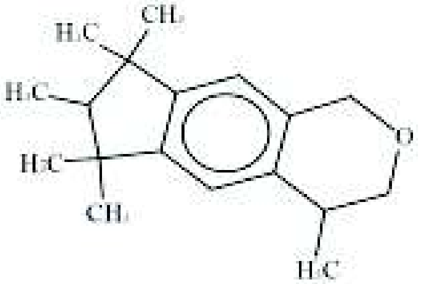
**Tabulka 10:** *Základní vlastnosti musk moskenu*

| Triviální název | Chemický název (IUPAC) | | Vzorec |
|---|---|---|---|
| Mosken | 1,3,3,5-pentamethyl-4,6-dinitro-indan | | $C_{14}H_{18}N_2O_4$ |
| **Strukturní vzorec** |  | **Vlastnosti** | žlutý krystalický prášek sladké vůně |
| **log Kow** | **Molekulová hmotnost** | **CAS** | **Tlak nasycených par** |
| 5,39 | 280,32 | 116-66-5 | --- mbar |

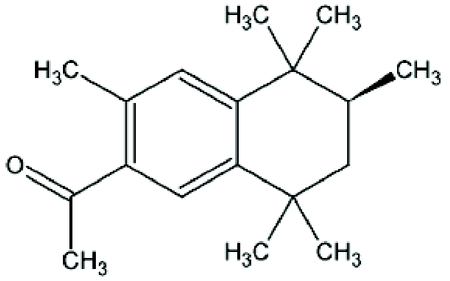
**Tabulka 11:** *Základní vlastnosti musk tibetenu*

| Triviální název | Chemický název (IUPAC) | | Vzorec |
|---|---|---|---|
| Tibeten | 1-*tert*-butyl-2,6,-dinitro-3,4,5-trimethyl-benzen | | $C_{13}H_{18}N_2O$ |
| **Strukturní vzorec** |  | **Vlastnosti** | světle žlutá krystalická látka nasládlé vůně |
| **log Kow** | **Molekulová hmotnost** | **CAS** | **Tlak nasycených par** |
| 4,69 | 266,3 | 145-39-1 | --- mbar |

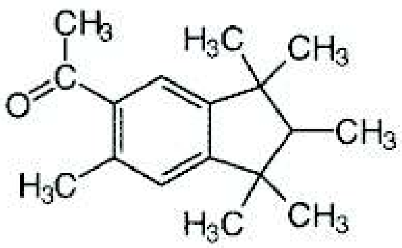
**Tabulka 12:** *Základní vlastnosti galaxolidu*

| Triviální název | Chemický název (IUPAC) | | Vzorec |
|---|---|---|---|
| Galaxolid (HHCB) | 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyklopenta-γ-2-benzopyran | | $C_{18}H_{26}O$ |
| **Strukturní vzorec** |  | **Vlastnosti** | bezbarvá čirá viskózní kapalina se silnou sladkou květinovou vůní |
| **log Kow** | **Molekulová hmotnost** | **CAS** | **Tlak nasycených par** |
| 5,9 | 258,4 | 1222-05-5 | 0,060 8 Pa |

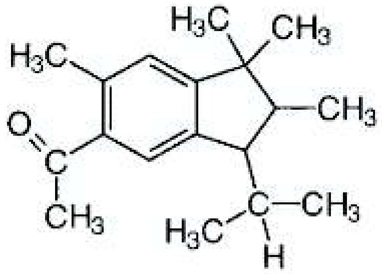
**Tabulka 13:** *Základní vlastnosti tonalidu*

| Triviální název | Chemický název (IUPAC) | | Vzorec |
|---|---|---|---|
| Tonalid (AHTN) | 1-(5,6,7,8-tetryhydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naphthalenyl)-ethynone | | $C_{18}H_{26}O$ |
| **Strukturní vzorec** |   | **Vlastnosti** | bílá krystalická látka se silnou sladkou vůní |
| **log Kow** | **Molekulová hmotnost** | **CAS** | **Tlak nasycených par** |
| 5,4 | 258,4 | 21145-77-7 | 0,072 7 Pa |

**Tabulka 14:** *Základní vlastnosti phantolidu*

| Triviální název | Chemický název (IUPAC) | | Vzorec |
|---|---|---|---|
| Phantolid | 6-acetyl-1,1,2,3,3,5-hexamethyl-dihydro-inden | | $C_{17}H_{24}O$ |
| **Strukturní vzorec** |   | **Vlastnosti** | našedlá krystalická látka se silně nasládlou ovocnou vůní |
| **log Kow** | **Molekulová hmotnost** | **CAS** | **Tlak nasycených par** |
| 5,85 | 244,37 | 15323-35-0 | 0,019 6 mbar |

**Tabulka 15:** *Základní vlastnosti traseolidu*

| Triviální název | Chemický název (IUPAC) | | Vzorec |
|---|---|---|---|
| Traseolid | 5-acetyl-1,1,2,6-tetramethyl-3-isopropylinden | | $C_{18}H_{26}O$ |
| **Strukturní vzorec** |   | **Vlastnosti** | světle žlutá až žlutá čirá viskózní kapalina vonící po bylinkách |
| **log Kow** | **Molekulová hmotnost** | **CAS** | **Tlak nasycených par** |
| 6,31 | 258,39 | 68140-48-7 | 0,009 1 Pa |

## *2.8 Analytické stanovení musk sloučenin*

Analytické stanovení musk sloučenin v ekosystémech je velice důležité pro hodnocení dopadu těchto látek na živé organismy včetně člověka. Přítomnost umělých musk sloučenin byla mnoha studiemi prokázána ve všech složkách životního prostředí. Musk sloučeniny jako kontaminanty jsou v přírodních matricích velmi často obsaženy pouze v malých až stopových množstvích, což musí zohledňovat techniky používané pro jejich stanovení [28].

Postup stanovení musk sloučenin ve složkách životního prostředí lze rozdělit do několika kroků:

- ***odběr vzorku (sampling),***
- ***transport a uchování vzorku (transport, storing),***
- ***úprava vzorku (sample preparation),***
- ***izolace analytu ze vzorku (isolation),***
- ***přečištění (clean up),***
- ***identifikace a kvantifikace analytu (analysis).***

Každý z jednotlivých bodů tohoto postupu je zatížen chybou stanovení. Vzhledem k tomu, že analyzované vzorky často obsahují pouze stopová množství sledovaných látek, je důležité nejen minimalizovat ztráty analytu během analýzy, ale také minimalizovat chyby stanovení, které postup zatěžují. Dalším rizikovým faktorem, kterého je třeba se vyvarovat, je kontaminace vzorku z vnějšího prostředí [9, 58].

### 2.8.1 Opatření proti vnější kontaminaci vzorku

Při analytickém stanovení musk sloučenin může docházet ke kontaminaci vzorků vlivem vnějšího prostředí. Umělé musk sloučeniny jsou běžnou součástí mycích a čistících prostředků, pracích prášků, kosmetiky i osvěžovačů vzduchu. Pro svoji semivolatilitu jsou uvolňovány do ovzduší a mohou kontaminovat vzorky během odběru i během analýzy v laboratoři. Proto je zapotřebí dbát zvýšených bezpečnostních opatření, aby ke kontaminaci nedocházelo [9, 30, 50].

Jedním ze zdrojů kontaminace může být nevhodně umyté laboratorní sklo. Detergenty určené k umývání skla obsahují velmi často vysoké koncentrace musk sloučenin, a proto nejsou vhodné k čištění laboratorního skla určeného pro analytické stanovení těchto látek. Pro čištění je vhodné zvolit postup, při kterém se použije vhodné rozpouštědlo namísto detergentu a důležité je především oplachování dostatečným množstvím čisté vody a sušení při vyšší teplotě. Hlavním zdrojem kontaminace, ke které může dojít jak v místě odběru vzorku, tak také při analýze v laboratoři, je člověk. Přípravky používané pro osobní hygienu (mýdlo, šampon, deodorant), kosmetika (lak na vlasy, parfém, pudr) i přípravky používané na prádlo (prací prášek, aviváž), obsahují umělé musk sloučeniny, které se během práce mohou uvolnit do ovzduší a mohou vzorek touto cestou kontaminovat. Je proto důležité vyvarovat se nadměrnému používání vonných mýdel a parfémů během práce v laboratoři, omezit používání vonných aviváží na oblečení a podobně. Dalšími kroky, kterými eliminujeme znečištění vlivem vnějšího prostředí, jsou nepoužívání osvěžovačů vzduchu a podobných vonných produktů a především dostatečné větrání laboratoře (nižší teplota znamená menší těkavost vonných látek). Při práci se vzorky a především se standardy postupujeme opatrně, avšak současně v co nejkratším čase, aby nedošlo k vytěkání vonných látek do ovzduší (vzorky i standardy uchováváme vždy těsně uzavřené a v chladu) [9, 30, 50, 57].

## 2.8.2 Odběr vzorku

Vzorkování je velice důležitým krokem v procesu analytického stanovení musk sloučenin. Chyby vzniklé při odběru vzorku není možné během analytického postupu odstranit a mají významný vliv na výsledky celé analýzy. Odběr vzorku probíhá různými způsoby a rozhodujícím faktorem pro výběr metody je skupenství vzorkované matrice a vlastnosti analytu. V souvislosti s musk sloučeninami bývají nejčastěji analyzovány složky vodního ekosystému (voda, kal a sediment, biota). Při vzorkování je kladen důraz na reprezentativnost odebraného vzorku (série vzorků), na jehož výsledcích analýzy bude založeno hodnocení výskytu analytu v celé vzorkované oblasti [9, 46, 47, 49, 50, 58].

### *2.8.2.1 Odběr vody*

Vzorkování vody (odpadní, povrchové) se provádí za použití skleněných vzorkovnic z tmavého skla nebo neprůsvitných plastových nádob s těsným víkem. Vzorkovnice je potřeba čistit speciálními postupy, aby se zabránilo kontaminaci. Tmavé nádoby zajišťují ochranu před procesy fotodegradace, přesto je však nutné vzorek po odebrání co nejrychleji umístit do chladna a temna. Množství odebraného vzorku závisí na rozsahu analýzy, většinou postačuje 0,1-2 l vody. Vzorkovnice by měla být naplněna až po okraj, aby se minimalizovala přítomnost kyslíku u vzorku a nedocházelo k oxidačním rozkladným reakcím a podpoře metabolických přeměn aerobních mikroorganismů. Zároveň se eliminuje možnost vytěkání musk sloučenin do plynné fáze nad kapalinou, což by způsobilo ztráty po otevření vzorkovnice (vytěkání musk látek do ovzduší). Při vzorkování musí být zaznamenán přesný postup odběru vzorku, včetně podmínek vzorkování (lokalita, klimatické podmínky, způsob odběru, množství odebraného vzorku atd.) [9, 47, 49, 50].

### *2.8.2.2 Odběr kalu, sedimentu*

Vzorkování pevných matric pro analýzu musk sloučenin se provádí podobně jako odběr kapalného vzorku. Používané pomůcky musí být speciálně čištěny, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. Odebírá se více vzorků z různých míst a ty jsou poté smíchány. Směsný vzorek se dále skladuje a upravuje dle potřeb analýzy [9, 47, 50].

### *2.8.2.3 Odběr biotických vzorků*

Biotické vzorky odebírané z akvatického ekosystému jsou především ryby a jiní drobní živočichové (mušle, krabi). Odběr biotických vzorků se provádí řízeným odlovem příslušných organismů podle předem vytvořeného plánu v souladu s platnou legislativou. Vzorkování musí probíhat v souladu se zákonem na ochranu zvířat a pod dohledem příslušných vodohospodářských orgánů [9, 47].

## 2.8.3 Transport a uchování vzorku

Odběrová místa jsou často hodně vzdálená od laboratoře, kde se provádí analýza vzorků. Je důležité dodržovat jistá opatření během transportu vzorku do laboratoře a podmínky uchování vzorku v laboratoři před vlastní analýzou, aby nedošlo ke znehodnocení vzorku nebo ke ztrátám analytu [9, 47].

#### 2.8.3.1 Transport vzorku

Při transportu vzorku do laboratoře a uchování vzorku v laboratoři do provedení analýzy je zapotřebí dodržovat některá pravidla, aby nedošlo ke znehodnocení vzorků a minimalizovalo se ovlivnění obsahu analytu ve vzorku. Musk sloučeniny jsou semivolatilní látky, které mohou podléhat fotodegradaci a termodegradaci, a proto je důležité pro odběr a transport vzorku používat vzorkovnice z tmavého skla, popřípadě z neprůsvitného plastu. Transport do laboratoře by měl být proveden v krátkém čase a během transportu by se vzorky neměly vystavovat vysokým teplotám, ale měly by být uchovány v temnu a chladnu (chladící boxy). Velice důležitá je těsnost víčka vzorkovnice, aby nedocházelo k těkání analytu nebo kontaminaci vlivem vnějšího prostředí [47, 50, 58].

#### 2.8.3.2 Uchování vzorku

Doba od odběru vzorku do provedení analýzy ovlivňuje stanovení; čím déle vzorek skladujeme, tím větší je pravděpodobnost ztráty analytu (biodegradace, fotodegradace, termolýza, sorpce na stěnu vzorkovnice, oxidace, těkání). Analýza vzorků v laboratoři by měla proběhnout bezprostředně po transportu, nebo co nejdříve je to možné. Pokud je zapotřebí vzorky skladovat, měly by být dodrženy podmínky, které minimalizují ztrátu analytu. Především je opět důležité použít tmavé vzorkovnice s těsným víkem (fotodegradace, termodegradace, volatilita); ideální je skladovat vzorky v nádobách, do kterých byl proveden odběr, aby nedocházelo ke ztrátám analytu a ke kontaminaci při manipulaci se vzorkem. Vzorky je vhodné uchovávat při teplotách +4 až -20 °C (lednice, mraznička), biotické vzorky hluboce zmrazené na teplotu až -70 °C [9, 47, 50].

### 2.8.4 Úprava vzorku

Před analýzou je zapotřebí některé vzorky upravit, především vzorky pevné, tj. biota, kal, sediment. Přípravou tuhých vzorků před analýzou se rozumí sušení vzorku a homogenizace.

#### 2.8.4.1 Sušení

Sušení je nejčastěji používaný způsob předúpravy vzorků. Odstranění vody ze vzorku umožňuje lepší homogenizaci a snadnější manipulaci se vzorkem. Odstranění vlhkosti je důležité také z hlediska analýzy. Moderní analytické přístroje jsou citlivé na obsah vody, a proto je důležité vlhkost vzorku minimalizovat. Sušení vzorku může probíhat třemi způsoby:

- ***sušení při laboratorní teplotě***

běžně používaný způsob sušení, nedochází k výrazným ztrátám analytu, ale hrozí kontaminace vzorku z prostředí; proto je nutné sušit vzorek v čisté a větrané místnosti

- ***sušení při zvýšené teplotě***

není vhodný pro úpravu vzorku obsahující semivolatilní a volatilní analyty (vytěkání, tepelná degradace), ale je to jediný způsob, jak odstranit ze vzorku chemicky vázanou vodu; uskutečňuje se volně nad plamenem, v pecích nebo sušárnách

- ***sušení pomocí sorpčních materiálů***

metoda vhodná při analýzách semivolatilních látek; jako sorpční materiál se používá silikagel, síran sodný, síran měďnatý a další. Pomocí této techniky lze odstraňovat vlhkost i z kapalných extraktů; výhodou je, že nedochází ke kontaminaci z okolí [45, 47].

#### *2.8.4.2 Homogenizace*

Homogenizace vzorku je velice důležitá. Pro analýzu používáme z celého odebraného vzorku často jen malý zlomek a homogenizací proto zajistíme rovnoměrné zastoupení analytu v celém objemu odebraného vzorku. Homogenizace znamená rozmělnění pevného vzorku na malé částice, čímž dochází ke zvětšení aktivního povrchu vzorku a k efektivnější izolaci analytu z matrice. Homogenizace se provádí ručně (třecí miska) nebo za použití laboratorních přístrojů (mlýnek, mixér). Důležitá je především při úpravě biologických vzorků, kdy dochází k narušení biologické tkáně, což má za následek snadnější izolaci analytu z buněk [9, 46, 47, 49].

### 2.8.5 Biotická matrice

Pro potřebu environmentálního monitoringu obsahu umělých musk sloučenin v životním prostředí je nutné stanovit obsah těchto polutantů nejen v anorganických matricích, ale také ve vzorcích živých organismů. Nejčastějšími vzorky biotického původu, ve kterých se musk kontaminanty stanovují, jsou vodní organismy, dále pak vzorky lidské krve a mateřského mléka [26].

Biotické matrice jsou složité směsi organických látek, které ztěžují stanovení konkrétních analytů. Velice důležitým krokem při analýze organických vzorků je izolace analytu z biotické matrice a následné přečištění vzorku, aby nedocházelo ke znehodnocování výsledků analýzy a ke znečištění přístrojů používaných k identifikaci a kvantifikaci analytu balastními látkami [26].

Pro extrakci analytu z kapalných vzorků (krev, krevní plazma a mléko) se používají metody extrakce kapalina-kapalina (LLE) a extrakce na tuhou fázi (SPE). Pro extrakci pevných matric se aplikují především techniky extrakce kapalinou (LSE) [25, 26, 34].

Na přečištění extraktu po izolaci analytu se využívá metod sloupcové (kolonové) a gelové permeační chromatografie, dialýzy a extrakce na pevnou fázi [25, 26, 34].

### 2.8.6 Izolace analytu ze vzorku

Účinná izolace musk sloučenin ze vzorku je rozhodujícím krokem v procesu analýzy. Cílem metody je získání analytu ze vzorku, a to s maximální výtěžností a bez nežádoucích příměsí. K izolaci analytu ze vzorku se používají různé extrakční techniky. Zvolená metoda izolace by měla být efektivní, jednoduchá, rychlá a levná. Hlavním cílem je vyextrahovat co největší množství analytu ze vzorku, a to v relativně krátké době. Důležité je nejen vybrat správnou metodu extrakce, ale před vlastní extrakcí vybranou metodu optimalizovat [30, 45].

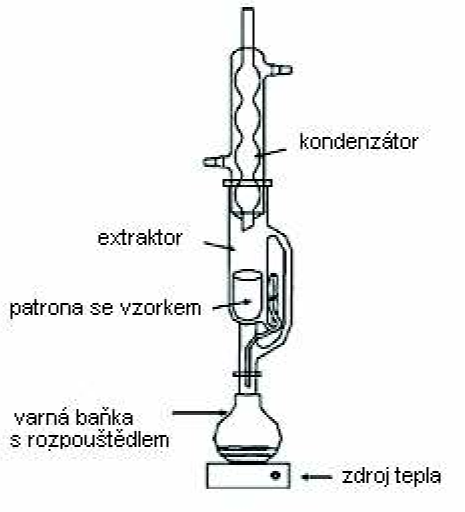
K izolaci musk sloučenin z pevných biotických vzorků (rybí tkáň) jsou využívány především techniky extrakce tuhé fáze kapalinou (LSE). Při LSE dochází k přestupu analytu z pevné matrice do rozpouštědla, v závislosti na rozpustnosti analytu v daném rozpouštědle. Proto se volí rozpouštědlo, ve kterém je daný analyt nejvíce rozpustný. Vhodná jsou selektivní rozpouštědla, která do sebe extrahují pouze daný analyt a jen minimum dalších látek a nečistot. Optimalizuje se množství rozpouštědla tak, aby spotřeba na extrakci byla minimální, ale aby současně došlo k dostatečné extrakci analytu [45, 49, 51, 58, 61].

Při extrakci často dochází ke koextrakci dalších látek spolu s analytem; tyto látky mohou způsobovat chyby při analýze a poškozovat analytické přístroje, a proto je nutné před samotnou analýzou extrakty dále upravit (přečištění vzorku). Zvýšení rozpustnosti lze docílit správnou volbou teploty a přestup látek se urychlí zvětšením aktivního povrchu vzorku (rozmělnění) [46, 49, 51, 58].

Vhodné metody izolace analytu z pevných biotických vzorků jsou - Soxhletova extrakce, zrychlená, tlakem podporovaná extrakce rozpouštědlem (PSE, ASE, PFE), ultrazvuková extrakce (sonikace) a mikrovlná extrakce (MASE).

#### *2.8.6.1 Soxhletova extrakce*

Soxhletova extrakce je nejčastěji využívaná technika izolace analytu z pevných materiálů. Principem metody je cyklická extrakce analytu rozpouštědlem. Vzhledem k vysoké teplotě, která je během extrakce udržována, není tato technika vhodná pro termolabilní analyty. Nevýhodou Soxhletovy extrakce, v porovnání s jinými technikami, je poměrně dlouhá doba potřebná na vyextrahování analytu ze vzorku (několik hodin až dnů), omezená použitelnost směsných rozpouštědel a vyšší spotřeba rozpouštědla. Výhodou je její jednoduchost a nízká cena zařízení [48, 49, 58].




**Obr. 12:** *Přístroj pro Soxhletovu extrakci*

Při Soxhletově extrakci je vzorek (po vysušení síranem sodným) převeden do papírové patrony umístěné v těle extraktoru nad varnou baňkou s rozpouštědlem. Zahříváním rozpouštědla nad teplotu varu dojde k jeho vypařování. Páry čistého rozpouštědla kondenzují v chladiči a stékají do patrony se vzorkem. V patroně dochází k přestupu analytu do rozpouštědla; po naplnění patrony rozpouštědlem je směs rozpouštědla a analytu vypuštěna zpět do varné baňky. Tento cyklus se neustále opakuje, přičemž je vzorek extrahován vždy čerstvým rozpouštědlem a analyt se hromadí ve varné baňce. Důležitá je volba rozpouštědla a teploty extrakce. [48, 49, 53, 58, 61]

Soxhletova extrakce existuje v několika modifikacích:

- *Vysokotlaká Soxhletova extrakce*
- *Automatizovaná Soxhletova extrakce (Soxtec)*
- *Ultrazvuková Soxhletova extrakce*
- *MA Soxhletova extrakce*

#### *2.8.6.2 Ultrazvuková extrakce (sonikace)*

Nejjednodušším typem extrakce analytu z pevné matrice je ultrazvuková extrakce (sonikace) pomocí rozpouštědla, prováděná při laboratorní teplotě. Principem sonikace je vystavení vzorku s rozpouštědlem účinkům ultrazvuku. Výhodou této techniky je relativně nízká teplota, která umožňuje extrakci i termicky nestabilních látek, a nízké pořizovací náklady. Doba potřebná na extrakci analytu z matrice je v porovnání se Soxhletovou extrakcí mnohem menší (minuty až hodiny), stejně jako spotřeba rozpouštědla. Nevýhodou sonikace je nízká výtěžnost, a proto se ultrazvuk nejčastěji používá v kombinaci s jinými technikami extrakce (např. Soxhlet).

Při sonikaci je baňka obsahující vzorek a rozpouštědlo umístěna do ultrazvukové lázně nebo ultrazvukové sondy tak, aby hladina vody v lázni byla souběžná s hladinou rozpouštědla v baňce (reprodukovatelnost, maximální účinnost). Při průchodu ultrazvuku kapalinou (rozpouštědlem) dochází k expanzi, zvýšení tlaku a k tvorbě bublin. Při zániku (implozi) vzniklých bublin dochází v přítomnosti pevné látky ke vzniku proudění. Vzniklý proud rozpouštědla je velice rychlý a silný, což umožňuje prostoupení rozpouštědla do pevné matrice a účinnou extrakci analytu v poměrně krátkém čase [48, 49, 61, 62].

#### *2.8.6.3 Mikrovlná extrakce*

Mikrovlnná extrakce s použitím rozpouštědla (MASE) je založena na působení mikrovln (neionizující záření o frekvenci 300-300 000 MHz) na rozpouštědlo nebo přímo na samotný vzorek s analyty. Principem metody je zahřátí rozpouštědla a vzorku pomocí energie mikrovlnného záření; podmínkou je přítomnost dielektrické látky schopné absorbovat mikrovlnou energii (polární rozpouštědlo) a použití nádoby, která neabsorbuje mikrovlny (např. teflon). Hlavním přínosem techniky MASE je snížení potřebné doby extrakce (možnost extrahovat více vzorků najednou, rychlejší ohřev směsi vzorku a rozpouštědla) a množství rozpouštědla potřebného pro extrakci analytu. Další výhodou je snadná reprodukovatelnost a relativně vysoká efektivita (velká výtěžnost) použité techniky [48, 49, 58, 61].

Extrakční zahřívání probíhá několika mechanismy:

- vzorek je ponořen do rozpouštědla, které velmi silně pohlcuje mikrovlny
- vzorek je ponořen v kombinovaném rozpouštědle, které obsahuje složky v různých poměrech, a to s vysokou i nízkou dielektrickou konstantou
- vzorky, které mají vysokou dielektrickou konstantu, mohou být extrahovány transparentním rozpouštědlem.

*Pressurized MAE extraction (PMAE)*

Vzorek je umístěn společně s rozpouštědlem, které silně absorbuje mikrovlny (vysoká dielektrická konstanta) do uzavřené patrony. Při extrakci dochází ke zvýšení tlaku a teploty, což má za následek efektivnější extrakci analytu.

*Focused MAE extraction (FMAE)*

Vzorek je umístěn do otevřené nádoby s rozpouštědlem, které neabsorbuje mikrovlnné záření. Extrakce probíhá za atmosférického tlaku. Energie záření je pohlcována vzorkem (nutná vysoká dielektrická konstanta), který se lokálně ohřívá, a analyty jsou extrahovány do chladnějšího rozpouštědla. Výhodou je možnost extrakce tepelně nestabilních látek [49, 58, 61].

#### 2.8.6.4 Metody zrychlené tlakové extrakce rozpouštědlem

Metody pro zrychlenou extrakci jsou:

- *PSE (Pressurized Solvent Extraction) – extrakce podporovaná tlakem*
- *ASE (Accelerated Solvent Extraction) – zrychlená extrakce rozpouštědlem*
- *PFE (Pressurized Fluid Extraction) – extrakce tekutinou pod tlakem*

Principem těchto metod je působení organického rozpouštědla na tuhý (popř. polotuhý) vzorek za zvýšené teploty (50-200 °C) a tlaku (cca 10-15 MPa). Hlavní výhodou je podstatné snížení doby potřebné pro extrakci (v řádu minut) a snížení množství organického rozpouštědla oproti ostatním metodám. Jako extrakční činidlo se používá polární nebo také nepolární organické rozpouštědlo, popřípadě směs rozpouštědel o známém poměru složek. Díky vysoké teplotě během extrakce dochází ke snížení viskozity a povrchového napětí rozpouštědla a zvyšuje se jeho kapacita. Tím dochází k efektivnější extrakci v krátké době. Současně musí být v systému udržován vysoký tlak, aby rozpouštědlo zůstalo v kapalné fázi [48, 49, 51, 58, 61].

**_Extrakce podporovaná tlakem_**

V práci byla pro izolaci musk sloučenin ze vzorku rybí tkáně vybrána metoda PSE – extrakce podporovaná tlakem na přístroji *one*PSE.

Principem této metody je izolace analytu z pevného vzorku za použití organického rozpouštědla při vysoké teplotě a tlaku. Vzorek je před extrakcí potřeba rozetřít s matrix nebo $Na_2SO_4$ (dojde k vysušení a zvětšení aktivního povrchu pro styk s rozpouštědlem). Poté je směs umístěna do nerezové patrony a vložena do extrakční cely přístroje. K patroně se vzorkem je přivedeno rozpouštědlo a vše se zahřívá na zvolenou teplotu (vyšší teplota než bod varu rozpouštědla). Extrakce při vysoké teplotě probíhá rychleji (vyšší difuzní rychlost, větší rozpustnost analytu, vyšší kapacita rozpouštědla) a efektivněji. Aby rozpouštědlo zůstalo v kapalném stavu, udržuje se v přístroji vysoký tlak. Zvýšený tlak napomáhá rychlejší a účinnější extrakci tím, že tlačí rozpouštědlo do pórů matrice a analyty tak snadněji difundují do roztoku. Při nastaveném tlaku a teplotě probíhá extrakce po dobu, kterou je nutno optimalizova; poté je extrakt vypuštěn do vialky. Celý cyklus lze libovolně opakovat. Konečným krokem je promytí patrony se vzorkem rozpouštědlem [48, 49, 57, 58, 61].

Optimalizace metody PSE zahrnuje volbu rozpouštědla, vhodné teploty, tlaku, doby zádrže a počtu cyklů. Optimalizace probíhá za změny jednoho z proměnných parametrů, ostatní zůstávají konstantní. Vhodné rozpouštědlo se volí na základě polarity látky, kterou chceme extrahovat (pro polární analyty se volí polární rozpouštědlo a pro nepolární analyty se volí nepolární rozpouštědlo), rozpustnosti analytu v daném rozpouštědle a selektivity rozpouštědla pro danou látku (aby nedocházelo ke koextrakci zbytečných nečistot). Doporučená teplota extrakce by měla být vyšší než je bod varu samotného rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel zvolených pro extrakci (zvýšená o 50 %). S teplotou souvisí tlak systému, který by měl zaručovat udržení rozpouštědla v kapalném stavu i při tak vysoké teplotě. Počet cyklů a doba zádrže se volí tak, aby extrakce proběhla s maximální efektivností, ale v co nejkratším čase. Výsledkem optimalizace je metoda, která zaručuje nejúčinnější extrakci analytu z matrice [48, 49, 51, 57, 58, 61].

Metoda PSE je v praxi používaná pro izolaci semivolatilních organických sloučenin (PCB, PCDDs, PCDFs, pesticidy, herbicidy, musk sloučeniny). Pro svoji jednoduchost a dobrou reprodukovatelnost byla validována pro izolaci analytu z pevné matrice v řádech µg/kg [49].

## 2.8.7 Přečištění

Při extrakci analytu ze vzorku dochází současně k vyextrahování dalších látek, které jsou pro následné analytické stanovení nežádoucí. Čištění extraktu je důležitou součástí analýzy, při které dochází k odstranění nežádoucích příměsí, které by způsobovaly zkreslení výsledků. Mezi rizikové látky patří lipidy (kontaminace inletu nebo kolony plynového chromatografu) a organické sloučeniny (koeluce cílových analytů s ostatními kontaminanty, indiference píků, kolísání odezvy, zvýšení šumu) [45, 47].

K přečištění extraktu se používají vhodné metody, které zaručují odstranění nečistot bez vlivu na kvalitu a kvantitu stanovovaného analytu. Čištění lze provádět dvěma způsoby:

- *působením chemických činidel*
- *aplikací separačních metod*

Nejčastějšími způsoby přečištění vzorku po extrakci jsou gelová permeační chromatografie (GPC) a adsorpční kolonová chromatografie [30, 47].

### *2.8.7.1 Gelová permeační chromatografie*

Gelová permeační chromatografie je nejčastěji používaná nedestruktivní metoda čištění extraktu z rostlinných a živočišných materiálů. Používá se pro odstranění interferujících látek (lipidy, proteiny) z extraktu obsahujícího analyt. Separace látek probíhá na základě různých velikostí molekul (molekulárně sítový efekt). Při gelové permeační chromatografii jsou používány kolony různých rozměrů (od 50 x 10 mm až po 600 x 25 mm) naplněné sorbetem (gelem). Volba gelu závisí na vlastnostech separovaných látek; hydrofilní gely se volí pro látky rozpustné ve vodě (Sephadex), hydrofóbní gely (Styragel) pro látky ve vodě nerozpustné. Pro oba typy analytu jsou pak vhodné univerzální gely na bázi silikagelu a porézních skel. Mobilními fázemi mohou být aromatické, chlorované a některé heterocyklické organické látky [51, 54].

Při gelové permeační chromatografii dochází k rozdělení látek mezi pohyblivou a stagnující část mobilní fáze. Chromatografická kolona obsahuje gel o známé velikosti pórů, které jsou vyplněny tzv. stagnující mobilní fází. Při průchodu vzorku kolonou dochází k pronikání (permeaci) malých částic analytu do rozpouštědlem naplněných pórů (menší částice pronikají hlouběji, velké do pórů neprojdou), a to způsobí jejich zdržení v koloně. Velké molekuly opouští kolonu společně s pohyblivou mobilní fází nejdříve, nejmenší molekuly vychází z kolony poslední [31, 51, 55, 58].

### *2.8.7.2. Adsorpční sloupcová chromatografie*

Další, často využívaná metoda přečištění extraktu po izolaci analytu z matrice, je adsorpční sloupcová (kolonová) chromatografie. Adsorpční kapalinová chromatografie využívá mezimolekulových přitažlivých sil působících mezi stacionární fází a analytem. Použitím kolony s vhodným adsorbentem a rozpouštědlem dochází k potřebnému odstranění balastních látek (např. lipofilního charakteru) od analytu [46, 58, 61].

Pro adsorpční sloupcovou chromatografii se používá skleněná kolona s teflonovým kohoutem pro regulaci průtoku rozpouštědla. Jako adsorbenty se používají porézní zrnité materiály s velkým specifickým povrchem (silikagel, florisil, alumina, aktivní uhlí, celulóza, uhličitan vápenatý), eluční činidla představují organická rozpouštědla (nepolární rozpouštědlo pro nepolární analyty, polární rozpouštědlo pro polární analyty) [54].

Po naplnění kolony sorbentem je nanesen vzorek a kolona je dále promývána elučním činidlem. Rychlost průtoku elučního činidla se nastaví pomocí kohoutu na spodní straně kolony, eluční činidlo protéká kolonou za atmosférického tlaku (pouze gravitační síla). Molekuly analytu jsou uvolňovány z povrchu stacionární fáze mobilní fází a jsou vymývány z kolony. Adsorpční aktivita stacionární fáze je dána její polaritou a specifickým povrchem (počtem adsorpčních míst). Mobilní fáze (eluční činidlo) je charakterizováno eluční silou (větší eluční síla znamená snadnější vytěsnění analytu z adsorbentu). Zvolené rozpouštědlo by mělo mít malou viskozitu (menší odpor při průtoku kolonou), nemělo by narušovat stacionární fázi a nemělo by reagovat s analytem (chemicky inertní). Eluce rozpouštědlem může být izokratická (jedním rozpouštědlem popř. směsí rozpouštědel) nebo gradientová (více rozpouštědel s rozdílnou polaritou) [51, 53, 58, 61].

Výhoda adsorpční kolonové chromatografie spočívá v jednoduchosti aparatury a provedení přečištění, dostupnosti a nízké ceně, možnosti kombinovat různé druhy adsorbentů a rozpouštědel. Hlavní nevýhodou je její časová a pracovní náročnost [30].

### 2.8.8 Identifikace a kvantifikace analytu

Nejvhodnější analytickou metodou pro identifikaci a kvantifikaci musk sloučenin v biotické matrici je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí. Použití plynového chromatografu je podmíněno volatilitou stanovovaných látek a ve spojení GC-MS lze ve vzorku detekovat již stopová množství musk sloučenin [52].

#### *2.8.8.1 Plynová chromatografie*

Plynová chromatografie je separační technika, při které je vzorek vnášen mezi dvě vzájemně se nemísitelné fáze. Mobilní fáze je zpravidla inertní plyn, stacionární fázi tvoří nejčastěji kapalina ukotvená na stacionárním nosiči (rozdělovací plynová chromatografie) nebo povrchový sorbent (absorpční plynová chromatografie) [46].

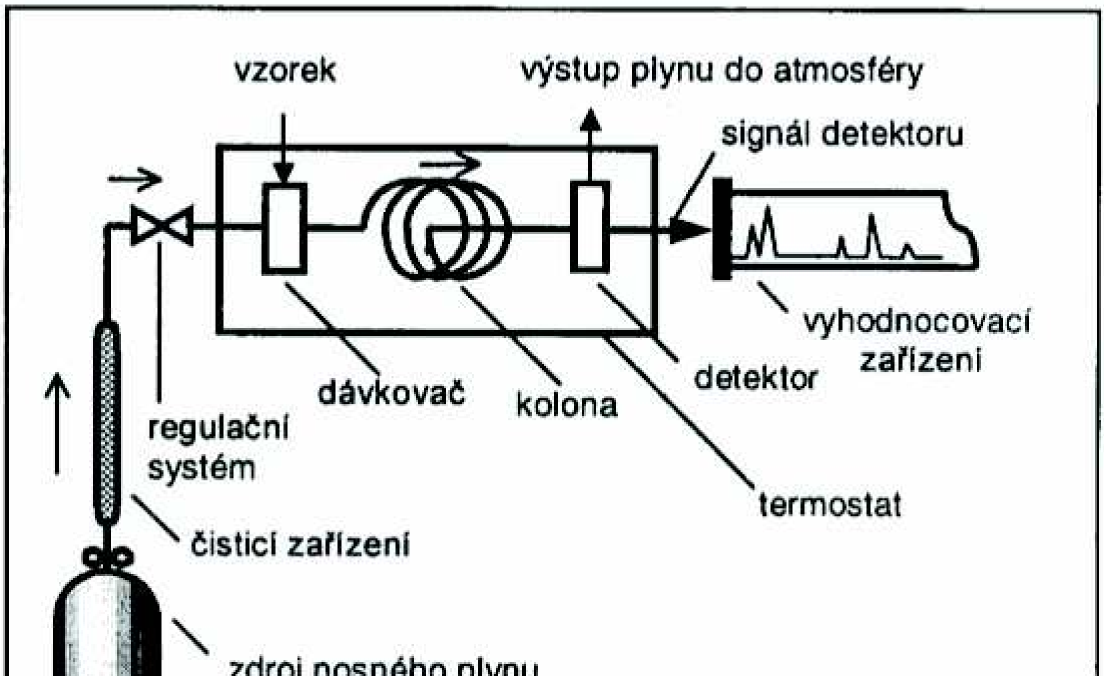
Dělení složek směsi probíhá po převedení vzorku do plynné fáze. Z tohoto důvodu lze separovat pouze tepelně stálé analyty s dostatečným tlakem nasycených par (bod varu do 400 °C) a relativní molekulovou hmotností menší než 1000. Plynovou chromatografií lze separovat plynné směsi látek, nedisociované kapaliny a pevné organické a organokovové látky [46, 48, 52].

Plynová chromatografie je nejvhodnější technikou pro stanovení těkavých organických polutantů, mezi něž patří i skupina musk sloučenin. Hlavní výhodou této metody je rychlá a jednoduchá analýza, vysoká separační účinnost a malé množství vzorku potřebné k analýze. Zásadní postavení při analýze organických látek má spojení plynové chromatografie s hmotnostním detektorem, který zvyšuje selektivitu a citlivost analýzy a urychluje identifikaci látek [46, 48, 52].

Principem dělení směsi látek ve vzorku pomocí plynové chromatografie je mnohonásobné ustalování rovnovážného poměru koncentrace složek mezi stacionární a mobilní fázi. Vzorek se dávkuje do proudu nosného plynu, kterým je unášen přes kolonu obsahující stacionární fázi. Jednotlivé složky vzorku mohou být stacionární fází zachyceny a zdrženy. Rovnovážné stavy koncentrací jsou vytvářeny na základě fyzikálně-chemických interakcí mezi složkou a mobilní a stacionární fází (adsorpce, chemisorpce, srážení, tvorba komplexů, síťový efekt a různé kombinace těchto interakcí). Podle převažujícího efektu se plynová chromatografie dále dělí na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou permeační a afinitní [46, 48, 55, 58].

K ustavení rovnováhy dochází v důsledku rovnoměrného rozdělení koncentrace složky analytu mezi mobilní a stacionární fázi. Složky, které se lépe vážou na stacionární fázi (silnější interakce), jsou zpomalovány a vycházejí z kolony později než složky, které se na stacionární fázi nevážou. Mobilní fáze transportuje vzorek v plynné fázi přes kolonu se stacionární fází a v celé délce kolony dochází k postupnému ustavení rovnováhy mezi analytem a fázemi. Místo ustalování rovnováhy se nazývá teoretické patro kolony. Účinnost chromatografické kolony pak lze kvantifikovat právě pomocí počtu teoretických pater nebo souvisejícího výškového ekvivalentu teoretického patra kolony. Čím více má kolona teoretických pater, tím je její separační účinnost větší [46, 48, 52, 55, 58].

Při plynové chromatografii se používá eluční technika nanášení vzorku (jednorázový nástřik vzorku do nosného plynu před kolonou obsahující stacionární fázi). Kromě separace jednotlivých složek umožňuje GC identifikaci těchto látek. Separované složky jsou postupně vymývány nosným plynem z chromatografické kolony a vnášeny do detekčního systému. Na základě fyzikálně-chemických vlastností analytu vzniká v detektoru signál (odezva), který je vyhodnocen v grafické formě v podobě chromatografického záznamu. Soubor signálů je v chromatogramu znázorněn formou píků. Poloha píku (retenční čas) nese kvalitativní informaci o analytu, plocha (popř. výška) píku je úměrná kvantitativnímu množství analytu ve vzorku [46, 48, 52, 55, 58].




**Obr. 13:** *Schéma plynového chromatografu* [55]

Plynový chromatograf sestává z následujících částí:

- *Zdroj nosného plynu*
- *Čistící zařízení*
- *Regulační systém*
- *Dávkovač (injektor)*
- *Kolona*
- *Termostat*
- *Detektor*
- *Vyhodnocovací zařízení*

***Zdroj nosného plynu:***

zdrojem nosného plynu je tlaková láhev. Jako nosný plyn se nejčastěji používá vodík, dusík, helium nebo argon. Nosný plyn tvoří mobilní fázi, unáší vzorek kolonou a vůči analytu a stacionární fázi se chová inertně. Hlavním kriteriem výběru nosného plynu jsou požadavky měřicího systému (druh kolony a detektoru); dalšími zohledňujícími faktory jsou viskozita, čistota a cena plynu [46, 55, 58].

***Čistící zařízení:***

zbavuje nosný plyn nežádoucích nečistot a vlhkosti. Velkým problémem v plynové chromatografii je obsah reaktivního kyslíku a vodní páry v nosném plynu. Tyto nečistoty nevratně poškozují separační systém (stárnutí stacionární fáze), případně mohou reagovat s analyty a znehodnocovat tak výsledky analýzy [46, 55].

***Regulační systém:***

jedná se o elektronické regulační zařízení zajišťující konstantní, popřípadě programově se měnící průtok nosného plynu kolonou a detektorem, a to bez ohledu na typ nosného plynu, teplotu a rozměr kolony. Při analýze je důležité udržovat definovaný průtok nosného plynu, aby nedocházelo k ovlivnění kvalitativních a kvantitativních výsledků analýzy. Tlak je proměnnou veličinou a nastaví se automaticky podle viskozity plynu, vnitřního průměru kolony a délky kolony tak, aby průtok kolonou byl konstantní i při změnách teploty během separace. Průtok mobilní fáze musí být optimalizován tak, aby se dosáhlo co nejlepšího rozdělení látek na koloně [46, 55].

***Dávkovač (injektor):***

slouží k rychlému a reprodukovatelnému zavedení plynného, kapalného nebo tuhého vzorku. Dávkování vzorku musí být rychlé, aby se nezměnily tepelné a tlakové podmínky v koloně, a aby nedocházelo během něj ke změnám ve složení vzorku. Současně musí dojít k okamžitému odpaření vzorku a jeho vnesení do nosného plynu [46, 55].

- *Plyny*

se dávkují plynotěsnými injekčními mikrostříkačkami, obtokovými pipetami nebo dávkovacími kohouty, které mohou dobře sloužit také jako automatizovaná dávkovací zařízení při kontrole technologických procesů.

- *Kapaliny*

se dávkují injekčními stříkačkami přes silikonové septum do vyhřátého dávkovacího prostoru (lineru), ve které dochází k rychlému odpaření vzorku za vysoké teploty. Páry vzorku jsou promíchány s nosným plynem a přiváděny na začátek kolony.

- *Tuhé látky*

budou moci být dávkovány pomocí speciálních dávkovačů, které se konstruují.

Separační účinnost kolon a přesnost výsledku závisí na způsobu dávkování a konstrukci dávkovacího systému (injektoru). Nástřik vzorku se nejčastěji provádí injekčními stříkačkami o objemu 0,1-10 μl, lze jej však provádět ručně (stříkačkou) nebo pomocí autosampleru. Dávkování lze provádět dvěma technikami. První z nich je nad ústí kolony umístěné na konci injektoru a využívá se především pro náplňové kolony. Druhou je dávkování přímo na kolonu, které se využívá u kapilárních kolon a lze jej realizovat různými způsoby [46, 52, 55, 58, 59].

- ***Nástřik na kolonu (on column)***

Nástřik přímo na kolonu je realizován pomocí speciálních mikrostříkaček a je vhodný při analýze termolabilních látek. Používá se u náplňových kolon a kapilárních kolon s průměrem nad 0,25 mm. Nastřikuje se 1 až 10 μl vzorku (náplňové kolony) nebo 0,2-2 μl vzorku (kapilární kolony s větší světlostí). Vzorek je aplikován do křemenné kapiláry na začátku kolony, která je zahřívána na teplotu o 10-30 °C nižší, než je teplota varu rozpouštědla, ve kterém je přítomen sledovaný analyt. Po nadávkování vzorku do tohoto prostoru dojde k vytvoření kapalného filmu na stěně kapiláry a po prudkém zvýšení teploty dochází k odpaření vzorku a smíchání par s mobilní fází. Nevýhodou tohoto postupu je nanášení velkého množství vzorku, který často obsahuje znečišťující látky, což způsobuje omezenou životnost kolony.

- ***Nástřik pomocí děliče toku (split injection)***

Nástřik pomocí děliče toku se využívá pro kolony s malým průměrem (malá kapacita) a pro koncentrované vzorky obsahující velké množství analyzovaných složek. Při tomto dávkování dochází po odpaření dávkovaného vzorku k jeho rozdělení na dvě přesně definované části (splitovací poměr, split ratio), přičemž jedna část je použita pro analýzu (0,1-10 %; 0,1-2 μl) a zbytek je prostřednictvím nosného plynu odveden do odpadu mimo kolonu. Tato technika nástřiku je vhodná především pro kvalitativní analýzu, kdy požadujeme velké rozlišení zón separovaných složek.

- ***Nástřik bez děliče toku (splitless injection)***

Nástřik bez děliče toku využívá stejné zařízení jako při nástřiku s děličem toku, jen s tím rozdílem, že odváděcí smyčka je uzavřená a celé nadávkované množství vzorku je nosným plynem unášeno na kolonu. Tato technika se používá pro analýzu zředěných roztoků obsahujících stopová množství analytu nebo pro přesnou kvantitativní analýzu, kdy je zapotřebí relativně větší objem vzorku (0,5-5 μl).

- ***Dávkování s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku***

Injektor s programovatelným vypařováním vzorku (PTV injection) umožňuje nastavení podmínek zplyňování vzorku. Tato technika nástřiku vzorku je vhodná pro analýzu směsí látek, které se výrazně liší teplotou bodu varu. Injektor může obsahovat vložku sloužící k odstranění rozpouštědla a nízkomolekulárních sloučenin a umožňuje zachytit netěkavé sloučeniny a nečistoty [46, 52, 55, 58, 59].

***Kolona:***

je část chromatografu, ve které je umístěna stacionární fáze a kde nastává separace složek. V plynové chromatografii se používají kolony náplňové (kolony většího průměru, vyšší kapacita - schopnost separovat větší množství vzorku) nebo ve stopové analýze častěji kapilární kolony (kolony menšího vnitřního průměru - poskytují vyšší účinnost separace).

- ***Náplňové kolony***

Náplňové kolony jsou vyrobeny z kovu nebo ze skla; jsou to trubice dlouhé 1-5 m s vnitřním průměrem 2-6 mm. Jako náplň se používá tuhý sorbent nebo nosič pokrytý kapalnou fází. Pro adsorpční chromatografii se využívají kolony plněné adsorbenty, např. silikagel (oxid křemičitý), alumina (oxid hlinitý), grafitizované saze (aktivní uhlí), nebo kopolymery styrenu a divinylbenzenu. Pro rozdělovací chromatografii jsou určeny kolony obsahující tenkou vrstvu inertní teplotně stálé kapaliny (stacionární fáze,) vázané na nosič (modifikovaná křemelina) kovalentními vazbami. Náplňové kolony mají horší rozlišení, a proto se používají především k separaci nízkovroucích málo zadržovaných plynů a v situacích, kdy je zapotřebí použití většího objemu stacionární fáze (preparativní účely).

- ***Kapilární kolony***

Kapilární kolony jsou skleněné, křemenné, plastové nebo kovové trubice o délce v rozmezí 15 až 100 metrů s vnitřním průměrem 100-700 µm. Stacionární fáze pokrývá vnitřní stěny kapiláry (netvoří v trubici sloupec). Jako sorbenty se používají aktivní uhlí, silikagel, molekulová síta a porézní polymery, kapalnou stacionární fázi tvoří např. polyethylenglykoly, estery, siloxany, uhlovodíky aj.

Podle typu vnitřní stacionární fáze rozlišujeme kolony WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) s kapalnou stacionární fází a kolony SCOT (*Support Coated Open Tubular*) s kapalnou stacionární fází zakotvenou na povrchu pevného nosiče na vnitřní straně kapiláry. Posledním typem je kolona PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) s vrstvou pevného aktivního sorbetu na vnitřním povrchu kapiláry [46, 52, 55, 58, 59].

***Termostat:***

je důležitou součástí plynového chromatografu, zajišťující stálou a dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru tak, aby byl vzorek udržen v plynném stavu. Teplo se na kolonu přivádí vyhřívacím médiem (plynem, kapalinou nebo tuhou látkou) nebo pomocí odporového drátu navinutého přímo na koloně. Dávkovač a detektor mají zpravidla vlastní řízené zahřívání. Uvnitř termostatu je vyžadována teplotní stabilita ± 0,1 °C.

Konstantní teplotu kolony lze při analýze využít pouze v případě, kdy teploty varu analytů ve směsi jsou si blízké. Pokud je vzorek tvořen směsí látek s rozdílnými teplotami varu, je třeba teplotu kolony programově měnit (teplotní program). Pracovní teplota se pohybuje v rozmezí 50-300 °C. Zvýšením teploty kolony dosáhneme zvýšení tlaku par složky a snížení retenčního času, což nám sníží dobu analýzy [46, 55].

***Detektor:***

slouží k detekci látek v nosném plynu. Reaguje na změny složení vstupujícího nosného plynu (přítomnost analytu) a vysílá signál (elektricky měřitelná veličina), který je zaznamenáván v závislosti na čase. Detektor sleduje analytické vlastnosti plynu vycházejícího z kolony, které závisí na druhu a koncentraci složek. Základními požadavky na detekční zařízení jsou nízký detekční limit (schopnost reagovat na nízké koncentrace analytu – nízká mez detekce), selektivita pro stanovované látky, citlivost (odezva detektoru v závislosti na změně koncentrace analytu) a lineární závislost síly signálu na koncentraci analytu v mobilní fázi. Detektory umožňují registraci jednotlivých zón separovaných složek, jejich identifikaci a kvantifikaci [46, 52, 55, 58, 59].

Detektory lze dělit na: nedestruktivní (analyt prochází detektorem bez chemických změn)

- *tepelně vodivostní detektor (TCD)*
- *detektor elektronového záchytu (ECD)*
- *argonový a heliový detektor (ArD, HeD)*
- *infračervený spektrometr (IRS)*

a destruktivní detektory (analyt se při průchodu detektorem nezvratně změní)

- *plamenový ionizační detektor (FID)*
- *plamenový termoionizační detektor s alkalickým kovem (AFID, TID)*
- *hmotnostní spektrometr (MS)*
- *fotoionizační detektor (PID)*
- *atomový emisní detektor (AED).*

***Vyhodnocovací zařízení:***

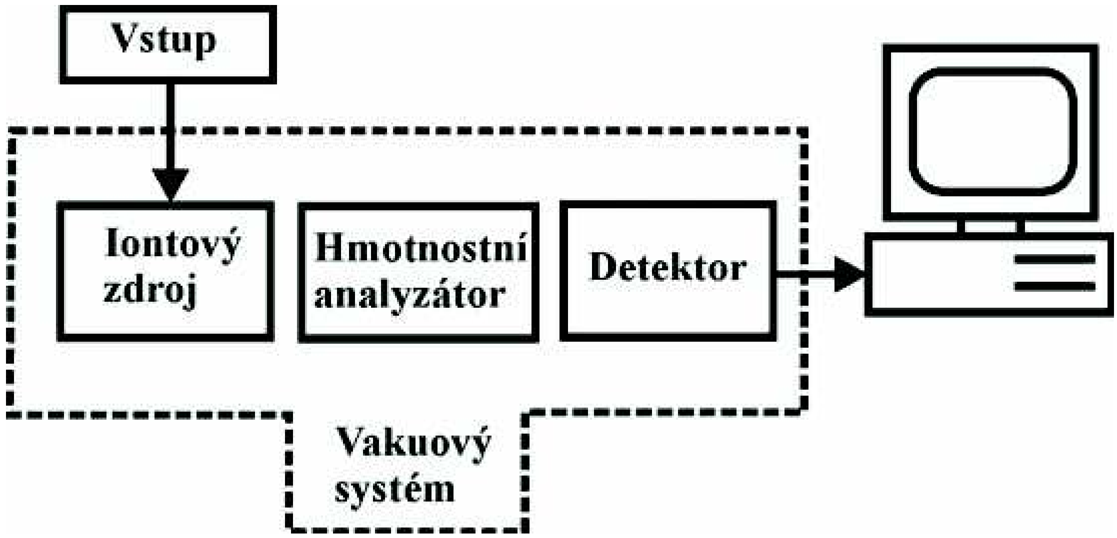
zpracovává a vyhodnocuje signál přicházející z detektoru; výsledkem je chromatografická křivka (chromatogram). V současnosti je pro vyhodnocení analýzy aplikována výpočetní technika se speciálními softwarovými programy, které jsou dodávány jako součást přístrojového vybavení plynového chromatografu [55].

### 2.8.8.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda používaná pro identifikaci látek ve vzorku, určení jejich struktury a kvantifikaci, a to na základě interakcí iontů analytu s elektrickým a magnetickým polem. Hmotnostní spektrometrie je destruktivní metoda (dochází k nezvratným změnám analyzovaného vzorku); výhodou metody je velmi malá spotřeba vzorku pro analýzu. Tuto techniku lze využít pro stanovení organických látek i anorganických prvků a sloučenin [46, 53, 54 ].

Princip hmotnostní spektrometrie: neutrální molekuly analytu jsou převedeny do plynné fáze a ionizovány v iontovém zdroji předáním dostatečného množství energie. Dojde k vytvoření nabitých iontů, které se při přebytku vnitřní energie vlivem ionizace štěpí na fragmentové ionty, radikály a neutrální částice. Nabité částice (molekulární a fragmentové ionty) jsou na základě různých poměrů hmotnosti a náboje (m/z) separovány v analyzátoru a zaznamenány detektorem [46, 53, 54, 56].

Vyhodnocením signálu z detektoru vzniká hmotnostní spektrum (závislost intenzity signálu na poměru hmoty a náboje). Molekulové ionty nesou informaci o molekulové hmotnosti analytu; vzniklé fragmentové ionty jsou charakteristické pro každou látku a poskytují informace o izotopickém zastoupení prvků v analytu a o struktuře látky [56].




**Obr. 14:** *Schéma hmotnostního spektrometru* [56]

Základními součástmi hmotnostního spektrometru jsou:

- *iontový zdroj* (generování iontů z atomů a molekul analytu)
- *hmotnostní analyzátor* (separování iontů na základě poměru m/z)
- *detektor* (detekce zastoupení iontů)
- *vakuový systém* (zajištění vysokého vakua)
- *vyhodnocovací systém* (vyhodnocování signálů z detektoru) [56].

***Iontový zdroj***

v iontovém zdroji dochází k ionizaci vzorku (generování iontů analytu). V současnosti existuje velké množství různých technik, které se volí na základě vlastností analyzovaného vzorku a podle potřeb analýzy. Úspěšná ionizace je klíčový krok v celém procesu analýzy hmotnostní spektrometrií.

Typy ionizačních technik

- *Ionizace proudem elektronů (EI)* - těkavé a polotěkavé sloučeniny (ionizace z plynného stavu)
- *Chemická ionizace (CI)* - těkavé a polotěkavé sloučeniny (ionizace z pevného stavu)
- *Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)* – spojení s LC (LC-MS)
- *Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)*
- *Indukčně vázané plazma (ICP)*
- *Ionizace elektrickým polem (FI), desorpce elektrickým polem (FD)*
- *Ionizace bombardováním rychlými částicemi (FAB, SIMS)*
- *Desorpce laserem (LD)*
- *Ionizace desorpcí laserem v přítomnosti matrice (MALDI)*
- *Elektrospej (ESI)* – analýza biomolekul (vzorek v kapalném stavu).

Každá z uvedených technik má své specifické vlastnosti a vyhovuje různým typům analytu a také potřebám analýzy [46, 53, 54, 56].

K nejpoužívanějším technikám, zejména ve spojení s plynovou chromatografií, patří ionizace proudem elektronů (EI) a chemická ionizace (CI).

- ***Elektronová ionizace (EI)***

Elektronová ionizace je nejběžněji používanou technikou ionizace v hmotnostní spektrometrii. Podmínkou použití této techniky je analyt v plynném stavu. Jedná se o tvrdou ionizační techniku, při které dochází ke vzniku fragmentových iontů z důvodu přebytku předané energie. Primárním zdrojem ionizace jsou elektrony emitované z elektricky žhaveného vlákna kovu (rhenium, wolfram), které jsou urychlovány elektrostatickým polem na energii 70 eV (maximální energie potřebná pro ionizaci většiny organických a anorganických molekul). Při srážce elektronu s neutrální molekulou analytu dojde k předání energie a vyražení elektronu z molekuly analytu (vzniká nabitá částice). Při srážce dochází k přenosu většího množství energie, než jaká je zapotřebí na ionizaci molekuly, a proto dochází nejen k ionizaci, ale také k fragmentaci molekulového iontu (rozštěpení molekuly, přesmyky, vznik fragmentových iontů a radikálů). Z hlediska hmotnostní spektrometrie je důležitou oblastí vznik negativních a pozitivních iontů a fragmentových iontů, které lze na základě poměru hmoty a náboje separovat a detekovat (především kationy a radikál-kationty). Detekovaný radikál-kationt vzniklý ionizací molekuly poskytuje informaci o molekulové hmotnosti analyzované látky, fragmentové ionty nesou informaci o struktuře analytu. Technika elektronové ionizace poskytuje konstantní stupeň fragmentace dané látky (díky zajištění energie elektronů 70 eV) a výsledkem analýzy je tabelované hmotnostní spektrum pro danou sloučeninu. EI je základní technikou pro identifikaci neznámých analytů, a to díky reprodukovatelnosti získaných hmotnostních spekter a existenci knihovny spekter. Tato technika je vhodná pro spojení s GC, používá se pro identifikaci složek ve směsi po předchozím rozdělení v procesu plynové chromatografie [46, 53, 54, 56].

- ***Chemická ionizace (CI)***

Princip chemické ionizace je shodný s EI, primárním zdrojem ionizace jsou opět elektrony ze žhaveného kovového vlákna (Re, W) urychlené na 70 eV, k ionizaci však nedochází přímo srážkou molekuly analytu s elektrony, ale prostřednictvím vhodného reakčního plynu. Vhodným reakčním plynem může být např. methan; zastoupení reakčního plynu v ionizátoru je při ionizaci až 1000krát vyšší než zastoupení sledovaného analytu. Po interakci reakčního plynu s elektrony vznikají nabité ionty, které následně ionizují molekuly zkoumané látky. Předaná energie postačuje k ionizaci molekul analytu, většinou však není dostatečně velká, aby došlo k rozsáhlejší fragmentaci molekul. Hmotnostní spektra za použití chemické ionizace jsou podstatně jednodušší než spektra vzniklá za použití EI. Další nevýhodou této techniky je, že nemá knihovnu spekter. Používá se v případě, kdy není možné rozpoznat pík s užitím EI [46, 53, 54, 56].

***Hmotnostní analyzátor***

zařízení sloužící k separaci iontů na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní analyzátory pracují na základě různých fyzikálních principů: odchýlení trajektorie letu iontu v elektrickém a magnetickém poli, oscilace iontů v elektrickém poli, doba letu nebo absorpce energie při cylkoidálním pohybu elektrickým a magnetickým polem. Po průletu analyzátorem jsou ionty o stejném m/z soustředěny do jednoho ohniska na detektoru [46].

Podle toho, na jakém principu pracují, se analyzátory dělí na různé druhy:

- *Magnetický analyzátor (B)*
- *Elektrostatický analyzátor (E)*
- *Kvadrupólový analyzátor (Q)*
- *Iontová past (QIT)*
- *Separace podle doby letu (TOF)*
- *Iontová cyklotronová rezonance (ICR)*
- *Analyzátor s dvojitou fokusací (HRMS)*

Ve spojení s plynovou chromatografií je často používaným typem kvadrupólový analyzátor (Q) a také separace podle doby letu (TOF) [46, 53, 54, 56].

- ***Kvadrupólový analyzátor***

Kvadrupólový analyzátor je nejběžnějším typem analyzátoru používaným v hmotnostní spektrometrii. Skládá se ze čtyř kovových tyčí hyperbolického nebo kruhového průřezu, které jsou připojeny ke zdroji stejnosměrného a radiofrekvenčního napětí (vždy dvě protilehlé elektricky spojeny). Do prostoru mezi tyčemi jsou přiváděny urychlené ionty z iontového zdroje souběžně s osou kvadrupólu. Ionty vlivem měnícího se elektrického pole začnou oscilovat a mění svoji dráhu v závislosti na přitažlivých a odpudivých silách, kterými na ně tyče působí. Při vhodném nastavení poměru napětí projdou analyzátorem jen ionty o definovaném poměru m/z a ty jsou detekovány. Kvadrupol funguje jako laditelný filtr (regulací poměru stejnosměrného a střídavého napětí lze definovat rozmezí iontů, které projdou na detektor), poměr napětí se v čase mění a na detektor procházejí ionty o různých m/z. Výhodou použití kvadrupólu je zisk lineární hmotnostní stupnice (signály mají při lineárním časovém rozvoji stejný tvar, vzdálenost i šířku) [46, 53, 54, 56].

- ***Letová trubice (TOF)***

Analyzátor doby letu – Time of flight je nejjednodušším separátorem používaným v MS. Je tvořen prázdnou trubicí s vakuem. Ionty jsou z iontového zdroje vedeny do akcelerační sekce, kde jsou urychleny na stejnou kinetickou energii. Je zapotřebí pulzní ionizace, aby došlo k vystřelení všech iontů současně. K separaci dochází v letové trubici na základě různě dlouhé doby, kterou ionty potřebují, aby doletěly na detektor (stejná kinetická energie a různá hmotnost iontů má za následek různou rychlost letu jednotlivých iontů a proto různou dobu letu iontů k detektoru). Dříve doletí lehčí ionty, těžké ionty mají delší dobu letu. Rozlišení závisí na délce dráhy, kterou iont překoná [46, 53, 54, 56].

***Detektor***

slouží k převedení proudu iontů dopadajících na detektor po průchodu analyzátorem na měřitelný elektrický signál. Základními typy detektorů jsou elektronový násobič a detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem.

- ***Elektronový násobič***

Elektronový násobič pracuje na principu sekundární emise elektronů za neustálého zesilování primárního signálu. Je konstruován jako zužující se trubice, na jejíž povrch dopadají ionty z analyzátoru a vyráží z povrchu elektrody elektron, který dopadá na další místo trubice a vyráží další elektrony. Tím se zesiluje elektronový proud 104 až 108krát.

- ***Detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem***

Detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem funguje na podobném principu. Náraz iontu na konverzní elektrodu způsobí vyražení elektronu, ten dopadá na fosforescenční stínítko a vyrazí foton. Foton je zachycen fotonásobičem [46, 53, 54, 56].

V hmotnostní spektrometrii se dále jako detektory používají následující zařízení:

- *Faradayova klec*
- *Fotografický detektor*
- *Elektrooptický detektor*

***Vakuový systém***

během hmotnostně spektrometrické analýzy je třeba udržovat v celém systému vysoký stupeň vakua ($10^{-4}$-$10^{-8}$ Pa), aby nedocházelo ke srážkám molekul analytu a chemickým reakcím během analýzy. Typický vakuový systém hmotnostních spektrometrů bývá dvoustupňový. První stupeň tvoří standardní rotační olejová vývěva, druhý difuzní nebo turbomolekulární čerpadlo [56].

***Vyhodnocovací systém***

je tvořen výpočetní technikou se softwarovým příslušenstvím. Slouží k vyhodnocování signálu přicházejícího z detektoru.

***Sběr dat***

existují dva základní pracovní módy hmotnostního spektrografu (SIM a SCAN)

- ***Mód kompletního spektra – SCAN***

Při nastavení režimu SCAN probíhá zaznamenání signálu ve zvoleném rozsahu hodnot *m/z*. Získané spektrum slouží především pro kvalitativní stanovení (rychlá identifikace analytu porovnáním spektra s referenčními knihovnami spekter) [56].

- ***Fragmentometrický mód – SIM, MIM***

Tento typ módu slouží pro monitorování vybraného iontu (single-ion monitoring – SIM) nebo více vybraných iontů (multiple-ion monitoring – MIM) v čase. Detekován je pouze signál příslušející vybranému iontu o definovaném *m/z*, případně několika iontů. Použití tohoto módu je vhodné především pro účely kvantitativní analýzy. Výhodou je podstatné snížení detekčního limitu stanovení [56].

#### 2.8.8.2 Tandemové spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Spojení separačních technik plynové kolonové chromatografi a hmotnostní spektrometrie přispělo významným způsobem k rozvoji environmentální analýzy. Spojení GC-MS představuje nepostradatelnou techniku identifikace neznámých složek směsí. Směs analytů je rozdělena pomocí kolonové chromatografie (GC – účinná separace složek) a hmotnostní detekcí (MS – citlivá a specifická detekce) jsou následně získána spektra jednotlivých analytů, která umožňují identifikaci sloučenin ve směsi [56, 59].

Propojení hmotnostního spektrometru s plynovým chromatografem s náplňovou kolonou je složité z hlediska velkého množství nosného plynu použitého jako mobilní fáze v GC. Velký průtok plynu by narušoval vakuum v hmotnostním spektrometru, proto je nutné použití mezičlenu (separátoru nosného plynu). Nejjednodušším řešením je použití děliče toku umístěného na výstupu z kolony před vstupem analytu do iontového zdroje. Další možností je použití molekulových separátorů. Molekulové separátory zajišťují oddělení nosného plynu od analyzované složky a zajišťují minimální ztráty analytu. V současnosti jsou nejběžnějšími typy molekulových separátorů:

- *tryskový*
- *solvatačně difúzní*
- *efúzní.*

Plynový chromatograf s kapilární nebo mikronáplňovou kolonou je pro spojení GC-MS mnohem vhodnější. Vzhledem k menšímu průtoku nosného plynu lze konec kapilární kolony zavést přímo do iontového zdroje aniž by došlo k výraznému narušení vakua. Není tedy nutné použití separátoru ani děliče toku, čímž nedochází ke snížení citlivosti dané metody a analýzou získané výsledky jsou mnohem přesnější [56, 59].

# 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části diplomové práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení musk sloučenin v biotické matrici a pomocí optimalizované metody stanovit obsah vybraných musk sloučenin v reálných vzorcích ryb. Dále provést diskuzi získaných výsledků a na jejich základě porovnat obsah musk sloučenin v rybách odlovených před ČOV a za ČOV v Brně Modřicích.

## *3.1 Používané chemikálie a standardy*

### 3.1.1 Chemikálie

- ***Cyklohexan,*** Merck, Německo
- ***Ethylacetát,*** Merck, Německo
- ***Aceton,*** Sigma-Aldrich, Německo
- ***Spe-ed PSE matrix,*** Applied Separations, USA
- ***Florisil,*** Sigma-Aldrich, Německo
- ***Bezvodý síran sodný,*** Merck, Německo
- ***Undekan,*** Sigma-Aldrich, Německo
- ***Destilovaná voda***
- ***Kyselina chromsírová***

### 3.1.2 Technické plyny

- ***Helium 6,0 (pro GC),*** Messer, Česká republika
- ***Dusík 5,0 (pro PSE),*** Messer, Česká republika

### 3.1.3 Standardy

- ***Phantolid,*** (1000 ng/μl v isooktanu), CHIRON AS
- ***Galaxolid,*** (1000 ng/μl v isooktanu), CHIRON AS
- ***Traseolid,*** (1000 ng/μl v isooktanu), CHIRON AS
- ***Ambrette,*** (10 ng/μl v cyklohexanu), Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburk, Německo
- ***Tonalid,*** (10 ng/μl v cyklohexanu), Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburk, Německo
- ***Musk xylen,*** (100 ng/μl v cyklohexanu), Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburk, Německo
- ***Musk tibeten,*** (10 ng/μl v cyklohexanu), Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburk, Německo
- ***Musk keton,*** (10 ng/μl v cyklohexanu), Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburk, Německo
- ***Musk moskene,*** (10 ng/μl v cyklohexanu), Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburk, Německo
- ***Deuterovaný musk xylen $D_{15}$,*** (100 ng/μl v acetonu), Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburk, Německo
- ***Deuterovaný tonalid $D_3$,*** (100 ng/μl v isooktanu), Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburk, Německo

## *3.2 Přístroje a zařízení, software*

### 3.2.1 Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem

- ***Plynový chromatograf Hewlett-Packard 6890N GC,*** Agilent, USA

Kolona: J&W Varian DB-5MS, kapilární – 20,0 m x 0,18 μm x 180 μm, Agilent Technologies, USA

- ***Hmotnostní detektor MSD 5973N,*** Agilent, USA

Elektronová ionizace, kvadrupól

- ***Automatický dávkovač vzorků HP 7683,*** Agilent, USA

### 3.2.2 Zrychlená extrakce rozpouštědlem

- ***Přístroj pro zrychlenou extrakci rozpouštědlem onePSE,*** Applied Separations, USA

### 3.2.3 Ostatní zařízení

- ***Analytické váhy PM 400,*** Mettler, Švýcarsko
- ***Analytické váhy AB265-S,*** Mettler Toledo, Švýcarsko
- ***Rotační vakuová odparka BÜCHI Rotavapor R-200*** s vodní lázní B-490 a vakuovým systémem, Švýcarsko
- ***Ultrazvuková lázeň Sonorex RK52H,*** Bandelin, Německo
- ***Běžné laboratorní sklo a vybavení analytické laboratoře***

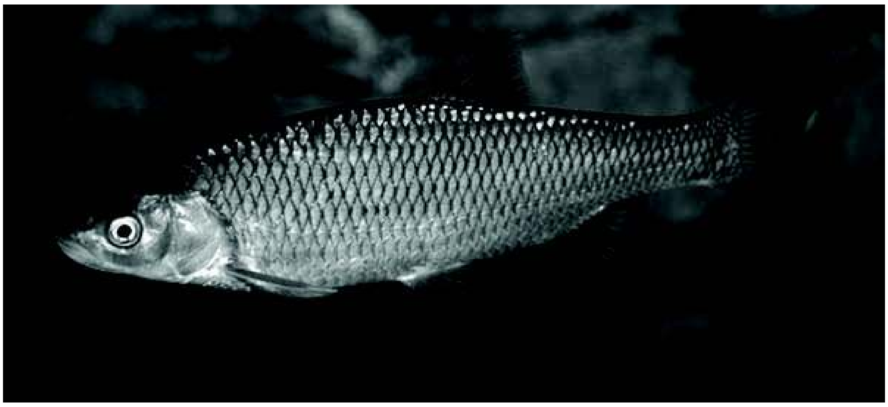
### 3.2.4 Software

- ***Enhanced ChemStation G1701DA Version D.00.00.38*** (19.11.2001) MSD Produktivity + Offline-MSD Data Analysis, Agilent Technologies, USA
- ***Knihovna spekter: NIST05.L***
- ***Microsoft® Word 2002,*** Microsoft Corporation, USA
- ***Microsoft® Excel 2002,*** Microsoft Corporation, USA

## *3.3 Biotický materiál*

### 3.3.1 Specifikace

Biotický materiál tvořila svalová tkáň vzorkovaných ryb. Konkrétně šlo o zástupce z čeledi kaprovitých – Jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*). Na analýzu bylo použito celkem 40 vzorků (20 ryb odlovených z řeky Svratky před ČOV a 20 za ČOV).



**Obr. 15:** *Jelec tloušť (Leuciscus cephalus)*

- ***Místo odlovu:***

| **Před ČOV:** | **Za ČOV:** |
|---|---|
| soutok Svratky a Svitavy - za Olympií | pod jezem mezi Rajhradem a Rajhradicemi |
| **GPS souřadnice:** 49° 8´ 32,45´´ N<br>16° 37´ 41,07´´ E | **GPS souřadnice:** 49° 5´ 29,42´´ N<br>16° 37´ 11,14´´ E |

**Obr. 16:** *Vyznačení odběrových míst na mapě*

- ***Datum odlovu:*** 10. 11. 2009
- ***Způsob uchování vzorků:*** hluboké zmrazení

➢ ***Informace o odběru vzorků:***

Ryby byly odloveny pracovníky Povodí Moravy, kteří mají pro tuto činnost akreditaci. Poté byly vzorky transportovány na Veterinární a farmaceutickou univerzitu v Brně, kde došlo k jejich zpracování a uchování do doby analýzy (zvážení, zaznamenání zdravotního stavu, věku a pohlaví, vykuchání, homogenizaci a zamrazení). Ke stanovení obsahu musk sloučenin byla použita pouze svalovina vzorkovaných ryb.

**Tabulka 16:** *Informace o vzorkovaných rybách odlovených před ČOV*

| číslo vzorku | druh ryby | délka [mm] | váha [g] | pohlaví | stáří | svalovina [g] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1.** | Jelec tloušť | 345 | 490 | F | 6+ | 275 |
| **2.** | Jelec tloušť | 250 | 170 | F | 3+ | 55 |
| **3.** | Jelec tloušť | 345 | 450 | F | 6+ | 155 |
| **4.** | Jelec tloušť | 345 | 490 | F | 5+ | 89 |
| **5.** | Jelec tloušť | 270 | 200 | F | 5+ | 77 |
| **6.** | Jelec tloušť | 300 | 310 | F | 5+ | 90 |
| **7.** | Jelec tloušť | 225 | 130 | M | 3+ | 53 |
| **8.** | Jelec tloušť | 225 | 140 | M | 3+ | 60 |
| **9.** | Jelec tloušť | 245 | 170 | M | 4+ | 50 |
| **10.** | Jelec tloušť | 230 | 150 | M | 3+ | 55 |
| **11.** | Jelec tloušť | 245 | 160 | M | 5+ | 58 |
| **12.** | Jelec tloušť | 260 | 190 | M | 5+ | 71 |
| **13.** | Jelec tloušť | 255 | 200 | F | 4+ | 60 |
| **14.** | Jelec tloušť | 290 | 290 | F | 3+ | 109 |
| **15.** | Jelec tloušť | 255 | 180 | F | 4+ | 55 |
| **16.** | Jelec tloušť | 270 | 250 | F | 4+ | 109 |
| **17.** | Jelec tloušť | 225 | 110 | M | 3+ | 31 |
| **18.** | Jelec tloušť | 260 | 220 | M | 5+ | 76 |
| **19.** | Jelec tloušť | 230 | 130 | M | 2+ | 42 |
| **20.** | Jelec tloušť | 205 | 110 | M | 4+ | 30 |

**Tabulka 17:** *Informace o vzorkovaných rybách odlovených za ČOV*

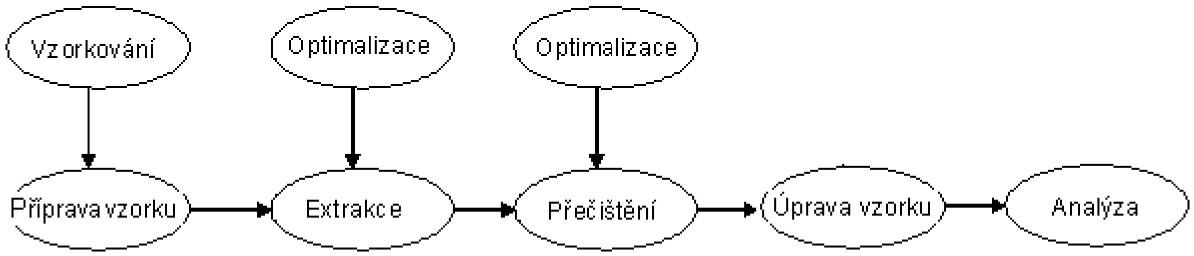
| číslo vzorku | druh ryby | délka [mm] | váha [g] | pohlaví | stáří | svalovina [g] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **21** | Jelec tloušť | 230 | 140 | M | 4+ | 55 |
| **22** | Jelec tloušť | 237 | 160 | F | 5+ | 64 |
| **23** | Jelec tloušť | 215 | 120 | M | 3+ | 45 |
| **24** | Jelec tloušť | 242 | 160 | F | 5+ | 59 |
| **25** | Jelec tloušť | 238 | 160 | M | 4+ | 62 |
| **26** | Jelec tloušť | 227 | 180 | M | 5+ | 60 |
| **27** | Jelec tloušť | 240 | 180 | M | 4+ | 49 |
| **28** | Jelec tloušť | 257 | 200 | F | 5+ | 65 |
| **29** | Jelec tloušť | 318 | 480 | M | 9+ | 152 |
| **30** | Jelec tloušť | 249 | 230 | M | 6+ | 90 |
| **31** | Jelec tloušť | 253 | 240 | M | 3+ | 77 |
| **32** | Jelec tloušť | 237 | 180 | M | 5+ | 61 |
| **33** | Jelec tloušť | 278 | 360 | M | 4+ | 141 |
| **34** | Jelec tloušť | 321 | 510 | M | 6+ | 153 |
| **35** | Jelec tloušť | 304 | 340 | F | 5+ | 126 |
| **36** | Jelec tloušť | 345 | 600 | F | 6+ | 215 |
| **37** | Jelec tloušť | 264 | 250 | M | 5+ | 97 |
| **38** | Jelec tloušť | 299 | 420 | M | 7+ | 133 |
| **39** | Jelec tloušť | 269 | 270 | M | 4+ | 79 |
| **40** | Jelec tloušť | 270 | 250 | M | 5+ | 79 |

## *3.4 Pracovní postupy*

V následující kapitole jsou uvedeny pracovní postupy, podle kterých bylo při vypracovávání praktické části diplomové práce postupováno.

Základním úkolem praktické části byl výběr analytů a optimalizace metody pro stanovení vybraných analytů v biotických vzorcích. Metoda stanovení byla rozdělena do několika kroků, které byly postupně optimalizovány, aby byla zajištěna maximální výtěžnost metody stanovení a reprodukovatelnost výsledků. Schéma pracovního postupu je znázorněno na obrázku 16.

Pro izolaci musk sloučenin z rybí tkáně byla zvolena metoda extrakce kapalinou podporovaná tlakem PSE a pro přečištění kolonová adsorpční chromatografie. Před vlastní analýzou vzorku byly tyto metody optimalizovány.




**Obr. 16:** *Schéma pracovního postupu stanovení musk sloučenin v reálném vzorku*

### 3.4.1 Příprava vzorku

Odlov ryb z vodního ekosystému řeky Svratky v odběrových místech před ČOV a za ČOV proběhl 10. 11. 2009 za realizace pracovníků Povodí Moravy. Po zpracování ryb (zvážení, vykuchání, porcování) byla rybí svalovina pomleta a uložena do mrazícího boxu pro následnou analýzu.

Příprava vzorků zahrnuje postupy přípravy reálného vzorku svaloviny a roztoků standardů pro optimalizaci použitých analytických metod (PSE, kolonová chromatografie).

#### *3.4.1.1 Příprava reálných vzorků pro analýzu vybraných musk sloučenin*

Přibližně 3 g homogenizované (pomleté) rybí svaloviny odvážené s přesností na 0,000 1 g byly rozetřeny v třecí misce s cca 6 g matrix pro PSE a kvantitativně převedeny do extrakční patrony. Ke vzorku byly do patrony Hamiltonovou stříkačkou o maximálním objemu 10 μl přikápnuty 2 μl deuterovaného standardu MX-$D_{15}$ a 2 μl deuterovaného standardu AHTN-$D_3$. Takto připravený vzorek byl použit pro extrakci PSE.

#### *3.4.1.2 Příprava vzorků pro optimalizaci extrakce*

Pro optimalizaci extrakce podporované tlakem byl použit reálný vzorek ryby, do kterého byly přidány deuterované standardy MX-$D_{15}$ a AHTN-$D_3$ o známém objemu a koncentraci.

Přibližně 3 g svaloviny odvážené s přesností na 0,001 g byly rozetřeny v třecí misce s cca 6 g matrix pro PSE a kvantitativně převedeny do extrakční patrony. Do patrony ke směsi vzorku a matrix byly Hamiltonovou stříkačkou přikápnuty 4 μl deuterovaného standardu MX-$D_{15}$ a 4 μl deuterovaného standardu AHTN-$D_3$. Takto připravený vzorek byl použit pro optimalizaci metody PSE.

#### *3.4.1.3 Příprava roztoků standardů pro optimalizaci přečištění*

Pro optimalizaci přečištění sloupcovou kolonovou chromatografií byla připravena série roztoků obsahující všech 11 standardů musk sloučenin včetně deuterovaných.

Do baňky byly odpipetovány 2 ml cyklohexanu a Hamiltonovou stříkačkou o maximálním objemu 10 μl bylo přidáno 10 μl standardu MK, 10 μl standardu AHTN, 10 μl standardu AMB, 10 μl standardu MOS, 10 μl standardu TI, 2 μl standardu MX a 4 μl deuterovaných standardů MX-$D_{15}$ a AHTN-$D_3$. Mikropipetou bylo dále přidáno 100 μl zásobního roztoku standardů PH, HHCB a TRAS, který byl připraven nadávkováním 2 μl od každého standardu do 994 μl

cyklohexanu. Takto připravené roztoky byly v baňce promíchány a připraveny k nanesení na kolonu.

Pro srovnání byl připraven vzorek přidáním stejného množství všech standardů (viz předchozí odstavec) do vialky obsahující 640 μl cyklohexanu. Tento vzorek byl po promíchání přímo analyzován na plynovém chromatografu.

## 3.4.2 Extrakce

Pro extrakci byla zvolena metoda extrakce analytu kapalinou z pevné matrice podporovaná tlakem PSE (*Pressurized Solvent Extraction*). Před použití metody k extrakci musk sloučenin z rybí tkáně bylo potřeba optimalizovat parametry extrakce PSE (teplota, doba zdržení, počet cyklů, volba rozpouštědla).

### *3.4.2.1 Optimalizace metody PSE*

Extrakce podporovaná tlakem je důležitý krok v analýze biotických vzorků na obsah musk sloučenin. Při extrakci je nutné s maximální výtěžností izolovat analyty (musk sloučeniny) ze vzorku pevné matrice (rybí svalovina), minimalizovat spotřebu rozpouštědla a čas potřebný pro extrakci. Při optimalizaci bylo hlavním cílem vybrat vhodné rozpouštědlo, kterým bude následně provedena extrakce analytu ze vzorku tkáně a dále optimalizace teploty, počtu cyklů a doby zdržení rozpouštědla ve vzorku. Optimalizace byla prováděna na reálném vzorku za přidání deuterovaných standardů musk sloučenin pomocí přístroje *one*PSE. Porovnávala se výtěžnost metody za použití různých rozpouštědel, teplot a pracovních cyklů.

Patrona se vzorkem (viz. kapitola 3.4.1.2) byla umístěna do extrakční cely přístroje *one*PSE, poté byly nastaveny podmínky extrakce a provedena extrakce analytu ze vzorku. Extrakt byl jímán do skleněné vialky, podroben stanovení výtěžnosti tuku a po přečištění byl vzorek analyzován na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí.

Optimalizace extrakce probíhala následujícím způsobem:

- ***volba rozpouštědla***

**Tabulka 18:** *Nastavení podmínek extrakce pro optimalizaci rozpouštědla*

| **nastavení parametrů** | | **volené rozpouštědlo** |
|---|---|---|
| **teplota** | 110 °C | EA 100% |
| **tlak** | 140 Bar | CH 100 % |
| **počet cyklů** | 2 | CH:EA (75:25) |
| **doba zdržení** | 8 min | CH:EA (25:75) |
| | | EA:CH (50:50) |

➢ ***volba teploty extrakce***

**Tabulka 19:** *Nastavení podmínek extrakce pro optimalizaci teploty*

| nastavení parametrů | | volená teplota |
|---|---|---|
| **rozpouštědlo** | CH:EA (25:75) | 80 °C |
| **tlak** | 140 Bar | 100 °C |
| **počet cyklů** | 2 | 110 °C |
| **doba zdržení** | 8 min | 120 °C |
| | | 140 °C |

➢ ***volba počtu cyklů a doby zdržení***

**Tabulka 20:** *Nastavení podmínek extrakce pro optimalizaci doby zdržení a počtu cyklů*

| nastavení parametrů | | doba zdržení/počet cyklů |
|---|---|---|
| **rozpouštědlo** | CH:EA (25:75) | 8 min/1 |
| **tlak** | 140 Bar | 8 min/2 |
| **teplota** | 120 °C | 4 min/1 |
| | | 4 min/2 |
| | | 4 min/3 |
| | | 12 min/1 |
| | | 16 min/1 |

#### *3.4.2.2 Extrakce vzorku metodou PSE*

Připravený vzorek v extrakční patroně (viz. kapitola 3.4.1.1) byl vložen do extrakční cely přístroje *one*PSE a po nastavení extrakčních podmínek byla provedena izolace analytů ze vzorku. Extrakt byl jímán do skleněné vialky a po stanovení výtěžnosti tuku přečištěn adsorpční kolonovou chromatografií a podroben stanovení analytu pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

**Tabulka 21:** *Nastavení podmínek extrakce pro izolaci musk sloučenin ze vzorku ryb*

| nastavení parametrů | |
|---|---|
| **teplota** | 120 °C |
| **tlak** | 140 Bar |
| **počet cyklů** | 3 |
| **doba zdržení** | 4 min |
| **rozpouštědlo** | CH:EA (25:75) |

### 3.4.3 Přečištění

Přečištění extraktu před analýzou na GC/MS je velice důležitá část pracovního postupu stanovení musk sloučenin ve vzorku. Hlavním cílem je odstranit z extraktu všechny nežádoucí balastní látky (především tuk), které by rušily stanovení analytů a současně minimalizovat ztráty analytů. Pro přečištění vzorku byla zvolena metoda adsorpční kolonové chromatografie. Hlavním cílem optimalizace bylo vybrat vhodné eluční činidlo a množství tohoto rozpouštědla potřebné pro eluci vzorku. Optimalizace byla prováděna za použití roztoků standardů.

#### *3.4.3.1 Optimalizace adsorpční kolonové chromatografie*

Adsorpční kolonová (sloupcová) chromatografie je jedna z metod používaných pro přečištění vzorku po extrakci analytu. K odstranění balastních látek z extraktu dochází v adsorbentem naplněné koloně za působení extrakčního činidla jako mobilní fáze. Právě volba a množství rozpouštědla je rozhodující pro účinné přečištění.

Prvním krokem optimalizace bylo zvolit účinné rozpouštědlo. Na dno chromatografické kolony byla umístěna odtučněná acetonová vata a kolona byla naplněna cyklohexanem. Do cyklohexanu byla naklepána vrstva bezvodého $Na_2SO_4$ (odstranění vlhkosti ze vzorku) a poté vrstva aktivovaného florisilu (adsorbent na zachycení látek na bázi lipidů, vypálen při teplotě 350 °C po dobu 12 hodin). Na závěr byl opět navrstven $Na_2SO_4$ (cca 1 cm). Po odpuštění cyklohexanu na úroveň síranu sodného byl na kolonu nanesen připravený vzorek (viz. kapitola 3.4.1.3) a eluován rozpouštědlem s rychlostí průtoku 6 kapek/min. Eluát byl jímán do baňky a po zakoncentrování na rotační vakuové odparce byl podroben stanovení obsahu analytu pomocí GC-MS.

Pro optimalizaci množství rozpouštědla byl zvolen stejný postup, eluát byl po průchodu kolonou jímán po frakcích (40 ml) a každá frakce byla analyzována na GC-MS.

**Tabulka 22:** *Ověřovaná rozpouštědla pro optimalizaci metody kolonové chromatografie*

| **ověřovaná rozpouštědla** | | |
|---|---|---|
| (20:80) aceton:CH | (50:50) aceton: CH | (80:20) aceton:CH |
| ethylacetat 100 % | (50:50) ETH:CH | (80:20) ETH:CH |

#### *3.4.3.2 Přečištění vzorku metodou adsorpční kolonové chromatografie*

Vzorek po extrakci byl zahuštěn na rotační vakuové odparce asi na 1 ml, ke vzorku byly přidány 2 ml cyklohexanu a poté byl vzorek kvantitativně převeden na chromatografickou kolonu. Kolona byla připravena naklepáním vypáleného florisilu do cyklohexanu (viz. kapitola 3.4.3.1). Eluce byla prováděna 80 ml ethylacetátu, průtok rozpouštědla kolonou byl nastaven na 6 kapek/min. Získaný eluát byl zakoncentrován na rotační vakuové odparce a byla provedena identifikace a kvantifikace stanovení obsahu vybraných musk sloučenin metodou GC-MS.

## 3.4.4 Identifikace a kvantifikace analytů pomocí GC/MS

### *3.4.4.1 Určení retenčních charakteristik stanovovaných analytů*

Pro stanovení retenčních časů byly analyzovány roztoky standardů o vysoké koncentraci. Pro každý analyt byly z hmotnostního spektra odečteny specifické ionty (hlavní a vedlejší m/z) a z výsledného chromatogramu byly odečteny hodnoty retenčních časů daných analytů.

Pomocí získaných charakteristik byl nastaven SIM mód přístroje, aby v daném okamžiku byly zaznamenány pouze signály příslušející látce o nastaveném m/z (zvýšení citlivosti přístroje).

Nastavení parametrů pracovního programu přístroje GC-MS pro analýzu musk sloučenin v reálných vzorcích rybí svaloviny bylo provedeno na základě údajů z literatury [60].

### *3.4.4.2 Analýza vzorků metodou GC-MS*

Vialka se vzorkem byla umístěna do automatického dávkovače plynového chromatografu a po nastavení podmínek analýzy bylo provedeno kvalitativní a kvantitativní stanovení obsahu syntetických musk sloučenin ve vzorku.

**Tabulka 23:** *Specifikace plynového chromatografu s hmotnostní detekcí*

| specifikace plynového chromatografu | | | |
|---|---|---|---|
| **kolona** | kapilární | **rozměry** | 20 m x 0,18 mm x 0,18 μm |
| **stacionární fáze** | DB-5MS | **teplotní rozsah** | - 60 °C až 325 °C |
| **mobilní fáze** | helium | | |
| **specifikace hmotnostního detektoru** | | | |
| **iontový zdroj** | elektronová ionizace | **analyzátor** | kvadrupól |

**Tabulka 24:** *Nastavení podmínek GC pro analýzu musk sloučenin* [60]

| nastavení parametrů GC a MS | | | |
|---|---|---|---|
| **teplota injektoru** | 250 °C | **rychlost nosného plynu v koloně** | 40 cm/s |
| **režim kolony** | konstantní průtok | **průtok nosného plynu kolonou** | 0,8 ml/min |
| **režim injektoru** | splitless | **průtok nosného plynu injektorem** | 28,5 ml/min |
| **režim analyzátoru** | SIM | **tlak nosného plynu v koloně** | 116 kPa |
| **doba analýzy** | 34 min | **tlak nosného plynu v injektoru** | 116 kPa |
| **solvent delay** | 17 min | **teplota iontového zdroje** | 230 °C |
| **teplota kvadrupólu** | 150 °C | **teplota transferline** | 280 °C |
| **doba analýzy** | 34 min | **množství nastřikovaného vzorku** | 1 μl |

**Tabulka 25:** *Nastavení teplotního programu GC* [60]

| nastavení teplotní rampy | | |
|---|---|---|
| **růst teploty** | **teplota** | **drženo** |
| | 50 °C | 1 min |
| 15 °C/min | 110 °C | 0 min |
| 5 °C/min | 165 °C | 8 min |
| 15 °C/min | 285 °C | 2 min |

Vyhodnocení množství analytu ve vzorku bylo provedeno z chromatogramu metodou přídavku interního standardu. Integrací plochy píku chromatogramu, odpovídajícímu dané musk sloučenině, byla získána hodnota použitá pro přepočet na koncentraci pomocí kalibračních křivek. Pro každý vzorek bylo provedeno paralelní stanovení a výsledná koncentrace byla spočítána jako aritmetický průměr obou hodnot.

## 3.4.5 Doplňující postupy

### *3.4.5.1 Stanovení obsahu tuku*

Po extrakci byl extrakt přelit přes síran sodný umístěný ve filtrační aparatuře, aby došlo k odstranění vlhkosti ze vzorku. Filtrát byl jímán do čisté, předem zvážené baňky, a pomocí rotační vakuové odparky byl získán tuk. Po zchladnutí v exikátoru byl vzorek v baňce zvážen a následně byl vypočítán procentuální obsah tuku ve vzorku.

### *1.4.5.2 Úprava vzorku před analýzou na GC/MS*

Eluát byl po průchodu kolonou jímán do baňky; pomocí vakuové odparky byl eluát zahuštěn na objem cca 1-2 ml (malý zbytek s rozpouštědlem). K takto odpařenému vzorku bylo přidáno 30 µl keeperu (undekan) a následovalo odpaření do konstantního objemu. Poukončení odpařování (obsah baňky 30 µl) bylo k odparku přidáno 770 µl cyklohexanu a mikropipetou byl vzorek kvantitativně převeden do vialky a podroben analýze na plynovém chromatografu.

### *3.4.5.3 Příprava roztoků standardů pro kalibraci*

Pro vyhodnocení obsahu sledovaných analytů v reálných vzorcích bylo zapotřebí sestrojit kalibrační křivky v koncentračním rozmezí zvoleném z předběžných výsledků analýz reálných vzorků. Pro sestrojení kalibrační závislosti byla analyzována koncentrační řada roztoků. Vzhledem k nízké koncentraci standardů byly kalibrační roztoky připravovány přímo do vialek, při vyšších koncentracích bylo použito insertů, které zajišťovaly nižší spotřebu standardů. Do vialky bylo mikropipetou nadávkováno vypočítané množství cyklohexanu a Hamiltonovou stříkačkou bylo přidáno vypočtené množství standardu.

# 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

## *4.1 Výběr analytů*

Na základě informací získaných z literatury byly pro analýzu jako nejčastější kontaminanty ze skupiny musk sloučenin zvoleny nitrované a polycyklické mošusové látky. Tyto kontaminanty byly již prokázány ve všech matricích ze životního prostředí, zejména ve vodních ekosystémech, a to v povrchové a odpadní vodě, v sedimentech a vodní biotě. Pro stanovení těchto analytů ve vzorcích vodní bioty (rybí svalová tkáň) byly ze skupiny nitrovaných musk sloučenin vybrány musk keton, musk xylen, musk mosken, musk tibeten a musk ambrette a ze skupiny polycyklických musk sloučenin galaxolid, tonalid, traseolid a phantolid. Právě tyto dvě skupiny látek byly v minulosti produkovány ve velkém množství a způsobily rozsáhlou kontaminaci ekosystémů díky svým negativním environmentálním vlastnostem (bioakumulace, perzistence).

## *4.2 Optimalizace metody*

Cílem praktické části diplomové práce byla optimalizace metody pro stanovení umělých (syntetických) musk sloučenin v biotických vzorcích a následné využití této optimalizované metody ke stanovení vybraných zástupců musk sloučenin v reálných vzorcích rybí tkáně. Výsledky optimalizace jsou uvedeny v následujících kapitolách. Hlavním úkolem bylo získat optimalizovanou metodu s maximální výtěžností a minimálními ztrátami analytu. Zohledňovanými parametry byla časová a pracovní náročnost, dále nároky na laboratorní a přístrojové vybavení a v neposlední řadě spotřeba chemikálií.

Metoda stanovení musk sloučenin ve vzorcích biotické tkáně se skládá ze 3 základních kroků, kterými jsou izolace analytu, přečištění extraktu a identifikace a kvantifikace analytu. K izolaci analytu byla použita metoda extrakce podporované tlakem, přečištění bylo provedeno kolonovou adsorpční chromatografií a identifikace a kvantifikace pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Každý z těchto specifikovaných kroků stopové analýzy byl optimalizován a výsledky optimalizací jsou uvedeny v následujících kapitolách. Výsledná optimalizovaná metoda byla použita pro analýzu vzorků ryb z řeky Svratky.

### 4.2.1 Optimalizace izolace analytů

Pro izolaci musk sloučenin byla vybrána metoda tlakem podporované extrakce (PSE) na přístroji *one*PSE. Metoda PSE vykazuje v porovnání s jinými extrakčními technikami výhody v rychlosti extrakce, malé spotřebě použitého rozpouštědla a v jednoduchosti provedení extrakce. Optimalizována byla volba rozpouštědla, teplota extrakce, doba zdržení rozpouštědla u vzorku při extrakci a počet cyklů. Optimalizace byla prováděna na reálném vzorku s přidáním vnitřního standardu. Výtěžnost metody při optimalizaci podmínek extrakce byla srovnávána s referenčními hodnotami získanými analýzou kalibračních roztoků vnitřních standardů (deuterovaných standardů musk sloučenin) a vyhodnocením účinnosti extrakce vybraných musk sloučenin z reálného vzorku (AHTN, HHCB, MX, MK).

#### *4.2.1.1 Volba rozpouštědla pro PSE*

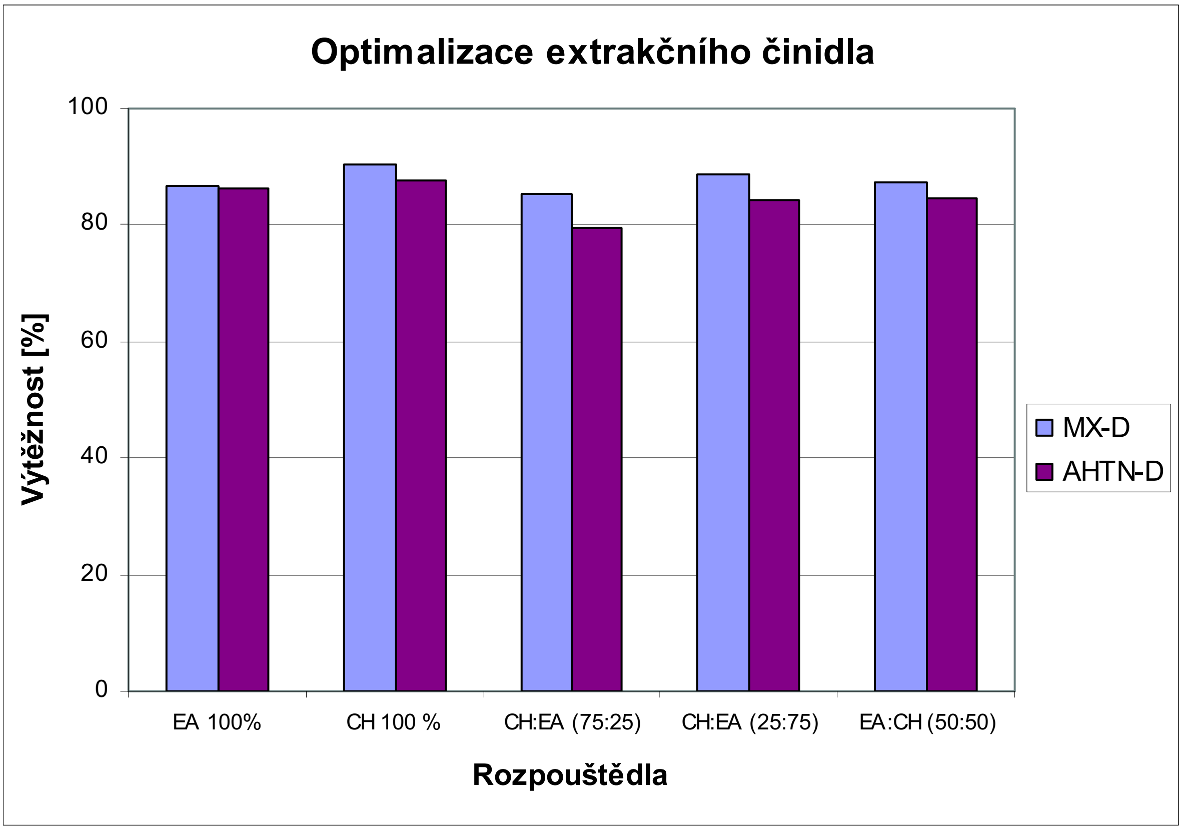
Optimalizace rozpouštědla probíhala podle postupu popsaného v kapitole 3.4.2.1. Výsledky optimalizace jsou shrnuty v následující tabulce a grafech.

**Tabulka 26:** *Výsledky analýz při optimalizaci extrakčního rozpouštědla*

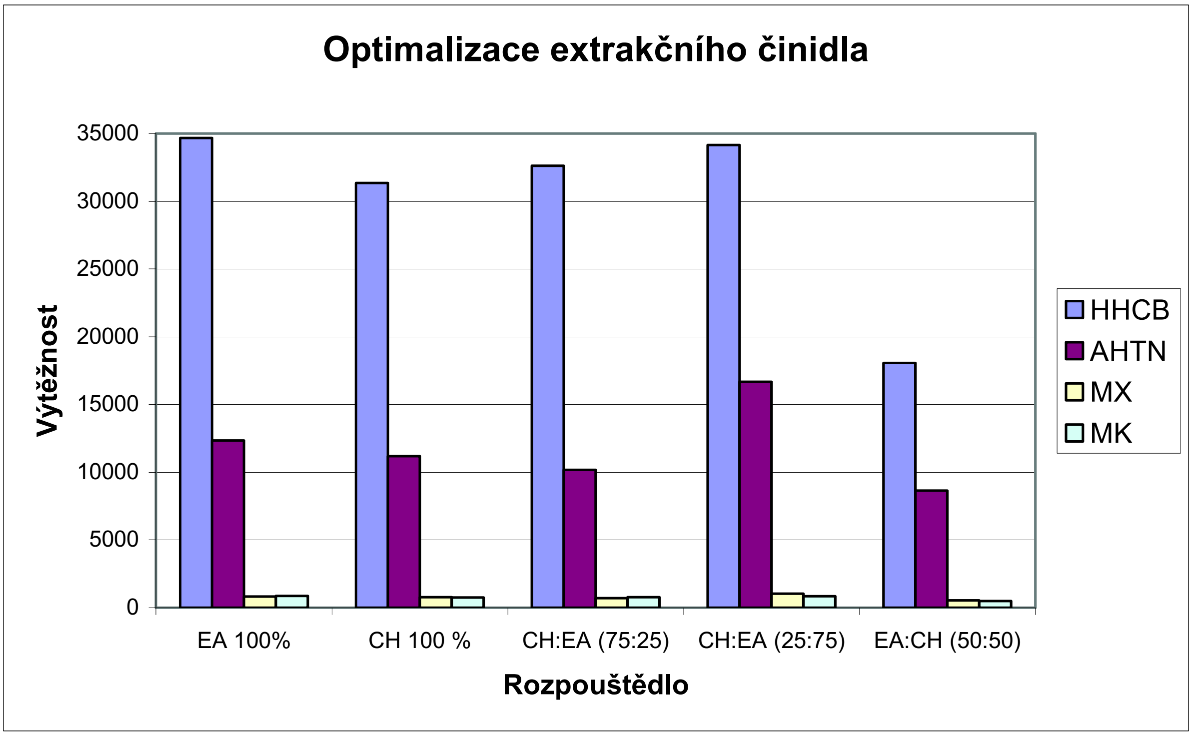
| **Rozpouštědlo** | **Procentuální výtěžnost** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Standard** | **EA 100%** | **CH 100 %** | **CH:EA (75:25)** | **CH:EA (25:75)** | **CH:EA (50:50)** |
| **MX-$D_{15}$** | 86,69 | 90,41 | 85,35 | 88,82 | 87,21 |
| **AHTN-$D_3$** | 86,38 | 87,69 | 79,57 | 84,39 | 84,56 |

Po provedeném hodnocení, a to na základě procentuální výtěžnosti naspikovaných (fortifikovaných) deuterovaných standardů, byl jako vhodné rozpouštědlo zvolen čistý cyklohexan; dalším vhodným extrakčním činidlem byla směs rozpouštědel cyklohexanu a ethylacetátu v objemovém poměru 25:75 (viz Graf 1). Při hodnocení, provedeném na základě množství vyextrahovaných musk sloučenin z reálného vzorku rybí tkáně, bylo konstatováno, že účinnějším extrakčním činidlem byla směs cyklohexanu a ethylacetátu v objemovém poměru 25:75 (viz. Graf 2). Vzhledem k této skutečnosti byla pro následné extrakce vybrána právě směs cyklohexanu a ethylacetátu v poměru 25:75.

Interní standardy byly přidány před extrakcí ke směsi v extrakční patroně, a proto o výsledku optimalizace bylo rozhodnuto zejména s ohledem na analyty, vyextrahované přímo z rybí tkáně (obsažené v buňkách svaloviny).




**Graf 1:** *Závislost výtěžnosti deuterovaných standardů na zvoleném rozpouštědle*




**Graf 2:** *Závislost výtěžnosti musk sloučenin z biotické tkáně na volbě extrakčního činidla*

Nejvhodnějším rozpouštědlem pro izolaci musk sloučenin ze vzorku rybí tkáně metodou tlakem podporované extrakce byla směs cyklohexanu a ethylacetátu v objemovém poměru 25:75. Tato směs byla použita při dalších postupech optimalizace, tj. určení teploty, doby a počtu cyklů extrakce. Rovněž byla použita při extrakci reálných vzorků optimalizovanou metodou.

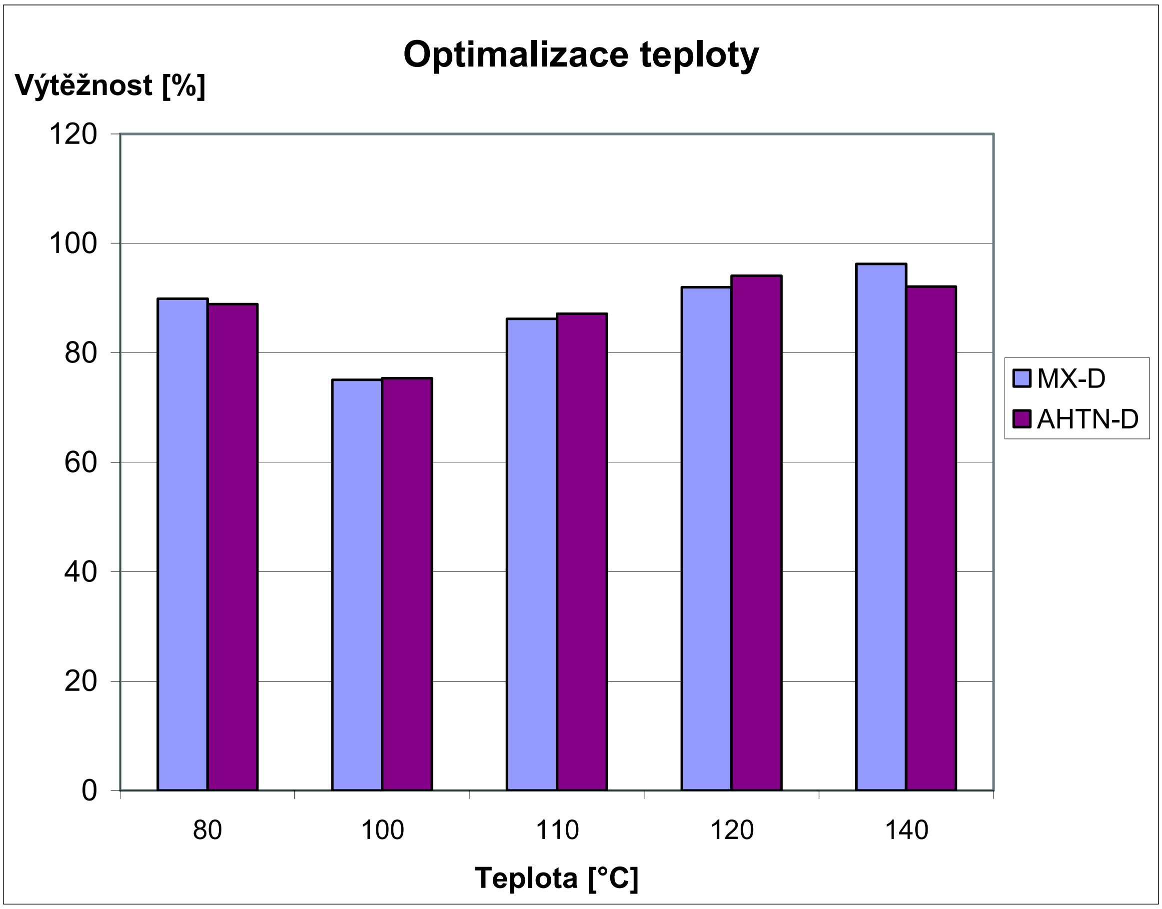
#### *4.2.1.2 Volba teploty pro PSE*

Optimalizace teploty probíhala podle postupu popsaného v kapitole 3.4.2.1. Výsledky optimalizace jsou shrnuty v následující tabulce a grafech.

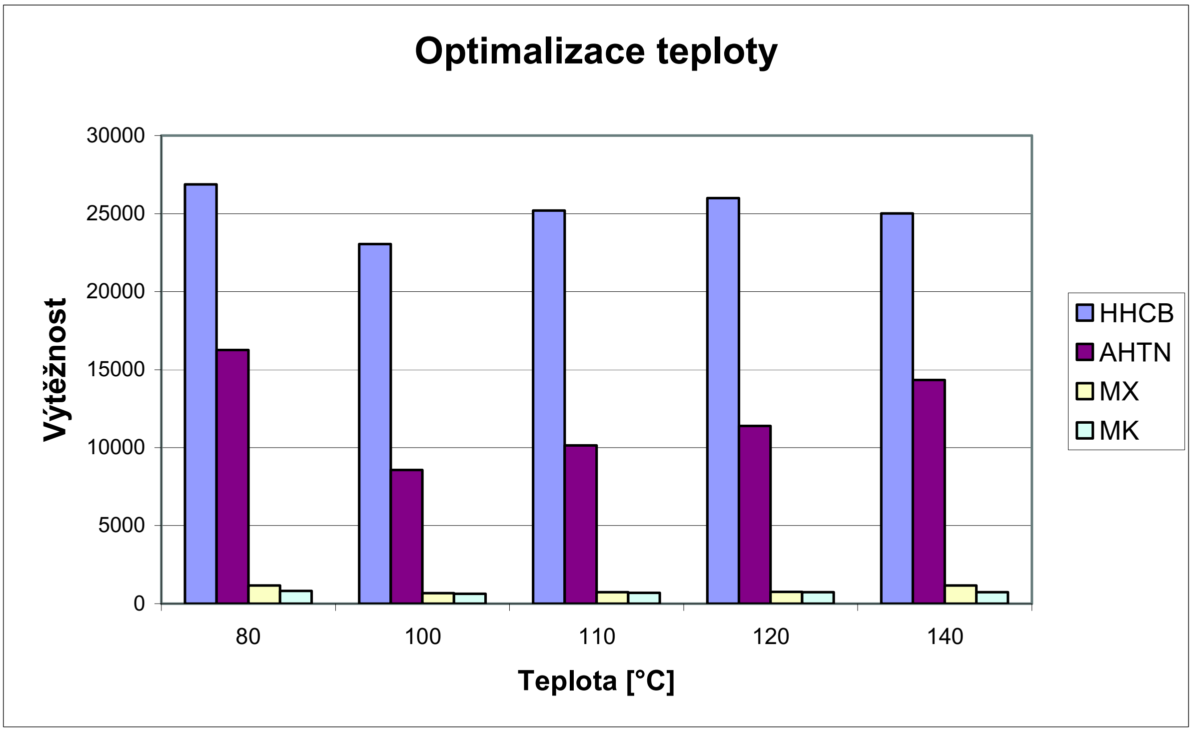
**Tabulka 27:** *Výsledky analýz při optimalizaci teploty extrakce*

| **Teplota** | **Procentuální výtěžnost** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Standard** | **80 °C** | **100 °C** | **110 °C** | **120 °C** | **140 °C** |
| **MX-$D_{15}$** | 89,84 | 75,09 | 86,20 | 91,97 | 96,20 |
| **AHTN-$D_3$** | 88,87 | 75,36 | 87,13 | 94,04 | 92,06 |

Pracovní extrakční teploty používaného extraktoru (onePSE) jsou v teplotním rozmezí 50-200 °C. Pro porovnání výtěžnosti byly zvoleny teploty pohybující se v tomto rozmezí. Nejvyšší zvolenou teplotou bylo 140 °C, protože jsme chtěli předejít změnám analytu vlivem vysoké teploty (tepelné degradace). Nejúčinnější extrakce vnitřních standardů přidaných do vzorku proběhla při teplotě 120 °C. Současně tato extrakční teplota byla nejvhodnější při porovnávání výtěžnosti analytů přítomných ve vzorku svaloviny, a proto byla použita při vlastní analýze.




**Graf 3:** *Závislost výtěžnosti deuterovaných standardů na teplotě extrakce*




**Graf 4:** *Závislost výtěžnosti musk sloučenin z biotické tkáně na volbě teploty extrakce*

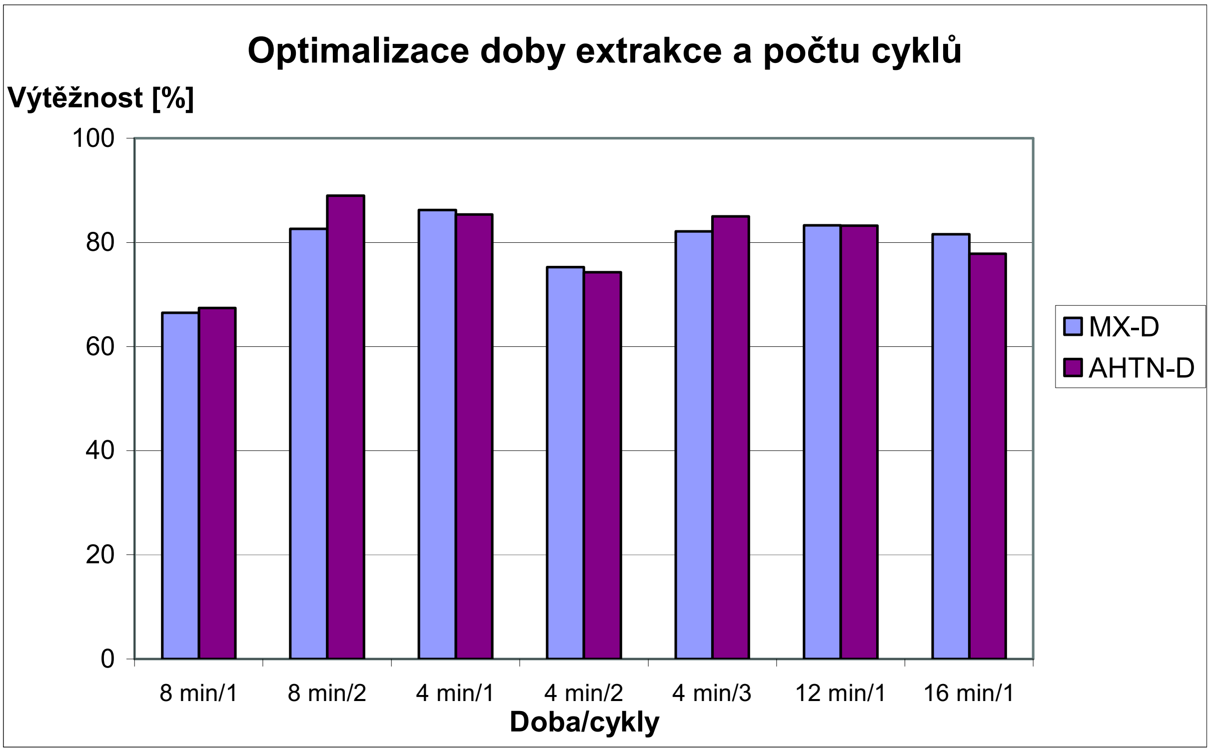
#### *4.2.1.2 Volba doby extrakce a počtu cyklů*

Optimalizace doby zdržení rozpouštědla u vzorku a počtu extrakčních cyklů probíhala podle postupu popsaného v kapitole 3.4.2.1. Výsledky optimalizace jsou shrnuty v následující tabulce a grafech.

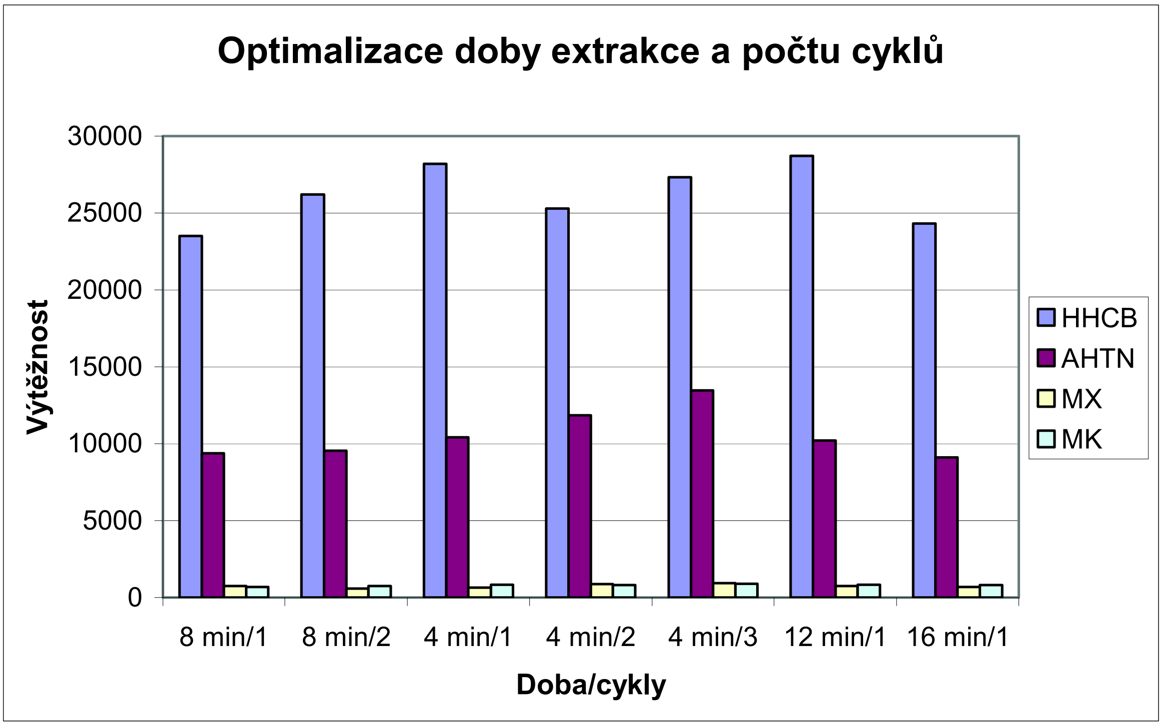
**Tabulka 28:** *Výsledky analýz při optimalizaci doby extrakce a počtu cyklů*

| **Doba/cykly** | **Procentuální výtěžnost** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Standard** | **8 min/1** | **8 min/2** | **4 min/1** | **4 min/2** | **4 min/3** | **12 min/1** | **16 min/1** |
| **MX-$D_{15}$** | 66,49 | 82,62 | 86,26 | 75,19 | 82,10 | 83,32 | 81,56 |
| **AHTN-$D_3$** | 67,39 | 88,99 | 85,35 | 74,26 | 85,03 | 83,23 | 77,86 |

Doba extrakce a počet cyklů jsou parametry, které významným způsobem ovlivňují výsledek extrakce. Závisí zejména na vlastnostech analytu a rozpouštědla, které je pro extrakci použito. Pokud se analyt extrahuje do rozpouštědla v důsledku své dobré rozpustnosti ve zvoleném extrakčním činidle, pak je rozhodujícím parametrem počet cyklů (čím více cyklů, tím lepší extrakce). Pokud probíhá extrakce analytu do rozpouštědla v důsledku difuze, pak je důležitým parametrem doba zdržení rozpouštědla v patroně se vzorkem. Zhodnocení výsledků analýz nám umožnilo konstatovat, že pokud byla použita směs rozpouštědel cyklohexan:ethylacetát (25:75), byly pro extrakci maximálního množství analytu nejvhodnější 3 extrakční cykly s dobou zdržení 4 minuty, což je patrné z grafů 5 a 6.




**Graf 5.** *Závislost výtěžnosti deuterovaných standardů na délce extrakce a počtu cyklů*




**Graf 6.** *Závislost výtěžnosti musk sloučenin z biotické tkáně na délce extrakce a počtu cyklů*

### *4.2.1.3 Optimalizovaná metoda PSE*

Pro izolaci analytů obsažených v reálných vzorcích rybí tkáně byla následně použita metoda extrakce podporovaná tlakem, jejíž optimalizované parametry jsou prezentovány v následující tabulce.

**Tabulka 29:** *Parametry optimalizované metody extrakce PSE*

| **Extrakce podporovaná tlakem (PSE)** | |
|---|---|
| **teplota** | 120 °C |
| **tlak** | 140 Bar |
| **počet cyklů** | 3 |
| **doba zdržení** | 4 min |
| **rozpouštědlo** | CH:EA (25:75) |

Nastavení těchto parametrů by mělo zajistit maximální výtěžnost metody PSE pro dané analyty (musk sloučeniny) a zvolenou matrici (vzorky rybí tkáně). Postup izolace optimalizovanou metodou tlakové extrakce je popsán v kapitole 3.4.2.2. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.5.

## 4.2.2 Optimalizace přečištění vzorku

Pro přečištění vzorku před analýzou pomocí GC-MS byla zvolena metoda sloupcové (kolonové) adsorpční chromatografie. Jako adsorbent byl použit aktivovaný florisil – křemičitan hořečnatý. Hlavním úkolem přečištění bylo odstranění tuku a dalších balastních látek ze vzorku před vlastním provedením analýzy na plynovém chromatografu. Hlavním důvodem jejich odstranění je zanášení inletu, kolony a dalších částí plynového chromatografu vysokomolekulárními látkami, koextrahovanými společně s analyty při PSE. Přítomnost nečistot by dále mohla pozitivně nebo negativně zkreslovat výsledek analýzy (zvýšení šumu, koeluce píků v chromatogramu). Při přečištění kolonovou adsorpční chromatografií je důležitý správný výběr elučního činidla a dále optimalizace objemu tohoto činidla potřebného pro eluci.

### *4.2.2.1 Optimalizace elučního činidla pro kolonovou chromatografii*

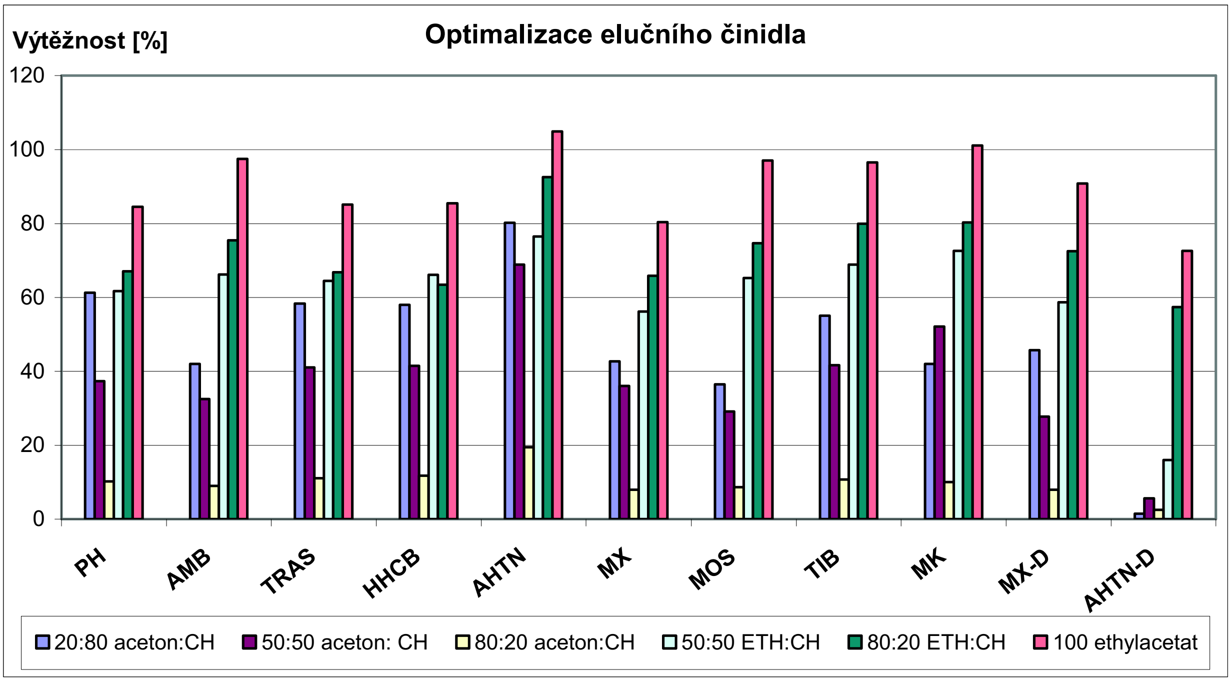
Výběr elučního činidla je podmíněn vlastnostmi analytů a stacionární fáze. Eluční síla rozpouštědla by měla být dostatečná pro vymytí požadovaných analytů z kolony, avšak současně by nemělo docházet k vymývání nečistot (především koextrahovaných látek lipidového charakteru). Postup optimalizace rozpouštědla pro sloupcovou adsorpční chromatografii je popsán v kapitole 3.4.3.1. Výtěžnost analytů za použití různých organických rozpouštědel je uvedena v tabulce 30 a grafu 7.

**Tabulka 30:** *Výsledky optimalizace elučního činidla*

| Rozpouštědlo | Procentuální výtěžnost | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Standard | AC:CH (20:80) | AC:CH (50:50) | AC:CH (80:20) | EA:CH (50:50) | EA:CH (80:20) | EA 100% |
| PH | 61,25 | 37,34 | 10,19 | 61,69 | 67,05 | 84,55 |
| AMB | 42,00 | 32,55 | 8,94 | 66,16 | 75,45 | 97,50 |
| TRAS | 58,32 | 41,05 | 11,17 | 64,48 | 66,77 | 85,16 |
| HHCB | 57,98 | 41,51 | 11,82 | 66,09 | 63,37 | 85,52 |
| AHTN | 80,22 | 68,82 | 19,50 | 76,49 | 92,58 | 104,88 |
| MX | 42,71 | 36,08 | 7,91 | 56,13 | 65,83 | 80,36 |
| MOS | 36,49 | 29,19 | 8,61 | 65,23 | 74,62 | 97,01 |
| TIB | 55,01 | 41,64 | 10,78 | 68,81 | 79,98 | 96,52 |
| MK | 42,05 | 52,09 | 10,02 | 72,55 | 80,33 | 101,08 |
| MX-D | 45,72 | 27,77 | 7,96 | 58,69 | 72,45 | 90,88 |
| AHTN-D | 1,51 | 5,60 | 2,46 | 16,09 | 57,38 | 72,59 |

Optimalizace rozpouštědla byla realizována se vzorkem obsahujícím přesné koncentrace standardů vybraných musk sloučenin. Výsledky analýz vzorků po přečištění byly porovnávány s referenčními hodnotami stanovenými analýzou vzorku se stejnou koncentrací standardů, který neprošel procesem přečištění.

Nejvyšší výtěžnost sledovaných analytů byla zjištěna v případě, kdy byl použit čistý ethylacetát, což je patrné z grafu 7. Proto bylo toto rozpouštědlo zvoleno jako eluční činidlo pro přečištění reálných vzorků metodou kolonové adsorpční chromatografie.




**Graf 7:** *Závislost výtěžnosti analytů na volbě elučního činidla*

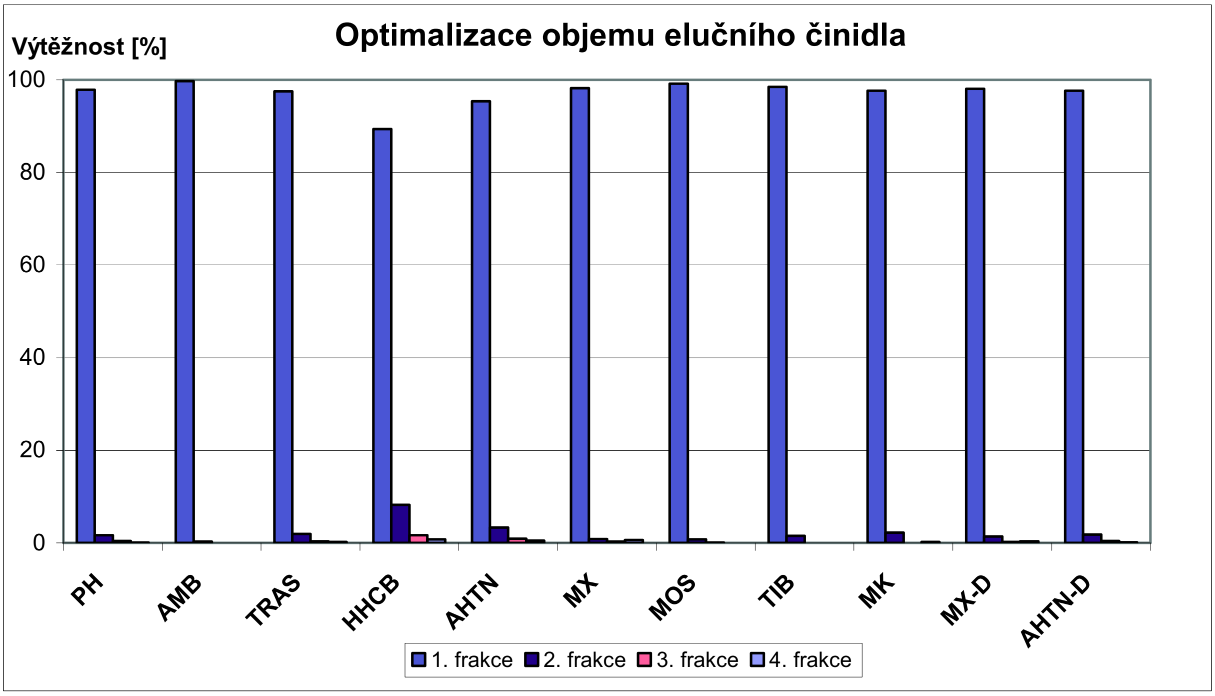
#### *4.2.2.2 Optimalizace množství elučního činidla pro kolonovou chromatografii*

Množství elučního činidla používaného při přečištění vzorku na chromatografické koloně s adsorpční náplní by mělo být dostatečné pro eluci analytů. Před analýzou vzorku zvolenou metodou GC-MS je nutné analyty ve vzorku zakoncentrovat, což se provádí odpařením rozpouštědla pomocí vakuové rotační odparky. Proto je vhodné při přečištění minimalizovat množství použitého elučního činidla. Postup optimalizace je popsán v kapitole 3.4.3.1. Výsledky optimalizace jsou uvedeny v následující tabulce a grafu 8.

**Tabulka 31:** *Údaje pro optimalizaci množství elučního činidla*

| **Objem (40 ml)** | **Procentuální výtěžnost** | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Standard** | **1. frakce** | **2. frakce** | **3. frakce** | **4. frakce** |
| **PH** | 97,87 | 1,64 | 0,39 | 0,09 |
| **AMB** | 99,72 | 0,28 | 0,00 | 0,00 |
| **TRAS** | 97,54 | 1,94 | 0,34 | 0,18 |
| **HHCB** | 89,40 | 8,19 | 1,63 | 0,79 |
| **AHTN** | 95,35 | 3,30 | 0,87 | 0,48 |
| **MX** | 98,21 | 0,86 | 0,29 | 0,64 |
| **MOS** | 99,18 | 0,78 | 0,05 | 0,00 |
| **TIB** | 98,48 | 1,49 | 0,02 | 0,00 |
| **MK** | 97,63 | 2,20 | 0,00 | 0,17 |
| **AHTN-$D_3$** | 98,07 | 1,41 | 0,18 | 0,34 |
| **MX-$D_{15}$** | 97,65 | 1,79 | 0,40 | 0,16 |

Výsledky optimalizace jasně ukazují, že již prvních 40 ml elučního činidla postačuje k eluci více než 90 % obsahu musk sloučenin. Pro zabezpečení možných ztrát analytu v důsledku rychlejšího průtoku činidla kolonou nebo odpařováním rozpouštědla bylo pro eluci zvoleno jako optimální množství 80 ml rozpouštědla.




**Graf 8:** *Výsledky optimalizace elučního činidla*

#### 4.2.2.3 Optimalizovaná metoda kolonové adsorpční chromatografie

Pro přečištění extraktu ze vzorku rybí tkáně byla použita metoda kolonové adsorpční chromatografie s optimalizovanými parametry uvedenými v tabulce 32. Postup je popsán v kapitole 3.4.3.2, výsledky pak v kapitole 4.5.

**Tabulka 32:** *Parametry optimalizované metody přečištění*

| Kolonová adsorpční chromatografie | |
|---|---|
| **eluční činidlo** | ethylacetát |
| **adsorbent** | florisil |
| **objem EČ** | 80 ml |
| **průtok EČ** | 6 kapek/min |

## 4.3 Identifikace a kvantifikace analytů

### 4.3.1 Identifikace analytů

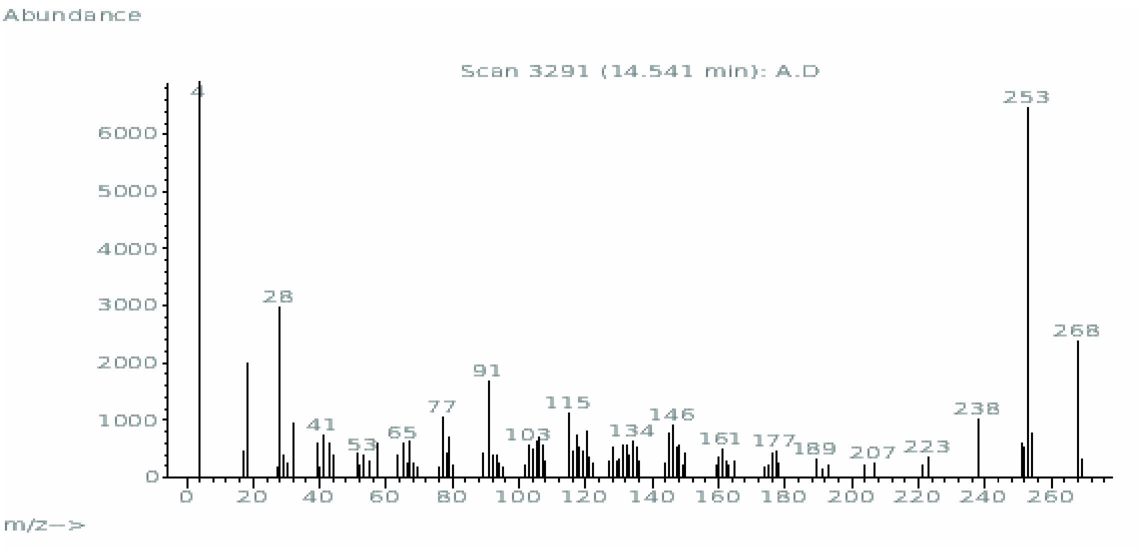
K identifikaci sledovaných musk sloučenin byla použita metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Vzhledem k velice nízkým koncentracím těchto látek, které byly ve vzorcích obsaženy, byl k identifikaci a kvantifikaci použit pracovní režim SIM, který vykazuje větší citlivost, a to až o dva řády, než SCAN. Identifikace analytů byla provedena pomocí standardů musk sloučenin. Postup je popsán v kapitole 3.4.4.1.

Z výsledků analýzy roztoku obsahujícího standardy sledovaných musk sloučeniny bylo získáno hmotnostní spektrum jednotlivých analytů, ze kterých byly odečteny identifikační a kvantifikační ionty. Na základě těchto charakteristik pak byly jednotlivé analyty identifikovány v chromatogramu a získány retenční časy potřebné pro nastavení parametrů pracovního módu SIM plynového chromatografu.

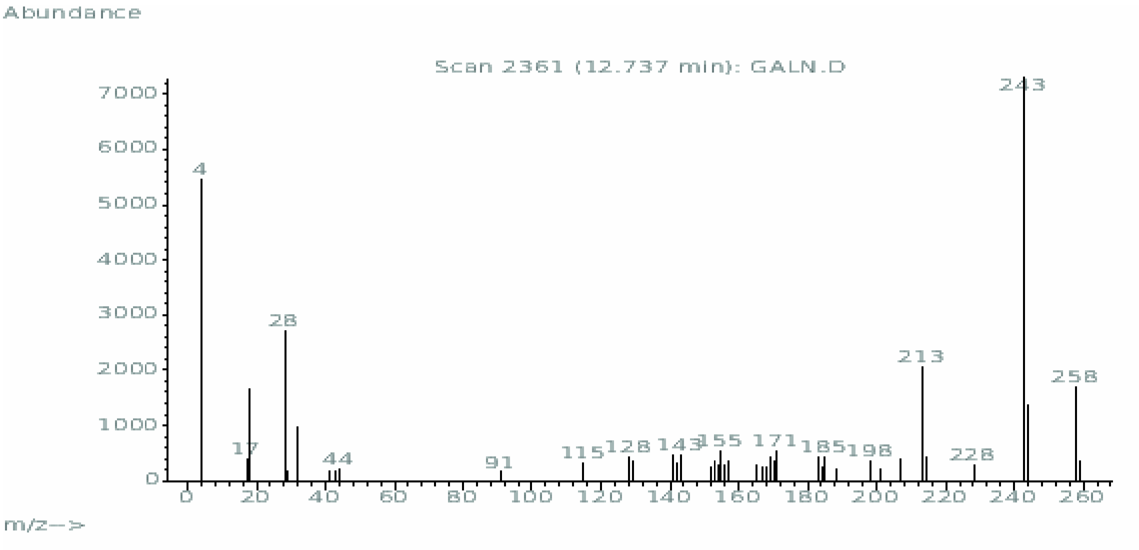
Na základě získaných charakteristik pro sledované analyty (identifikační a kvantifikační ion, retenční čas) byly identifikovány jednotlivé musk sloučeniny v chromatografu získaném analýzou reálného vzorku.

#### 4.3.1.1 Hmotnostní spektra, chromatogram

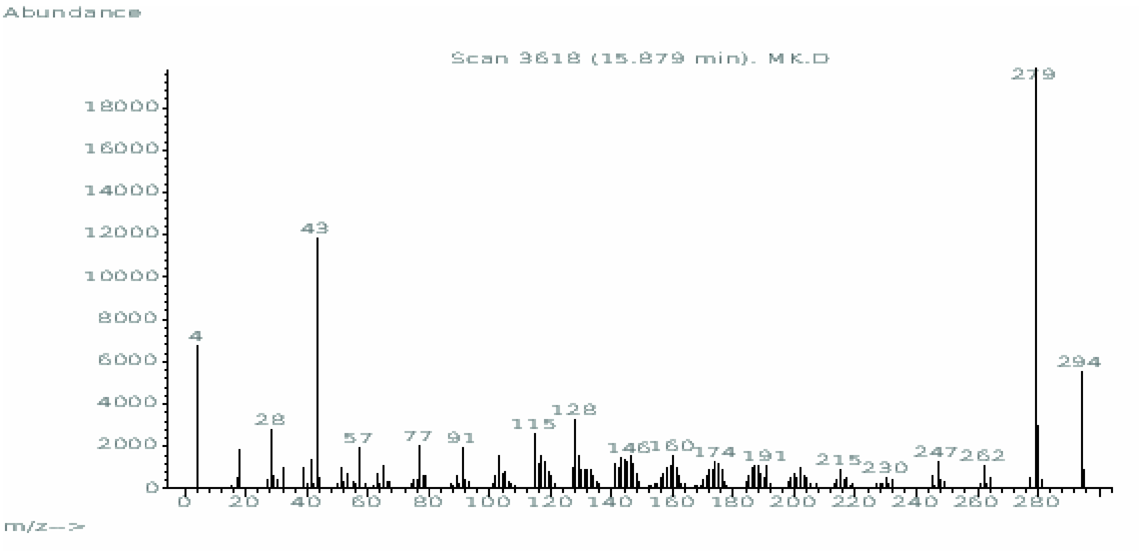
Na obrázcích 16-24 jsou uvedena hmotnostní spektra pro jednotlivé analyty, která byla získána analýzou roztoků standardů, a to postupem uvedeným v kapitole 3.4.4.1. Pro ověření správnosti byla spektra porovnána se spektry v knihovně spekter příslušného MS. Tato hmotnostní spektra nám umožnila získat identifikační a kvantifikační ionty pro jednotlivé analyty. Obrázek 24 představuje ukázkový chromatogram analýzy roztoku, obsahujícího všech 9 sledovaných musk sloučenin. Chromatogram byl získán analýzou při nastavení podmínek uvedených v kapitole 3.4.4.2., s výjimkou prvního parametru teplotní rampy; proto se retenční časy v tomto případě liší od skutečných, které byly odečteny z jiných, již upravených chromatogramů. Výsledné charakteristické ionty a retenční časy jsou uvedeny v kapitole 4.3.1.2.



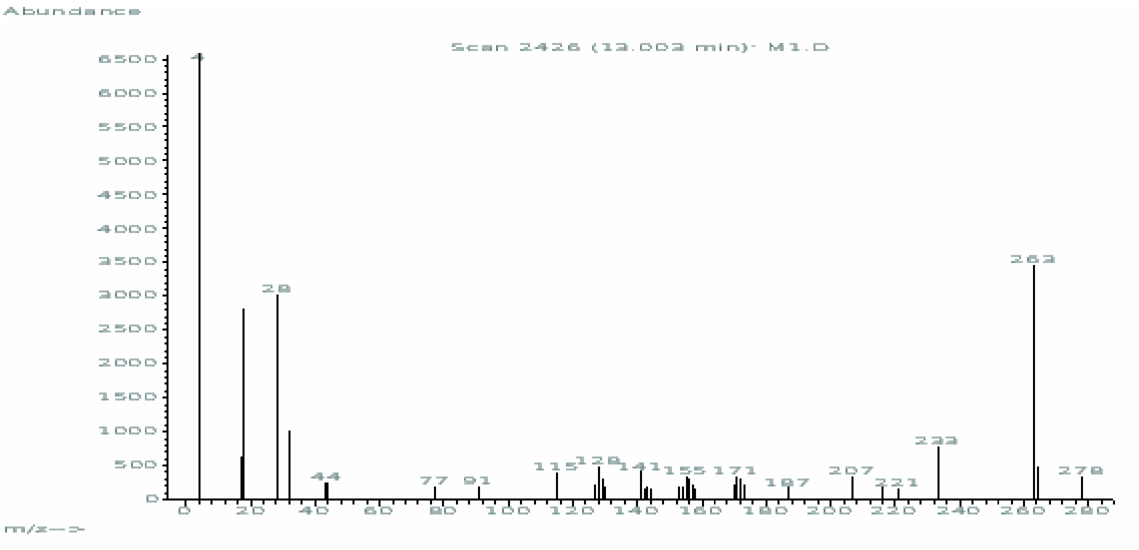

**Obr. 16:** *Hmotnostní spektrum ambrette*



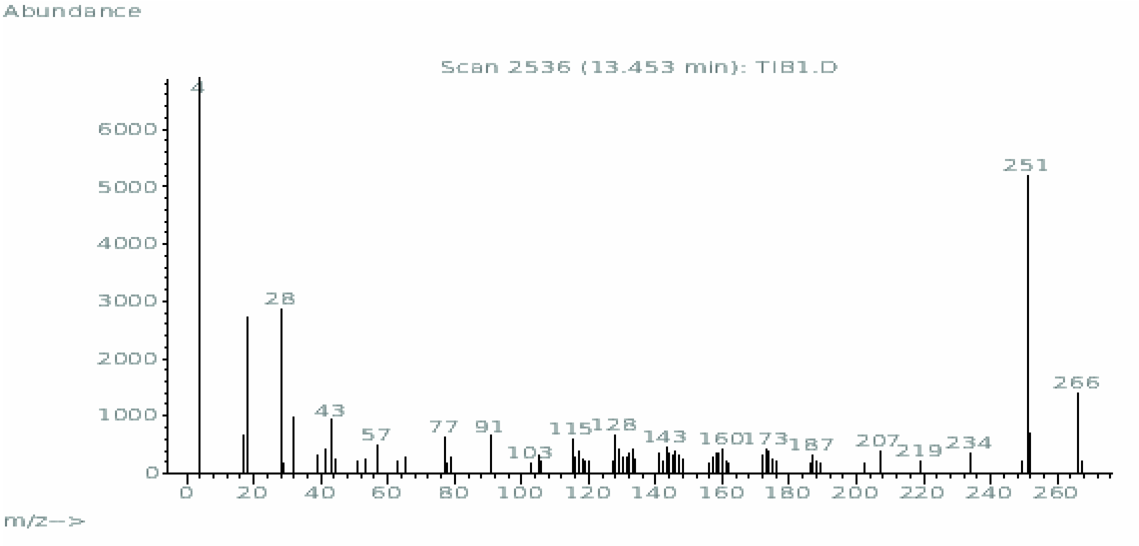

**Obr. 17:** *Hmotnostní spektrum galaxolidu*



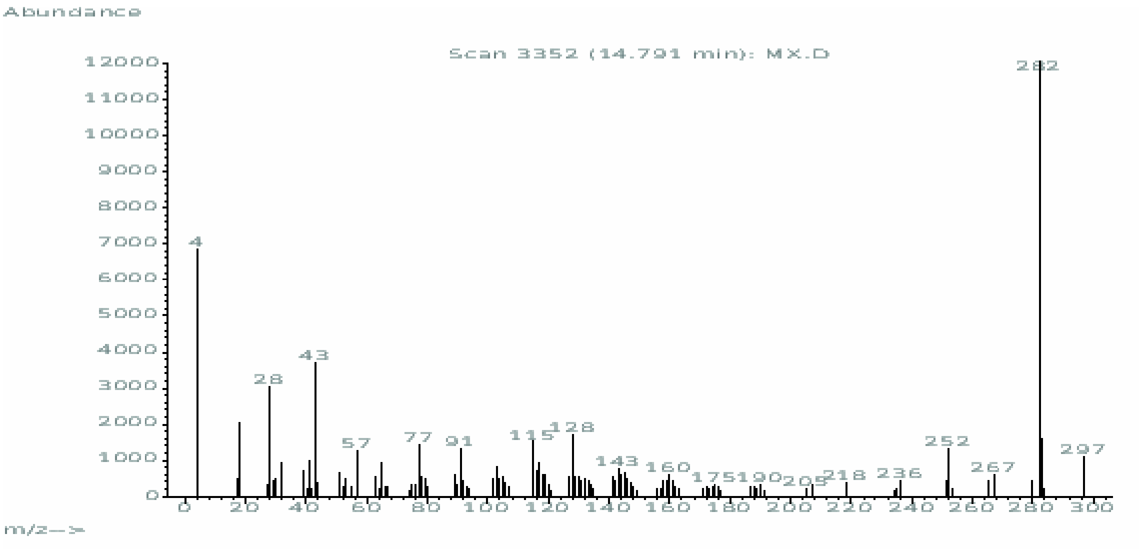

**Obr. 18:** *Hmotnostní spektrum musk ketonu*



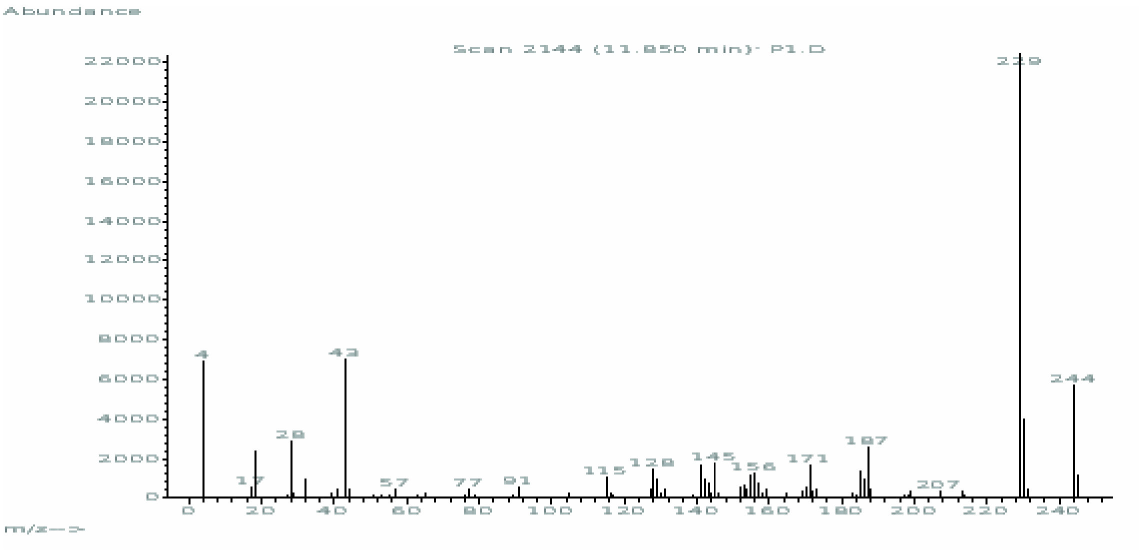

**Obr. 19:** *Hmotnostní spektrum musk moskenu*



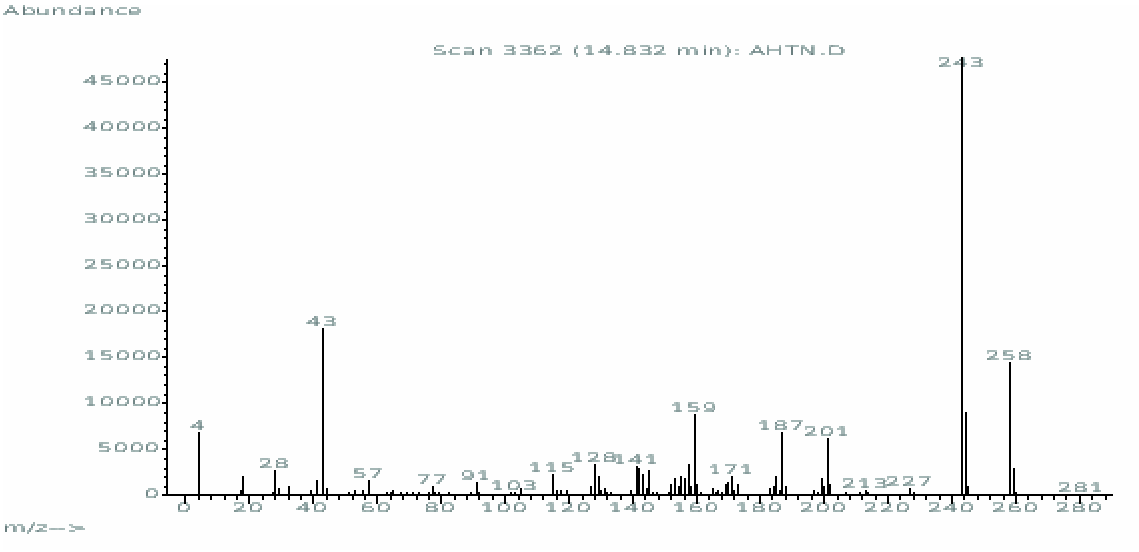

**Obr. 20:** *Hmotnostní spektrum musk tibetenu*



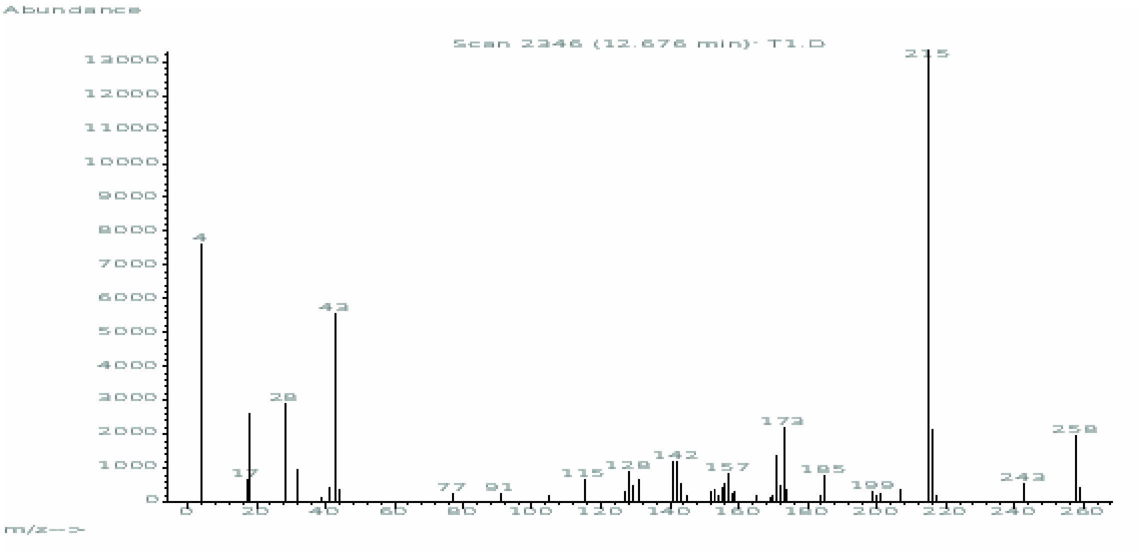

**Obr. 21:** *Hmotnostní spektrum musk xylenu*



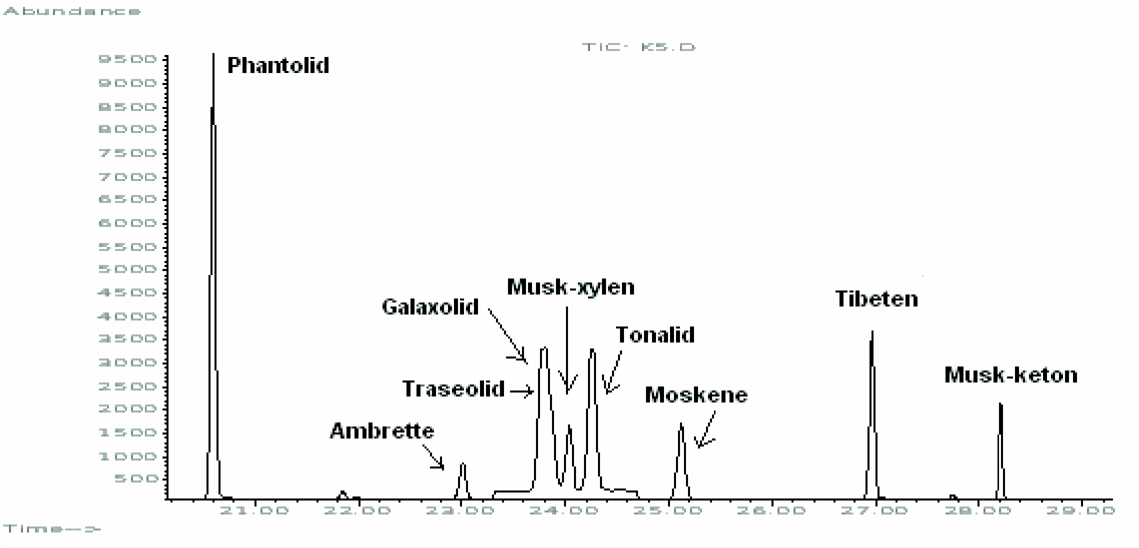

**Obr. 22:** *Hmotnostní spektrum phantolidu*




**Obr. 23:** *Hmotnostní spektrum tonalidu*




**Obr. 24:** *Hmotnostní spektrum traseolidu*




**Obr. 25:** *Ukázkový chromatogram 9 musk sloučenin*

Z chromatogramu na obrázku 25 je zřejmé, že píky Galaxolidu a Traseolidu se vzájemně překrývají. Díky použití hmotnostně-spektrometrického detektoru je možné tyto píky od sebe extrahovat výběrem specifického identifikačního iontu, což usnadňuje integraci a odečet hodnot. Není proto nutné upravovat teplotní rampu GC.

#### *4.3.1.2 Charakteristické ionty, retenční časy*

Charakteristiky sledovaných musk sloučenin získané analýzou roztoků standardů jsou uvedeny v tabulce 33.

**Tabulka 33:** *Charakteristiky sledovaných analytů*

| Musk sloučenina | Zkratka | Hlavní m/z | Vedlejší m/z | Retenční čas |
|---|---|---|---|---|
| **Phantolid** | PH | 229 | 244 | 18,608 |
| **Ambrette** | AMB | 253 | 268 | 21,02 |
| **Traseolid** | TRAS | 215 | 258 | 21,77 |
| **Galaxolid** | HHCB | 243 | 258 | 21,824 |
| **Tonalid** | AHTN | 243 | 258 | 22,253 |
| **Musk-xylen** | MX | 282 | 297 | 22,092 |
| **Musk-moskene** | MOS | 263 | 278 | 23,110 |
| **Musk-tibeten** | TIB | 251 | 266 | 24,986 |
| **Musk-keton** | MK | 279 | 294 | 26,219 |
| **Tonalid $D_3$** | AHTN-$D_3$ | 246 | 261 | 22,159 |
| **Musk-xylen $D_{15}$** | MX-$D_{15}$ | 294 | 312 | 21,516 |

### 4.3.2 Kalibrace

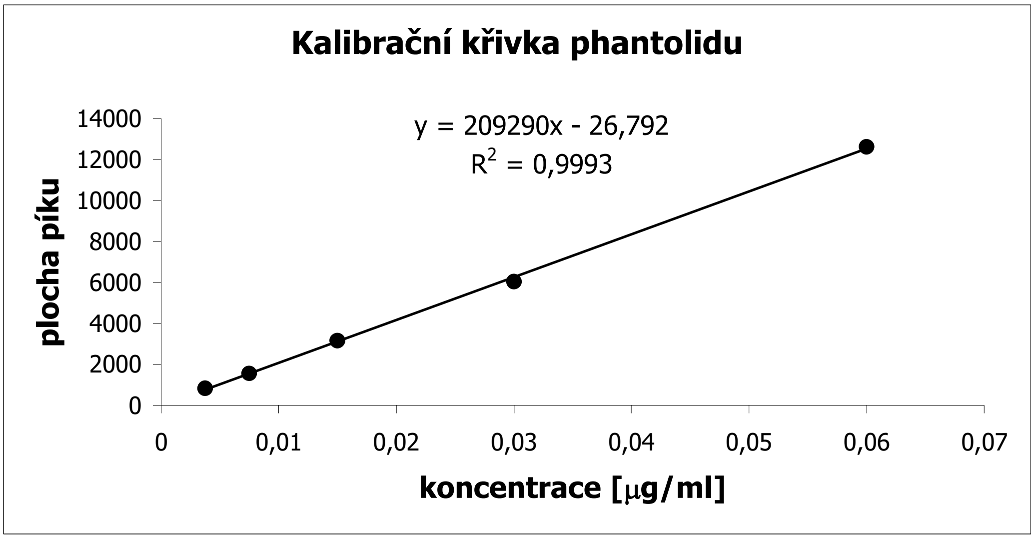
Pro vyhodnocení výsledků analýzy bylo nutné vytvoření kalibrační závislosti velikosti signálu na koncentraci stanovovaného analytu. K tomuto účelu byly použity roztoky standardů o přesné, známé koncentraci, jejichž naředěním jsme získali koncentrační řadu o různých koncentracích. Po proměření jednotlivých kalibračních roztoků a sestrojení grafů závislosti signálu na koncentraci, jsme obdrželi lineární závislosti koncentrace a velikosti signálu pro každý stanovovaný analyt. Proložením bodů jsme získali lineární přímku (spojnici) charakterizovanou regresní rovnicí. Z hodnot regresních rovnic a údajů získaných ze spektra při proměřování reálných vzorků byly vypočítány reálné koncentrace analytů, obsažené ve vzorcích ryb.

Při přípravě kalibrační řady roztoků standardů bylo velice důležité rozhodnout, jaké koncentrace by bylo vhodné naředit. Koncentrační rozsah jednotlivých kalibračních křivek byl zvolen v rozsahu blízkém očekávaným výsledkům koncentrací stanovovaného analytu ve vzorku. Proto byly použity hodnoty předběžných stanovení vzorků. Pro každý standard stanovované musk sloučeniny byla sestrojena vlastní kalibrační závislost.

#### *4.3.2.1 Kalibrační závislost phantolidu*

**Tab. 34:** *Data pro sestrojení kalibrační závislosti phantolidu*

| c [μg/ml] | plocha |
|---|---|
| 0,00375 | 827 |
| 0,0075 | 1548 |
| 0,015 | 3163 |
| 0,03 | 6038 |
| 0,06 | 12620 |

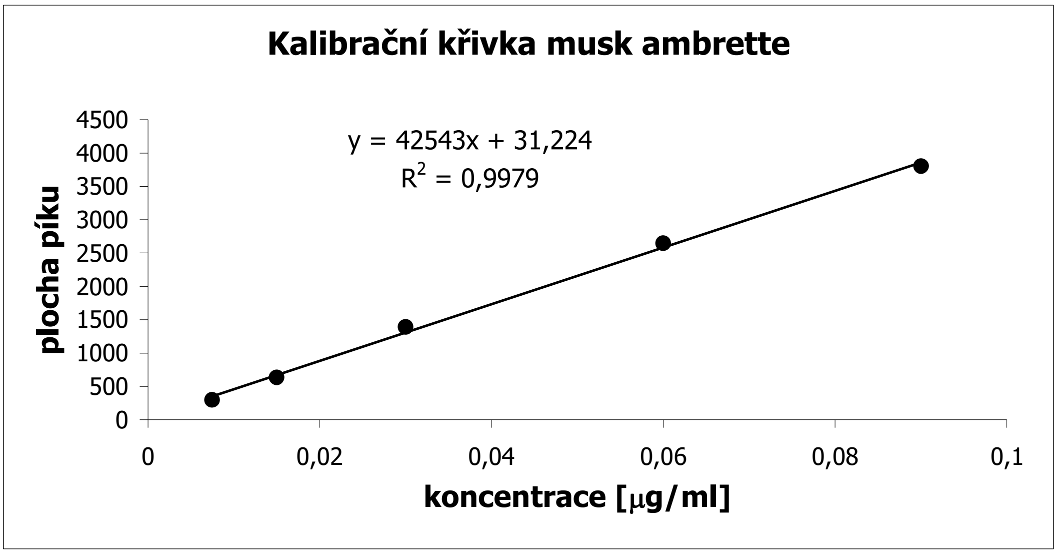



**Graf 9:** *Kalibrační závislost phantolidu*

#### *4.3.2.2 Kalibrační závislost musk ambrette*

**Tab. 35:** *Data pro sestrojení kalibrační závislosti musk ambrette*

| c [μg/ml] | plocha |
|---|---|
| 0,0075 | 296 |
| 0,015 | 637 |
| 0,03 | 1393 |
| 0,06 | 2643 |
| 0,09 | 3802 |

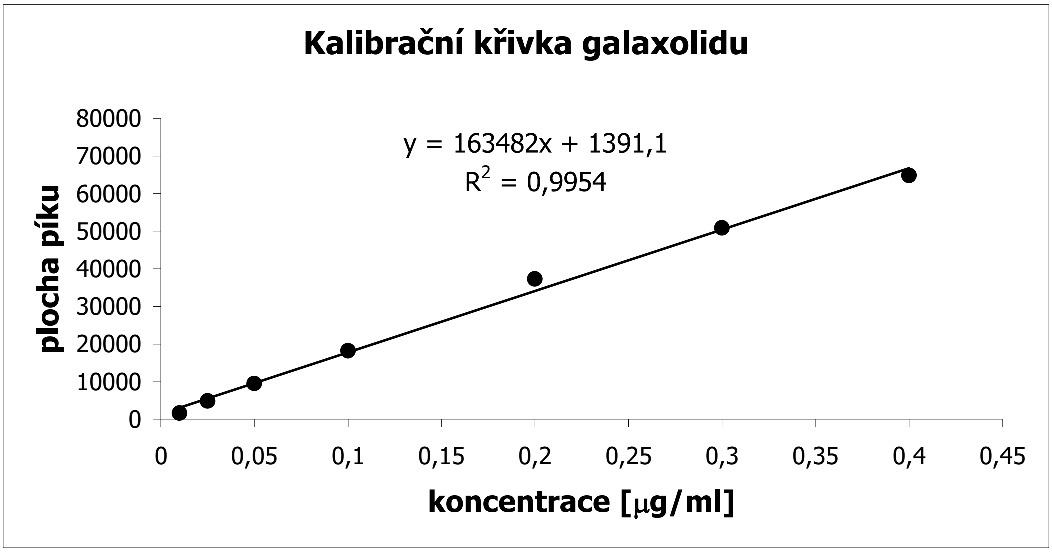



**Graf 10:** *Kalibrační závislost musk ambrette*

#### *4.3.2.3 Kalibrační závislost galaxolidu*

**Tab. 36:** *Data pro sestrojení kalibrační závislosti galaxolidu*

| c [μg/ml] | plocha |
|---|---|
| 0,01 | 1614 |
| 0,025 | 4828 |
| 0,05 | 9456 |
| 0,1 | 18260 |
| 0,2 | 37271 |
| 0,3 | 50834 |
| 0,4 | 64853 |

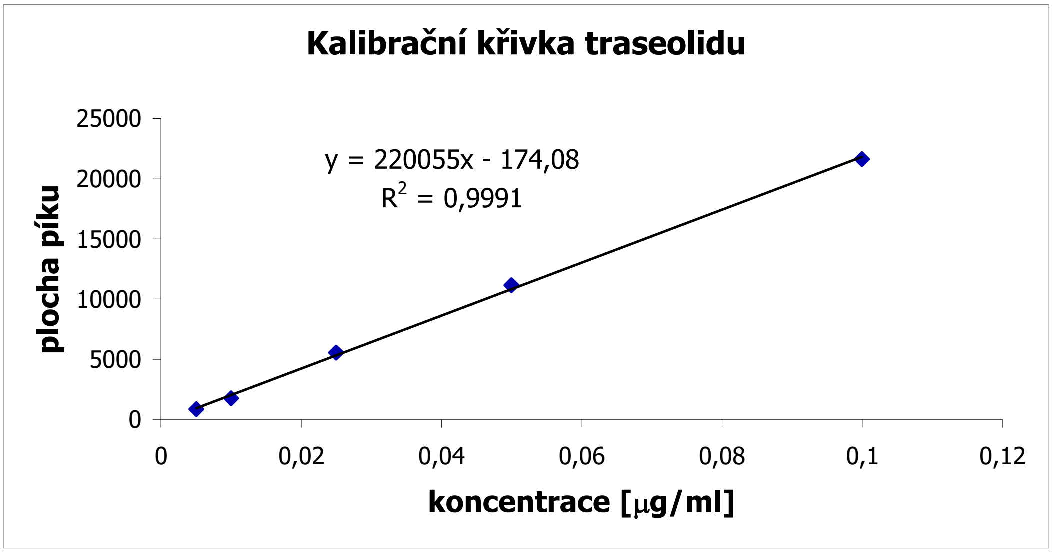



**Graf 11:** *Kalibrační závislost galaxolidu*

#### *4.3.2.4 Kalibrační závislost traseolidu*

**Tab. 37:** *Data pro sestrojení kalibrační závislosti traseolidu*

| c [μg/ml] | plocha |
|---|---|
| 0,005 | 852 |
| 0,01 | 1739 |
| 0,025 | 5550 |
| 0,05 | 11153 |
| 0,1 | 21646 |

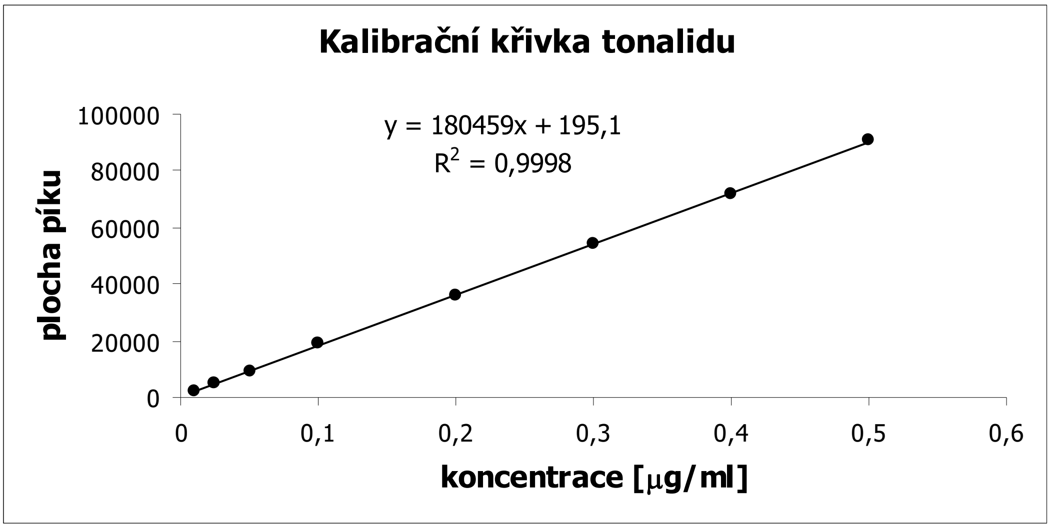



**Graf 12:** *Kalibrační závislost traseolidu*

#### *4.3.2.5 Kalibrační závislost tonalidu*

**Tab. 38:** *Data pro sestrojení kalibrační závislosti tonalidu*

| c [μg/ml] | plocha |
|---|---|
| 0,01 | 1855 |
| 0,025 | 4686 |
| 0,05 | 9458 |
| 0,1 | 18734 |
| 0,2 | 35949 |
| 0,3 | 53959 |
| 0,4 | 71896 |
| 0,5 | 91052 |

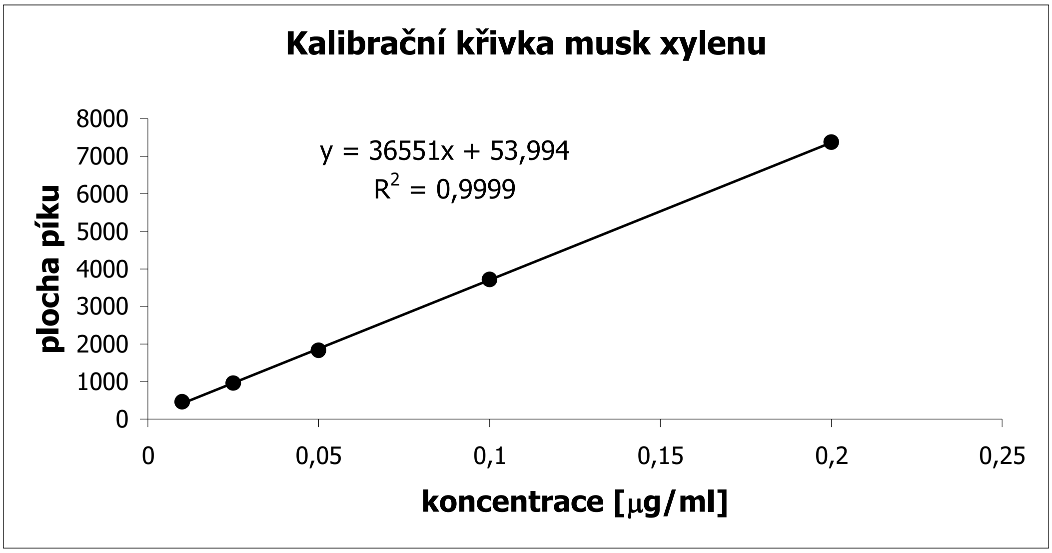



**Graf 13:** *Kalibrační závislost tonalitu*

#### *4.3.2.6 Kalibrační závislost musk xylenu*

**Tab. 39:** *Data pro sestrojení kalibrační závislosti musk xylenu*

| c [μg/ml] | plocha |
|---|---|
| 0,01 | 455 |
| 0,025 | 962 |
| 0,05 | 1836 |
| 0,1 | 3720 |
| 0,2 | 7369 |

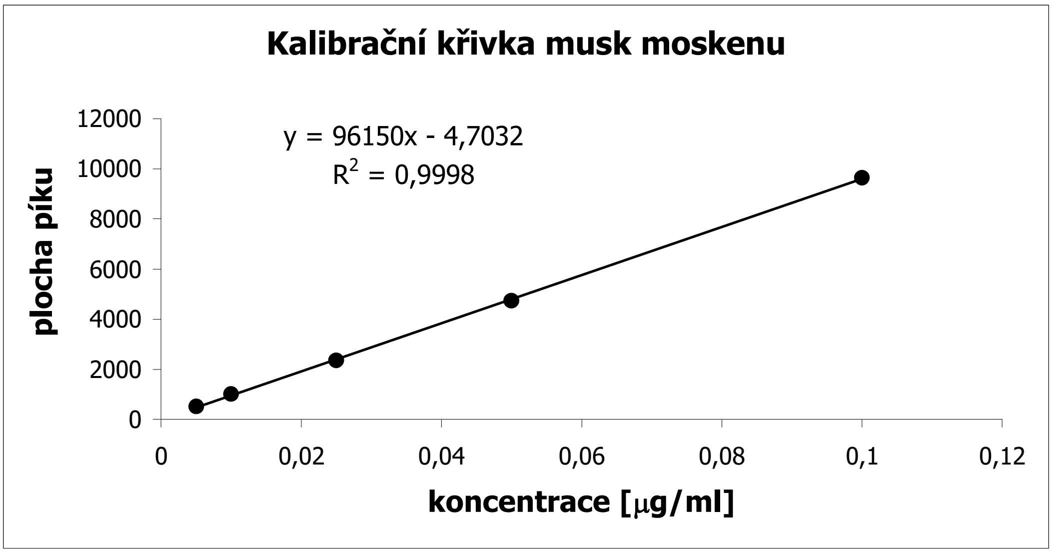



**Graf 14:** *Kalibrační závislost musk xylenu*

#### *4.3.2.7 Kalibrační závislost musk moskenu*

**Tab. 40:** *Data pro sestrojení kalibrační závislosti musk moskenu*

| c [μg/ml] | plocha |
|---|---|
| 0,005 | 503 |
| 0,01 | 1003 |
| 0,025 | 2354 |
| 0,05 | 4736 |
| 0,1 | 9649 |

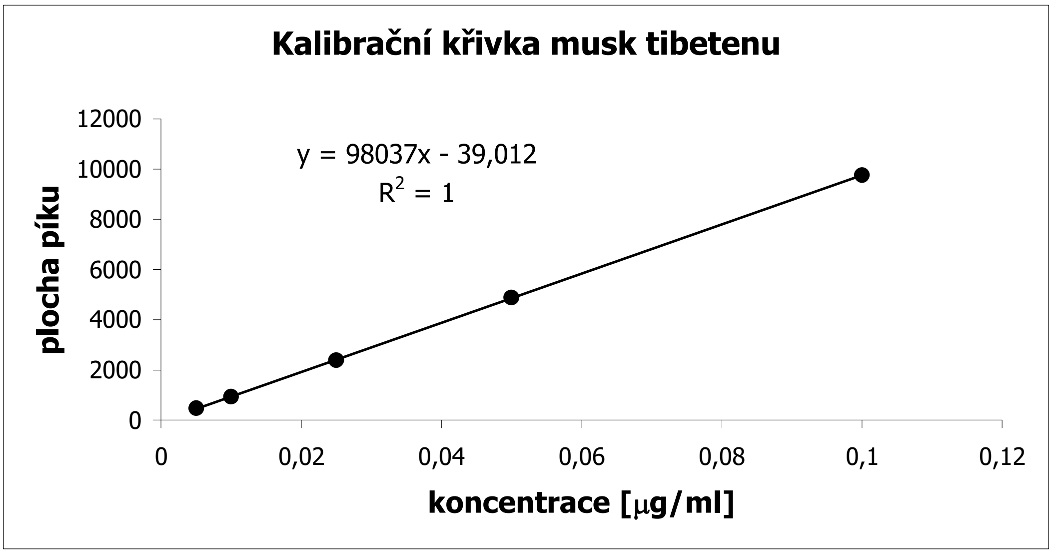



**Graf 15:** *Kalibrační závislost musk moskenu*

### *4.3.2.8 Kalibrační závislost tibetenu*

**Tab. 41:** *Data pro sestrojení kalibrační závislosti tibetenu*

| c [μg/ml] | plocha |
|---|---|
| 0,005 | 464 |
| 0,01 | 931 |
| 0,025 | 2394 |
| 0,05 | 4884 |
| 0,1 | 9759 |

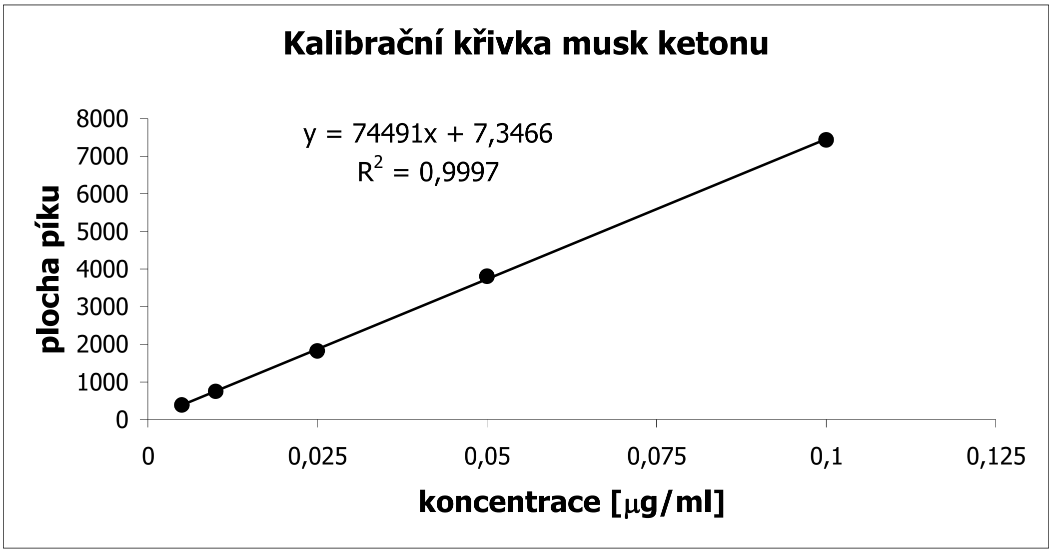



**Graf 16:** *Kalibrační závislost tibetenu*

### *4.3.2.9 Kalibrační závislost musk ketonu*

**Tab. 42:** *Data pro sestrojení kalibrační závislosti musk ketonu*

| c [μg/ml] | plocha |
|---|---|
| 0,005 | 382 |
| 0,01 | 744 |
| 0,025 | 1826 |
| 0,05 | 3808 |
| 0,1 | 7430 |




**Graf 17:** *Kalibrační závislost musk ketonu*

## 4.3.3 Určení meze detekce a stanovitelnosti

Pro vyhodnocení výsledků analýzy je zapotřebí určit mez detekce LOD a mez stanovitelnosti LOQ optimalizované metody, použité pro stanovení vybraných musk sloučenin.

### *4.3.3.1 Mez detekce (LOD)*

Mez detekce (*LOD – Limit of detection*) – představuje nejmenší koncentraci hodnoceného analytu, kterou je možno ve vzorku spolehlivě zjistit, avšak nemusí být stanovitelná jako exaktní hodnota. Odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu.

Mez detekce je nejnižší výsledek měření pro daný analytický postup a analyt, který může být na dané hladině významnosti přijat za odlišný od hodnoty získané stejným analytickým postupem při použití materiálu, který daný analyt neobsahuje [58].

### *4.3.3.2 Mez stanovitelnosti (LOQ)*

Mez stanovitelnosti (*LOQ – Limit of quantitation)* – představuje nejmenší koncentraci stanovovaného analytu, kterou je možno ve vzorku spolehlivě stanovit. Odpovídá koncentraci, při kterou je přesnost stanovení taková, že dovoluje kvantitativní vyhodnocení [58].

### *4.3.3.3 Citlivost*

Citlivost (sensitivity) analytické metody je takový rozdíl v koncentraci analytu, který odpovídá nejmenšímu zjistitelnému rozdílu v odezvě signálu metody. Je definována jako podíl změny odezvy měřicího zařízení (výstupní signál) a odpovídající změny podnětu (vstupní signál). Citlivost analytické metody je rovna směrnici kalibrační závislosti v případě, že je kalibrační závislost signálu na koncentraci analytu lineární. Není-li kalibrační závislost lineární, mění se citlivost s koncentrací analytu [58].

#### 4.3.3.4 Výpočet LOD, LOQ

Pro výpočet byl použit vztah mezi směrodatnou odchylkou kalibrační závislosti velikosti signálu na koncentraci analytu a směrnicí regresní křivky.

- **Mez detekce:** $LOD = \frac{3 \cdot s_a}{k}$

kde $s_a$ je směrodatná odchylka lineární závislosti kalibrace a $k$ je směrnice kalibrační křivky.

- **Mez kvantifikace:** $LOQ = \frac{10 \cdot s_a}{k}$

kde $s_a$ je směrodatná odchylka lineární závislosti kalibrace a $k$ je směrnice kalibrační křivky.

- **Relativní směrodatná odchylka:** $s_a = \sqrt{\frac{\sum (Y - Y_i)^2}{n-2}}$ [58]

**Tabulka 43:** *Meze detekce a stanovitelnosti metody pro stanovení musk sloučenin*

| Musk sloučenina | směrnice kalibrace | LOD [μg/kg] | LOQ [μg/kg] |
|---|---|---|---|
| **PH** | 209289,96 | 0,5454 | 1,818 |
| **AMB** | 42542,63 | 1,464 | 4,880 |
| **TR** | 220054,73 | 1,105 | 3,684 |
| **HHCB** | 163482,12 | 8,949 | 29,83 |
| **AHTN** | 180459,42 | 1,985 | 6,615 |
| **MX** | 36550,72 | 0,7486 | 2,495 |
| **MOS** | 96150,08 | 0,5004 | 1,668 |
| **TIB** | 98037,15 | 0,1543 | 0,514 |
| **MK** | 74490,88 | 0,5705 | 1,902 |

## 4.4 Obsah musk sloučenin v reálných vzorcích

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat metodu stanovení musk sloučenin v biotické matrici a následně optimalizovanou metodu použít pro analýzu reálných vzorků rybí tkáně na obsah vybraných umělých mošusových látek. Postup anylýzy je uveden na obrázku 16, popis postupu optimalizovanou metodou je uveden v kapitolách 3.4.2.2, 3.4.3.2 a 3.4.4.2. Specifikace vzorků je uvedena v kapitole 3.3.1. Výsledky analýz vzorkovaných ryb na obsah vybraných musk sloučenin jsou uvedeny v následujících kapitolách, včetně nejistot měření.

V tabulkách se vyskytují tři druhy „hodnot“:

- číslo – koncentrace je vyšší než mez stanovitelnosti, reálná hodnota koncentrace uvedená v μg/kg
- NQ – koncentrace je vyšší než mez detekce, ale nižší než mez stanovitelnosti (LOD < nq < LOQ)
- nd – koncentrace je nižší než mez detekce (< LOD)

K analýze byly použity dvě série vzorků (20 ryb odlovených před ČOV a 20 ryb odlovených za ČOV); na závěr je provedeno porovnání kontaminace těchto dvou sérií vzorků.

Pro výpočet průměrné koncentrace sledovaných analytů ve vzorcích ryb byly hodnoty nd a NQ nahrazeny číselnými hodnotami vycházejícími z meze detekce a meze stanovitelnosti. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 44.

**Tabulka 44:** *Hodnoty nd a NQ pro výpočet průměrné koncentrace*

| Analyt [mg/kg] | PH | AMB | TR | HHCB | AHTN | MX | MOS | TIB | MK |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **nd** | 0,2727 | 0,7320 | 0,5527 | 4,474 | 0,9923 | 0,3743 | 0,2502 | 0,0772 | 0,2853 |
| **NQ** | 0,5454 | 1,464 | 1,105 | 8,949 | 1,985 | 0,7486 | 0,5004 | 0,1543 | 0,5705 |

## 4.5.1 Výsledky analýz ryb odlovených před ČOV

Z výsledků analýz svalové tkáně ryb odlovených před čistírnou odpadních vod v Modřicích jsme získaly kvantitativní údaje pouze pro tři vybrané analyty.

**Tabulka 45:** *Výsledky analýzy vzorků tkáně ryb odlovených před ČOV*

| číslo vzorku | Výtěžnost tuku [%] | Koncentrace musk sloučenin [µg/kg svaloviny] | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PH | AMB | TR | HHCB | AHTN | MX | MOS | TIB | MK |
| **1** | 3,63 | nd | nd | nd | NQ | 10,52 | nd | nd | nd | NQ |
| **2** | 2,14 | nd | nd | nd | NQ | NQ | nd | nd | nd | 12,16 |
| **3** | 2,23 | nd | nd | nd | NQ | NQ | NQ | nd | nd | NQ |
| **4** | 5,95 | NQ | NQ | nd | 30,36 | 15,17 | NQ | nd | nd | 3,570 |
| **5** | 1,51 | nd | nd | nd | NQ | NQ | NQ | nd | nd | NQ |
| **6** | 3,58 | NQ | nd | NQ | 39,26 | NQ | nd | nd | nd | NQ |
| **7** | 2,41 | nd | nd | nd | NQ | NQ | NQ | nd | nd | NQ |
| **8** | 1,99 | NQ | nd | nd | 48,92 | NQ | nd | nd | nd | NQ |
| **9** | 2,64 | nd | nd | nd | NQ | nd | NQ | nd | nd | NQ |
| **10** | 1,89 | nd | nd | nd | NQ | NQ | nd | nd | nd | NQ |
| **11** | 2,11 | NQ | nd | nd | NQ | NQ | nd | nd | nd | 2,037 |
| **12** | 1,97 | NQ | NQ | nd | NQ | NQ | nd | nd | nd | 1,9245 |
| **13** | 1,64 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | 2,589 |
| **14** | 2,01 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | NQ |
| **15** | 2,36 | NQ | nd | nd | NQ | NQ | nd | nd | nd | 2,290 |
| **16** | 3,70 | nd | nd | nd | 79,78 | 7,424 | NQ | nd | nd | 3,780 |
| **17** | 1,37 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | 2,459 |
| **18** | 2,63 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | 3,974 |
| **19** | 0,79 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | NQ |
| **20** | 1,27 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | nd | NQ |

Koncentrace galaxolidu se ve vzorcích vyskytovala v koncentračním rozmezí 30-80 µg/kg svaloviny; nutno však upozornit na tu skutečnost, že přítomnost galaxolidu byla prokázána téměř ve všech vzorcích ryb, nicméně v koncentracích menších, než byla vypočítána pro mez stanovitelnosti. Pouze u jednoho vzorku nebyla přítomnost galaxolidu prokázána (hodnota pod mezí detekce).

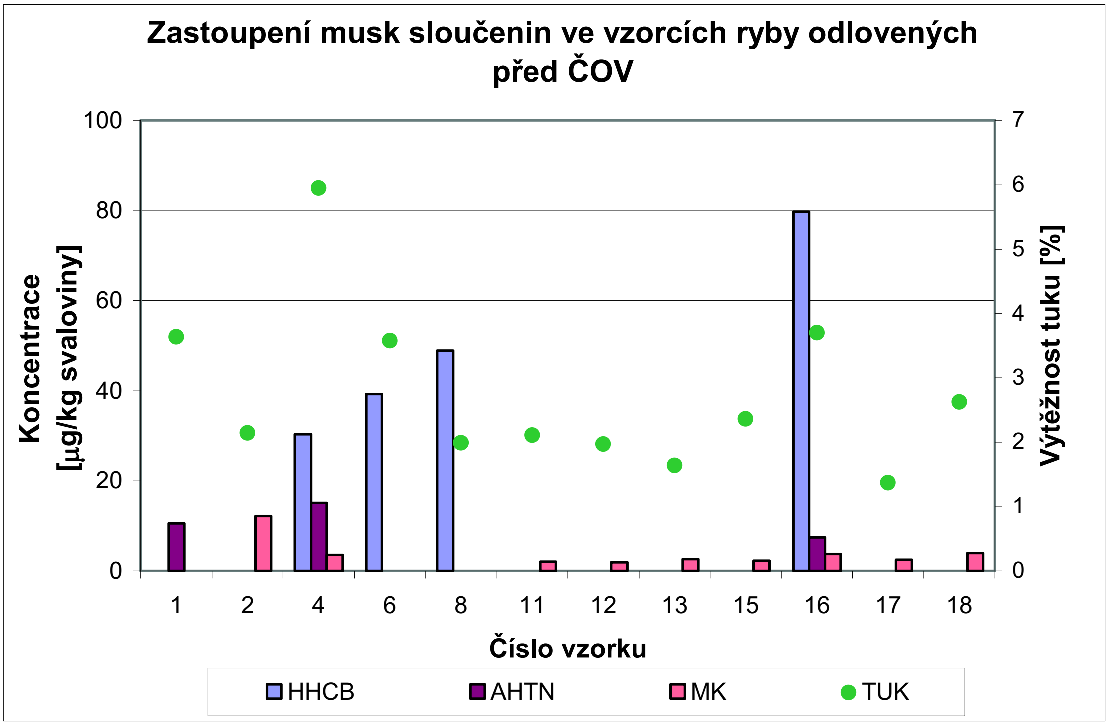
Podobné výsledky vykazovala i další, v minulosti ve velkém objemu produkovaná polycyklická musk sloučenina, tonalid. Koncentrace tonalidu se pohybovaly v rozmezí hodnot 7-15 µg/kg svaloviny ve vzorcích a v mnoha vzorcích byla opět jeho přítomnost prokázána v množství pod mezí kvantifikace.

Posledním prokázaným analytem byl musk keton. Hladina koncentrace musk ketonu v rybách byla až na výjimku vyrovnaná (2-4 µg/kg svaloviny). Opět i v tomto případě byla optimalizovanou metodou prokázána přítomnost musk analytu ve vzorcích v množství pod mezí stanovitelnosti.

Mezi analyty, které byly ve vzorcích detekovány, patří musk xylen a phantolid. Jejich koncentrace byly velmi nízké (pod mezí kvantifikace a často pod mezí detekce).

Další dva analyty - musk ambrette a traseolid byly prokázány jen v jednom, případně ve dvou vzorcích ze série ryb, odlovených před ČOV; v ostatních vzorcích byla jejich koncentrace pod mezí detekce.

Poslední skupinou analytů jsou mosken a tibeten. Jejich přítomnost ve vzorcích nebyla prokázána (hodnoty pod mezí detekce).




**Graf 18:** *Koncentrace musk sloučenin ve vzorcích ryb odlovených před ČOV*

Do grafu byly vyneseny pouze hodnoty koncentrací přesahující mez kvantifikace. Současně byly do grafu vyneseny procentuální výtěžnosti tuku z rybí svaloviny. Z grafu je patrné, že přestože jsou umělé musk sloučeniny prokazatelně lipofilní látky, jejich obsah v biotické tkáni nebyl přímo závislý na množství vyextrahovaného tuku.

Při hodnocení výsledků je nutno upozornit na tu skutečnost, že když vzorky ryb pochází ze stejného odběrového místa, koncentrační rozmezí galaxolidu ve vzorcích je značně široké. Kontaminace těchto ryb může souviset nejen s prostředím, ve kterém žijí, ale také se stářím ryb, jejich hmotností, fyziologickými procesy přijímání a vylučování a schopností přizpůsobovat se vnějším podmínkám.

## 4.5.2 Výsledky analýz ryb odlovených za ČOV

**Tabulka 46:** *Výsledky analýzy vzorků tkáně ryb odlovených za ČOV*

| číslo vzorku | Výtěžnost tuku [%] | Koncentrace musk sloučenin [μg/kg svaloviny] | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PH | AMB | TR | HHCB | AHTN | MX | MOS | TIB | MK |
| **21** | 1,10 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | NQ |
| **22** | 0,15 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | NQ |
| **23** | 1,13 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | NQ |
| **24** | 0,92 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | NQ |
| **25** | 0,67 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | 2,794 |
| **26** | 0,84 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | NQ |
| **27** | 2,04 | nd | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | NQ |
| **28** | 1,48 | nd | nd | nd | 39,40 | NQ | nd | nd | nd | NQ |
| **29** | 1,39 | 2,035 | nd | nd | NQ | nd | nd | nd | nd | NQ |
| **30** | 1,42 | nd | nd | NQ | 31,36 | 6,967 | NQ | nd | nd | NQ |
| **31** | 1,64 | NQ | nd | NQ | 36,92 | 7,379 | nd | nd | nd | 2,064 |
| **32** | 2,62 | nd | nd | nd | NQ | NQ | nd | nd | nd | NQ |
| **33** | 2,70 | nd | nd | nd | NQ | NQ | nd | nd | nd | NQ |
| **34** | 3,75 | NQ | NQ | nd | NQ | 7,667 | nd | nd | NQ | 2,177 |
| **35** | 2,86 | nd | nd | NQ | 39,61 | 7,662 | nd | nd | nd | NQ |
| **36** | 1,12 | nd | nd | nd | NQ | 7,641 | NQ | nd | nd | NQ |
| **37** | 2,16 | NQ | NQ | nd | NQ | 8,416 | NQ | nd | nd | 3,056 |
| **38** | 1,69 | NQ | nd | nd | NQ | 11,75 | NQ | nd | nd | 2,241 |
| **39** | 3,71 | nd | nd | nd | 34,32 | 8,279 | nd | nd | nd | 2,124 |
| **40** | 4,54 | NQ | nd | NQ | NQ | 7,361 | NQ | nd | NQ | 3,189 |

Analýzou svalové tkáně ryb odlovených z řeky Svratky za čistírnou odpadních vod jsme získaly kvantitativní údaje pro čtyři vybrané analyty.

Koncentrace galaxolidu se ve vzorcích vyskytovala v koncentračním rozmezí 30-40 μg/kg svaloviny, současně byla přítomnost galaxolidu prokázána ve všech vzorcích série ryb odlovených za ČOV, nicméně v koncentracích pod mezí stanovitelnosti.

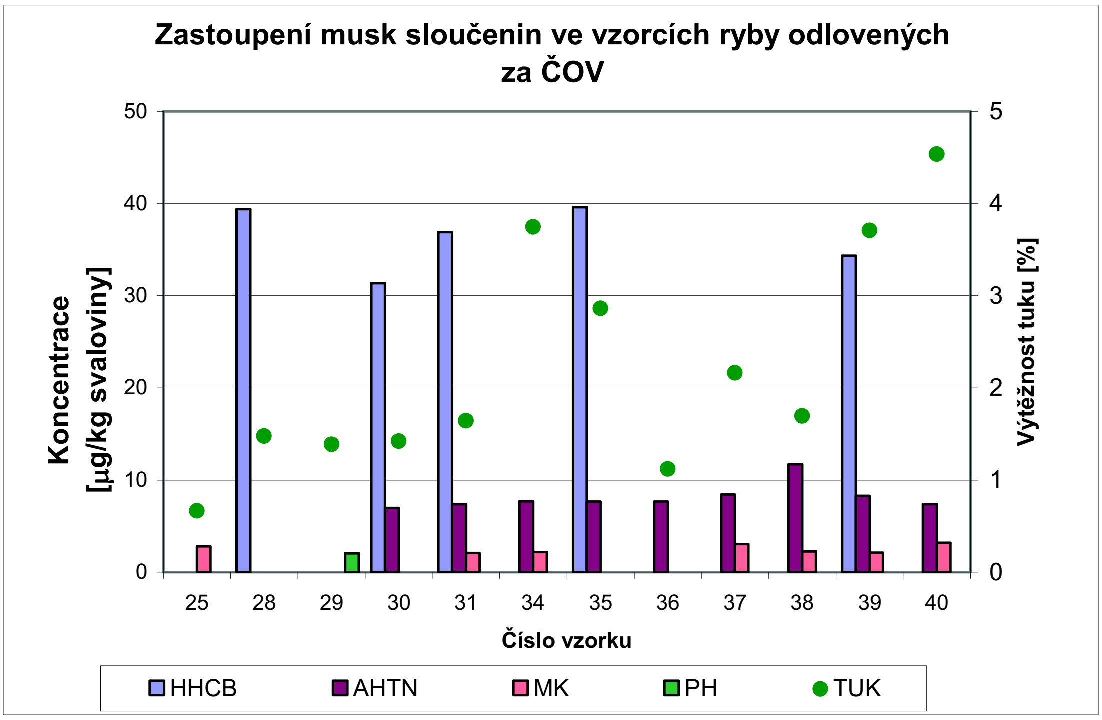
Koncentrace tonalidu se pohybovaly v rozmezí hodnot 7-12 μg/kg svaloviny, avšak v mnoha vzorcích bylo množství tonalidu menší, než mez detekce, tzn., že nebyla jeho přítomnost ve vzorku s určitou pravděpodobností prokázána.

Dalším prokázaným analytem byl musk keton. Stejně jako galaxolid i musk keton byl prokázán ve všech vzorcích z této série, v mnoha případech však jeho koncentrace nepřekročila mez kvantifikace. Koncentrační rozmezí musk ketonu v rybách odlovených za ČOV byla úzká (2-3 μg/kg svaloviny).

Posledním analytem, jehož koncentrace překročila hranici LOQ, byl phantolid.

Přítomnost zbylých posuzovaných analytů (musk xylen, tibetten, traseolid a ambretten) ve vzorcích odlovených za ČOV byly prokázány jen v několika případech, a to v koncentracích pod mezí stanovitelnosti.

Přítomnost moskenu ve vzorcích opět nebyla prokázána (hodnoty pod mezí detekce).




**Graf 19:** *Koncentrace musk sloučenin ve vzorcích ryb odlovených za ČOV*

### 4.5.4 Porovnání kontaminace vzorků ryb

V sérii ryb odlovených před ČOV byla koncentrace analytů stanovena jen v malém podílu všech vzorků; koncentrace stanovených musk sloučenin se v jednotlivých vzorcích podstatně liší (HHCB: 30-80 μg/kg, AHTN: 7-15 μg/kg). Proto je pravděpodobné, že vybrané ryby byly kontaminovány specifickým způsobem a množství analytu, které v nich bylo stanoveno, nemusí mít přímou souvislost s kontaminací ekosystému, ve kterém žily.

Pokud budeme porovnávat výsledky analýz vzorků ryb odlovených za ČOV je zřejmé, že koncentrace musk sloučenin se v jednotlivých vzorcích pohybují v relativně podobných koncentračních hladinách. Předpokládaným zdrojem kontaminace vodního ekosystému musk sloučeninami je odpadní voda, která prochází čistícím procesem v ČOV Modřicích, avšak jak již bylo v práci uvedeno, ČOV nemá 100% účinnost odstranění musk sloučenin z odpadní vody. Výsledky analýz vody, vypouštěné z ČOV do recipientu, dokumentují vysoké koncentrace polycyklických musk sloučenin (především HHCB a AHTN). Účinnost jejich odstranění se pohybuje okolo 55-65%. Zvýšená koncentrace AHTN ve vzorcích ryb odlovených za ČOV je pravděpodobně následkem zvýšené kontaminace vodního prostředí vodou vytékající z ČOV.

Maximální a minimální koncentrace jednotlivých analytů stanovených ve vzorcích rybí svaloviny jsou přehledně uvedeny v následující tabulce. Dále je v tabulce uveden počet vzorků, u nichž byla prokázána přítomnost daného analytu v koncentraci menší než limit kvantifikace a počet vzorků, u nichž koncentrace analytu nedosahovala meze detekce (analyt ve vzorku nebyl prokázán). Hodnoty jsou uvedeny pro jednotlivé série vzorků před ČOV a za ČOV.

Tabulka 47: Porovnání koncentrací analytu v sériích vzorků

| [µg/kg] | max. koncentrace | | min. koncentrace | | počet vzorků NQ | | počet vzorků nd | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Analyt** | **před ČOV** | **za ČOV** | **před ČOV** | **za ČOV** | **před ČOV** | **za ČOV** | **před ČOV** | **za ČOV** |
| **PH** | NQ | 2,035 | nd | nd | 6 | 5 | 14 | 14 |
| **AMB** | 1,464 | NQ | NQ | nd | 2 | 2 | 18 | 18 |
| **TR** | NQ | NQ | nd | nd | 1 | 4 | 19 | 16 |
| **HHCB** | 79,78 | 39,61 | nd | NQ | 15 | 15 | 1 | 0 |
| **AHTN** | 15,17 | 11,75 | nd | nd | 10 | 3 | 7 | 8 |
| **MX** | NQ | NQ | nd | nd | 6 | 5 | 14 | 15 |
| **MOS** | nd | nd | nd | nd | 0 | 0 | 20 | 20 |
| **TIB** | nd | NQ | nd | nd | 0 | 2 | 20 | 18 |
| **MK** | 12,16 | 3,189 | NQ | NQ | 11 | 13 | 0 | 0 |

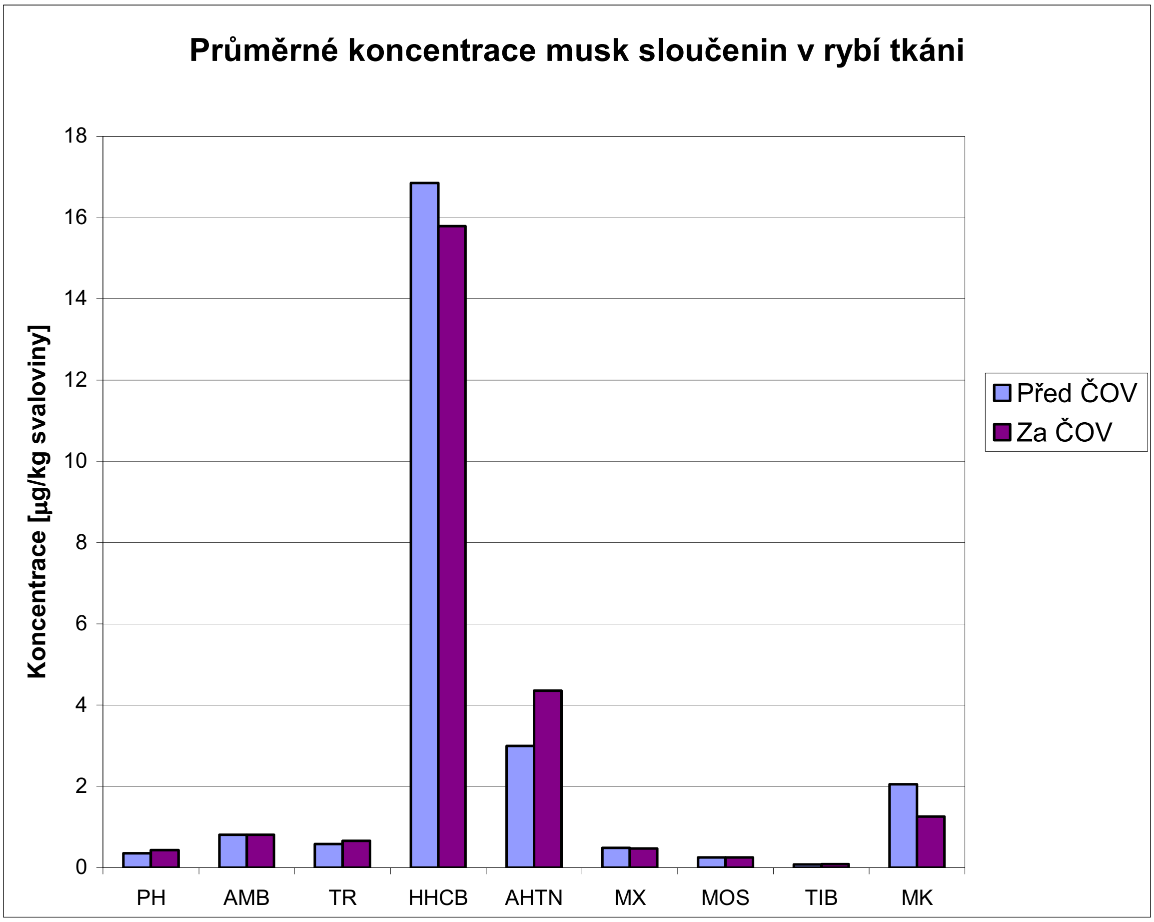
#### *4.5.4.1 Průměrné koncentrace analytů ve vzorcích*

Pro stanovené analyty byly vypočítány průměrné hodnoty koncentrací v souboru vzorků ryb odlovených z řeky Svratky před ČOV a za ČOV. Při průměrování byly použity hodnoty ND a NQ vypočítané z mezí LOD a LOQ, uvedené v tabulce 44. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech.

**Tabulka 47:** *Průměrné koncentrace analytů*

| Analyt | Koncentrace [µg/kg ž.v.] | |
|---|---|---|
| **Vzorky** | **před ČOV** | **za ČOV** |
| **PH** | 0,3545 | 0,4290 |
| **TRAS** | 0,8052 | 0,8052 |
| **HHCB** | 0,5803 | 0,6632 |
| **AHTN** | 16,85 | 15,79 |
| **MX** | 2,995 | 4,350 |
| **MOS** | 0,4866 | 0,4679 |
| **TIB** | 0,2502 | 0,2502 |
| **MK** | 0,0772 | 0,0849 |
| **AMB** | 2,053 | 1,253 |

Průměrné hodnoty koncentrací musk sloučenin v jednotlivých sériích jsou si velmi blízké. Tato skutečnost může být způsobena tím, že v mnoha vzorcích byly koncentrace pod mezí detekce nebo kvantifikace, a tyto hodnoty byly následně nahrazeny koncentracemi uvedenými v tabulce 44, shodně pro vzorky před i za ČOV.




**Graf 20:** *Průměrné hodnoty kontaminantů ve vzorcích*

V tabulce 48 jsou uvedeny průměrné hodnoty koncentrací analytů spolu s nejistotami měření, které byly v reálných vzorcích stanoveny v koncentraci nad mezí kvantifikace.

Z grafu 20 je vidět, že koncentrace analytů ve vzorcích za ČOV a před ČOV jsou si blízké. Vyšší koncentrace HHCB a MK byly stanoveny v rybách odlovených před ČOV, naopak AHTN a PH dosahoval vyšších koncentrací v rybách za ČOV. Nelze tedy jednoznačně potvrdit vliv ČOV na kontaminaci vodní bioty musk sloučeninami, které prochází na ČOV procesem čištění a nejsou z odpadní vody před vstupem do recipientu zcela ostraněny.

**Tabulka 48:** *Průměrné koncentrace musk sloučenin, které byly ve vzorcích ryb stanoveny v koncentracích nad mezí kvantifikace*

| **Analyt** | **Průměrná koncentrace musk sloučenin ve vzorcích [µg/kg svaloviny]** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Vzorky** | **HHCB** | **RSD [%]** | **AHTN** | **RSD [%]** | **MK** | **RSD [%]** | **PH** | **RSD [%]** |
| **Před ČOV** | 16,85 | 8,57 | 2,995 | 9,77 | 2,053 | 8,53 | 0,3545 | 6,47 |
| **Za ČOV** | 15,80 | | 4,350 | | 1,253 | | 0,4290 | |

Mediány jednotlivých analytů se pro série před a za ČOV rovnají, což opět způsobuje vysoký počet hodnot nd, NQ. Mediány významově i číselně odpovídají hodnotám nd příp. NQ, z čehož vyplývá, že stanovované analyty se ve vzorcích nevyskytují v měřitelných koncentracích.

Množství musk sloučenin stanovené ve vzorcích ryb se často pohybovalo pod mezí kvantifikace, dokonce pod mezí detekce. Z toho lze vyvozovat, že ryby žily v relativně čistém prostředí. Jak je uvedeno v předložené diplomové práci, musk sloučeniny jsou látky lipofilního charakteru a k jejich vstupu do organismu ryb může docházet buď orálně (společně s potravou), nebo prostupem kůží z vodního prostředí. Pokud látky prochází do organismu dermálně, je možné, že se zachytí v buňkách podkožního tuku a neprostoupí do buněk svalové tkáně.

Musk sloučeniny, především nitromusk, podléhají po vstupu do organismu různým biodegradačním procesům a transformacím, což snižuje jejich vlastní koncentraci a zvyšuje koncentrace metabolitů.

Naše výsledky nebyly porovnávány se žádnými publikovanými údaji, protože posouzení ryb odlovených před ČOV a za ČOV nebylo v dostupné literatuře nalezeno.

### 4.5.3 Nejistoty a chyby měření

Každý analytický postup stanovení analytu ve vzorku je zatížen do jisté míry chybami. Nejistota měření je parametr charakterizující rozmezí hodnot, kdy lze výsledek analýzy považovat za správný (přesný a pravdivý).

K vyhodnocení nejistot měření byla v práci použita metoda „top-down“, při níž dochází ke komplexnímu hodnocení nejistot na základě souhrnných údajů získaných při analýzách (opakovatelnost a výtěžnost analytické metody) [58].

#### *4.5.3.1 Opakovatelnost a výtěžnost analytické metody*

Pro výpočet opakovatelnosti analytické metody byly použity výsledky analýz reálného vzorku z jedné série opakování (n=5).

**Tabulka 49:** *Opakovatelnost analytické metody*

| Analyt | RSD [%] | Analyt | RSD [%] |
|---|---|---|---|
| **PH** | 1,67 | **MX** | 10,75 |
| **AMB** | 10,56 | **MOS** | 11,01 |
| **TRAS** | 1,96 | **TIB** | 2,73 |
| **HHCB** | 1,10 | **MK** | 3,48 |
| **AHTN** | 0,73 | | |

RSD … opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka

Výtěžnost analytické metody byla stanovena za pomocí interních standardů, přidávaných do vzorku (deuterované standardy musk xylenu a tonalidu). Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

**Tabulka 50:** *Výsledky výtěžnosti analytické metody*

| Analyt | Výtěžnost [%] |
|---|---|
| **MX-$D_{15}$** | 92,59 |
| **AHTN-$D_3$** | 89,76 |

Výsledky výtěžností jednotlivých musk sloučenin se vztahují k výtěžnostem deuterovaných standardů. V závislosti na chemické struktuře a vlastnostech analytů byly hodnocené musk sloučeniny přiřazeny k jednomu z deuterovaných standardů a dále pak byla uvažována stejná výtěžnost analytu a standardu (viz. tabulka 50).

**Tabulka 51:** *Výtěžnost analytů ze vzorku*

| Analyt | Standard | Výtěžnost [%] |
|---|---|---|
| **PH** | AHTN-$D_3$ | 89,76 |
| **TRAS** | AHTN-$D_3$ | 89,76 |
| **HHCB** | AHTN-$D_3$ | 89,76 |
| **AHTN** | AHTN-$D_3$ | 89,76 |
| **MX** | MX-$D_{15}$ | 92,59 |
| **MOS** | MX-$D_{15}$ | 92,59 |
| **TIB** | MX-$D_{15}$ | 92,59 |
| **MK** | MX-$D_{15}$ | 92,59 |
| **AMB** | MX-$D_{15}$ | 92,59 |

#### *4.5.3.2 Nejistoty měření*

K výpočtu nejistot měření byl použit přístup „top-down" (shora-dolů). Jedná se o hodnocení na základě dílčích chyb získaných z výsledů opakovatelnosti (příspěvek náhodných chyb) a výtěžnosti (příspěvek systematických chyb).

Získané hodnoty nejistoty výtěžnosti a kombinované nejistoty celého analytického postupu pro jednotlivé analyty byly vypočítány pomocí uvedených vzorců a jsou shrnuty v následující tabulce.

- ***Nejistota výtěžnosti:*** $u(R_t) = \frac{0{,}5 \cdot (100 - R_t)}{\sqrt{3}} [\%]$,

kde $R_t$ je procentuální výtěžnost analytů.

- ***Nejistota celého analytického postupu:*** $u_{ct} = \sqrt{r_t^2 + u(R)_t^2} [\%]$,

Kde $r_t$ je relativní směrodatná odchylka (RSD) a $u(R)_t$ je nejistota výtěžnosti [63].

**Tabulka 52:** *Procentuální nejistoty výtěžnosti a analytického postupu stanovení*

| Analyt | $u(R_t)$ [%] | $u_{ct}$ [%] |
|---|---|---|
| **PH** | 2,956 | 3,40 |
| **TRAS** | 2,956 | 10,97 |
| **HHCB** | 2,956 | 3,55 |
| **AHTN** | 2,956 | 3,15 |
| **MX** | 2,139 | 2,26 |
| **MOS** | 2,139 | 10,96 |
| **TIB** | 2,139 | 11,22 |
| **MK** | 2,139 | 3,47 |
| **AMB** | 2,139 | 4,08 |

# 5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá tématem výskytu umělých mošusových látek v životním prostředím a volbou vhodných metod pro jejich stanovení v biotických vzorcích.

Pro stanovení vybraných umělých musk sloučenin v reálných vzorcích rybí tkáně byla zvolena metoda GC-MS. Pro izolaci analytů ze vzorku byla optimalizována metoda tlakové extrakce PSE a přečištění extraktu bylo realizováno metodou kolonové adsorpční chromatografie. K analýze byly použity dvě série vzorků ryb (odloveny před ČOV a za ČOV), a následně byly porovnány úrovně kontaminace vzorků syntetickými musk sloučeninami.

Závěry diplomové práce jsou shrnuty do následujících bodů:

- Byli vybráni zástupci polycyklických a nitrovaných umělých musk sloučenin, jejichž koncentrace byla stanovována ve vzorcích biotické tkáně: nitrované musk sloučeniny - musk keton, musk xylen, musk mosken, musk tibeten a musk ambrette; polycyklické musk sloučeniny - galaxolid, tonalid, traseolid a phantolid.
- Byly optimalizovány podmínky izolace vybraných analytů z biotické matrice: jako rozpouštědlo pro tlakovou extrakci PSE byla vybrána směs ethylacetátu a cyklohexanu v objemovém poměru 75:25, jako nejvhodnější extrakční teplota byla vyhodnocena teplota 120 °C, doba zdržení rozpouštědla u vzorku byla optimalizována na 4 min a byly zvoleny 3 extrakční cykly.
- Byla optimalizována metoda přečištění extraktu ze vzorku: nejvhodnějším elučním činidlem byl vyhodnocen ethylacetát, potřebný objem používaný pro eluci byl 80 ml.
- Byla ověřena vhodnost teplotního programu plynového chromatografu (uvedeného v literatuře 60) pro analýzu musk sloučenin z biotického vzorku a nastavení parametrů GC-MS. Později byly tyto podmínky použity při analýze svalové tkáně ryb.
- Byly sestrojeny kalibrační závislosti jednotlivých analytů pomocí analýz standardů musk sloučenin, z těchto dat byly stanoveny meze detekce a stanovitelnosti a určeny koncentrace nd a nq.
- Bylo provedeno vlastní stanovení obsahu musk sloučenin ve vzorcích rybí tkáně pomocí optimalizované analytické metody. Výsledné koncentrace stanovené ve vzorcích jsou tyto:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **před ČOV** | PH: | nd-nq μg/kg svaloviny | **za ČOV** | nd-2,035 μg/kg svaloviny |
| | AMB: | nq-1,464 μg/kg svaloviny | | nd-nq μg/kg svaloviny |
| | TR: | nd-nq μg/kg svaloviny | | nd-nq μg/kg svaloviny |
| | HHCB: | nd-79,78 μg/kg svaloviny | | nq-39,61 μg/kg svaloviny |
| | AHTN: | nd-15,17 μg/kg svaloviny | | nd-11,75 μg/kg svaloviny |
| | MX: | nd-nq μg/kg svaloviny | | nd-nq μg/kg svaloviny |
| | MOS: | nd μg/kg svaloviny | | nd μg/kg svaloviny |
| | TIB: | nd μg/kg svaloviny | | nd-nq μg/kg svaloviny |
| | MK: | nq-12,16 μg/kg svaloviny | | nq-3,189 μg/kg svaloviny |

- Byly určeny nejistoty a chyby měření, výtěžnost a opakovatelnost analytické metody.

Na základě analýz reálných vzorků ryb byly vysloveny tyto závěry:

- Nebyla prokázána souvislost obsahu musk sloučenin v rybí tkáni s množstvím vyextrahovaného tuku, přestože jsou musk sloučeninami lipofilními. Při analýze byly stanoveny velmi nízké koncentrace, často pod mezí detekce nebo kvantifikace, z čehož vyplývá nízká kontaminace ryb; analyzována byla pouze svalovina (je možné předpokládat vyšší obsah musk sloučenin v kůži a vnitřních orgánech) a nebyl zjišťován obsah metabolitů musk sloučenin (biodegradační a biotransformační procesy).

- Zastoupení musk sloučenin jako kontaminantů přítomných ve svalovině vzorkovaných ryb bylo velmi individuální. V mnoha vzorcích byly sledované analyty prokázány v množství pod mezí stanovitelnosti, některé kontaminanty nebyly prokázány (koncentrace pod mezí detekce). Koncentrace musk sloučenin ve vzorcích ryb odlovených z řeky Svratky před ČOV a za ČOV si byly vzájemně velmi blízké. Nebyl proto zjištěn a prokázán zásadní vliv ČOV jako zdroje kontaminace vodního ekosystému vypouštěnou přečištěnou odpadní vodou.

# 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ


[1]. OREL, Miroslav; FACOVÁ, Věra. *Člověk, jeho smysly a svět*. Vydání 1. Praha : Grada Publishing, a.s., 2010. 256 s. ISBN 978-80-247-2946-6.

[2]. TROJAN, Stanislav; SCHRIEBER, Michal. *Atlas biologie člověka*. Vydání 2. Praha : Scientia, 2007. 136 s. ISBN 80-86960-11-0.

[3]. PEHLE, Tobias; JONAS, Sylvia. *Trochu jiný... PARFÉM*. Vydání 1. Praha : REBO Productions , 2009. 296 s. ISBN 978-80-255-0050-7.

[4]. ROČEK, Zbyněk. *Obecná morfologie živočichů : skripta* [online]. Praha : Přírodovědecká fakulta UK v Praze, 1998 [cit. 2011-04-24]. Dostupné z WWW: <http://rocek.gli.cas.cz/Courses/courses.htm>.

[5]. KRAFT, Philip ; SWIFT, Karl A. D. *Perspectives in flavor and fragrance research*. Zürich (Switzerland) : Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005. 251 s. ISBN 3-906390-36-5.

[6]. ČERVENÝ, Libor. Syntetické vonné a chuťové látky. *Chemické listy* [online]. 1999, vol. 93, ISSUE 7, [cit. 2011-04-24]. Dostupný z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_412-420.pdf>. ISSN 1213-7103.

[7]. TREPKOVÁ, E., VONÁŠEK, F.: *Vůně a parfémy – tajemství přitažlivosti.* Praha: MAXDORF s.r.o., 1997. 173 s. ISBN 80-85800-48-9.

[8]. SELL, Charles. *The Chemistry of Fragrances : From Perfumer to Consumer* . 2nd Edition. Cambridge (UK) : The Royal Society of Chemistry, 2006. 348 s. ISBN 0-85404-824-3.

[9]. Přednášky z předmětu: *Environmentální analýza* [online]. Brno: VUT, FCH, 2008 [cit. 2011-04-24]. Dostupné z WWW: https://www.vutbr.cz/elearning/.

[10]. BERGER, Ralf G. *Flavours and Fragrances : Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Berlin : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. 641 s. ISBN 978-3-540-49338-9.

[11]. BULÁNKOVÁ, Iveta. . *Léčivé rostliny na naší zahradě*. 1. vydání. Praha : Grada Publishing, a.s., 2005. 84 s. ISBN 80-247-1274-1.

[12]. VANKAR, Padma S. Essential Oils and Fragrances from Natural Sources . *Resonance* [online]. 2004, volume 9, Number, [cit. 2011-04-25]. Dostupný z WWW: <http://www.springerlink.com/content/0971-8044/9/4/>.

[13]. FORTINEAU, Anne-Dominique. Chemistry Perfumes Your Daily Life. *Journal of chemical education : Chemistry for Everyone* [online]. 2004, Vol. 81, No. 1, [cit. 2011-04-25]. Dostupný z WWW: <www.JCE.DivCHED.org>.

[14]. SURBURG, Horst ; PANTEN, Johannes . *Common fragrance and flavor materials : Preparation, properties and uses*. 5th completely revised. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH, 2006. 318 s. ISBN 3-527-31315.

[15]. WARD , J. P. ; VAN DORP, D. A. The animal musks and a comment of their biogenesis . *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 1981, Volume 37, Number 9, [cit. 2011-04-25]. Dostupný z WWW: <http://www.springerlink.com/content/gt76130187481567/>.

[16]. PANDA, H. *The Complete Technology Book on Herbal Perfumes & Cosmetics*. Delhi (india) : National Institute of Industrial Research, 2003. 678 s. ISBN 8-186-6236-20.

[17]. VONÁŠEK, F., TREPKOVÁ, E., NOVOTNÝ, L.: *Látky vonné a chuťové*. Praha : SNTL/Alfa, 1987. 437 s.

[18]. SOMMER, Cornelia. The Role of Musk and Musk Compounds in the Fragrance Industry . *The Handbook of Environmental Chemistry* [online]. 2004, Volume 3, Part X, [cit. 2011-04-25]. Dostupný z WWW: <http://www.springerlink.com/content/au6u72xw04rnf7hy/>.

[19]. RIMKUS, Gerhard G. *The Handbook of Environmental Chemistry – Synthetic Musk Fragrances in the Environment* [online]. Weinheim : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004 [cit. 2011-04-25]. Dostupné z WWW: <http://books.google.cz/>. 338 s. ISBN 3-540-43706-1.

[20]. SHIBAMOTO, Takayuki ; BJELDANES, Leonard . *Introduction to Food Toxicology* . 2nd Edition. London (United Kingdom) : Stratford Books , 2009. 320 s. ISBN 0-12-640025-3.

[21]. SWEDISH SOCIETY FOR NATURE CONSERVATION. Fragrances 2000. *Leffingwell & Associates* [online]. 2000, 2000, [cit. 2011-04-25]. Dostupný z WWW: <http://www.leffingwell.com/rap-bmv-fragrances2000.pdf>.

[22]. WWF-UK Panda House. Synthetic musks : Factsheet. *Chain of Contamination : The Food Link* [online]. 2006, 2006, [cit. 2011-04-25]. Dostupný z WWW: <http://www.wwf.org.uk/filelibrary/pdf/contamination.pdf >.

[23]. OSPAR Commission. Musk xylene and other musks. *The Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic*. [online]. London : OSPAR Commission, 2004 [cit. 2011-04-25]. Dostupné z WWW: <http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00200_BD%20on%20musk%20xylene.pdf>. ISBN 1-904426-36-0.

[24]. AGENTURA ECHA: Data on manufacture, import, export, uses and releases of musk xylene. *Evropská agentura pro chemické látky* [online]. Helsinki (Finland) : European Chemicals Agency Annankatu, 2009 [cit. 2011-04-25]. Dostupné z WWW: <http://echa.europa.eu/doc/consultations/recommendations/tech_reports/tech_rep_musk_xylene.pdf>.

[25]. RIMKUS, G.G.; HUHNERFUSS, H.; GATERMANN , R. Musk xylene and musk ketone amino metabolites in the aquatic environment. *Toxicology Letters* [online]. 1999, Volume 111, Issue 1-2, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com >.

[26]. BESTER, Kai. Analysis of musk fragrances in environmental samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, Volume 1216, Issue 3, [cit. 2011-04-27]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com >.

[27]. BRUNN, Hubertus; BITSCH, Nikola; AMBERG-MÜLLER, Judith. Toxicology of Synthetic Musk Compounds in Man and Animals. *The Handbook of Environmental Chemistry* [online]. 2004, Volume 3, Part X, [cit. 2011-04-27]. Dostupný z WWW: <http://www.springerlink.com/content/3ew7l39vugvl0cp4/>.

[28]. PECK, Aaron M. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices . *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2006, Volume 386, Number 4, [cit. 2011-04-27]. Dostupný z WWW: <http://www.springerlink.com/content/m723j88l44472807/>.

[29]. ESCHKE, Hans-Dietrich. Synthetic Musks in Different Water Matrices . *The Handbook of Environmental Chemistry* [online]. 2004, Volume 3, Part X, [cit. 2011-04-27]. Dostupný z WWW: <http://www.springerlink.com/content/rdw8phejr8rr3dfe/>.

[30]. ZOUHAR, L. *Syntetické vonné látky ve vodní biotě.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 95 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

[31]. RIMKUS, Gerhard G. Synthetic musk fragrances as a new class of environmental pollutants. *American Chemical Society* [online]. 1999, Vol. 39 , No. 1, [cit. 2011-04-29]. Dostupný z WWW: <http://www.envirofacs.org/Pre-prints/Vol%2039%20No%201/Papers/Lipnick%20-%207/248.pdf>.

[32]. KIYMET, Nihan. *Determination of synthetic musk compound levels in indole air* [online]. Izmir : Master of science, 2009. 59 s. Diplomová práce. The Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology. Dostupné z WWW: <http://library.iyte.edu.tr/tezler/master/kimyamuh/T000197.pdf>.

[33]. LUTTER, Stephan . Synthetic Musk Fragrances. In *North-East Atlantic Programme* [online]. WWF briefings, 2000 [cit. 2011-04-29]. Dostupné z WWW: <http://www.ngo.grida.no/wwfneap/Publication/briefings/Musk.pdf>.

[34]. RIMKUS, Gerhard G. . Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicology Letters* [online]. 1999, Volume 111, Issue 1-2, [cit. 2011-04-29]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com>.

[35]. Česká republika. Vyhláška Ministerstva životního prostředí o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě. In *Sbírka zákonů ČR*. 2001, 382/2001 Sb., 8 s..

[36]. FOOKEN, Cornelia . Synthetic Musks in Suspended Particulate Matter (SPM), Sediment, and Sewage Sludge. *The Handbook of Environmental Chemistry* [online]. 2004, Volume 111, Part X, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <http://www.springerlink.com/content/dm2yjycb207mlpqb/>.

[37]. World Health Organization. Musk ambrette and musk xylene. In *IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risk to human*. 2005, Volume 65, s. 477-495. Dostupný také z WWW: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol65/mono65-15.pdf>.

[38]. MOORE, Terry. Synthesi and fragrance properties of macrocyclic musks. *R.E.A.C.T. (Reaching and Educating America's Chemists of Tomorrow)* [online]. 2005, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <http://chemistry.illinois.edu/research/organic/seminar_extracts/2004_2005/12_Moore_Abstract_SP05.pdf>.

[39]. KRAFT, Philip; EICHENBERGER, Walter . Synthesis and Odor of Aliphatic Musks : Discovery of a New Class of Odorants. *European Journal of Organic Chemistry* [online]. 2004, Volume 2004, Issue 2, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejoc.200300578/abstract>.

[40]. BALK, Froukje; FORD, Richard A. Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU : I. Fate and exposure assessment. *Toxicology Letters* [online]. 1999, Volume 111, Issue 1-2, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com>.

[41]. BALK, Froukje; FORD, Richard A. Environmental risk assessment for the polycyclic musks, AHTN and HHCB: II. Effect assessment and risk characterisation. *Toxicology*

*Letters* [online]. 1999, Volume 111, Issue 1-2, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com>.

[42]. TASA, J. W., et al. Environmental risk assessment of musk ketone and musk xylene in the Netherlands in accordance with the EU-TGD. *Chemosphere* [online]. 1997, Volume 35, Issue 12, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com>.

[43]. OH, Jeong-Eun; LEE, Sung-Hee; LEE, In-Seok. Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment. *Water research* [online]. 2010, Issue 44, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com>.

[44]. RIMKUS, Gerhard G.; WOLF, Manfred. Nitro Musk Fragrances in Biota from Freshwater and Marine Environment. *Chemosphere* [online]. 1995, Volume 30, Issue 4, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com>.

[45]. LORD, Heather L.; PAWLISZYN, Janusz. *Handbook of Sample Preparation*. London (United Kingdom): John Wiley & Sons Ltd, 2010. 496 s. ISBN 0470099348.

[46]. SOMMER, Lumír; *Základy analytické chemie II*. Brno: VUTIUM, 2000. 1. vyd. 347 s. ISBN 80-214-1742-0

[47]. BUCHBERGER, W. W. Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment . *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, Volume 1218, Issue 4, [cit. 2011-04-30]. Dostupný z WWW: <http://www.sciencedirect.com >.

[48]. DEAN, John R. *Methods for Environmental trace analysis: Analytical Techniques in the Sciences (AnTS)*. Northumbria University, Newcastle, UK : John Wiley & Sons Ltd, 2003. 286 s. ISBN 0-470-84422-1.

[49]. DEAN, John R. *Extraction Techniques in Analytical Sciences* . London (United Kingdom): John Wiley & Sons Ltd, 2009. 308 s. ISBN 978-0-470-77284-3.

[50]. MESTEK, Oto; NONDEK, Lubomír. *Zásady správného odběru vzorků pro analýzu životního prostředí*. 2. vyd. Praha: Eurachem - ČR, 1999. 65 s. ISBN 80-901-8683-1.

[51]. HAINES, Peter J.; FIFIELD, Frederick William. *Environmental analytical chemistry* . 2nd Edition. London : Wiley-Blackwell, 2000. 490 s

[52]. CSERHÁTI, Tibor. *Chromatography of Aroma Compounds and Fragrances*. Berlin : Springer, 2009. 389 s. ISBN 978-3-642-01655-4.

[53]. SMITH, Roy-Keith. *Handbook of environmental analysis.* New York: Genium Publishing Corporation, 1994. 2nd ed. 350 s. ISBN 0-931690-77-3

[54]. BUDDE, William L. *Analytical mass spectrometry :strategies for environmental and related applications*. Washington :American Chemical Society, 2001. 386 s. ISBN 0-8412-3664-X

[55]. Přednášky z předmětu: *Instrumentální a strukturní analýza* [online]. Brno: VUT, FCH, 2008 [cit. 2011-04-24]. Dostupné z WWW: <https://www.vutbr.cz/elearning>.

[56]. Přednášky z předmětu: *Hmotnostní spektrometrie* [online]. Brno: VUT, FCH, 2008 [cit. 2011-04-24]. Dostupné z WWW: <https://www.vutbr.cz/elearning>.

[57]. SKOOG, Douglas A. *Analytical Chemistry :An Introduction.* Fort Worth :Saunders College Publishing,1999. 7th Ed. 773 s. ISBN 0-03-020293-0

[58]. KELLNER, R. *Analytical chemistry :the approved text to the FECS curriculum analytical chemistry*. Weinheim :Wiley-VCH,1998. 916 s. ISBN 3-527-28881-3

[59]. CLEMENT, Ray E. *Gas chromatography :biochemical, biomedical, and clinical applications.* New York :John Wiley and Sons,1990. 393 s. ISBN 0-471-01048-0

[60]. ZOUHAR, Libor, VÁVROVÁ, Milada, MRAVCOVÁ, Ludmila, KUBÍČKOVÁ, Kristýna: Problematika stanovení musk sloučenin v odpadní vodě. *Seminář: Analýza organických látek v životním prostředí,* 18.-20. 10. 2010, s. 138-142. Komorní Lhotka. Sborník přednášek – ISBN 978-80-86380-54-4.

[61]. VOLKA, Karel, et al. *Analytická chemie II*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.

[62]. REEVE, Roger N. *Introduction to Environmental Analysis*. Chichester : John Wiley and Sons Ltd., 2002. 301 s. ISBN 04-714-9295-7.

[63]. Štěpán, R.: *Rezidua moderních pesticidů a jejich degradační produkty / metabolity v potravinářských surovinách a produktech.* Praha, 2005. 170 s., 3 s. příloh. Disertační práce na Fakultě potravinářské a biochemické technologie Vysoké školy chemickotechnologické v Praze na Ústavu chemie a analýzy potravin.Vedoucí disertační práce Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.

# 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|---|---|
| EU | Evropská Unie |
| POPs | perzistentní organické polutanty |
| PCP | personal care produkt – produkty osobní péče |
| ČOV | čistírna odpadníc vod |
| PH | phantolid |
| AMB | ambrette |
| TRAS | traseolid |
| HHCB | galaxolid |
| AHTN | tonalid |
| MX | musk xylen |
| MOS | moskene |
| TIB | tibeten |
| MK | musk keton |
| $MX\text{-}D_{15}$ | deuterovaný musk xylen |
| $AHTN\text{-}D_3$ | deuterovaný tonalid |
| MUSK | syntetická vonná látka |
| ŽP | životní prostředí |
| ČR | Česká republika |
| UV | ultrafialové záření |
| $LD_{50}$ | letální dávka, při které zahyne 50 % testovaných organismů |
| Kow | rozdělovací koeficient n-oktanol / voda |
| CAS | identifikační číslo chemické látky podle „Chemical Abstracts Service“ |
| UIPAC | Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii |
| SPE | extrakce pevnou fází |
| LLE | extrakce kapalina-kapalina |
| LSE | extrakce |
| PSE | technika zrychlené extrakce rozpouštědlem |
| ASE | technika zrychlené extrakce rozpouštědlem |
| PFE | technika zrychlené extrakce rozpouštědlem |
| MASE | mikrovlnná extrakce s použitím rozpouštědla |
| MAE | extrakce pomocí mikrovln (uzavřený systém) |
| PCB | polychlorované bifenyly |
| PCDDs | polychlorované dibenzo-p-dioxiny |
| PCDFs | polychlorované dibenzofurany |
| GC | plynová chromatografie |
| MS | hmotnostní spektrometrie |
| GPC | gelová permeační chromatografie |
| WCOT | kolona s kapalnou stacionární fází |
| SCOT | kolona s kapalnou stacion. fází zakotvenou na povrchu pevného nosiče |
| PLOT | kolona s vrstvou pevného sorbentu na vnitřní stěně |
| TCD | tepelně vodivostní detektor |
| ECD | detektor elektronového záchytu |
| ArD | argonový detektor |
| HeD | heliový detektor |
| IRS | infračervený spektrometr |
| FID | plamenový ionizační detektor |
| AFID | plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem |

| | |
|---|---|
| PID | fotoionizační detektor |
| AED | atomový emisní detektor |
| EI | elektronová ionizace |
| CI | chemická ionizace |
| APCI | chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) – spojení s LC (LC-MS) |
| APPI | fotoionizace za atmosférického tlaku |
| ICP | indukčně vázané plazma |
| FI | ionizace elektrickým polem |
| FD | desorpce elektrickým polem |
| m/z | poměr hmotnosti a náboje iontu |
| LC | kapalinová chromatografie |
| ESI | elektrosprej |
| B | magnetický analyzátor |
| E | elektromagnetický analyzátor |
| Q | kvadrupól |
| QIT | iontová past |
| TOF | průletový analyzátor |
| ICR | iontová cyklotronová rezonance |
| HRMS | analyzátor s dvojí fokusací |
| SIM | režim hmotnostního analyzátoru pro monitorování vybraného iontu |
| MIM | režim hmotnostního analyzátoru pro monitorování vybraných iontů |
| SCAN | režim hmotnostního analyzátoru pro snímání celého spektra |
| MALDI | ionizace desorpcí laserem v přítomnosti matrice |
| LD | desorpce laserem |