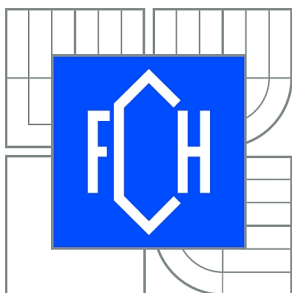




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY  
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF  
ENVIRONMENTAL PROTECTION

## KONTAMINACE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ MUSK SLOUČENINAMI

CONTAMINATION OF ENVIRONMENT OF MUSK COMPOUNDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LENKA TOBKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2015



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0887/2014</b>	Akademický rok: <b>2014/2015</b>
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	<b>Bc. Lenka Tobková</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	<b>prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Kontaminace životního prostředí musk sloučeninami

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracovat literární rešerši na téma makrocyclických a polycyclických musk sloučenin ve vodním prostředí a v kosmetických přípravcích
2. Na základě provedené rešerše zvolit vhodnou metodu a optimalizovat ji na uměle kontaminovaných vzorcích
3. Metodu aplikovat na stanovení reálných vzorků odebraných ve vodním prostředí a zakoupených v obchodní síti
4. Ve vybraných složkách životního prostředí provést ekotoxikologické hodnocení prostřednictvím alternativních testů toxicity
5. Zhodnotit získané výsledky z environmentální analýzy a ekotoxikologického posouzení a provést jejich interpretaci

### Termín odevzdání diplomové práce: 15.5.2015

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

-----  
Bc. Lenka Tobková  
Student(ka)

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## Abstrakt

Syntetické musk sloučeniny jsou uměle vyrobené organické sloučeniny, které našly své využití jako vonné složky nejrůznějších produktů osobní péče, a to od parfémů, kosmetiky, detergentů až po čisticí a prací prostředky. Vzhledem k jejich širokému použití a jejich schopnosti perzistence pronikly tyto sloučeniny do všech složek životního prostředí, zejména pak do vodního ekosystému. Proto je v poslední době věnovaná pozornost studiu těchto látek, jejich vlastností a osudu v různých složkách ekosystému.

V rámci diplomové práce bylo studováno pět sloučenin (habanolid, exaltolid, ambretolit, musk MC4 a ethylen brasylat) ze skupiny makrocyclických musk sloučenin ve vzorcích odpadních vod odebraných na přítoku a na odtoku tří čistíren odpadních vod (ČOV Brno-Modřice, ČOV Lednice, ČOV Mikulov). Základem této práce bylo optimalizovat metodu na stanovení vybraných musk sloučenin v odpadní vodě, zhodnocení a interpretace získaných výsledků. Pro izolaci analytů z odpadní vody byla použita mikroextrakce tuhou fází (SPME) a finální analýza byla provedena pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií. Na základě vyhodnocení dat byla vyjádřena míra účinnosti eliminace daných vonných látek čistírnou odpadních vod.

## Abstract

Synthetic musk compounds are artificial organic substances commonly used as fragrant constituents of personal care products as perfumes, cosmetics, detergents, in-house cleaning and washing agents. Given their large area of applications and their ability to be persistent, they leaked into all parts of ecosystem, especially aquatic one. There have been a big focus on studying these compounds, their properties and fate in the different parts of ecosystems in the last years.

The aim of master's thesis was carrying out the determination of five representatives (habanolide, exaltolide, ambrettolide, musk MC4 and ethylene brassylate) of macrocyclic musk compounds in waste water samples from influent and effluent of three water treatment plants (WWTP Brno-Modřice, WWTP Lednice and WWTP Mikulov). One of the main tasks was to perform a optimisation method for the determination of selected musk compounds in waste water and evaluation and interpretation of the results. Solid phase microextraction (SPME) technique was used for the extraction of analytes, consequently gas chromatography-mass spectrometry was used for analysis of selected analytes. Following evaluation the removal efficiency of musk compounds in the waste water treatment plant was assessed.

## Klíčová slova

Makrocyclické musk sloučeniny, vůně, odpadní voda, čistírna odpadních vod, mikroextrakce tuhou fází, plynová chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií

## Keywords

Macrocyclic musk compounds, fragrance, waste water, waste water treatment plant, solid-phase microextraction, gas chromatography-mass spectrometry

## Citace

TOBKOVÁ, L. *Kontaminace životního prostředí musk sloučeninami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 114 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

## Prohlášení

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

.....  
Podpis studenta

## Poděkování

Ráda bych poděkovala paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za podporu, vstřícnost a odbornou pomoc v průběhu řešení této diplomové práce. Poděkování patří také panu doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc., za jeho obětavou pomoc a cenné rady. Rovněž bych chtěla poděkovat panu Ing. Josefu Krajčovičovi, Ph.D. a vedení Centra materiálového výzkumu za to, že mi umožnili provést měření v jejich laboratoři. V neposlední řadě bych na tomto místě chtěla poděkovat také Ing. Tereze Švestkové za ochotu předat mi své zkušenosti týkající se řešené problematiky. Velice děkuji také své rodině a svému příteli za neustálou podporu a lásku.

# OBSAH

Obsah.....	5
1 Úvod.....	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Rozdělení vonných látek.....	8
2.1.1 Vonné látky rostlinného původu.....	8
2.1.2 Vonné látky živočišného původu.....	9
2.1.3 Syntetické vonné látky.....	11
2.2 Syntetické musk sloučeniny.....	11
2.2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti musk sloučenin.....	12
2.2.2 Musk sloučeniny v životním prostředí.....	20
2.2.3 Osud musk sloučenin v životním prostředí.....	30
2.3 Sledované musk sloučeniny.....	34
2.3.1 Ethylen brasylat.....	34
2.3.2 Habanolid.....	34
2.3.3 Exaltolid.....	35
2.3.4 Musk MC4.....	35
2.3.5 Ambretolid.....	36
2.4 Stanovení syntetických musk sloučenin.....	36
2.4.1 Odběr vzorku.....	36
2.4.2 Transport a uchování vzorku.....	37
2.4.3 Příprava tuhých vzorků před analýzou.....	37
2.4.4 Izolace analytů z matrice.....	38
2.4.5 Čištění vzorku, předseparace a zakoncentrování analytů.....	42
2.4.6 Identifikace a kvantifikace.....	42
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	52
3.1 Používané přístroje, zařízení a software.....	52
3.1.1 Zařízení použité k přípravě standardů a vzorků.....	52
3.1.2 Mikroextrakce tuhou fází (SPME).....	52
3.1.3 Plynový chromatogram s hmotnostním spektrometrem.....	52
3.2 Chemikálie a standardy.....	52
3.2.1 Standardy.....	52
3.2.2 Chemikálie.....	52
3.3 Sledované analyty.....	52
3.4 Příprava roztoků standardů.....	53
3.5 Optimalizace identifikace a kvantifikace analytů metodou GC/MS.....	53
3.5.1 Stanovení charakteristik standardů syntetických vonných látek.....	53
3.5.2 Optimalizace nastavení GC/MS.....	53
3.5.3 Nastavení hmotnostního detektoru.....	54
3.6 Optimalizace mikroextrakce tuhou fází (SPME).....	55
3.6.1 Výchozí podmínky SPME.....	55
3.6.2 Výběr vhodného vlákna a provedení.....	55
3.6.3 Vliv vysolování.....	55
3.6.4 Teplota sorpce.....	56
3.6.5 Doba sorpce.....	56

3.6.6	Množství přidané soli (vysolování) .....	57
3.7	Stanovení analytů v reálných vzorcích .....	57
3.7.1	Metoda standardního přídavku .....	58
3.8	Stanovení limitů detekce a kvantifikace (LOD a LOQ) .....	58
3.8.1	Stanovení meze detekce .....	59
3.8.2	Stanovení meze stanovitelnosti .....	59
3.9	Opakovatelnost měření .....	59
3.10	Vzorkování .....	60
3.10.1	Specifikace vzorků z ČOV Brno-Modřice .....	60
3.10.2	ČOV Mikulov .....	60
3.10.3	ČOV Lednice .....	60
3.11	Stanovení mykrocyclických musk sloučenin v produktech osobní péče .....	61
3.11.1	Reálné vzorky parfémů .....	61
3.12	Čištění laboratorního skla .....	64
4	Výsledky a diskuze .....	65
4.1	Optimalizace teplotního programu .....	65
4.2	Optimalizace SPME .....	66
4.2.1	Aktivace vláken .....	66
4.2.2	Výběr vlákna .....	67
4.2.3	Vliv teploty sorpce .....	70
4.2.4	Doba sorpce .....	70
4.2.5	Množství přidané soli (vysolování) .....	71
4.2.6	Optimalizovaná metoda SPME .....	72
4.3	Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti .....	73
4.4	Opakovatelnost měření .....	73
4.5	Vyhodnocení reálných vzorků odpadních vod .....	74
4.5.1	Čistírna odpadních vod Brno-Modřice .....	74
4.5.2	Porovnání analýz odpadní vody odebrané ze všech čistíren odpadních vod .....	77
4.6	Účinnost čistícího procesu .....	78
4.6.1	Produkty osobní péče (parfémy) .....	80
4.6.2	Porovnání naměřených výsledků s údaji publikovanými v literatuře .....	85
5	Závěr .....	87
6	Citovaná literatura .....	88
7	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	95
8	Přílohy .....	97

# 1 ÚVOD

Vonné látky jsou nepostradatelnou součástí široké škály produktů osobní péče, od parfémů, kosmetických výrobků až po prací a čisticí prostředky. Dříve byly vonné látky vyráběné čistě z přírodních zdrojů, tj. z rostlin, případně z produktů živých organismů. Postupem času však začaly být, a to především z etických a ekonomických důvodů, hojně nahrazovány uměle vyrobenými vonnými látkami, které v současnosti zařazujeme do skupiny s názvem syntetické musk sloučeniny.

Syntetické musk sloučeniny představují relativně novou skupinu perzistentních organických polutantů, které se běžně vyskytují v životním prostředí a setrvávají zde dlouhou dobu. Po aplikaci kosmetických nebo pracích přípravků jsou tyto sloučeniny vypouštěny do městské kanalizace, odkud se prostřednictvím odpadních vod dostávají do čistíren odpadních vod (ČOV). Účinnost čištění odpadních vod je v mnoha případech nedostatečná a limity přípustných koncentrací pro tyto sloučeniny nejsou stanoveny ani nijak kontrolovány. Prostřednictvím vyčištěné odpadní vody odtékající z ČOV tak dochází k pronikání syntetických musk sloučenin do vodního ekosystému. Odpadní vodu lze proto považovat za primární zdroj znečištění životního prostředí musk sloučeninami. Musk sloučeniny jsou lipofilní povahy a proto se velmi ochotně bioakumulují v různých živých vodních organismech. Přítomnost těchto sloučenin byla detekována rovněž u člověka, a to v lidské tukové tkáni a v tělních tekutinách. U mnoha polutantů z této skupiny byl již prokázán jejich negativní vliv (toxické účinky) na člověka, organismy a na složky životního prostředí. Z tohoto důvodu byly musk sloučeniny zařazeny mezi potenciálně nebezpečné látky a používání některých z nich bylo již zakázáno, případně podstatně omezeno. Informace o environmentálních vlastnostech syntetických musk sloučenin jsou nedostatečné, protože v současnosti ještě není komplexně studován vliv těchto sloučenin na životní prostředí a zejména na člověka. Je proto nezbytné provádět pravidelný monitoring těchto sloučenin v životním prostředí a tyto sloučeniny podrobně studovat, a to nejen za účelem zjištění jejich specifických environmentálních vlastností, ale především z důvodu prokázání jejich negativního dopadu na živé organismy a zejména na člověka.

V této diplomové práci je řešena problematika stanovení vybraných musk sloučenin ze skupiny makrocyclických musk sloučenin (habanolid, exlatolid, ambretolid, musk MC4 a ethylen brasylat) ve vzorcích odpadní vody z velkokapacitní ČOV Brno-Modřice a ze dvou malokapacitních ČOV Lednice a Mikulov. Dále byly tyto sloučeniny zjišťovány v produktech osobní péče (parfémy).

Cílem této studie bylo rovněž optimalizace komplexního analytického postupu pro stanovení vybraných makrocyclických zástupců v reálných vzorcích odpadní vody, odebíraných na přítoku a na odtoku z ČOV. Jako vhodná metoda pro jejich izolaci z matrice byla zvolena a následně optimalizována mikroextrakce tuhou fází (SPME), pro identifikaci a kvantifikaci sledovaných analytů byla použita plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Rozdělení vonných látek

Vonné látky zaujímaly již v minulosti významnou roli a jejich důležitost je stále opodstatněná, což platí především pro kosmetický průmysl. Jedná se o sloučeniny rozmanitého původu, které působí na čichové receptory a vyvolávají vjem vůně nebo pachu. Dříve se vůně připravovaly převážně ze směsí vonných olejů extrahovaných z rostlin. Je však známo, že se rovněž používaly živočišné příměsi. Od konce 19. století se vědci začali pokoušet izolovat vonné látky především ze silic a snažili se především objasnit jejich chemickou strukturu. Díky těmto studiím mohly vzniknout syntetické vonné látky, což jsou uměle syntetizované analogy přírodních silic, které však nemají většinou stejnou chemickou strukturu. Vonné látky můžeme podle původu rozdělit do tří hlavních skupin, ve kterých má každá látka své specifické vlastnosti [1; 2].

#### 2.1.1 Vonné látky rostlinného původu

Rostlinné vonné látky, jinak také nazývané silice (dříve éterické oleje), jsou většinou příjemně vonící těkavé kapaliny, nerozpustné ve vodě, avšak dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Jsou to komplikované směsi nacházející se v olejových, případně v siličných žlázách květů a plodů rostlin, řídčeji v kůře nebo ve dřevě rostlin. Silice obsahují vždy uhlovodíky a kyslíkaté složky, které patří do skupiny terpenů, tzn., že mají skelet složený z izoprenových jednotek. Dále jsou v silicích přítomny aromatické sloučeniny a případně také alifatické sloučeniny, které mohou mít ve své struktuře kyslík, síru a dusík. Uhlovodíky jsou složky, které nemají pro vonné vlastnosti rozhodující význam, protože naopak zhoršují jejich vydatnost, rozpustnost a stabilitu. Kyslíkaté složky jsou však velmi důležité, protože právě ony jsou nositeli vůně. V rostlině může v průběhu vegetace probíhat mnoho biochemických procesů. Primárním mechanismem vznikají látky potřebné pro rostlinu jako zdroj energie, případně jako stavební jednotky. Patří sem především vysokomolekulární látky, dále rovněž cukry, tuky a bílkoviny. Degradací těchto produktů primárního metabolismu vznikají za optimálních podmínek produkty sekundárního metabolismu. Do této skupiny zařazujeme sloučeniny, které rostlina nutně nepotřebuje ke svému vývoji, tj. například alkaloidy, glykosidy, třísloviny, steroidní látky a vonné látky. V současné době je známo přibližně 100 000 druhů rostlin, z nichž jen asi 1700 druhů obsahuje tyto silice.

V parfumerii mají mimořádný význam rovněž další produkty získávané z rostlin, zejména balzámy, pryskyřice a klejoprskyřice. Tyto produkty se v parfumerii používají vesměs jako ustalovače vonných kompozic. Balzámy jsou viskózní tekutiny až polotuhé hmoty (rozpustné v ethanolu), které jsou vylučované rostlinou, nejčastěji stromem. Se stářím rostliny se viskozita balzámu zvyšuje a naopak jeho rozpustnost klesá. Pryskyřice jsou pevné amorfní výměšky rostlin, zejména keřů a stromů, které jsou téměř bez vůně. Klasickým představitelem pryskyřice je kalafuna. Klejoprskyřice jsou vylučovány rostlinami typu myrha, olibanum, benzoe. Mezi nejznámější rostliny, které jsou využívány pro získávání silic, patří například andělíka lékařská, blahovičnick kulatoplodý (eukalypt), jasmín velkokvětý, máta peprná, růže stolistá a vanilovník plocholistý [2; 3; 4].





Obrázek č.1: *Andělka lékařská, Eukalypt, Jasmín velkokvětý, Máta peprná, Růže stolistá, Vanilovník plocholistý* [5]

## 2.1.2 Vonné látky živočišného původu

Vonné látky mohou být v přírodě produkovány i živočichy, avšak živočichové neposkytují takové množství vůní jako rostlinná říše. Vonné látky živočišného původu jsou velmi důležitými surovinami pro výrobu parfému, zejména proto, že dodávají voňavkám tzv. animální notu. Kromě toho působí tyto látky rovněž jako fixátory a dodávají parfémům hluboký, sladký a jemný tón.

Při výrobě vonných kompozic se používají živočišné látky jako extrakty ve formě tinktur a resinoidů. Živočišné suroviny obsahují určité množství těžko rozpustných balastních látek, které se rozdělí při extrakci. Vůně z živočišných extraktů dosahují největší intenzity až při výrobě a zejména při zrání tinktur. Hlavními složkami animálních vůní jsou makrocyclické ketony, které se vyznačují skutečně vynikajícími fixačními a vonnými vlastnostmi.

Vonné látky produkuje řada živočichů, např. ondatra, aligátor, brouk skarab, pekari, zebu a další. Ve velké míře jsou však používány pouze čtyři druhy přirozených animálních vonných látek, tj. ambra, mošus, cibet a kastoreum. Tyto látky jsou poměrně drahé a byla po nich velká poptávka, což mělo za následek to, že došlo k ohrožení a téměř k vyhubení producentů těchto vonných látek [2; 4].

### 2.1.2.1 Ambra

Ambra je voskovitá hmota s bodem tání kolem 50°C, která vzniká v zažívacím traktu vorvaně obrovského (*Physeter catodon*), a to jako patologický produkt, který je někdy vyvrhován po poranění polykanou potravou. Tato hmota bývá vzácně nalézána na pobřeží jižních moří (Nový Zéland, Východní Indie, Indonésie a Západní i Jihozápadní Afrika), avšak mnohem více ambry se získává při zpracování ulovených vorvaňů. Přirozená ambra má stříbřitě šedou barvu a obsahuje triterpenický alkohol ambrein, v množství od 25 do 45 %, který v přirozeném stavu vůbec nevoní. Ambrová vůně se uvolňuje teprve při výrobě tinktury a to tak, že se ambrein štěpí na ambreinolid a dihydro-gama jonon. Tyto dvě látky jsou hlavními vonnými látkami ambry, kterou používáme v parfumerii. V současné době se ambrenolid a dihydro-gama jonon připravují také synteticky a jsou podstatou různých preparátů nabízených jako náhrada pravé ambry. Ambra je extrahována ethanolem s příměsí uhličitanu draselného a laktosy. Laktosa přispívá k rozmělnění voskovité struktury. Ambrová tinktura zraje několik měsíců za normální nebo mírně zvýšené teploty. Dobu zrání lze zkrátit přidáním zředěného peroxidu vodíku, čímž získá ambrová tinktura jemnou sametovou vůni [1; 2; 4].



Obrázek č. 2: *Vorvaň obrovský* [6]

### 2.1.2.2 Cibet

Cibet je silně páchnoucí výměšek žlázy samce i samičky z rodu cibetkovitých (*Viverra civetta aj.*). Žláza se nachází ve váčcích poblíž pohlavního ústrojí a řitního otvoru. Při vybrání cibetu z váčku není nutné zvíře usmrtit. Čistý cibet je běložlutá, tukovitá hmota, která na vzduchu hnědne. Vyznačuje se však velmi intenzivní vůní (spíše pach), která se teprve při velkém zředění stává příjemně vonící. Hlavním dodavatelem cibetu je Afrika. Surový cibet se rafinuje extrakcí alkoholem nebo jinými rozpouštědly; následně se alkoholický extrakt upravuje na tinkturu s množstvím okolo 3 % extraktivních látek. Tuto tinkturu je nutné nechat poměrně dlouhou dobu uležet a teprve poté je možné ji používat. Hlavními vonnými složkami cibetu je makrocyclický nenasycený keton cibeton, skatol a mastné kyseliny [2; 4].



Obrázek č.3: Cibetka [7]

### 2.1.2.3 Mošus

Jedná se o drobná zrnečka pocházející ze zvláštních váčků umístěných mezi pohlavním a řitním otvorem samců kabara pižmového (*Moschus moschiferus*), žijícího především v oblasti Himálají a Tibetu. Na trhu jsou k dostání dva druhy mošusu, a to tonkinský a sibiřský. Tonkinský mošus je více ceněný především vzhledem k jeho jemnější vůni. Mošus je získáván následujícím způsobem. Do výroby se dodávají sušené, chlupy porostlé váčky vejčitého tvaru (5 až 8 cm dlouhé). Tyto váčky se rozřežou a pouze jejich hnědý, zrnitý obsah se zpracovává stejným způsobem, jako cibet. Mošus se nejčastěji roztírá s trochou potaše a následně se extrahuje do ethylalkoholu. Běžně se vyrábí 3% tinktura, která se po dlouhém zrání používá jako fixátor do jemných parfémových kompozic. Hlavními vonnými složkami mošusu je muskon a skatol. Tyto dvě složky lze v praxi nahradit makrocyclickými laktony nebo estery [2; 3].



Obrázek č.4: Kabar pižmový [8]

#### 2.1.2.4 Kastoreum

Kastoreum je látka, která je vyměšována bobry (*Castor fiber*) a je shromažďována ve dvou žlázových váčcích nacházejících se poblíž pohlavních orgánů. Váček je hruškovitého tvaru o celkové hmotnosti asi 100 g. Každý váček by měl obsahovat až 80 % látek rozpustných v ethylalkoholu. Hlavními vonnými složkami kastorea jsou deriváty fenolu, které zřejmě pocházejí z rostlinné potravy (kůra stromů). Na trhu se poměrně málo vyskytuje preparát s kastorovou notou, důvodem je menší použití v praxi, na rozdíl od jiných živočišných přísad [2].



Obrázek č. 5: Bobr [9]

#### 2.1.3 Syntetické vonné látky

Hlavní podíl mezi surovinami aplikovanými v moderní parfumerii tvoří vedle již specifikovaných přírodních vonných látek i uměle vyráběné (syntetické) vonné látky. Analytičtí chemici se již od konce 19. století začali zaměřovat na izolaci, určení struktury a objasnění působení přírodních vonných látek. Následně byly vypracovány postupy jejich syntézy a syntéz podobných vonných skupin, které se v přírodě vůbec nevyskytují. Syntetické látky mají podobné vonné vlastnosti jako přírodní vonné látky, avšak odlišují se od nich svojí strukturou. Jedná se zejména o látky aldehydické, etherové, alkoholové a polycyklické organické sloučeniny. Hlavní příčinou výroby syntetických vonných látek byla nedostatečnost vonných zdrojů pocházejících z přírody. Proto se lze domnívat, že vznikly především z důvodu uspokojení poptávky trhu. Každá nově syntetizovaná látka musí být podrobena testům biologické odbouratelnosti a rovněž testům toxicity. V neposlední řadě je důležitá také ekologická a ekonomická stránka výrobní technologie syntetických vonných látek. Velmi specifickou skupinu syntetických vonných látek tvoří tzv. musk sloučeniny neboli syntetické analogy pižma [2].

### 2.2 Syntetické musk sloučeniny

Mošusové sloučeniny neboli musk sloučeniny jsou přírodní i umělé připravené vonné látky vyznačující se rozmanitými vůněmi. Mluvíme-li o přírodních musk sloučeninách, myslíme tím především sloučeniny živočišného původu, konkrétně výměšky kabara pižmového, od něhož byl právě odvozen název musk sloučenin. Přírodní mošusové látky (živočišné i rostlinné) jsou však velmi vzácné a cenné, což je také hlavní důvod, proč jsou stále častěji v parfumerii a v kosmetickém průmyslu nahrazovány syntetickými vonnými látkami. Výrobní cena syntetických vonných látek je podstatně nižší než cena přírodních vonných látek. Syntetické vonné látky se výrazně odlišují svojí chemickou strukturou, avšak spojuje je typická vzácná vůně. Jejich zástupce lze nalézt téměř ve všech skupinách organických látek. Musk sloučeniny jsou jedny z nejdůležitějších vonných látek, které jsou pro svoji schopnost fixace a ucelení vonné kompozice využívány ve voňavkářství. Nalezly své využití především jako vonné složky v mnohých spotřebitelských produktech, jakými jsou parfémy, mýdla, tělová mléka, šampóny, sprchové gely, pěny do koupele, pleťové krémy a jiná kosmetika. Kromě toho jsou přítomny v osvěžovačích vzduchu, detergentech, změkčovačích tkanin, průmyslových i domácích čisticích prostředcích a také v potravinářských přísadách. Vzhledem ke stále

rozšířenějšímu používání syntetických musk sloučenin došlo k jejich průniku do všech složek životního prostředí. Jsou přítomny ve vodě, sedimentech, vzduchu a také v prachu z domácností. Tyto sloučeniny byly dále detekovány v biotě, v lidské tukové tkáni, mateřském mléce, v krevním séru, v krvi matky i v krvi pupeční šňůry dítěte. Pronikání syntetických musk sloučenin, případně jejich bioaktivních metabolitů do složek ekosystému však představuje skutečný problém, protože se zde akumulují a působí toxicky na organismy, zvláště v akvatickém prostředí [10; 11; 12]

### **2.2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti musk sloučenin**

Syntetické musk sloučeniny jsou semivolatilní organické látky nepolárního charakteru, které se díky své lipofilně dobře rozpouští v organických rozpouštědlech a tucích. Naopak jejich rozpustnost ve vodě je velmi omezená. Syntetické musk sloučeniny se velmi dobře adsorbují, procházejí přes buňku a také se díky těmto svým vlastnostem dobře bioakumulují [12]. Bioakumulace byla studována zejména u polycyklických musk sloučenin; zde bylo prokázáno, že galaxolid a tonalid jsou v rybách metabolizovány na polárnější produkty, které jsou však během 1-3 dnů vyloučeny [13]. Některé musk sloučeniny mají velmi stabilní struktury a proto jsou odolnější vůči rozkladu. Prokazují také odolnost vůči tepelné degradaci, fotodegradaci a částečně i biodegradaci. Sloučeniny tonalid a galaxolid ze skupiny polycyklických musk sloučenin biodegradují na polárnější oxidační produkty, které mají v aktivovaném kalu poločas rozpadu kolem 21 hodin a v půdních systémech může být poločas rozpadu v rozmezí 1 až 4 měsíců [14]. Nitromusk sloučeniny se v anaerobním prostředí metabolizují na aminometabolity, které mají výrazně odlišné vlastnosti než mateřská sloučenina. Biotická degradace se uskutečňuje u nitromusk sloučenin pomocí mikroorganismů; tento způsob degradace je částečně omezen, a proto byla hodnocena jiná metoda rozkladu, kterou je fotochemická degradace. V rámci posuzování vlivu fotochemické degradace bylo ozařováno sorpční SPME vlákno UV zářením; sorbované analyty byly zjišťovány prostřednictvím finální metody GC-MS. Tímto způsobem byla analyzována směs čtyř nitromusk sloučenin (musk xylen, musk keton, musk tibeten a musk mosken) a bylo získáno 14 fotoproduktů s poločasem rozpadu 3 až 32 minut (reakce 1. řádu) [15]. Molekulová hmotnost se u polycyklických a nitromusk sloučenin pohybuje v rozmezí 200-300. Patří mezi POPs (perzistentní organické polutanty) a rovněž mezi tzv. PCP (personal product care) [16; 17].

Musk sloučeniny dělíme podle struktury do 4 skupin [18]:

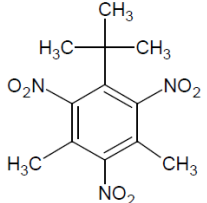
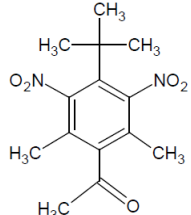
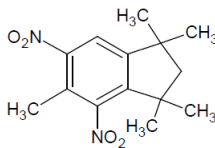
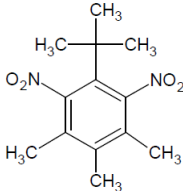
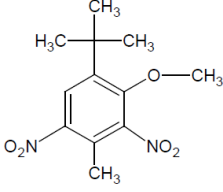
- Nitro musk sloučeniny
- Polycyklické musk sloučeniny
- Makrocyclické musk sloučeniny
- Nové (lineární) musk sloučeniny

#### **2.2.1.1 Nitromusk sloučeniny**

Nitromusk sloučeniny tvoří první uměle vytvořenou skupinu syntetických vonných látek, které začaly být ve velké míře používány již od počátku 20. století. Jedná se o substituované dinitro- a trinitro-deriváty benzenu. První nitromusk sloučenina byla poprvé vyrobena v roce 1891 Albertem Bauerem, který náhodně objevil tzv. Bauerovo pižmo, když se pokoušel zvýšit účinnost výroby trinitrotoluenu, a to při kondenzaci toluenu s isobutylchloridem v přítomnosti chloridu hlinitého a na ni navazující nitraci produktu [19]. V následujících letech byly procesem derivace syntetizovány z této sloučeniny další aromatické nitromusk sloučeniny, které dokázaly, a to vzhledem ke svým vlastnostem, nahradit velké části přírodní musk sloučeniny. Tyto uměle vytvořené vonné látky měly podobnou vůni jako přírodní musk sloučeniny, přestože mají naprosto rozdílnou chemickou strukturu a v přírodě se vůbec nevyskytují. Masivní používání těchto látek bylo zaznamenáno v počátcích jejich výroby, a

to především díky jejich nízké ceně, velmi dobré fixační vlastnosti a obecné dostupnosti. Pro svoji příjemnou vůni našly své použití jako běžné složky mýdel, pracích prášků a čistících prostředků [12; 17]. V roce 1987 představovala celosvětová produkce nitromusk sloučenin přibližně 2500 tun, přičemž největším producentem těchto látek byla Čína a Indie. Od roku 1983 došlo k snížení výroby nitromusk sloučenin, zejména z důvodu šířících se zpráv o fotoalergických dopadech, které byly způsobeny musk ambrettem [20]. V 80. letech 20. století byly poprvé detekovány nitromusk sloučeniny (musk xylen a musk keton) ve vzorcích ryb odlovených z japonské řeky Tama (nedaleko japonského Tokia) a také ve vodě odebrané za ČOV, což vedlo k ukončení používání těchto sloučenin v Japonsku [21]. Proto začal být prováděn systematický výzkum i v dalších zemích. V důsledku toho byla provedena řada monitorizačních studií, zahrnujících i analýzy mateřského mléka. Rezidua těchto sloučenin byla detekována rovněž v mateřském mléce, kde byla prokázána přítomnost musk xyleny, musk ketonu a v malém množství také musk ambrette a musk moskeny [22]. Za účelem zjištění potenciálních zdrojů těchto kontaminantů nebezpečných pro člověka, byla v Německu vypracována studie, v rámci které byly sledovány tyto analyty především v levné kosmetice a detergencích. Nejčastěji se ve vzorcích analyzované kosmetiky vyskytoval musk keton (55 %), případně také musk xylen (41,5 %) [23]. Díky těmto poznatkům byly nitromusk sloučeniny podrobeny mnoha ekotoxikologickým a toxikologickým testům. Výroba některých nitromusk sloučenin byla proto v různých zemích zastavena, a to vzhledem k jejich prokázané toxicitě a karcinogenitě. V současné době je jejich množství v životním prostředí pravidelně sledováno. Nitromusk byly zejména v posledních desetiletí nahrazeny polycyklickými musk sloučeninami. Mezi nejznámější nitromusk sloučeniny patří musk keton, musk xylen, musk ambrette, musk tibeten a musk mosken [24].

Tabulka č. 1: Příklady zástupců nitromusk sloučenin [3]

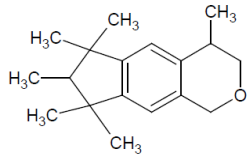
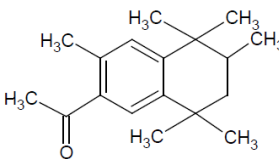
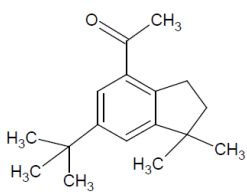
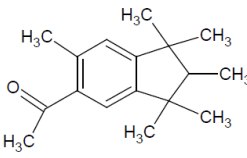
Triviální název	CAS	Empirický vzorec	Molární hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )	Strukturní vzorec
Musk xylen	81-15-2	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	297,26	
Musk keton	81-14-1	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	294,3	
Musk moskene	116-66-5	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	278,3	
Musk tibetene	145-39-1	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	266,3	
Musk ambrette	83-66-9	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	268,3	

### 2.2.1.2 Polycyklické musk sloučeniny

Další skupinu syntetických vonných látek tvoří polycyklické musk sloučeniny, které se staly velmi populární po druhé světové válce a v podstatě nahradily nitromusk sloučeniny. Tyto sloučeniny můžeme podle jejich struktury rozdělit na deriváty indanu, tetralinu, kumarinu a tricyklické sloučeniny. Mezi nejvýznamnější zástupce této skupiny polycyklických musk sloučenin patří galaxolid (HHCB) a tonalid (AHTN), jejichž společným znakem je indanový nebo tetralinový skelet, který je nejčastěji substituován methylovými skupinami [16]. Typické pro většinu polycyklických musk sloučenin je přítomnost chirálního centra. Galaxolid má dvě chirální centra a celkově proto může vytvořit 4 stereoizomery, kde pouze 2 mají silnou, charakteristickou vůni. Tonalid má pouze jedno chirální centrum [25; 26]. Z ekologického hlediska nepředstavují polycyklické musk sloučeniny takové nebezpečí pro životní prostředí jako nitromusk sloučeniny; hlavním důvodem je nepřítomnost nitro- skupiny. V porovnání s nitromusk sloučeninami jsou odolnější vůči alkáliím, jsou stálější na světle a jejich syntéza je levnější. Polycyklické musk sloučeniny se v přirozeném prostředí nevyskytují, dostávají se sem pouze lidskou činností. Své využití našly převážně v kosmetických přípravcích, produktech osobní hygieny a také v detergentech [16].

Polycyklické musk sloučeniny se začaly objevovat po roce 1950. Prvním ze syntetizovaných polycyklických musk sloučenin byl phantolid (AHDI). Dále můžeme do této skupiny zařadit již zmiňovaný tonalid (AHTN), galaxolid (HHCB), celestolid (ADBI) a v neposlední řadě traseolid (ATI). Na počátku roku 1970 byl galaxolid používán ve větším množství než tonalid, především díky jeho nižší výrobní ceně, avšak zanedlouho se tonalid stal cenově stejně dostupný jako galaxolid. Ročně se v USA a v Evropě spotřebuje 1500 tun tonalidu a 3800 tun galaxolidu, což představuje 95 % celkové spotřeby polycyklických musk sloučenin [17]. V roce 1994 se objevily první zmínky o přítomnosti polycyklických musk sloučenin ve vzorcích ry; v roce 1995 již byly tyto analyty detekovány také u člověka, a to ve vzorcích mateřského mléka a tuku. V současné době patří polycyklické musk sloučeniny mezi potenciálně nebezpečné, protože mohou narušovat celulární metabolismus [27].

Tabulka č. 2: Příklady zástupců polycyklických musk sloučenin[3]

Triviální název	CAS	Empirický vzorec	Molární hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )	Strukturní vzorec
Galaxolid	1222-05-5	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O	258,4	
Tonalid	1506-02-1	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O	258,4	
Celestolid	13171-00-1	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O	244,4	
Phantolid	15323-35-0	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O	244,4	



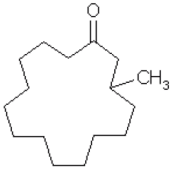
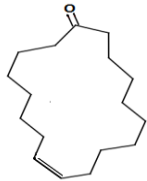
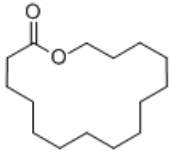
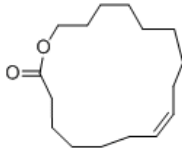
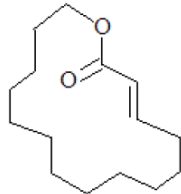
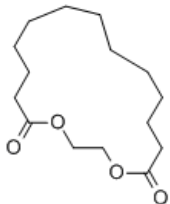
### 2.2.1.3 Makrocyklické musk sloučeniny

Vývoj makrocyklických musk sloučenin byl zahájen v roce 1926, a to popisem struktury masconu a civetonu, kteří jsou odpovědní za typický mošusový zápach některých živočišných výměšků, jako je např. výměšek kabara pižmového (mascon) a cibetky (civeton). Toto zjištění publikoval Leopold Ruzicka a ostatní členové jeho výzkumného týmu. Makrocyklické musk sloučeniny jsou cyklické makromolekuly, jejichž vznik byl možný vlivem tzv. „Bayerově teorii pnutí“. Vzhledem k tomuto „průlom“ ve vývoji makrocyklických sloučenin byly syntetizovány další sloučeniny vyznačující se pižmovou vůní. Makrocyklické musk sloučeniny obsahují 15 až 17 čtené cykly obsahující ketonovou nebo laktonovou skupinu, jejichž intenzita a typ vůně je ovlivňován právě velikostí kruhu. Vůně sloučenin majících 14 čtený kruh atomů má slabší intenzitu než sloučeniny s 15 až 16 čteným kruhem, které mají silnou pižmovou vůni. Rovněž bylo prokázáno, že přírodní makrocyklické sloučeniny živočišného původu jsou povahou ketony, zatímco látky rostlinného původu jsou povahou laktony [12; 17; 25].

Makrocyklické musk sloučeniny jsou velmi žádané v průmyslu, a to především díky jejich stabilitě na světle, odolnosti vůči alkáliím, velmi dobrým fixačním vlastnostem, trvanlivosti a intenzitě vůně. Tyto sloučeniny jsou žádané rovněž vzhledem k jejich snadnější biodegradovatelnosti, v porovnání s polycyklickými a nitromusk sloučeninami. Další jejich velkou výhodou je šetrnost k životnímu prostředí. Proto se makrocyklické musk sloučeniny staly z hlediska kvality nejvíce oceňovanými látkami ve „vonném“ průmyslu. Nevýhodou je však jejich relativně vysoká cena, což je prozatím hlavním důvodem, proč makrocyklické musk sloučeniny nebyly dosud rozšířeny ve větším měřítku a proč ještě zcela nenahradily nitro- a polycyklické musk sloučeniny, nebezpečné pro životní prostředí. Proto se neustále ověřují a zkoušejí nové postupy k vytvoření dalších typů musk sloučenin vhodných pro průmyslové použití, které nebudou tak finančně náročné [12; 17; 25]. V roce 1996 tvořily makrocyklické sloučeniny pouze cca 5 % celkové spotřeby musk sloučenin. O dva roky později, tj. v roce 1998, představovaly makrocyklické musk sloučeniny z celkového množství ve světě vyrobených musk sloučenin, méně než 25 %. V roce 2008 stoupl toto číslo na 60 až 65 % [28]. V budoucnu se však očekává ještě větší produkce těchto látek z důvodu jejich klesající ceny, což je vhodným stimulem ke zvýšení používání těchto musk sloučenin. Makrocyklické musk sloučeniny se používají v kvalitnějších parfémeh, především vzhledem ke své vůni a dobrým fixačním vlastnostem (silné ustalovací vlastnosti a silnější, účinnější a stabilnější vůni). Jejich vůně je velmi intenzivní, a proto není zapotřebí používat tak velká množství, jaká se používají v případě musk sloučenin z ostatních skupin. Kromě toho jsou šetrnější k životnímu prostředí, snadněji odbouratelné a také mají menší estrogení aktivitu v porovnání s nitromusk sloučeninami a polycyklickými musk sloučeninami. Také jsou šetrnější ve vztahu k biotě. Některé sloučeniny ze skupiny makrocyklických musk sloučenin můžeme detekovat také v přírodě (mascon, civeton, cyklopentadekanolid). Bylo zjištěno, že hmotnostní spektra makrocyklických musk sloučenin jsou podobná spektrům mastných kyselin a jejich derivátů. Separace makrocyklických musk sloučenin je velmi obtížná, a to především z důvodu jejich podobnosti s přírodními produkty.

Jedním z nejznámějších zástupců je ethylen brasylat, který se vyrábí synteticky a jeho roční produkce činí okolo 300 tun. Jedná se o výrobně nenákladnou sloučeninu, především díky její snadné syntéze a nízké ceně základního materiálu. Další, pro výrobu rovněž finančně nenáročnou makrocyklickou musk sloučeninou, je habanolid a jeho nenasycená verze exaltolid. Mezi důležité zástupce makrocyklických musk sloučenin patří kromě těchto látek také ambretolid, muscon, civeton, musk MC4 a musk NN [25; 29; 30].

Tabulka č. 3: Příklady zástupců makrocyclických musk sloučenin[3]

Triviální název	CAS	Empirický vzorec	Molární hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )	Strukturní vzorec
Muscon	541-91-3	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O	238,4	
Civeton	542-46-1	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> O	250,4	
Exaltolid	106-02-5	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	240,4	
Ambretolid	28645-51-4	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	252,4	
Habanolid	34902-57-3	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	238,4	
Ethylen brasylat	105-95-3	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	270,4	

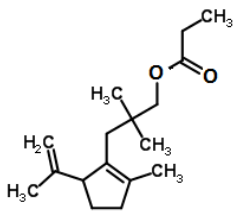
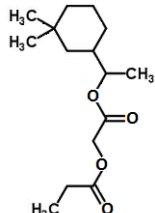
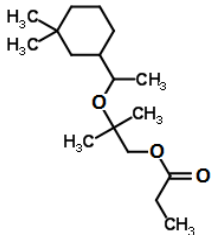
### 2.2.1.4 Nové (lineární) musk sloučeniny

Lineární musk sloučeniny jsou směs cykloalkylestery neboli alicyklické sloučeniny. Je to skupina látek, která se od ostatních musk sloučenin odlišuje zejména svojí strukturou. Hlavním důvodem vývoje lineárních musk sloučenin byla potřeba nahrazení škodlivých nitromusk a polycyklických musk sloučenin, které nejsou, jak již bylo řečeno, příznivé pro životní prostředí a také makrocyclických musk sloučenin, které sice tolik neškodí životnímu prostředí, avšak jejich výroba je finančně příliš nákladná [31].

V roce 1975 syntetizovali Hoffmann a von Fraunbergsvětla žlutou kapalinu, vyznačující se ovocnou vůní připomínající jahodové aroma. Tuto sloučeninu, z hlediska chemické struktury trisubstituovaný derivát cyklopentenu, pojmenovali komerčním názvem cyklomusk [31]. V roce 1990 byl objeven další zástupce lineárních musk sloučenin helvetolid, což je derivát cyklohexanu, který se rovněž vyznačuje ovocnou vůní, avšak spíše připomíná hruškové aroma. Podíl na objevu této sloučeniny měli Giersch a Schulte-Elte, kteří pracovali pro švýcarskou parfumérskou firmu Firmenich [31]. Další důležitá sloučenina ze skupiny lineárních musk sloučenin je romandolid, který svojí vůní připomíná nitromusk sloučeniny, konkrétně musk ambrette.

V současné době je produkováno poměrně velké množství lineárních musk sloučenin s nejrůznější strukturou, o kterých však dosud neexistuje dostatek informací. Proto jsou tyto sloučeniny stále ještě studovány mnoha odborníky, kteří chtějí vlastnosti této nejméně prozkoumané skupiny musk sloučenin lépe popsat a především objasnit jejich osud, vliv a chování v životním prostředí [31; 32].

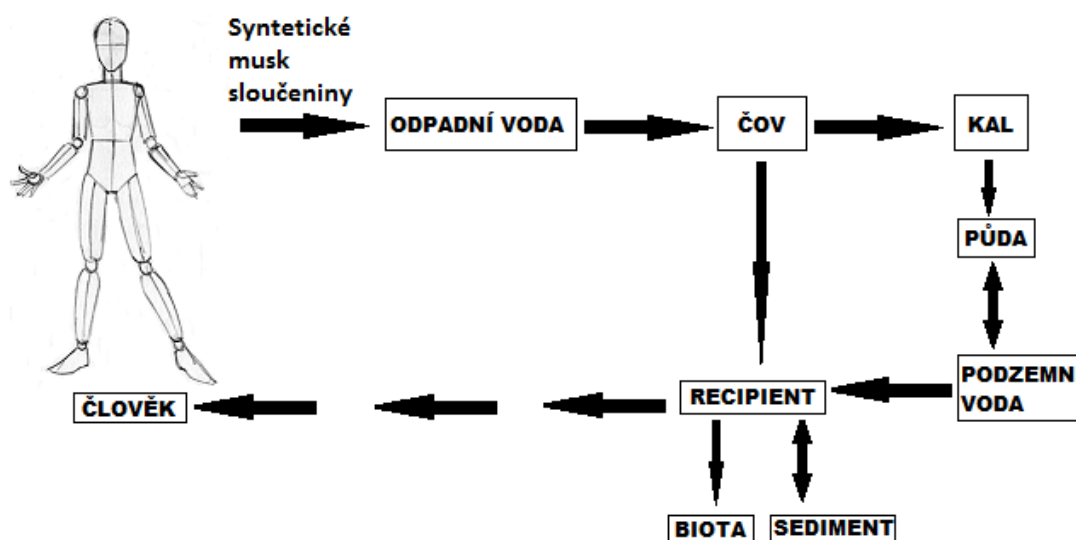
Tabulka č. 4: Příklady zástupců nových (lineárních) musk sloučenin [3]

Triviální název	CAS	Empirický vzorec	Molární hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )	Strukturní vzorec
Cyklomusk	84012-64-6	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	264,5	
Romandolid	236391-76-7	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	270,4	
Helvetolid	141773-73-1	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	284,4	

## 2.2.2 Musk sloučeniny v životním prostředí

Syntetické musk sloučeniny vstupují do životního prostředí především vlivem činností člověka. Ve stopových koncentracích je detekujeme ve všech složkách životního prostředí (vodní prostředí, půda, ovzduší) a kromě těchto složek i v potravním řetězci. Ke kontaminaci může docházet např. při úniku ve výrobním procesu, dále z odpadů obsahujících tyto látky a především z odpadní vody, která může vonné látky obsahovat.

Odpadní voda (efluent z ČOV) a následně také aplikace čistírenských kalů v zemědělství jsou považovány za největší zdroj kontaminace syntetickými musk sloučeninami. Důvodem je to, že právě do odpadní vody jsou splachovány čisticí, mycí a prací prostředky. Z ČOV jsou syntetické musk sloučeniny nedostatečně odstraňovány, zejména vzhledem k jejich nízké biodegradaci. Proto jsou nemetabolizované zbytky musk sloučenin kumulovány v kalcích z čistíren odpadních vod a následně se dostávají spolu s vyčištěnou vodou do recipientů. Zvláštní pozornost je třeba věnovat vodním živočichům (ryby), kteří jsou přímo vystaveni působení těchto látek. V důsledku jejich nepříznivých hodnot  $K_{ow}$  (rozdělovací koeficient oktanol-voda) dochází k jejich akumulaci v tukové tkáni živočichů. Tak se ryby stávají hlavním vstupem syntetických musk sloučenin do potravního řetězce. Do organismu člověka se tyto látky dostávají přes pokožku a přes sliznici, odkud mohou být transformovány až do dýchacího ústrojí [11; 33; 34; 35].



Obrázek č6: Průnik musk sloučenin do vodního prostředí [3]

### 2.2.2.1 Hydrosféra

Syntetické musk sloučeniny detekujeme nejčastěji ve vodním prostředí, kam se dostávají právě z již zmiňované odpadní vody z velkých městských aglomerací a také z významných průmyslových podniků zabývajících se výrobou detergentů a vonných látek. Hlavním zdrojem kontaminace syntetickými musk sloučeninami je odpadní voda a čistírenský kal, který se může aplikovat v zemědělství. Odpadní vody jsou čištěny na čistírnách odpadních vod (ČOV), odkud však musk sloučeniny nejsou používanými technologiemi zcela odstraněny. Přecházející odpadní vody odtékají dále do řek, kde dochází k jejich sorpci na organickou hmotu a také k jejich desorpci do ovzduší. Musk sloučeniny se velmi ochotně sorbují na sedimenty, kde jsou kumulovány. Pokud se z těchto sedimentů následně uvolní, mohou přes buněčné membrány přestupovat do vodní bioty, ze které se potravním řetězcem šíří do vyšších trofických úrovní [34; 36; 37; 38].

## **Odpadní voda a kal z ČOV**

Syntetické musk sloučeniny se používají jako prostředky osobní hygieny, a to od parfému přesostatní kosmetiku až po mycí prostředky. Tyto sloučeniny se po aplikaci částečně uvolňují do odpadní vody a zbylá část těchto látek ulpívá na těle, kde setrvávají relativně dlouhou dobu a uvolňují dlouhotrvající vůni. Po použití jsou syntetické musk sloučeniny unášeny prostřednictvím odpadních vod do ČOV. Nejvyšší koncentrace musk sloučenin byly protokvantifikovány právě ve znečištěných odpadních vodách. Syntetické musk sloučeniny jsou lipofilní povahy a velmi ochotně se sorbují na organickou hmotu, která je ve velkém množství přítomna v kalu z městských ČOV (60-70 %). Kal je heterogenní suspenze anorganických a organických látek vznikající odsazením z odpadní vody, případně při technologických procesech čištění odpadních vod. Jedná se o velmi bohatý zdroj organické hmoty, základních živin a stopových prvků.

V roce 2001 byla provedena rozsáhlá studie zaměřená na posouzení zatížení různých znečištěných míst v oblasti Berlína (Německo) polycyklickými musk sloučeninami. Průměrný obsah v odpadní vodě z ČOV byl pro galaxolid  $6,85 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a pro tonalid  $2,24 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Galaxolid a tonalid patřily k nejčastěji detekovaným a nejvíce zastoupeným musk sloučeninám ve všech složkách životního prostředí a byly kvantifikovány ve všech posuzovaných lokalitách. V koncentracích o jeden řád nižších byly detekovány i jiné sledované analyty, a to phantolid, traseolid a celestolid. Maximální koncentrace galaxolidu v odpadní vodě byla  $13,33 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  [39]. V jiné studii pocházející z roku 2004 (Německo) byla průměrná koncentrace galaxolidu na přítoku do ČOV  $1941 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a průměrná koncentrace tonalidu  $583 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . V kalu z ČOV byla průměrná koncentrace galaxolidu  $3068 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a průměrná koncentrace tonalidu  $1525 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . Pomocí této studie bylo dále prokázáno, že zhruba 35 % galaxolidu a tonalidu se během čistícího procesu nezměnilo a bylo vypuštěno do řeky; přibližně 5-10 % galaxolidu se během procesu čištění odpadních vod oxidovalo na lakton (HHCB-lakton). Obsah HHCB-laktonu na přítoku byl  $231 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a na odtoku  $367 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ , což představuje zhruba 62% přírůstek. Hlavním procesem odstranění syntetických musk sloučenin na ČOV byla podle autorů této studie sorbce na kal. Tonalid se nasorboval na kal v největším množství. Účinnost čistíren odpadních vod pro odstranění musk sloučenin se obvykle pohybuje v rozmezí 50-90 %, v řadě případů je však tato účinnost menší. Účinnost čistícího procesu je závislá na mnoha faktorech, přičemž mezi ty nejdůležitější patří velikost ČOV (počet ekvivalentních obyvatel), typ odpadní vody a použité čistírenské technologie [14; 40]. Další studie, ve které se její autoři zabývali stanovením 11 syntetických musk sloučenin v odpadní vodě a v kalu z ČOV, byla v roce 2006 zpracována v Kanadě. Musk xylen ze skupiny nitromusk sloučenin byl detekován pouze v polovině vzorků odpadní vody, zatímco ostatní sloučeniny z této skupiny (musk ambrette, musk mosken a musk tibeten) nebyly detekovány vůbec. Nejvyšší koncentrace byla prokázána u galaxolidu  $36-567 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a tonalidu  $13-137 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  ze skupiny polycyklických musk sloučenin. Účinnost čistírenského procesu se pohybovala v rozmezí 43,3-56,9 %. Velké množství odstraněných syntetických musk sloučenin se vyskytovalo rovněž v kalu. Po aplikaci tohoto kalu na zemědělskou plochu došlo ke kontaminaci půdy těmito sloučeninami; koncentrace galaxolidu byla  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  a tonalidu  $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Během 6 týdnů po aplikaci došlo k výraznému snížení koncentrace těchto látek, avšak galaxolid byl detekovatelný ještě 6 měsíců po aplikaci kalu na zemědělskou půdu [41]. Syntetické musk sloučeniny (11 sloučenin) byly zjišťovány také ve vzorcích kalu z čistíren odpadních vod v Jižní Korei. Analýza byla prováděna v kalech odebraných z obecních ČOV a z ČOV situovaných v zemědělských a farmaceutických podnicích. Ve vzorcích kalu byly identifikovány čtyři polycyklické musk sloučeniny a jeden zástupce ze skupiny nitromusk sloučenin, přičemž převládajícími zástupci byly rovněž i v tomto případě galaxolid a tonalid; koncentrace galaxolidu se pohybovala v rozmezí 0,52 až  $82 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  vztaženo na sušinu, u tonalidu byla koncentrace v rozmezí 0,12-28,8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  vztaženo na

sušinu. Výsledky ukázaly, že obě polycyklické musk sloučeniny byly ve velké míře používány v Jižní Korei [42]. Studie mapující výskyt polycyklických musk sloučenin ve vzorcích odpadní vody z ČOV situované v čínském městě Guagdong byla provedena v roce 2007. Do této ČOV přitékají jak komunální odpadní vody (30 %) tak rovněž průmyslové odpadní vody (70 %) ze dvou kosmetických závodů. Koncentrace galaxolidu na přítoku byla v rozmezí 1,01-3,08  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , koncentrace tonalidu v rozmezí 0,12-10,16  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a koncentrace cashmeranu v rozmezí 0,19-0,34  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Odpadní voda byla před analýzou centrifugována a také byla přefiltrována přes filtr ze skleněných vláken o velikosti 0,7  $\mu\text{m}$ . Bylo prokázáno, že odfiltrované částice z odpadní vody obsahovaly mnohonásobně větší množství musk sloučenin, než bylo kvantifikováno v odpadní vodě. Galaxolid byl na částicích nasorbován v množství 36x větším než v odpadní vodě a tonalid v množství 17x větším. Na odtoku z ČOV byla koncentrace galaxolidu v rozmezí 0,95-2,05  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , koncentrace tonalidu v rozmezí 0,10-0,14  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a koncentrace cashmeranu v rozmezí 0,06-0,10  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Účinnost čištění ČOV byla v případě galaxolidu 86 až 97 %, tonalidu 87 až 96 % a cashmeranu 61 až 75 %. [43]. Studie prováděná v deseti ČOV v jihokorejském městě Busan mapovala účinnost odstranění musk sloučenin (galaxolid, tonalid, musk keton, musk xylen). Celková koncentrace syntetických musk sloučenin se pohybovala v rozmezí 3,69-7,33  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  na přítoku a 0,96-2,69  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  na odtoku. Bylo zjištěno, že biologický stupeň čištění vykazoval mnohem vyšší účinnost odstranění musk sloučenin než chemický proces, dezinfekce a filtrace. Koncentrace musk sloučenin na odtoku a přítoku byla následujícího charakteru: galaxolid > tonalid > musk keton > musk xylen. Galaxolid, tonalid a musk keton byly detekovány ve všech vzorcích na přítoku a na odtoku z ČOV. Musk xylen byl detekován pouze ve 4 vzorcích z 10. Účinnost odstranění musk sloučenin za použití biologického stupně čištění byla u galaxolidu 53 %, tonalidu 56 % a musk ketonu 53 % [40].

### **Povrchová voda a sediment**

Hlavním zdrojem musk sloučenin v povrchové vodě je odpadní voda odtékající z odtoků čistíren odpadních vod. Není proto žádným překvapením, že nejvyšší koncentrace musk sloučenin jsou detekovány právě na odtoku odpadní vody z ČOV. Obsah syntetických musk sloučenin sepozdvojnásobně snižuje se vzrůstající vzdáleností od ČOV, a to především v důsledku zředování, degradace a sorpčních jevů. Na podkladě tohoto zjištění můžeme říci, že obsah syntetických musk sloučenin v povrchové vodě závisí především na podílu odpadních vod. Přítomnost polycyklických musk sloučenin, tj. tonalidu a galaxolidu, můžeme proto považovat za spolehlivé indikátory znečištění povrchových vod odpadními vodami [16]. Sedimenty jsou dalším velkým rizikem možného výskytu musk sloučenin ve vodním ekosystému. Vypouštěním musk sloučenin z ČOV do vodních recipientů dochází k jejich sorpci na říční sediment. Říční sediment představuje ideální podmínky pro akumulaci musk sloučenin, především z důvodu přítomnosti minerálních částic, které mají velký specifický povrch a také přítomnosti organické hmoty. Hlavní nebezpečí říčního sedimentu spočívá ve vzniku více nebezpečných metabolitů z akumulovaných musk sloučenin, které vznikají anaerobním procesem a mohou se ze sedimentu vyplavovat do vodní bioty.

Studie zabývající se výskytem syntetických musk sloučenin v sedimentech byly prováděny v letech 1996-1999 v Německu (oblast Dolního Saska). Celkem bylo analyzováno 54 vzorků sedimentů z menších i větších řek nacházejících se v této oblasti. Galaxolid a tonalid se až na výjimky vyskytovaly v rozmezí  $\leq$  LOD a 40  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (vztaženo na sušinu), přičemž nejvyšší kvantifikované hodnoty byly prokázány v sedimentech, které se vyskytovaly v blízkosti výpusti vyčištěné odpadní vody do vodního toku. Hodnoty galaxolidu byly 900  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , vztaženo na sušinu a tonalidu 2600  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , vztaženo na sušinu. Nitromusk sloučeniny byly detekovány v sedimentu v menším množství, například musk xylen byl kvantifikován ve vzorcích sedimentu v průměrných hodnotách ležících v rozmezí 1-4  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , vztaženo na sušinu. Musk keton byl prokázán v různých sedimentech,

avšak jeho obsah se výrazně lišil v závislosti na místě odběru sedimentu [37]. V již zmiňované studii z roku 2001, která byla zaměřena na stanovení polycyklických musk sloučenin v různě znečištěných oblastech Berlína (Německo), byly kromě odpadní vody analyzovány rovněž vzorky povrchové vody a vzorky sedimentů. Průměrný obsah galaxolidu v povrchové vodě (středně znečištěná oblast) byl  $0,23 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a tonalidu  $0,07 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . V sedimentu byla zjištěna koncentrace galaxolidu  $0,22 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , vztaženo na sušinu a tonalidu  $0,26 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , vztaženo na sušinu. Maximální koncentrace galaxolidu v nejvíce znečištěných oblastech byly následující: pro povrchovou vodu  $3,15 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a pro sediment  $2,20 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , vztaženo na sušinu [39].

### **Biota**

Syntetické musk sloučeniny se vyznačují nejen vysokým stupněm bioakumulace, ale také vysokou perzistencí. Jsou to sloučeniny velice stabilní, které setrvávají v životním prostředí dlouho a téměř ve složkách životního prostředí nedegradují, a proto jejich koncentrace ve vodním prostředí neustále vzrůstá. Syntetické musk sloučeniny patří mezi všudypřítomné polutanty nacházející se ve vodním ekosystému a již byly identifikovány také ve vodní biotě, zejména v rybách.

V roce 1994 byla v Německu provedena studie zaměřená na zjištění průměrného zastoupení nitromusk sloučenin ve vodní biotě, tj. ve 145 vzorcích ryb, garnátů a slávek. Musk xylen byl přítomen ve vzorcích v koncentracích v rozmezí od  $<0,01$ - $1,06 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  tuku a musk keton v rozmezí  $<0,01$ - $0,38 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  tuku (průměrný výskyt musk ketonu a musk xylen se řádově pohyboval v setinách až desetínách  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  tuku) [44]. Syntetické musk sloučeniny byly rovněž předmětem další studie prováděné v Číně, a to ve druhém největším sladkovodním jezeře Taihu; ve 24 druhích ryb bylo detekováno celkem pět zástupců polycyklických musk sloučenin a dva zástupci ze skupiny nitromusk sloučenin, přičemž nejvyšší koncentrace byly prokázány u galaxolidu a tonalidu. Galaxolid se vyskytoval v koncentracích v rozmezí hodnot  $\leq \text{LOQ}$  až do  $52,9 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  tuku a tonalid rovněž od hodnot  $\leq \text{LOQ}$  až do  $7,5 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  tuku. Ostatní syntetické musk sloučeniny byly kvantifikovány ve velmi nízkých koncentracích, případně jejich nízké hodnoty byly  $\leq \text{LOQ}$  [45]. Další studie, která byla realizována v japonských pobřežních vodách, byla zaměřena na výskyt polycyklických musk sloučenin (galaxolid a tonalid) ve tkáních mořských savců a žraloků. Galaxolid byl detekován v tuku sviňuchy hladkohřbeté v koncentracích v rozmezí 13 až  $149 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  živé hmotnosti. Kromě toho bylo prokázáno, že plod sviňuchy obsahoval rovněž galaxolid, a to v koncentraci  $26 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  živé hmotnosti, což naznačuje, že došlo k transplacentárnímu přenosu této sloučeniny do plodu. Největší koncentrace galaxolidu byla zjištěna v tuku obklopujícím ledviny, což poukazuje na tu skutečnost, že se polycyklické musk sloučeniny, stejně jako perzistentní organochlorové sloučeniny, ochotně kumulují v lipidických tkáních. Obsah tonalidu a nitromusk sloučenin byl ve tkáních mořských savců a žraloků nízký ( $\leq \text{LOQ}$ ). Z toho vyplývá, že tonalid není v Japonsku součástí tolika komerčních výrobků, jako galaxolid. Galaxolid byl rovněž detekován ve vzorcích žraloka kladivouna, a to v koncentracích v rozmezí 16-48  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  živé hmotnosti. Výskyt galaxolidu ve vzorcích vyšších trofických organismů dokazuje, že galaxolid se velmi špatně rozkládá ve složkách vodních ekosystémů a tak dochází k jeho hromadění v mořských predátorech, kteří představují vrchol mořského potravního řetězce [46; 47].

### **Kontaminace musk sloučeninami zjišťovaná v České republice**

V České republice byla rovněž provedena rozsáhlá studie zabývající se sledováním nejvýznamnějších syntetických musk sloučenin, kterými byly musk keton a musk xylen ze skupiny nitromusk sloučenin a ze skupiny polycyklických musk sloučenin galaxolid a tonalid. Pilotně provedená analýza ryb odchycených v Labi v Hřensku v roce 1996 poukázala na značný rozsah kontaminace syntetickými musk sloučeninami v této lokalitě nacházející se v blízkosti německých hranic. V následujících letech bylo proto provedeno vyšetření více než 650 vzorků ryb a sedimentů, získaných z 11 odběrových

lokalit na řekách Labe, Vltava a Tichá Orlice. Výsledky ukázaly, že syntetické musk sloučeniny jsou všudypřítomnými kontaminanty českých řek. Také bylo prokázáno, že nejvyšší koncentrace syntetických musk sloučenin byly zjištěny v lokalitách po proudu od velkých městských nebo průmyslových aglomerací, v porovnání s lokalitami nad těmito aglomeracemi. Nejrozsáhlejší kontaminace byla zjištěna v lokalitě Klecany, a tocca 3 km od výpusti odpadní vody z ČOV. Koncentrace jednotlivých musk sloučenin v rybách byla následující: galaxolid > tonalid > musk xylen  $\geq$  musk keton. Nitromusk sloučeniny, tj. musk keton a musk xylen, byly v rybách stanoveny v koncentracích v rozmezí od desetin až po setiny  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  tuku a galaxolid a tonalid byly kvantifikovány řádově v koncentracích od desetin až po jednotky  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  tuku. Různé druhy ryb mají rozdílný biokontrační faktor a také rozsah biokontrační. Pro zjišťování průniku musk sloučenin z odpadních vod do povrchových vod se často jako vhodný bioindikační organismus používá cejn velký. V této studii byl nejvyšší biokontrační faktor a zároveň nejmenší rozsah biotransformace zjištěn právě u této ryby. Ve vyšetřovaných rybách byla prokázána i přítomnost aminoderivátů syntetických musk sloučenin (zejména 4-NH<sub>2</sub>-MX), a to v koncentracích vyšších než byla koncentracenesubstituované musk sloučeniny [48; 49; 50].

Další studie, která se zabývala stanovením syntetických musk sloučenin v ČR, se zabývala úrovní jejich kontaminace sledované na přítoku a odtoku ČOV Brno-Modřice; tato studie byla provedena v únoru roku 2010. Mezi sledovanými zástupci bylo pět zástupců ze skupiny nitromusk sloučenin (musk xylen, musk keton, musk tibeten, musk mosken, musk ambrette) a čtyři zástupci ze skupiny polycyklických musk sloučenin (galaxolid, tonalid, phantolid, tresolid). Pro izolaci analytů ze vzorků odpadních vod byla použita metoda mikroextrakce tuhou fází (SPME). Identifikace a kvantifikace byla provedena metodou plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Nejvíce rozšířenými analyty byly tonalid a galaxolid, jejichž maximální koncentrace byla následující: galaxolid  $2765 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a tonalid  $422 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ze skupiny nitromusk sloučenin byl detekován musk keton, jehož průměrná koncentrace byla  $90,33 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  a musk xylen, jehož průměrná koncentrace byla  $40,55 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . Musk mosken a musk tibeten nebyly identifikovány v žádném vzorku. Celkové odstranění syntetických musk sloučenin z čistírny odpadních vod Brno-Modřice bylo v rozmezí 37,43 až 99,99 % [51].

Cíle další studie prováděné v České republice bylo stanovení čtyř syntetických musk sloučenin v průmyslové odpadní vodě pocházející z kosmetického závodu Dermacol. Byly sledovány dva analyty ze skupiny polycyklických musk sloučenin (tonalid a galaxolid) a dva ze skupiny nitromusk sloučenin (musk keton a musk ambrette). Odpadní voda z tohoto závodu je čištěna pomocí ultrafiltrace a teprve poukonečím tohoto procesu čištění je vypouštěna do kanalizace. Vzorky odebrané na přítoku byly nejdříve přefiltrovány a následně pro stanovení musk ambrette a musk ketonu byly naředěny destilovanou vodou (poměr 1:5). Pro stanovení galaxolidu a tonalidu byl vzorek odpadní vody ředěn v poměru 1:10. Izolace analytů z odpadní vody byla provedena pomocí mikroextrakce tuhou fází (SPME) a finální analýza byla provedena metodou GC-MS. Vzorky odpadní vody byly odebírány po dobu 14 dní na přítoku do ultrafiltračního zařízení a na odtoku z tohoto zařízení, a to za účelem zjištění, jak efektivní je odstranění výše specifikovaných musk sloučenin pomocí ultrafiltrace. Výsledky potvrdily, že koncentrace nitromusk sloučenin se v environmentálních maticích stále snižuje, a to i v průmyslových odpadních vodách, protože musk ambrette nebyl detekován v žádném vzorku a musk keton byl přítomen pouze ve vzorcích odebraných v prvních třech dnech. Naproti tomu galaxolid byl identifikován ve všech odebraných vzorcích odpadní vody, přičemž koncentrace na přítoku se pohybovala v rozmezí od  $31,1\text{--}772 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  a na odtoku v rozmezí  $<\text{LOQ}\text{--}1,84 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Rovněž tonalid byl prokázán ve všech vzorcích odpadní vody, a to na přítoku v koncentracích od



5,19 do 141 ng·ml<sup>-1</sup> a na odtoku v rozmezí koncentrací 0,145-5,19 ng·ml<sup>-1</sup>. Průměrná účinnost odstranění syntetických musk sloučenin byla u galaxolidu 99 % a u tonalidu 98 % [52].

Další studie zabývající se stanovením čtyř lineárních musk sloučenin (dihydromyrcenol, cyclohexylethylacetate, arofir, jasmocyclen) a dvou polycyklických musk sloučenin (galaxolid a tonalid) byla provedena rovněž na čistírně odpadních vod Brno-Modřice. Izolace sledovaných analytů z matrice byla provedena prostřednictvím mikroextrakce tuhou fází (SPME), jejich identifikace a kvantifikace pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Všechny sledované analyty byly identifikovány ve všech odebraných vzorcích odpadní vody, a to jak na přítoku, tak také na odtoku z ČOV. Dihydromyrcenol byl detekován v odpadní vodě v nejvyšších koncentracích, přičemž jeho průměrná koncentrace byla 174,6 μg·l<sup>-1</sup> na přítoku a 0,078 μg·l<sup>-1</sup> na odtoku. Druhou nejčastěji kvantifikovanou sloučeninou byl galaxolid, jehož průměrná koncentrace na přítoku do ČOV byla 2,367 μg·l<sup>-1</sup> a na odtoku 0,822 μg·ml<sup>-1</sup>. Ostatní sledované sloučeniny byly kvantifikovány v odpadní vodě v mnohem nižších koncentracích, než předchozí dvě již specifikované musk sloučeniny. Účinnost čistícího procesu se pro všechny sledované analyty pohybovala v rozmezí 58,26-99,94 % [53].

### **Musk sloučeniny a jejich obsah ve tkáních a tělních tekutinách člověka**

Musk sloučeniny jsou látky lipofilního charakteru, a proto velmi ochotně pronikají přes buněčnou membránu (kůži) a akumulují se v tukové tkáni. Kromě lipofility mají i další schopnosti vhodné pro jejich akumulaci, tzn. schopnost bioakumulace, biokoncentrace a v neposlední řadě také bioobohacování. Tyto schopnosti přispívají ke kumulaci syntetických musk sloučenin ve tkáních všech živočichů. Vodní živočichové představují nejvíce ohroženou skupinu, protože představují potravu pro vyšší organismy. Potravním řetězcem jsou musk sloučeniny následně transportovány do těl vyšších organismů, kde může docházet k jejich metabolickým přeměnám a také k tvorbě jejich toxických metabolitů, které mohou rovněž přecházet do tkání člověka.

Za hlavní zdroj kontaminace člověka však není považována potrava, nýbrž expozice kůži a nosní sliznicí. Používáním parfémovaných přípravků, ať již přímým stykem (krémy, mýdla) nebo nepřímo vdechováním (parfémy, osvěžovače vzduchu), dochází k transportu musk sloučenin přes buněčné membrány do organismu. Studium kontaminace člověka musk sloučeninami se ve světě zabývalo několik výzkumných skupin; na základě jejich studií lze konstatovat, že přítomnost musk sloučenin byla již prokázána u člověka, a to v tukové tkáni, krevním séru a mateřském mléce [11; 16; 54; 55].

Syntetické musk sloučeniny mají schopnost se kumulovat v lidském těle, zejména u starších lidí. Tato problematika byla řešena v rámci speciální studie zaměřené na stanovení koncentrací jedenácti syntetických musk sloučenin v krvi žen. Porovnávány byly naměřené hodnoty u žen starších 50 let a u mladých žen. Krev byla odebrána 53 ženám ve věku vyšším než 50 let (od 51 do 71 let, průměrný věk byl 60 let). Galaxolid byl detekován ve vzorcích plasmy ve větším množství, a to v maximální koncentraci 6900 ng·l<sup>-1</sup> (89 % žen). Musk tibeten, celestolid a traseolid se vyskytovaly pod limitem detekce. Z nitromusk sloučenin byl ve větším množství prokázán i musk xylen, a to v maximální koncentraci 190 ng·l<sup>-1</sup> (62 % žen) a musk keton v maximální koncentraci 280 ng·l<sup>-1</sup> (43 % žen). Ve dvou případech byl rovněž identifikován musk ambrette. Byla nalezena spojitost mezi koncentrací galaxolidu a mírou používání parfémů, deodorantů a šampónů. Používání mýdel a aviváží souviselo s výskytem vyšších koncentrací musk xyleny v krevní plasmě. Dále bylo pomocí této studie prokázáno, že stravovací návyky, typ pleti, body mass index (BMI) a povrch těla neměly vliv na koncentraci musk sloučenin v krevní plasmě. Rovněž bylo zjištěno, že vzorky krevní plasmy obsahovaly vyšší koncentrace musk sloučenin. Předpokládá se, že to může být způsobeno tím, že starší lidé používají ve větší míře krémy na obličej a ruce, protože jejich pokožka je suchá. Kromě toho je známo, že fyziologické změny kůže způsobují vyšší absorpci

musk sloučenin přes kůži. Pouze u tří žen nebyly identifikovány žádné musk sloučeniny [56]. Studie zabývající se výskytem tonalidu a galaxolidu v lidském těle byla dále provedena také ve Spojených státech amerických (New York). V rámci této studie byla posuzována přítomnost tonalidu a galaxolidu v lidském podkožním tuku. Koncentrace galaxolidu a tonalidu v lidské tukové tkáni byla následující: pro galaxolid bylo rozmezí koncentrací mezi 12 až 798 ng·g<sup>-1</sup> tuku a pro tonalid od hodnot < 5 až 134 ng·g<sup>-1</sup> tuku. Také v tomto případě byla prokázána korelace mezi obsahem galaxolidu a tonalidu v lidské tukové tkáni. Kromě toho bylo konstatováno, že koncentrace syntetických musk sloučenin se s věkem nezvyšuje. Nejvyšší koncentrace galaxolidu v tukové tkáni byly stanoveny u osob ve věkové kategorii 25-35 let. Závislost pohlaví údajně nehrála téměř žádnou roli, přesto však byly nepatrně vyšší koncentrace zjištěny u žen [57]. Další studie, která byla zaměřena na člověka, se zabývala stanovením koncentrace pěti nitromusk sloučenin a šesti polycyklických musk sloučenin ve vzorcích krve odebraných od mladých a zdravých dobrovolníků z řad studentů a pracovníků Lékařské fakulty ve Vídni (55 žen a 45 mužů, věk 19-43 let). Součástí studie bylo také vyplnění dotazníku, který obsahoval otázky týkající se užívání kosmetických přípravků, stravování a dalších návyků. Výsledky ukázaly, že více jako polovina osob používala nejméně jednou denně parfém a krém a 70 % dárců použilo kromě toho nejméně jednou denně deodorant. Polovina studentů konzumovala alespoň jednou týdně ryby, což může představovat další zdroj kontaminace syntetickými musk sloučeninami. Největší výskyt syntetických musk sloučenin v krvi byl prokázán u galaxolidu, a to v průměrné koncentraci 420 ng·l<sup>-1</sup> (91 %) a musk xylen v průměrné koncentraci 11 ng·l<sup>-1</sup> (7 %). Musk keton a tonalid byly přítomny pouze v 17 % testovaných vzorků. Musk ambrette byl identifikován ve dvou případech [58]. Studie zabývající se výskytem syntetických musk sloučenin (musk ambrette, musk keton a musk xylen) v 391 vzorcích mateřského mléka (48 vzorků v roce 1991, 343 vzorků v roce 1992) byla provedena v jižním Bavorsku (Německo). Musk ambrette a musk keton byly kvantifikovány v množství pohybujícím se od <0,01 do 0,29 mg·kg<sup>-1</sup> tuku (musk ambrette) a v rozmezí <0,01-0,24 mg·kg<sup>-1</sup> tuku pro musk keton. Koncentrace musk xyleny byla 2-3krát vyšší, tj. od 0,01 do 1,22 mg·kg<sup>-1</sup> tuku [59]. Jiná analýza mateřského mléka (110 vzorků) byla provedena v roce 2009 v čínském městě Chengdu (Sichuan Province). Byla zaměřena na zjišťování koncentrace 13 musk sloučenin, přičemž 4 cílové analyty byly kvantifikovány s průměrnou koncentrací 16,5 ng·g<sup>-1</sup> tuku (tonalid), 11,5 ng·g<sup>-1</sup> tuku (galaxolid), 7,85 ng·g<sup>-1</sup> tuku (HHCb-lactone) a <1,4 ng·g<sup>-1</sup> tuku (musk keton). Matky, které velmi často používaly krém na ruce, sprchové gely, šampón a přípravky na vlasy, měly výrazně vyšší obsah galaxolidu v mateřském mléce. Nižší věk matek ovlivňoval koncentraci tonalidu a galaxolidu v mateřském mléce, zatímco BMI, počet dětí a místo bydliště neměly na obsah těchto látek v mateřském mléce vliv [60]. V publikované dánské studii se autoři zaměřili na stanovení nitro- a polycyklických musk sloučenin v mateřském mléce odebraném od deseti prvorodiček v roce 1999; jako finální metoda byla aplikována GC/MS. V rámci této studie byly galaxolid a tonalid identifikovány ve všech analyzovaných vzorcích mateřského mléka, přičemž průměrná koncentrace vypočtená pro galaxolid byla 147 μg·kg<sup>-1</sup>, vztaženo na tuk a pro tonalid 17,5 μg·kg<sup>-1</sup>, vztaženo na tuk. Průměrné koncentrace nitromusk sloučenin byly nižší pro musk xylen 9,4 μg·kg<sup>-1</sup>, vztaženo na tuk, pro musk keton 14,9 μg·kg<sup>-1</sup>, vztaženo na tuk a pro musk moskene <1,3 μg·kg<sup>-1</sup>, vztaženo na tuk [61]. Studie zabývající se stanovením osmi běžně používaných syntetických musk sloučenin ve 126 vzorcích mateřského séra, pupečnickové krvi a mateřského mléka byla publikována v Šanghaji. Nejčastěji detekovanými zástupci byl galaxolid a musk xylen. Celková průměrná koncentrace těchto specifikovaných musk sloučenin byla v pupečnickové krvi 87,3 ng·g<sup>-1</sup>, v mateřském mléku 35,2 ng·g<sup>-1</sup> a v mateřském séru 71,2 ng·g<sup>-1</sup>, vše vztaženo na tuk [62].

### **Stanovení syntetických musk sloučenin v produktech osobní péče**

Z hlediska hodnocení a potenciálních zdrojů kontaminace pro člověka a životní prostředí je důležitá znalost koncentrací konkrétních musk sloučenin v produktech osobní péče. Koncentrace a zastoupení musk sloučenin v produktech osobní péče stejného typu bývají často velmi odlišné. Drtivá většina vonných látek v produktech osobní péče bývá syntetického původu, protože přírodní vonné látky jsou velmi drahé. Galaxolid ze skupiny polycyklických musk sloučenin se nejčastěji používá jako vonná složka v parfémeh, tělovém mléce, krémech a detergentech. Zastoupení galaxolidu v těchto produktech se pohybuje v rozmezí 0,09-2,4 %, a proto lze předpokládat, že za dermální expozici galaxolidem odpovídají převážně tyto produkty osobní péče. Musk xylen se nejčastěji používá v detergentech a mýdlech, jeho koncentrace v těchto produktech se pohybuje v rozmezí 0,02 až 1 %. V současné době je používání řady nitromusk sloučenin (musk ambrette, musk tibeten, musk mosken) v kosmetice zakázáno, případně postupně omezováno (musk xylen a musk keton). Evropská unie stanovila možnou koncentraci musk xylenu a musk ketonu v produktech osobní péče na 0,03-1 %, respektive 0,042-1,4 %, a to v závislosti na typu produktu. Koncentrace polycyklických musk sloučenin v kosmetických produktech byla v důsledku toho snížena na maximální koncentraci, která byla u tonalidu omezena na 0,2 % u prostředků, které se oplachují a 0,1 % u prostředků, které se neoplachují. U vodně-alkoholických výrobků je povoleno 0,1 % tonalidu, u parfému může být koncentrace tonalidu až 2,5 %, u vonných krémů do 0,5 % [18; 27].

Jak již bylo několikrát prezentováno, produkty osobní péče jsou hlavním zdrojem kontaminace syntetickými musk sloučeninami. To byl také důvod, proč bylo provedeno několik studií zaměřených na stanovení těchto sloučenin v produktech osobní péče, parfémeh a prostředcích pro úklid domácností. Syntetické musk sloučeniny (galaxolid, tonalid, musk xylen a musk keton) byly zjišťovány v rámci jedné studie v Číně, v rámci které bylo analyzováno 158 produktů osobní péče, zejména zubní pasty, výrobky pro péči o vlasy, toaletní mýdla, hydratační krémy a make-up. Analyty ze vzorků byly izolovány ultrazvukovou extrakcí (sonikací) a následně přečištěny pomocí SPE kolonek. Finální analytickou metodou byla plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Vyhodnocení výsledků této experimentální studie prokázalo, že více než 80 % analyzovaných vzorků obsahovalo alespoň jednu ze syntetických musk sloučenin. Celková koncentrace syntetických musk sloučenin byla vyšší než  $1,02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . Nejvíce se vyskytující musk sloučeninou byl ve všech vzorcích galaxolid [63]. Podobný postup byl použit rovněž ve studii prováděné v USA, v rámci které byly zjišťovány galaxolid a tonalid v produktech osobní péče. Koncentrace posuzovaných analytů byly následující: galaxolid byl v rozmezí  $<5-4000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , tonalid v rozmezí  $<5-451 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Největší procento syntetických musk sloučenin bylo přítomno v parfémeh, tělových krémech a deodorantech [64]. V jiné studii, pocházející také z Číny (Šanghaj), bylo analyzováno celkem 31 vzorků produktů osobní péče. Byly získány tyto údaje: galaxolid byl přítomen v 61 %, tonalid v 36 %, musk keton v 16 % a musk xylen v 6 % analyzovaných vzorků. Nejvyšší koncentrace galaxolidu ( $8,04 \cdot 10^5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) byly kvantifikovány v parfému, zatímco nejvyšší koncentrace tonalidu ( $4,69 \cdot 10^4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) naopak v šampónu. Průměrné koncentrace v dalších výrobcích, tj. ve sprchových gelech, šampónech a prostředcích na praní byly na podobných koncentračních hladinách, tj. galaxolid  $5,9 \cdot 10^4$ ;  $5,2 \cdot 10^4$  a  $2,4 \cdot 10^4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  a tonalid  $2,5 \cdot 10^3$ ;  $1,2 \cdot 10^4$  a  $8,8 \cdot 10^3 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$  [65]. V další poměrně rozsáhlé studii (celkem 82 vzorků) byl zjišťován galaxolid, tonalid, musk xylen a musk keton v produktech osobní péče, které byly rozděleny do následujících kategorií: tělová mléka, parfémy, deodoranty, produkty určené k péči o vlasy, sprchové gely a čisticí prostředky pro domácnost. Tonalid byl v těchto kosmetických výrobcích obsažen v 70 %, galaxolid v 55 %, musk xylen v 10 % a musk keton v 9 % analyzovaných vzorků, přičemž maximální zjištěná koncentrace byla u galaxolidu  $22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , tonalidu  $8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , musk xylenu  $26 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  a musk ketonu  $0,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  [55].

### 2.2.2.2 Postupy pro stanovení makrocyklických musk sloučenin

Makrocyklické musk sloučeniny nejsou tak často aplikovány jako nitromusk a polycyklické musk sloučeniny, avšak jejich výroba se stále více rozšiřuje, a to vzhledem k jejich charakteristické vůni. Je známo, že jejich vůně je mnohem intenzivnější a množství použité vonné látky, potřebné k získání stejné intenzity vůně, je v porovnání s nitromusk a polycyklickými musk sloučeninami mnohem nižší. Mezi další výhody makrocyklických musk sloučenin patří jejich snadnější odbouratelnost ze životního prostředí. Pro jejich izolaci z matrice a pro finální analýzu jsou také preferovány separační metody.

Pro stanovení makrocyklických musk sloučenin ve složkách životního prostředí, a to zejména v odpadní vodě a kalu z ČOV, bylo zapotřebí najít účinnou analytickou metodu, která dokáže tyto látky spolehlivě identifikovat a kvantifikovat. Rovněž bylo rozhodující zjistit, zda technologie používaná v ČOV je schopná přispět, a to ještě před vypuštěním do recipientu, k odstranění makrocyklických musk sloučenin z odpadní vody. Zkušenosti z analýzy ostatních musk sloučenin prokázaly, že vhodnou extrakční technikou pro izolaci těchto látek ze vzorků odpadní vody je mikroextrakce tuhou fází (SPME), která nevyžaduje předchozí extrakci nebo předčištění. Pro izolaci makrocyklických musk sloučenin z kalu z ČOV je vhodná extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku (PSE). Doporučovanou analytickou metodou pro stanovení makrocyklických musk sloučenin je plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Sice již bylo publikováno mnoho studií zpracovaných na téma optimalizace syntézy makrocyklických sloučenin, případně na objasnění problému enantioselektivity, která je prioritní pro intenzitu vůně makrocyklických musk sloučenin, avšak pouze málo studií bylo zaměřeno na zjišťování jejich přítomnosti ve složkách životního prostředí.

Byla zpracována studie zabývající se stanovením osmi makrocyklických musk sloučenin (civeton, musk MC4, exaltolid, exalton, habanolid, ambretolid, musk NN a muscon) v odpadní vodě; v rámci tohoto experimentu byla použita plně automatizovaná metoda, která dokáže spolehlivě stanovit tyto sloučeniny. Metoda byla založena na SPME mikroextrakci a na identifikaci a kvantifikaci metodou plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Analyzované vzorky odpadní vody byly odebírány po dobu 3 měsíců na přítoku a na odtoku dvou čistíren odpadních vod (ČOV A, ČOV B) v oblasti Tarragony (Španělsko). Čistírny odpadních vod zpracovávaly městskou odpadní vodu a také odpadní vodu z průmyslových výpustí; jejich technologie byla založena na principu čištění aktivovaným biologickým kalem. Vzorky odpadní vody byly odebírány do skleněných lahví, v laboratoři přefiltrovány přes skleněný a nylonový filtr a potom až do doby zahájení analýzy skladovány v chladničce při teplotě 4 °C. Kvantifikace a identifikace byla provedena metodou GC-MS, na plynovém chromatografu Varian 3800 s hmotnostním detektorem (spektrometr Varian 4000, detektor iontová past). Izolace analytů byla provedena metodou SPME, přičemž bylo testováno celkem pět SPME vláken (PDMS 7 µm, PDMS 30 µm, PDMS 100 µm, PDMS/DVB 65 µm a PA 85 µm). Pro extrakci bylo jako nejvhodnější vybráno vlákno PDMS/DVB 65 µm (headspace). Postup HS-SPME byl následující: bylo analyzováno 10 ml vzorku odpadní vody s přidávkou standardů osmi makrocyklických musk sloučenin umístěných v 20 ml HS vialce. Vialka se vzorkem byla zahřívána při teplotě 100 °C po dobu 45 minut (otáčky 750 rpm). Získané výsledky prokázaly, že nejčastěji se vyskytující musk sloučeninou z této skupiny musk sloučenin byl ambretolid, jehož průměrná koncentrace byla v rozmezí < LOQ-4,36 µg·l<sup>-1</sup>. Další analyty, tj. exalton, MC4 a musk NN, byly přítomny ve všech vzorcích na přítoku ČOV A v koncentracích v rozmezí 0,01-2 µg·l<sup>-1</sup>. Na přítoku ČOV B byly identifikovány všechny specifikované musk sloučeniny, avšak nejvíce byl zastoupen ambretolid v rozmezí koncentrací 0,39-12,29 µg·l<sup>-1</sup>. Množství makrocyklických musk sloučenin zjištěné na odtoku z ČOV byla nižší než na přítoku. Nejvíce zastoupeným analytem na odtoku byl ambretolid a exalton, v koncentračním rozmezí < LOQ-2,46 µg·l<sup>-1</sup> [66].

Tabulka č. 5: Koncentrace makrocyclických musk sloučenin v odpadní vodě na přítoku a odtoku ČOV A a B[66]

Sloučenina	ČOV A (ng·g <sup>-1</sup> )		ČOV B (ng·g <sup>-1</sup> )	
	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok
Exalton	0,39-2,00	0,25-1,68	0,39-2,89	<LOQ-2,26
Exaltolid	ND-0,40	ND-0,16	ND-1,49	ND-0,48
Muscon	ND-0,57	ND-0,37	ND-2,46	ND-0,43
Habanolid	ND-0,50	ND-0,16	0,07-1,57	ND-0,53
Ambrettolid	<LOQ-4,36	<LOQ-1,43	<LOQ-12,29	<LOQ-2,46
Musk MC4	0,04-0,82	ND-0,17	0,02-0,61	0,01-0,17
Civeton	ND-2,20	ND-1,79	0,01-1,31	<LOQ-0,05
Musk NN	0,01-0,33	ND-0,14	<LOQ-0,73	<LOQ-0,17

Pozn.: ND - nedetekováno; <LOQ - pod mezí stanovitelnosti

Na základě této optimalizované metody byly zjišťovány makrocyclické musk sloučeniny (civeton, musk MC4, exaltolid, exalton, habanolid, ambrettolid, musk NN, muscon) ve vzorcích kalů. Vzorky kalu z ČOV byly odebírány ze tří městských čistíren odpadních vod situovaných v Tarragoně (ČOV A), Reusu (ČOV B) a Gironě (ČOV C). Vzorky odpadního kalu se skládaly z primární a sekundární odpadní vody, která byla anaerobně přečištěna a odvodněná prostřednictvím tlakových filtrů. Ambrettolid, exalton a musk NN byly přítomny ve všech analyzovaných vzorcích kalů. Výskyt sledovaných analytů se však lišil podle typu kalu. V ČOV A byl nejvíce zastoupen muscon a ambrettolid, přičemž muscon byl detekován v největším množství, a to v koncentračním rozmezí od <LOQ do 2 ng·g<sup>-1</sup>. V případě ČOV B byla většina makrocyclických musk sloučenin detekována pod LOQ, pouze ambrettolid, MC4 a Musk NN byly kvantifikovány ve vyšších koncentracích. V této ČOV byl nejvíce zastoupen musk NN, jehož koncentrace se pohybovala v rozmezí od <LOQ do 1,45 ng·g<sup>-1</sup>. V kalu z ČOV C byly všechny sloučeniny zjištěny v koncentračním rozmezí <LOQ až 0,89 ng·g<sup>-1</sup>, přičemž ambrettolid, habanolid a musk NN byly nejvíce zastoupenými makrocyclickými musk sloučeninami, s maximální koncentrací 0,85 ng·g<sup>-1</sup>; 0,50 ng·g<sup>-1</sup> a 0,89 ng·g<sup>-1</sup>. Výsledky této prezentované studie zejména prokázaly, že ambrettolid je jeden z nejvíce rozšířených makrocyclických musk sloučenin vyskytujících se ve složkách životního prostředí [67].

Tabulka č. 6: Koncentrace makrocyclických musk sloučenin v kalu ČOV A, B, C [67]

Sloučenina	ČOV A (ng·g <sup>-1</sup> )	ČOV B (ng·g <sup>-1</sup> )	ČOV C (ng·g <sup>-1</sup> )
Exalton	<LOQ-0,08	<LOQ	<LOQ
Exaltolid	ND-0,13	<LOQ	<LOQ
Muscon	<LOQ-2,0	ND-<LOQ	<LOQ
Habanolid	ND-0,15	ND-<LOQ	<LOQ-0,50
Ambrettolid	<LOQ-0,24	<LOQ-0,09	0,09-0,85
Musk MC4	nd-0,13	<LOQ-0,19	<LOQ-0,19
Civeton	ND-<LOQ	<LOQ	<LOQ-0,13
Musk NN	<LOQ-0,13	<LOQ-1,45	<LOQ-0,89

Pozn.: ND - nedetekováno; <LOQ - pod mezí stanovitelnosti

V další experimentální studii zaměřené na stanovení makrocyclických musk sloučenin (musk MC4, muscon, musk NN, habanolid, exaltolid, ambretolid, civeton a exalton) ve vzorcích odpadních vod z ČOV, byla pro extrakci zvolena MEPS technika. Stejně jako v ostatních ČOV, byly koncentrace musk sloučenin i zde vyšší na přítoku než na odtoku. Nejčastěji přítomnou musk sloučeninou, obsaženou ve všech vzorcích odebraných na přítoku, byl ambretolid v koncentracích  $2,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (ČOV A) a  $9,3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (ČOV B). Stejně jako ambretolid byl přítomen i exalton a civeton; jejich koncentrační rozmezí bylo  $1,5\text{-}2,9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (exalton) a  $0,1\text{-}2,2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (civeton). Až na exaltolid a muscon byly všechny makrocyclické musk sloučeniny detekovány ve vzorcích odebraných na přítoku odpadních vod, s průměrnou koncentrací vyšší než je limit kvantifikace. Nejčastěji se vyskytující makrocyclickou musk sloučeninou ve vzorcích odpadních vod na odtoku byl exalton (koncentrace v rozmezí  $0,4\text{-}2,3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), další byl ambretolid ( $<\text{LOQ}\text{-}2,5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Ostatní analyty z této skupiny byly na odtoku detekovány v menším množství než na přítoku; některé z nich (exaltolid, muscon, habanolid a musk NN) byly přítomny v koncentracích pod LOQ, případně nebyly identifikovány vůbec [68].

Další použitou technikou extrakce vhodnou pro stanovení musk sloučenin bylo on-line spojení SPE extrakce s GC-MS; pomocí tohoto analytického postupu bylo sledováno 17 zástupců syntetických musk sloučenin, nejčastěji aplikovaných do produktů osobní péče. Jednalo se o šest analytů ze skupiny polycyclických musk sloučenin (cashmeran, celestolid, phantolid, traseolid, galaxolid a tonalid), třináct analytů ze skupiny nitromusk sloučenin (musk xylen, musk keton, musk mosken), sedm analytů ze skupiny makrocyclických musk sloučenin (musk MC 4, exaltolid, exalton, ambrettolid, civeton, musk NN, muscon) a jeden degradační produkt ze skupiny polycyclických musk sloučenin (HHCb-lacton). Pro extrakci byla zvolena metoda SPE, která byla použita v on-line spojení s plynovou chromatografií. On-line spojení minimalizuje možnou ztrátu vzorku, případně jeho kontaminaci během přenosu, podporuje reprodukovatelnost metody, umožňuje snížení množství vzorku a doby extrakce. Ve vzorcích z přítoku odpadních vod byla prokázána přítomnost tří nejvíce zastoupených analytů tj. galaxolidu, tonalidu a ambretolidu. Ostatní musk sloučeniny byly zjištěny v nižších koncentracích, přičemž dva zástupci makrocyclických musk sloučenin (musk MC4 a civeton) nebyly detekovány vůbec. Rovněž byla provedena analýza odpadních vod na odtoku z ČOV, pomocí které bylo prokázáno, že koncentrace všech sloučenin, v porovnání s výsledky získanými při měření na přítoku, se snížila. Snížení koncentrací bylo více signifikantní v případě polycyclických a nitromusk sloučenin, než u makrocyclických musk sloučenin [69].

Makrocyclické musk sloučeniny se používají především jako vonné složky parfému. Stanovením makrocyclických musk sloučenin (ethylenbrasylat, exaltolid, ambretolid, civeton) ve vzorcích parfému se ve své studii zabýval Ruud J.B. Peters. Mezi posuzovanými vzorky byly parfémy známých světových značek (Adidas, Armani, Blvgari, Hugo Boss, Calvin Klein, Coty, Chanel, Yves Saint Laurent, Dior, Gucci, atd.). Makrocyclické musk sloučeniny byly identifikovány v 21 vzorcích z 29 testovaných vzorků odpadních vod. Nejčastěji se vyskytující analytem byl ethylenbrasylat, který byl přítomen v 15 vzorcích z 29 analyzovaných. Skutečnost, že makrocyclické musk sloučeniny byly identifikovány v 21 vzorcích a byly základní složkou v 11 vyšetřovaných vzorcích dokumentuje, že makrocyclické musk sloučeniny postupně nahrazují nitromusk a polycyclické musk sloučeniny [70].

### 2.2.3 Osud musk sloučenin v životním prostředí

Syntetické musk sloučeniny jsou sice vysoce stabilní v životním prostředí, avšak i přesto dochází k jejich částečné degradaci a k metabolickým přeměnám. Proto představují značné riziko, a to

především z důvodu jejich akumulace v ekosystému a také jejich negativního dopadu na organismy. Kromě toho musí být rovněž sledován vliv metabolitů musk sloučenin na životní prostředí.

### **2.2.3.1 Degradace**

Syntetické musk sloučeniny patří do skupiny perzistentních organických polutantů, které jsou schopny setrvávat dlouhou dobu ve složkách životního prostředí. Perzistence představuje odolnost látky vůči rozkladu, ať už se jedná o rozklad chemickou, fotochemickou, termickou nebo biochemickou cestou. Perzistenci lze popsat jako dobu života chemické látky v životním prostředí, která se nejčastěji vyjadřuje pomocí poločas rozpadu. Poločas rozpadu je doba, během které koncentrace sledované látky klesne na polovinu původní hodnoty v dané složce životního prostředí. Perzistence závisí zejména na fyzikálně-chemických vlastnostech dané sloučeniny a také na vlastnostech daného prostředí, ve kterém se tento analyt vyskytuje.

#### **Fotodegradace**

Chemické děje fotodegradace probíhají tam, kam proniknou fotony. Fotodegradace může probíhat jak v ovzduší, tak také ve vodním ekosystému, a to za podmínky působení UV záření. Vliv fotodegradace byl studován u sloučeniny musk ambrette. Degradace působením fotonů byla u tohoto analytu posuzována v roztoku cyklohexanu a skvalenu. Dalším hodnoceným parametrem byl vliv atmosférického kyslíku na tuto fotodegradaci. Bylo prokázáno, že musk ambrette se ochotně rozkládá jak za přítomnosti kyslíku, tak rovněž bez jeho přítomnosti. K rozpadu 97 % musk ambrette došlo během 3 hodin, bez ohledu na to, zda byl přítomen kyslík [20; 71]. V rámci jiné studie byla hodnocena fotodegradace nitromusk sloučenin (musk xylen, musk keton, musk tibeten, musk ambrette a musk mosken) v nasycených vodných roztocích těchto látek. Bylo zjištěno, že nitromusk sloučeniny podléhají vlivem UV záření fotodegradaci a fotolýze. Po 1 hodině klesla koncentrace nitromusk sloučenin na jednu setinu původní koncentrace. Produkty rozpadu byly však detekovatelné i po 5 hodinách, což ukazuje na to, že produkty rozpadu nitromusk sloučenin jsou stabilnější, než samotné mateřské produkty [72].

#### **Metabolizace**

Syntetické musk sloučeniny jsou vysoce rezistentní, a to i přesto, že se při analýzách začaly objevovat látky strukturně velmi podobné původním látkám. Nejrůznější studie potvrdily, že syntetické musk sloučeniny mohou v životním prostředí částečně podléhat metabolizaci prostřednictvím živých organismů. Živé organismy přeměňují syntetické musk sloučeniny na toxické metabolity, které se liší svými vlastnostmi od původních musk sloučenin.

Nejvíce prozkoumanou skupinou látek podléhající metabolizaci jsou nitromusk sloučeniny. Nitromusk sloučeniny podléhají metabolizaci v živých systémech, v životním prostředí a rovněž na ČOV v redukčním (anaerobním) prostředí. K redukci dochází na nitroskupinách, které se mění na aminoderiváty. Důkazem této přeměny je přítomnost mateřské sloučeniny a amino derivátů v odpadní vodě odebrané na odtoku z ČOV; jejich přítomnost byla rovněž zjištěna v povrchových vodách, sedimentech a v kalech z ČOV. Fyzikálně-chemické vlastnosti nově vzniklých metabolitů jsou odlišné od vlastností původních mateřských sloučenin, přičemž toxicita amino derivátů není ještě dostatečně prostudována, avšak lze se domnívat, že jsou toxičtější než mateřské produkty. Mezi nejznámější aminoderiváty patří 4-amino-MX, 2-amino-MX a 2-amino-MK. Nitroskupiny musk xyleny jsou redukovány přes nitroso- a hydroxylamin- meziprodukty na aminoskupiny umístěné v poloze ortho a para. Redukce v poloze para je upřednostňována, protože metabolit v poloze ortho není tak výrazně zastoupen. Metabolity s aminoskupinami v obou polohách se vyskytují naprosto výjimečně. Dalším způsobem metabolizace je vlivem oxidace, v rámci které je oxidována tert-butyl

skupina nebo methylová skupina; u metabolitu 4-amino-MX bylo zjištěno, že je vysoce toxický pro organismus *Daphnia magna*, u kterého je  $EC_{50}$  rovna  $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ostatní aminometabolity jsou méně toxické. Metabolit 4-amino-MX se nejčastěji vyskytuje ve vodní biotě a jeho koncentrace je často několikrát vyšší než koncentrace původní mateřské sloučeniny. Metabolit 2-amino-MX se vyskytuje ve vodním prostředí v menší míře, a to z důvodu sférického efektu tert-butyl skupiny. Mechanismus vzniku amino derivátů je v případě musk ketonu následující: nejdříve dochází k redukci nitroskupiny na aminoskupinu a následně k oxidaci tert-butyl skupiny a methylových skupin. Protože musk keton obsahuje nitroskupinu pouze v poloze ortho, vzniká tak pouze jeden primární metabolit [73; 74; 75]. U polycyklických musk sloučenin byla již popsána metabolická přeměna HHCB, který se degraduje za vzniku několika metabolitů s vyšší polaritou. Degradace HHCB probíhá ve dvou fázích; v první fázi je HHCB přeměněn pomocí hub na polární metabolity, druhá fáze představuje jejich rychlou degradaci běžnými půdními organismy [76].

### **Toxicita**

Toxicita je schopnost látky poškozovat živý organismus a je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech dané látky. Toxicitu dělíme na akutní, kdy je posuzován škodlivý účinek při jednorázové expozici škodlivé látky a na toxicitu chronickou, která je zapříčiněna opakovanou expozicí škodlivou látkou. Měření toxicity se provádí pomocí tzv. smrtelné dávky LD (lethal dose), nejčastěji ve formě  $LD_{50}$ , která představuje smrtelnou dávku pro 50 % testovaných jedinců. Akutní toxicita musk sloučenin je poměrně nízká, hodnoty  $LD_{50}$  se u hlodavců pohybují řádově v jednotkách  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Závažnější riziko představují chronické účinky musk sloučenin, a to při dlouhodobém zatížení organismu nízkými koncentracemi těchto látek. Expozice organismu může probíhat externí, případně interní cestou. Mezi externí způsoby expozice patří vstup látek přes pokožku těla v místě expozice, odkud se dostává přes kožní buňky do krevního oběhu, kde působí na celý organismus.

V rámci toxikologických studií zaměřených na nitromusk sloučeniny bylo zjištěno, že musk xylen vykazuje karcinogenní účinky u myši. Na základě toho byl musk xylen v rámci Evropské unie klasifikován jako karcinogen 3. třídy. Informace o karcinogenitě musk xyleny jsou však nedostatečné pro to, aby byl musk xylen zařazen mezi prokazatelné karcinogeny, avšak existuje závažné podezření, že může mít karcinogenní účinky [77]. Další analyt, musk ambrette, je fotoalergický a může způsobovat hyperpigmentaci; kromě toho je fyto-senzitivní, mutagenní a neurotoxický. Proto byl v některých státech již zakázán, případně bylo jeho použití značně omezeno [20; 78]. Test akutní toxicity musk ambrette byl proveden pomocí *Daphnia magna*; při 48 hodinovém testu toxicity byla stanovena efektivní koncentrace  $EC_{50}$   $0,62 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , přičemž maximální rozpustnost ve vodě byla  $0,79 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ostatní nitromusk sloučeniny nevykazovaly při maximální rozpustnosti ve vodě akutní toxické účinky na *Daphnia magna*. Některé nitromusk sloučeniny nevykazují toxické účinky zejména z důvodu jejich nízké rozpustnosti ve vodě. Lze však předpokládat, že v případě přítomnosti koloidních substancí ve vodě může dojít ke zvýšení rozpustnosti, čímž se podstatně zvýší jejich expoziční koncentrace [79]. Ve studii, ve které byla hodnocena absorpce nitromusk sloučenin in vivo (absorpce kůží) bylo zjištěno, že dermální expozicí se vstřebalo 40 % musk ambrette, 31 % musk ketonu a 19 % musk xyleny. Po 5 dnech od expozice bylo v těle přítomno pouze 1 až 2 % z původního množství analytu naneseného na kůži. Nejvyšší koncentrace sledovaných látek byla prokázána v tuku a játrech, avšak většina absorbovaného množství byla pomocí žluče převedena na vyloučitelné polární konjugované metabolity. Při opakované čtrnáctidenní dermální expozici potkanů musk ketonem a musk xylenem bylo prokázáno, že bioakumulace těchto látek je nízká a k vyloučení dochází mezi 9. a 13. dnem [80]. U musk xyleny a musk ketonu bylo kromě toho zjištěno, že patří mezi silné induktory jaterních enzymů, což bylo prokázáno prostřednictvím testů na potkanech, při kterých došlo ke zvětšení jejich jater. Tyto sloučeniny působí také jako kogenotoxikanty.



Polycyklické musk sloučeniny patří mezi tzv. endokrinní disruptory, což jsou aktivní látky, které narušují fyziologické funkce endogenních hormonů. Dosud u nich nebyl prostřednictvím žádných provedených testů prokázán jejich mutagenní (genotoxický) účinek [81]. Akutní orální toxicita polycyklických musk sloučenin je nízká; v pokusu na potkanech bylo zjištěno, že  $LD_{50}$  se pro tonalid pohybovala v rozmezí  $0,57-1,37 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  [82]. Dále bylo prokázáno, že pravidelné perorální podávání vyšší dávky tonalidu potkanům po dobu 2 týdnů vedlo ke snížení tělesné hmotnosti a ke zvětšení hmotnosti jater u sledovaných jedinců. Požití vyšší dávky tonalidu vedlo k redukci hmotnosti jedince, pigmentaci jater, vlivu na lymfatické uzliny a také k hematotoxicitě. Po 7 dnech podávání tonalidu bylo pozorováno rozšíření jaterních buněk, nekróza buněk a zánět jater. Pravidelné podávání  $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$  po dobu 90 dnů nezpůsobilo potkanům žádné zdravotní komplikace, avšak střední dávka  $600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$ , podávána po dobu 2 týdnů, způsobila snížení tělesné hmotnosti a zvětšení hmotnosti jater [83]. Studie zabývající se dlouhotrvající inhibicí „molekulárního čerpadla“ nitromusk a polycyklických musk sloučenin byla prováděna na buňkách žáber mořských plžů *Mytilus galloprovincialis*. Molekulární čerpadlo zprostředkovává multixenobiotickou rezistenci (MXR). MXR je obranný mechanismus působící proti toxickým látkám, jehož inhibice vede k hromadění toxických látek v buňce. Sloučeniny inhibující MXR se nazývají chemosenzibilizéry. V případě polycyklických musk sloučenin můžeme mezi chemosenzibilizéry zařadit galaxolid, jehož účinek se již projevuje 1 až 2 dny po expozici [84].

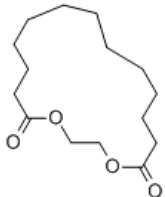
Problematicke toxicity lineárních musk sloučenin bylo věnováno poměrně málo odborných studií. Akutní toxicita isoamylsalicylátu byla testována na potkanech, a to při jejich orální expozici. Bylo zjištěno, že akutní toxicita je relativně nízká a v důsledku toho nevyvolala žádné abnormality;  $LD_{50}$  byla vyšší než  $5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Tato musk sloučenina byla také aplikována na lidskou kůži a rovněž nevyvolala žádnou negativní reakci [85]. Do skupiny lineárních musk sloučenin patří i linalool, což je přírodní monoterpen, který je součástí esenciálních olejů obsažených v mnoha rostlinách. Pomocí testu prováděného na myších bylo zjištěno, že linalool snižuje agresivní chování a zvyšuje sociální interakci myší. Akutní toxicita linaloolu je však nízká,  $LD_{50}$  po orálním podávání potkanům byla  $2,8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Kromě toho bylo zjištěno, že linalool vykazuje hypnotickou aktivitu u myší a také indukuje jaterní enzymy při pravidelném dávkování. Mutagenní účinky a iritace kůže nebyla u linaloolu prokázána [86; 87].

Makrocyclické musk sloučeniny patří mezi bezpečnější polutanty, v porovnání s ostatními skupinami syntetických musk sloučenin, a to především vzhledem k jejich struktuře, která je odvozena od přírodních musk sloučenin. V rámci sledování toxického účinku těchto látek byl posuzován zejména jejich genotoxický potenciál a karcinogenita. Testy genotoxicity zástupců makrocyclických musk sloučenin (ethylen brassylat, cyklopentadekanolid, dodekanedioat) vyloučily genotoxicitu těchto sloučenin [30].

## 2.3 Sledované musk sloučeniny

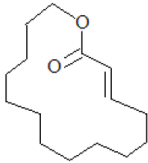
### 2.3.1 Ethylen brasylat

Tabulka č. 7: Fyzikálně-chemické vlastnosti ethylen brasylatu[88; 89]

Systematický název	1,4-dioxacycloheptadecane-5,17-dione
CAS	105-95-3
Empirický vzorec	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )	270,4
Hustota (g·cm <sup>-3</sup> )	0,99
Teplota varu (°C)	464,5
Log K <sub>ow</sub>	4,7

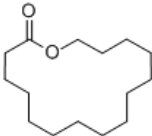
### 2.3.2 Habanolid

Tabulka č. 8: Fyzikálně-chemické vlastnosti habanolidu[90; 91]

Systematický název	Oxacyclohexadecen-2-one
CAS	34902-57-3
Empirický vzorec	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )	238,37
Hustota (g·cm <sup>-3</sup> )	0,959 - 0,969
Teplota varu (°C)	388,4
Log K <sub>ow</sub>	5,53

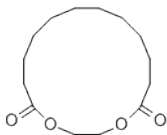
### 2.3.3 Exaltolid

Tabulka č. 9: Fyzikálně-chemické vlastnosti exaltolidu [92; 93]

Systematický název	Oxacyclohexadecan-2-one
CAS	106-02-5
Empirický vzorec	$C_{15}H_{28}O_2$
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost ( $g \cdot mol^{-1}$ )	240,4
Hustota ( $g \cdot cm^{-3}$ )	0,918
Teplota varu ( $^{\circ}C$ )	344,8
Log $K_{ow}$	6,1

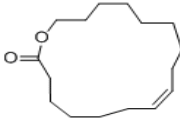
### 2.3.4 Musk MC4

Tabulka č. 10: Fyzikálně-chemické vlastnosti musk MC4 [94]

Systematický název	1,4-dioxacyclohexadecane-5,16-dione
CAS	54982-83-1
Empirický vzorec	$C_{14}H_{24}O_4$
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost ( $g \cdot mol^{-1}$ )	255,33
Hustota ( $g \cdot cm^{-3}$ )	1,055-1,065
Teplota varu ( $^{\circ}C$ )	464,5
Log $K_{ow}$	2,33

### 2.3.5 Ambretolid

Tabulka č. 11: Fyzikálně-chemické vlastnosti ambretolidu

Systematický název	Oxacycloheptadec-10-en-2-one
CAS	123-69-3
Empirický vzorec	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )	259,39
Hustota (g·cm <sup>-3</sup> )	0,956
Teplota varu (°C)	378,7
Log K <sub>ow</sub>	5,52

## 2.4 Stanovení syntetických musk sloučenin

Musk sloučeniny patří do skupiny semivolatilních organických látek nepolárního charakteru, které lze detekovat prakticky ve všech složkách životního prostředí. Jejich koncentrace jsou však velmi nízké, pohybují se ve stopovém až ultrastopovém množství. Právě vzhledem k velmi nízkému obsahu těchto kontaminantů (až oblast ultrastopové analýzy) v přírodních matricích je nutné zvolit optimální techniky pro jejich stanovení a závažnost analytického procesu, prováděného na nízkých koncentračních hladinách, si uvědomovat v průběhu celé analýzy. Z důvodů nízkých koncentrací těchto analytů a jejich těkavosti může docházet ke kontaminaci vzorku. Analytický pracovník pracující se vzorky se musí vyvarovat používání výrobků, které by mohly obsahovat stanovované syntetické musk sloučeniny. Ke kontaminaci dochází často užíváním předmětů denní potřeby obsahujících sledované látky, tj. mýdla, kosmetika, parfémy, prací a čisticí prostředky. Experimentální práce se standardy musí být rychlá, přesná a správná a v laboratoři musí být zabezpečen prostor, ve kterém nemůže dojít ke kontaminaci. Použité laboratorní sklo musí být umyto bez přísadků detergentů; pro jeho čištění se používá především kyselina chromsírová nebo organická rozpouštědla. Sušení laboratorního skla se provádí při vyšších teplotách (250 °C). Následná manipulace se vzorky musí být rovněž rychlá a přesná.

Stanovení musk sloučenin probíhá v následujících krocích:

- Odběr vzorku (sampling)
- Transport a uchování vzorku (transport, storing)
- Příprava vzorku před analýzou (sample preparation)
- Izolace analytu z matrice (isolation)
- Čištění vzorku, separace analytu (clean up)
- Identifikace a kvantifikace (analysis)

### 2.4.1 Odběr vzorku

Odběr vzorků (vzorkování) je jedním z hlavních a zároveň nejdůležitějších kroků analytického postupu. Chyby způsobené při odběru vzorku nelze následně žádnou úpravou vzorku odstranit. Z tohoto důvodu je nutné přikládat odběru vzorku velkou důležitost, protože správně provedený odběr má velmi výrazný vliv na generované výsledky stanovení. Odebraný vzorek by měl být reprezentativní, tzn., že by měl poskytovat informace o celé vzorkované lokalitě. Způsob zvoleného odběru závisí na skupenství matrice a na povaze analytu. V případě musk sloučenin bývají nejčastěji

analyzovány složky vodního prostředí, tj. voda, kal, sediment a vodní biota. Vzorkovaná voda musí být po odběru umístěna do skleněných vzorkovnic z tmavého skla nebo do neprůsvitných plastových lahví s těsným šroubovacím víkem. Nádoby vyrobené z tmavého skla zajišťují ochranu před fotodegradací, vzorkovnice z plastu se využívají méně, a to z důvodu velmi rychlé sorpce nepolárních sloučenin na stěny nádoby. Vzorkovnice seplní až po okraj, aby se minimalizovala přítomnost vzduchu, který by mohl urychlovat rozklad analytů nebo způsobovat rozvoj metabolických přeměn aerobních organismů. Při odběru vzorku z povrchového toku je nutné odebírat vzorek z celého vzorkovaného objemu, protože sledovaný analyt nemusí být rovnoměrně rozdělen. Často se vzorkuje na více místech a potom se smícháním získává průměrný směsný vzorek. Na analýzu většinou postačuje 1-2 l vody. Odebraný vzorek je nutné co nejdříve zpracovat nebo umístit do lednice, a to až do doby zahájení analýzy. Vzorkování pevných matric je prováděno podobným způsobem, přičemž je odebíráno více vzorků z různých míst a ty jsou následně smíchány ve směsný vzorek. Syntetické musk sloučeniny jsou často zjišťovány i v biotických vzorcích. Mezi nejčastěji odebírané biotické matrice patří především ryby a drobní živočichové, tj. mušle a krabi. Samotný odběr biotických vzorků se provádí řízeným odlovem organismu podle předem vytvořeného odběrového plánu, který je v souladu s platnou legislativou, se zákonem na ochranu zvířat a současně je také pod dohledem vodohospodářských orgánů [95; 96; 97].

## **2.4.2 Transport a uchování vzorku**

Odběry vzorků jsou velmi často prováděny ve vzdálených lokalitách od laboratoře, a proto musí být při přepravě vzorku zajištěny takové podmínky, aby nedošlo ke kontaminaci odebraného vzorku z vnějšího prostředí, případně z vozidla dopravujícího vzorky do laboratoří. Při transportu vzorků je důležité zajistit těsnost víčka a zamezit vystavení vzorkovnic teplotě a světlu. Po dopravení vzorků do laboratoře by měla proběhnout okamžitá analýza vzorků. Doba od odběru vzorku do samotné analýzy zásadně ovlivňuje stanovení; často platí, že čím déle vzorek skladujeme, tím větší je pravděpodobnost ztráty analytu. Pokud není možné provést analýzu vzorku ihned, skladujeme je takovým způsobem, abychom co nejvíce minimalizovali ztrátu analytu. Vzorek skladujeme v tmavé vzorkovnici s těsným víkem, ideálně v nádobách, do kterých byl proveden odběr. Teploty vhodné pro skladování se pohybují mezi +4 až -20 °C, přičemž biotické vzorky jsou zmrazeny až na -70 °C. V některých případech lze ke vzorkům přidat konzervanty, které zabraňují mikrobiální degradaci (dichlormethan, trichlormethan) [96; 97].

## **2.4.3 Příprava tuhých vzorků před analýzou**

### **2.4.3.1 Homogenizace**

Při homogenizaci dochází k promíchávání a zmenšování částic vzorku z původní heterogenní směsi (nestejnorodá) na směs homogenní (stejnorodá). Pro preanalytickou přípravu se homogenizace využívá zejména z důvodu zajištění stejných vlastností v celém rozsahu vzorku. Homogenizace vzorku se provádí například drcením, mletím nebo využitím homogenizátoru. Dobře provedená homogenizace je jedním ze základních předpokladů k získání správného materiálu pro následující analytickou část. Příprava vzorků k homogenizaci a podmínky vlastního postupu homogenizace se řídí charakterem vzorků, které jsou předmětem analýzy a vlastními nároky na jednotlivá stanovení. Nejjednodušším způsobem homogenizace kapalných vzorků je třepání, které nesmí být příliš intenzivní, aby nedošlo k napěnění vzorku. Viskózní, rosolovité a sypké vzorky se protřepávají v ředícím roztoku (destilovaná voda nebo pufr), který obsahuje skleněné perly nebo jiné pevné částice,

ktelé materiál rozdrťí. Pevné vzorky se roztírají ručně v třecí misce s tloučkem, případně se drťí v dispergátorech a homogenizátorech typu tyčových a jiných mlýnků [98].

### 2.4.3.2 Sušení

Sušení je rovněž jedním z neodmyslitelných kroků přípravy pevných vzorků. Hlavním důvodem, proč se sušení provádí, je odstranění přebytečné vody na co nejmenší množství. Řada moderních analytických přístrojů je na přítomnost vody velmi citlivá, a proto je důležité zredukovat množství vody přítomné ve vzorku. Další výhodou sušení je lepší separace a homogenizace vzorku. Snížení přebytečné vody omezuje kromě toho biologickou degradaci a hydrolytické reakce. Existuje řada způsobů sušení, přičemž ten nejvhodnější způsob sušení vybíráme na základě fyzikálně-chemických vlastností analytu.

Mezi nejstarší a nejpoužívanější metody sušení patří sušení vzorku volně na vzduchu. Při tomto způsobu sušení nedochází k výraznějším ztrátám a navíc zde hrozí riziko kontaminace z vnějšího prostředí; proto je nutné pracovat v čistém a dobře větraném prostředí. Další vhodnou metodou je sušení pomocí sorpčních materiálů (silikagel, bezvodý  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  a další). Tento způsob sušení se využívá při analýze volatilních a semivolatilních látek a rovněž u látek, kterým hrozí kontaminace z vnějšího prostředí. Výše uvedenými způsoby sušení však nelze odstranit vodu vázanou v molekulách, tzv. krystalickou vodu. Krystalickou vodu lze odstranit až sušením za zvýšené teploty (žiháním). Sušení za zvýšené teploty se provádí volně nad plamenem nebo častěji v pecích a sušárnách. Velkou výhodou pecí a sušáren je jejich regulovatelnost na potřebné teploty, přičemž lze zvolit různé teplotní programy. Jedná se o poměrně rychlý způsob sušení, který se však nedá použít pro látky volatilního a semivolatilního charakteru [97].

### 2.4.4 Izolace analytů z matrice

Izolaci analytů z matrice lze provést prostřednictvím nejrůznějších extrakčních technik. Hlavním cílem izolace je získání analytu s maximální vyčistností a bez nežádoucích příměsí v relativně krátkém čase. Výběr metody závisí především na skupenství matrice, ze které jsou analyty detekovány a na účinnosti izolace, jednoduchosti, rychlosti celého postupu a v neposlední řadě také na finanční stránce proveditelnosti celé analýzy.

Hlavním problémem při stanovení syntetických musk sloučenin ve vzorcích vody představuje především jejich nízké koncentrace, ve kterých se tyto látky ve vodě vyskytují ( $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$  až  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Proto je nezbytné provést před samotnou analýzou izolaci a prekoncentraci těchto sloučenin. Podle typu vody (povrchová, pitná, podzemní, odpadní) je dále nutné brát v úvahu přítomnost (koexistenci) jiných látek přítomných ve vodě, které mohou ovlivňovat analýzu (organické látky, povrchově aktivní látky, anorganické soli apod.). Je známo, že syntetické musk sloučeniny se velmi ochotně adsorbují na suspendované částice ve vodě z důvodu jejich hydrofobicity; pokud by byla provedena filtrace analyzovaných vod, mohlo by takto dojít ke ztrátě analytů. Z tohoto důvodu musí být pro stanovení syntetických musk sloučenin ve vzorcích vody, které obsahují suspendované částice, použity extrakční metody nevyžadující filtraci. Syntetické musk sloučeniny se vyskytují ve vysokých koncentracích v odpadních vodách ( $1\text{--}32\ 060\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ), v kalu z ČOV ( $8\text{--}549\ 680\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a v povrchových vodách ( $0,03\text{--}2544\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ), a to zejména v místech odběru blízko ČOV. Musk sloučeniny byly zjištěny v nižších koncentracích také v podzemní vodě. Pro stanovení syntetických musk sloučenin ve vzorcích vody mohou být aplikovány tyto extrakční metody: extrakce kapalina-kapalina (LLE), disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME), extrakce na magnetickém míchadle (SBSE), mikroextrakce se sorbentem umístěným v mikrostřikačce (MEPS) a neposlední řadě mikroextrakce na pevné fázi (SPME).

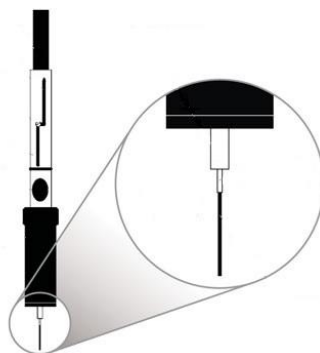
#### 2.4.4.1 Mikroextrakce tuhou fází SPME

V roce 1989 profesor Janusz Pawliszyn a jeho tým spolupracovníků z Univerzity Waterloo v kanadském Ontariu vyvinul novou mikroextrakční techniku pro analýzu environmentálních polutantů obsažených v různých maticích. Jedná se o techniku mikroextrakce tuhou fází (SPME), což je jednoduchá, rychlá a velmi účinná sorpčně-desorpční technika zakoncentrování analytu, aplikovaná bez potřeby rozpouštědla nebo sestavení komplikované aparatury. SPME se hodí jak pro kvalitativní, tak i pro kvantitativní analýzu vzorku a lze ji použít v kombinaci jak s náplňovými, tak také s kapilárními kolonami v plynové chromatografii, ve spojení s GC-MS (split/splitless nebo přímý nástřik na kolonu). Pro kombinaci s kapalinovou chromatografií je nutné použít adaptér SPME-HPLC, s jehož pomocí je analyt eluován rozpouštědlem a následně je dávkován na kolonu kapalinového chromatografu.

Podstatou SPME je křemenné vlákno, které může být pokryto různými typy stacionární fáze, lišícími se od sebe svojí polaritou a sorpčními vlastnostmi. Vlákna mohou být opakovaně používána až na cca 100 analýz, a to v závislosti na typu aplikace a péči o vlákno. Vlákna se při opakovaném použití aktivují zahřátím. Sorpce analytů probíhá na vláknech do dosažení rovnováhy; tím se metoda liší od klasických metod, u kterých je analyt extrahován ze vzorku v co největším množství. Rovnovážný stav je u SPME metody závislý na koncentraci analytu ve vzorku, na druhu a tloušťce polymeru, který tvoří povrch křemenného vlákna. Množství sorbovaného analytu závisí rovněž na velikosti distribuční konstanty. Dobu extrakce určuje analyt s největší distribuční konstantou. Hodnota distribuční konstanty roste se zvyšující se molekulovou hmotností a bodem varu analytu [99; 100; 101; 102].

#### Popis zařízení pro mikroextrakci tuhou fází

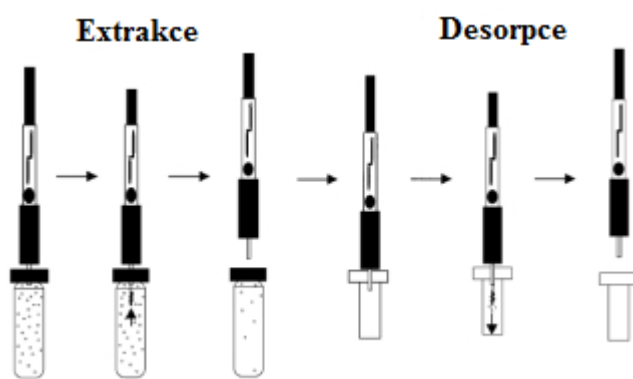
Zařízení SPME se skládá z držáku a jehly, ve které je uloženo křemenné vlákno. Jehlu s požadovaným vláknem lze snadno vyměnit za jinou. SPME vlákno je uloženo v ochranné jehle, na kterou nasedá okování a za ním těsnící víčko s pružinou. Pro rozlišení jednotlivých typů vláken se používají barevné koncovky. V současné době existuje několik druhů držáku v závislosti na způsobu jejich použití. Pro automatické vzorkování a HPLC analýzy se používá automatický držák, který je použitelný spolu s nejrůznějšími druhy autosamplerů; zde dochází k eluci analytu rozpouštědlem pomocí tohoto adaptéru. Pak již následuje finální analýza pomocí HPLC. Dalším typem je držák pro ruční vzorkování, který se využívá u systému GC. Pozice vlákna pro vzorkování a správné umístění do vyhřívaného bloku nástřiku GC je nastavitelná. Vlákno lze jednoduše zajistit v pozici, při které dochází k sorpci a desorpci a potom ho jednoduše zatáhnout zpět do jehly. Posledním typem je přenosný držák SPME, který je vhodný pro vzorkování v terénu. Tento typ SPME držáku slouží k jednorázovému použití, protože vlákno je v ocelové jehle uloženo nastálo a nedá se nahradit novým [103].



Obrázek č. 7: SPME vlákno [104]

## **Postup při sorpci a desorpci analytu**

Křemenné vlákno je potažené sorpční vrstvou a umístěno v duté ocelové jehle, která ho chrání před mechanickým poškozením. Postup při sorpci analytu je následující: v první fázi dochází k propíchnutí septa ocelovou jehlou v zátku zkumavky, potom je pomocí pístu vlákno ponořeno do vzorku (direct immersing SPME, DI-SPME), nebo jen nad hladinu, kde je koncentrace par sledovaných látek největší (head-space SPME, HS-SPME). Analyt je následně sorbován do vrstvy pokrývající vlákno a to až do doby, kdy je dosaženo sorpční rovnováhy. Poté je vlákno opět zasunuto do jehly a spolu s ní je vytaženo ze zkumavky se vzorkem. Doba extrakce (extrakční čas) je různá a závisí na mnoha faktorech (tloušťka sorpční vrstvy, poloha vlákna atd.); většinou trvá 15 až 20 minut. Při desorpci analytu je jehla zavedena do nástřikového prostoru plynového chromatografu, kde je v případě plynové chromatografie analyt tepelně desorbován a posléze unášen kolonou; pokud je použita jako finální metoda kapalinová chromatografie, je pomocí SPME-HPLC adaptéru eluován analyt rozpouštědlem a potom nadávkován na kolonu kapalinového chromatografu [105].



Obrázek č. 8: Princip SPME: extrakce a desorpce [99]

## **Optimalizace podmínek stanovení pro SPME**

### SPME stacionární fáze

Správný výběr vhodné stacionární fáze zakotvené na SPME vlákne hraje klíčovou roli pro izolaci analytů pomocí SPME. Jedno z možných rozdělení SPME vláken je zvoleno podle toho, zda je stacionární fáze na vlákno vázaná nebo nevázaná. Vázané fáze jsou ve většině používaných organických rozpouštědel stabilní, avšak v některých nepolárních rozpouštědlech mohou slabě bobtnat. Nevázané fáze jsou stabilní v organických rozpouštědlech mísitelných s vodou, ve kterých mohou slabě bobtnat; nikdy však nesmí být čištěny nepolárními organickými rozpouštědly. Stacionární fáze můžeme ještě rozdělovat na homogenní čisté polymery, tj. absorbenty a na porézní částice suspendované v polymeru, tzv. adsorbenty. V případě absorpce je analyt zachycen přímo ve vrstvě pokrývající křemenné vlákno, kdežto v případě adsorpce je analyt zachycen na povrchu porézních částic, které jsou suspendovány ve vrstvě na povrchu vlákna. Dalším možným rozdělením stacionárních fází je dělení podle polarit, tj. na polární a nepolární. Vliv polarit se však projevuje až u molekul o molekulové hmotnosti  $M_r > 90$ ; pro extrakci nepolárních látek je mnohem efektivnější použít nepolární fáze, pro extrakci polárních analytů naopak polární fáze. Nejdůležitější vlastností stacionární fáze je její tloušťka, přičemž silnější vrstva dokáže sorbovat větší množství analytů než vrstva tenká. Proto je vhodné použít silnější vrstvu pro více těkavé látky, protože analyt je touto vrstvou sorbován rychleji a ve větším množství. Dobře jsou touto vrstvou extrahovány především složky o vysokém bodu varu, avšak jejich sorpce je zdlouhavá. Tenká vrstva sice nemá tak dobré



extrakční vlastnosti jako silná vrstva, avšak termální desorpce u ní probíhá rychleji. Proto je nutné při výběru vhodné tloušťky vrstvy přihlídnout nejen k množství získaného extraktu a velikosti molekul, ale také k časové náročnosti celého analytického postupu [102; 106; 107].

Jak již bylo uvedeno, na podkladě sorpčního mechanismu můžeme vlákna rozdělit na absorbenty (homogenní čisté polymery) a adsorbenty (porézní částice suspendované v polymeru). Zatímco adsorpce probíhá pomocí porézních částic suspendovaných v polymeru (DVB, CAR<sup>TM</sup> atd.), v případě čistých homogenních polymerů hovoříme o absorpci. Mezi adsorpční vlákna patří například carboxen-polydimethylsiloxan (CAR-PDMS), polydimethylsiloxan-divinylbenzen (PDMS-DVB) a divinylbenzen-carboxen-polydimethylsiloxan (DVB-CAR-PDMS). Pomocí mnoha již provedených experimentů bylo zjištěno, že s rostoucí porozitou částic roste i celková kapacita vlákna, schopnost vrstvy zadržovat analyty a celková selektivita vlákna. Pokud je koncentrace analytu ve vzorku mnohem větší než u rovnovážného stavu, případně pokud je afinita k sorpční vrstvě velmi malá, potom lze pozorovat lineární závislost mezi počáteční koncentrací a extrahovaným množstvím. V devadesátých letech minulého století byla vyvinuta křemenné vlákna potažená několikanásobnou vrstvou CAR<sup>TM</sup> částic v PDMS, což zajišťovalo větší kapacitu a celkovou účinnost SPME. Tato vlákna jsou vhodná především pro extrakci molekul s uhlíkovým řetězcem v rozsahu C2-C12, kdežto pro molekuly větší jak C12 se uvedené vlákno nedoporučuje, protože tyto molekuly jsou velmi silně zachyceny a jejich desorpce je náročná [99; 108].

#### Způsob vzorkování

Existují dva typy vzorkování, a to přímé ponoření vlákna do extraktu (Direct Immersion SPME, tzv. DI-SPME) a extrakce z prostoru nad vzorkem prováděná v uzavřené nádobě (Head Space SPME, tzv. HS-SPME). DI-SPME se nejčastěji používá pro extrakci analytů z matric v kapalném skupenství, případně pro vybrané tuhé látky, zatímco HS-SPME se aplikuje pro extrakci těkavých analytů, analytů o nízkém bodu varu a rovněž pro vzorkování analytů z ovzduší. Je známo, že ustálení rovnováhy mezi vláknem a analytem v plynném stavu probíhá rychleji než u DI-SPME, protože analyty se rychleji pohybují v plynu než v ostatních skupenstvích. Jsou-li v matrici přítomny také makromolekulární látky a mechanické nečistoty, které by mohly ovlivnit průběh extrakce, je nutné SPME vlákno chránit membránou, nebo těsně před extrakcí upravit matrici filtrováním nebo odstředěním [99; 108].

#### Míchání vzorku

Míchání vzorků patří mezi významné faktory ovlivňující SPME, tj. zkracuje a zlepšuje extrakci molekul s vyšší molekulovou hmotností a s vysokým difuzním koeficientem. Při HS-SPME vzorkování těkavých látek nemá míchání skoro žádný vliv na průběh extrakce, naopak při aplikaci HS-SPME vzorkování pro izolaci méně těkavých analytů urychluje míchání transport a rovněž má za následek rychlejší dosažení rovnováhy mezi vláknem a okolním prostředím. U DI-SPME vzorkování míchání rovněž urychluje dosažení rovnováhy. Občasné míchání se převážně neprovádí, protože zhoršuje přesnost stanovení. Naopak míchání pomocí ultrazvuku sice zvyšuje sorpci analytu na vlákno, avšak může způsobovat nechtěné zahřívání vzorku a možné odpařování vzorku do prostoru headspace [106; 108].

#### Přídavek soli a změna pH

Z literatury je rovněž známo, že přídavkem 20 až 30 % roztoku chloridu sodného (NaCl) nebo úpravou pH vzorku lze zvýšit iontovou sílu roztoku a tím ovlivnit požadovanou rozpustnost analytů. Rovněž lze pomocí přídavku soli zvýšit u nízko polárních těkavých látek výtěžek extrakce; provysoce polární látky se přídavek soli nepoužívá z důvodu možného vzniku interferujících píků.

Úprava pH může také vést k vyššímu výtěžku extrakce, protože kyselé složky lze snadněji extrahovat v kyselém prostředí a bazické naopak v bazickém prostředí [106; 108].

#### Doba extrakce

Doba extrakce patří rovněž mezi kritické parametry u SPME. Maximální účinnost SPME je dosažena v rovnovážném stavu, avšak z literatury je již známo, že pro optimální izolaci analytu není dosažení úplné rovnováhy nezbytně nutné. Extrakce obvykle trvá 15 až 20 minut, může však být i kratší. Doba extrakce je u HS-SPME extrakce kratší než u DI-SPME. Tato doba závisí na velikosti molekuly dané sloučeniny, typu SPME fáze, způsobu extrakce stanovovaného analytu ze vzorku a na koncentraci analytu ve vzorku. Doba extrakce lze zkrátit analyzováním sloučenin s malou molekulovou hmotností ( $<150 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), nepoužitím tenké sorpční vrstvy pokrývající SPME vlákno, lepším využitím techniky HS-SPME, případně izolace analytů z matric, kde jsou obsaženy ve vysokých koncentracích [106; 108].

#### Teplota aplikovaná při mikroextrakci

Teplota vzorku je důležitým parametrem nezbytným pro správnou kvantifikaci vzorku. Proto je nutné použít pro všechny extrakce vždy konstantní teplotu. Během headspace extrakce se využívá teplota, která je optimální k uvolnění analytů ze vzorku a ke zlepšení selektivity a zkrácení celkové doby potřebné pro extrakci. Je-li použita příliš vysoká teplota, potom může docházet k uvolnění analytů z SPME fáze, čímž dojde ke snížení celkové citlivosti, což platí zejména pro adsorpční typ vlákna (PDMS) a pro kapalnou fázi. Tyto typy vláken většinou nevyžadují zvýšení teploty a celá analýza probíhá za laboratorních podmínek. Při izolaci těkavých a vysoce těkavých analytů z matrice může již malé zvýšení teploty významně zkrátit čas potřebný pro extrakci vzorku [106; 108].

### **2.4.5 Čištění vzorku, předseparace a zakoncentrování analytů**

Účelem čištění extraktu izolovaného ze vzorku je odstranění nežádoucích příměsí, protože izolovaný extrakt může kromě samotného sledovaného analytu obsahovat i další koextrahované složky, které by mohly způsobovat zkreslení výsledků, případně zcela znemožnit vlastní analýzu. Čištění extraktu se může provádět buď pomocí klasické extrakce působením chemických činidel, nebo aplikací separačních metod. Klasická extrakce spočívá ve vytřepávání extraktu s roztoky minerálních kyselin nebo hydroxidů (tzv. kyselá nebo bazická hydrolyza), čímž dojde k odstranění bazických a kyselých podílů. Druhým způsobem je aplikace separačních metod, které jsou používány k oddělení nežádoucích příměsí na základě interakce molekul analytu s náplní kolony. Mezi tyto separační metody patří extrakce tuhou fází (SPE), gelová permeační chromatografie (GPC) a adsorpční sloupcová (kolonovou) chromatografie [109].

### **2.4.6 Identifikace a kvantifikace**

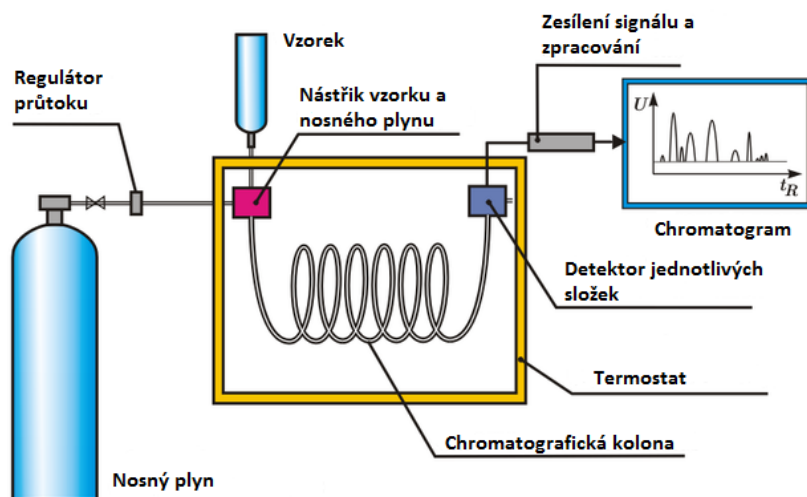
Musk sloučeniny se vyskytují v reálných vzorcích ve velmi nízkých koncentracích (stopové množství), a proto je nutné pro jejich optimální stanovení použít vysoce citlivý detektor, který je schopen detekovat co nejmenší množství analytů. Tímto detektorem může být hmotnostně spektrometrický detektor, jehož detekční limit dosahuje až jednotek pikogramů. Rovněž je velmi důležité zvolit optimální separaci, aby mohly být eliminovány nežádoucí příměsi, které by rušili finální stanovení sledovaných analytů. Protože musk sloučeniny patří mezi látky semivolatilní, termostabilní a nepolární, je nejvhodnější metodou pro jejich stanovení plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS).

### 2.4.6.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je analytická separační metoda, která využívá k rozdělení analytuobsažených ve směsi jejich distribuci mezi dvě fyzikálně odlišné (nemísitelné) fáze, z nichž jedna je stacionární (nepohyblivá) a druhá mobilní (pohyblivá). V plynové chromatografii tvoří mobilní fázi nosný plyn. Na podkladě převažujícího mechanismu separace (typ stacionární fáze) rozlišujeme dva základní typy plynové chromatografie, tj. rozdělovací a adsorpční. Při rozdělovací plynové chromatografii je netěkavá kapalina zakotvená na povrchu inertního nosiče, případně na vnitřní stěně kapiláry, zatímco v případě adsorpční plynové chromatografie je řídicím procesem adsorpce složky z plynné fáze na povrch tuhého absorbentu (např. silikagel, aktivní uhlí, alumina). Tato metoda je omezeně použitelná pro plyny a některé kapaliny o nízké molekulární hmotnosti.

Principem plynové chromatografie je ustavování rovnovážné koncentrace analytu mezi mobilní a stacionární fází. Vzorek se umísťuje na kolonu na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi umístěnou v koloně dochází k unášení vzorku celým systémem. Analyty jsou při tomto pohybu různě zadrženy; znamená to, že více jsou zpomalovány složky, které jsou poutány stacionární fází silněji. Naopak analyty nejméně poutané stacionární fází se dostávají spolu s mobilní fází na konec kolony jako první. Takovým způsobem dochází k postupné separaci všech analytů obsažených ve vzorku. Nejčastější používanou technikou při analytické aplikaci je eluční proces, který začne probíhat po jednorázovém nástřiku přečištěného extraktu na kolonu. Vzorek je nanášen naráz do proudu nosného plynu, kde dochází k jeho přeměně na plyn, který je následně unášen prostřednictvím nosného plynu kolonou. Nosný plyn slouží výhradně k transportu analytů kolonou a se separovaným složkami ani se stacionární fází nesmí reagovat. Pohyb mobilní fáze je zajištěn pomocí tlakového spádu. Plynová chromatografie umožňuje kromě již deklarované separace také identifikaci a kvantifikaci jednotlivých analytů. Separované analyty jsou unášeny do detektoru, který na přítomnost analytu reaguje signálem (odezva detektoru). Soubor signálů je znázorněn formou píků a celkový záznam celého děje se nazývá chromatogram. Poloha píku na časové ose chromatogramu (retenční čas  $t_R$ ) udává kvalitativní informaci o daném analytu, plocha tohoto píku je úměrná kvantitativnímu množství analytu obsaženém ve vzorku. Pro samotnou separaci je v plynové chromatografii nezbytné převést složky vzorku do plynné fáze. Proto je možno separovat pouze takové sloučeniny, které mají dostatečný tlak syté páry, jsou tepelně stálé, mají počet uhlíkových atomů menší než 100 a jejich molekulová hmotnost je menší než 1000. Tato selektivní analytická metoda je použitelná k separaci plynů, nedisociovaných kapalin, pevných organických molekul a rovněž mnoha organokovových látek; není však použitelná k separaci organických a anorganických solí nebomakromolekul. Hlavní výhodou plynové chromatografie je její jednoduchost, rychlost provedení analýzy, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebného k analýze.

Plynový chromatograf je složen z těchto základních částí: zdroje nosného plynu (mobilní fáze), nástřikového bloku (injektoru), chromatografické kolony umístěné v termostatu, detektoru a vyhodnocovacího zařízení [110; 111; 112].



Obrázek č.9: Schéma plynového chromatografu [3]

### **Zdroj nosného plynu (mobilní fáze)**

Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující inertní plyn, tj. helium, vodík, dusík nebo argon. Hlavní úlohou nosného plynu je transport separované složky vzorku kolonou. Při volbě vhodného nosného plynu je další požadovanou vlastností jeho inertnost vůči stacionární fázi a také vůči stanovovaným analytům. Dalšími důležitými faktory při výběru nosného plynu jsou viskozita, účinnost, čistota, citlivost, typ používaného detektoru a kolony, cena a bezpečnost práce (toxicita, hořlavost). Volba správného nosného plynu je velmi důležitá, protože má v důsledku rozdílných difuzních koeficientů složek značný vliv na separační účinnost. Nosný plyn musí být vysoké čistoty, bez vlhkosti a nesmí obsahovat kyslík. Výskyt vlhkosti a nečistot v nosném plynu by mohl nenávratně poškodit stacionární fázi, a proto se často zařazují do chromatografického systému sušičky, případně také absorbéry kyslíku. V současné době mají dodávané nosné plyny velmi vysokou čistotu, a protonení čistící zařízení většinou zapotřebí. Tlaková láhev je opatřena regulačním systémem, který zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu [110; 111; 112].

### **Injektory**

Injektory se používají k dávkování extraktu získaného z analyzovaného vzorku na začátek chromatografické kolony; zde je nadávkovaný extrakt převeden do plynného stavu a následně je vnesen do proudu nosného plynu. Teplotu injektoru volíme tak, aby při dávkování byl vzorek okamžitě odpařen a nedocházelo k jeho případné kondenzaci. Součástí injektoru je vnitřní vyměnitelná, zpravidla křemenná vložka (liner), která má vytvořit chemicky inaktivní prostředí pro zplyněný vzorek. V lineru dochází vlivem vysoké teploty k rychlému odpaření vzorku a k promíchání par vzorku s nosným plynem. Nástřik roztoků se nejčastěji provádí pomocí automatického dávkovače (autosampler), případně ručně pomocí mikrodávkovače, přičemž obvyklé dávkované množství extraktuje 1  $\mu\text{l}$ . Plynotěsné stříkačky nebo obtokové dávkovací kohouty se používají pro dávkování plynných vzorků [110; 111; 112]. Dávkování lze provádět několika způsoby:

#### *Dávkování s děličem toku (split injektor)*

Tento typ dávkování se používá u vzorků, které obsahují velké množství analyzovaných látek. Dávkovaný vzorek (0,1-2  $\mu\text{l}$ ) se po vypaření smísí s nosným plynem a rozdělí se na dvě části, přičemž pro vlastní analýzu se použije podstatně menší část nastříkovaného množství (0,1-10 %) a zbytek

je oddělen do odpadu. Tento typ dávkování se aplikuje především při kvalitativní analýze, pokud je hlavním požadavkem velké rozlišení zón separovaných složek [111; 112].

#### Dávkování bez děliče toku (splitless injector)

Dávkování bez děliče toku je vhodné pro analýzu zředěných vzorků nebo vzorků s malým obsahem analytů (ultrastopová analýza roztoků). Tento typ dávkování je doporučován pro stanovení komponent vzorků, na které klademe přísné kvantitativní požadavky. Metoda je vhodná pro vzorky o objemu 0,5 až 5  $\mu\text{l}$ ; pro vyšší objemy použijeme techniku nástřiku velkého objemu (LVI). Používá se stejné zařízení jako v případě dávkování s děličem toku, avšak s tím rozdílem, že odvod děliče je uzavřen, takže je analyzováno celé nastříknuté množství [111; 112].

#### Nástřik do kolony (on column injector)

Nástřik do kolony se zpravidla provádí u náplňových kolon, kdy je dávkován objem vzorku v rozmezí 1-10  $\mu\text{l}$ . Tento typ nástřiku lze použít i pro kapilární kolony větší světlosti (průměr od 0,25 mm), kde se pomocí dávkovače obvykle dávkuje 0,2-2  $\mu\text{l}$  extraktu. Tento typ nástřiku se používá při analýzách vzorků, jejichž složky se těsně nad bodem varu rozkládají (termolabilní látky). Vzorek se dávkuje do části křemenné kapiláry na začátku kolony (počátek kolony má deaktivovaný povrch). Teplota kolony musí být nižší, než je bod varu rozpouštědla použitého pro rozpouštění. Extrakt musí být rychle nadávkován, aby vytvořil kapalnou film; asi po 60 sekundách se teplota kolony prudce zvýší a dojde k odpaření vzorku [111; 112].

#### Dávkování s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku (PTV)

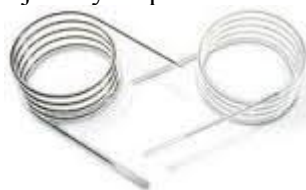
Tento typ dávkování umožňuje přesné nastavení podmínek, při kterých bude docházet ke zplynění extraktu. PTV dávkování se používá pro minimalizaci diskriminace složek podle bodů varů a rovněž umožňuje použití relativně vyšších nástřikových objemů [111; 112].

### **Kolony**

Kolona představuje část chromatografu, ve které je umístěná stacionární fáze a kde probíhá separace složek. V plynové chromatografii jsou využívány dva základní typy kolon, tj. náplňové a kapilární kolony. Kapilární kolony se vzhledem k vyšší účinnosti využívají v plynové chromatografii častěji než kolony náplňové [111; 112].

#### Náplňové kolony

Náplňové kolony jsou převážně kovové trubice (Al, Cu, Ni, nerezová ocel) s vnitřním průměrem 2 až 4 mm, jejichž délka je obvykle 0,5-5 m. Jsou naplněny adsorbenty (silikagel, aktivní uhlí, molekulová síta, kopolymery styrenu a divynylbenzenu) nebo negativním nosičem pro zakotvenou fázi (křemelina, modifikovaná křemelina). Jako zakotvené fáze se používají netěkavé, při použité teplotě chemicky inertní kapaliny. Účinnost kolon se odvíjí od velikosti částic; platí, že čím menší částice použijeme, tím lepší účinnosti dosáhneme, avšak musí být použit větší tlak pro transport mobilní fáze kolonou. Částice sorbentů mají obvykle průměr v rozmezí 0,13-0,40 mm [111; 112].



Obrázek č 10: Náplňové kolony [113]

### Kapilární kolony

Kapilární kolony mohou být vyrobeny z různých materiálů; v současné době jsou nejčastěji používány křemenné kapilární kolony, které jsou potažené ochrannou vrstvou polyamidu, s vnitřním průměrem 0,1-0,5 mm a délkou 10-60 m. Funkci nosiče u kapilárních kolon zastávají vnitřní stěny kapiláry, které jsou pokryty kapalnou stacionární fází. Tloušťka filmu stacionární fáze je silná 0,1-2  $\mu\text{m}$ . Částice adsorbentů jsou v rozmezí 0,13-0,40  $\mu\text{m}$ . Podle způsobu uložení stacionární fáze v kapilární koloně rozlišujeme několik typů kapilárních kolon. Kolony WCOT (wall-coated open tubular column) mají kapalnou stacionární fází nanesenou přímo na vnitřní stěnu kapiláry, kapilární kolony SCOT (Support-Coated Open Tubular) mají naopak zakotvenou kapalnou stacionární fází na povrchu pevného nosiče umístěného na vnitřní stěně kapiláry a kapilární kolony PLOT (porous-layer open tubular column) mají vrstvu pevného aktivního sorbentu umístěnou na vnitřním povrchu kapiláry. Používanými sorbenty jsou nejčastěji silikagel, aktivní uhlí, molekulová síta a porézní polymery. Kapalnou stacionární fází jsou většinou na bázi polysiloxanů, na kterých jsou navázány substituenty, které ovlivňují výslednou polaritu stacionární fáze [111; 112].



Obrázek č11: Kapilární kolona [114]

### Termostat

Funkcí termostatu je udržet konstantní teplotu kolony, injektoru a dávkovače na takové teplotě, aby byl vzorek udržen v plynném stavu. V případě izotermického procesu udržuje termostat konstantní teplotu kolony, případně může být teplota pomocí termostatu během analýzy měněna a tak může být vytvořen teplotní program. Konstantní teplota se využívá pouze tehdy, máme-li identifikovat analyty obsažené ve vzorku, které se příliš neliší svými teplotami varu. Pokud máme vzorek obsahující analyty s širokým spektrem teploty varu, využíváme teplotní program [111; 112].

### Detektory

Detektor je zařízení sloužící k detekci složek obsažených v nosném plynu, které opouštějí chromatografickou kolonu. Detektor reaguje na přítomnost jednotlivých složek, případně na změny jejich složení; následně je vyslán elektrický signál, který je zaznamenáván v závislosti na čase. Detektory v plynové chromatografii jsou buď univerzální, které se dají použít k detekci širokého spektra sloučenin, případně selektivní, které umožňují pouze detekci sloučenin majících specifické vlastnosti. Posuzovanými vlastnostmi detektoru jsou především citlivost (odezva detektoru v závislosti na změně koncentrace analytu), odezva (citlivost detektoru na sledovaný analyt), nízký detekční limit (schopnost reagovat na nízké koncentrace analytu), šum produkovaného signálu, lineární dynamický rozsah odezvy a efektivní objem, doba a rychlost odezvy. Detektory umožňují registraci jednotlivých zón separovaných složek, jejich identifikaci a kvantifikaci. Podle povahy závislosti signálu rozlišujeme detektory koncentračně závislé (signál detektoru je funkcí koncentrace složky vstupující do detektoru) a hmotnostně závislé (signál je funkcí hmotnosti složky vstupující do detektoru). Kromě toho můžeme detektory rozdělit na destruktivní (dochází k nevratným změnám analytu po průchodu detektorem) a nedestruktivní (látka prochází detektorem bez chemických změn) [111; 112].

Nedestruktivní detektory:

- Detektor elektronového záchytu (ECD)
- Tepelně-vodivostní detektor (TCD)
- Infračervený spektrometr (IRS)
- Argonový a heliový detektor (ArD, HeD)

Destruktivní detektory:

- Hmotnostní spektrometr (MS)
- Plamenový ionizační detektor (FID)

### **Vyhodnocovací zařízení**

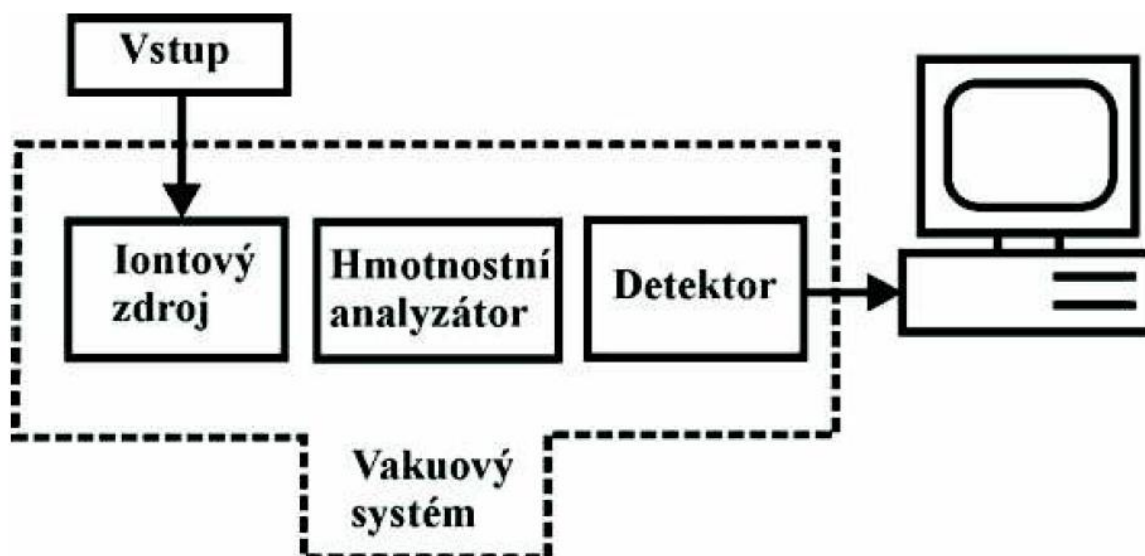
Zpracování a vyhodnocení analýzy je v současné době záležitostí výpočetní techniky a speciálních softwarových programů dodávaných spolu s přístroji.

#### **2.4.6.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)**

Hmotnostní spektrometrie je analytická, velmi účinná spektrometrická metoda, která nalezla své uplatnění jak v kvalitativní, tak také v kvantitativní analýze. V kvalitativní analýze je používána zejména pro identifikaci neznámých sloučenin, k určení molekulové hmotnosti a struktury látek. Tato metoda nám poskytuje značné množství informací o struktuře vzorku a jeho složení, a proto se velmi často používá k řešení analytických problémů, zejména v organické chemii, biochemii a při stanovení analytů izolovaných z environmentálních matric. Hlavní výhodou této metody je její použitelnost pro prakticky všechny prvky a sloučeniny. Kromě toho umožňuje tato metoda dosáhnout nízkých detekčních limitů a má velmi širokou oblast lineární odezvy. Hmotnostní spektrometrie má nízký požadavek na množství vzorku potřebného k analýze a umožňuje stanovovat látky o velmi vysokých hodnotách relativní molekulové hmotnosti.

Principem metody je převedení extraktu ze vzorku na ionizovanou plynnou fázi v iontovém zdroji (ionty), kde se mohou při nadbytku vnitřní energie (získané při ionizaci) dále štěpit na fragmentové ionty, radikály aj. Rozsah fragmentace je závislý na množství dodané energie (typ ionizace). Dobře provedená ionizace je hlavním předpokladem pro úspěšnou analýzu v hmotnostní spektrometrii, protože přístrojové zařízení dále reaguje pouze na ionty. Ionty jsou následně separovány v analyzátoru, a topodle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Výsledkem je získání hmotnostního spektra, které představuje záznam relativní četnosti iontových druhů v závislosti na poměru jejich hmotnosti a neseného náboje. Molekulární ion ve spektru poskytuje informaci o relativní molekulové hmotnosti analyzované sloučeniny a fragmentové ionty poskytují informaci o struktuře analyzované látky.

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru, vyhodnocovacího zařízení a vakuového systému [18; 111; 112].



Obrázek č. 12: Schéma hmotnostního spektrometru [3]

### **Iontový zdroj**

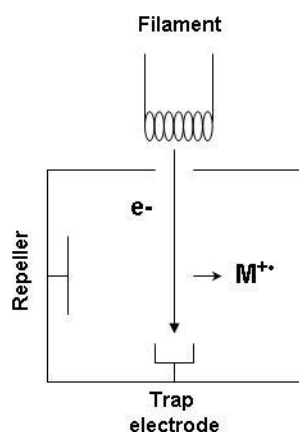
Veškeré informace poskytované hmotnostní spektrometrií se týkají pouze částic nesoucí náboj (ionty), a proto je nutné provést ionizaci. K ionizaci analyzovaných látek (atomů, molekul, sloučenin) dochází v iontovém zdroji pomocí některé ze zvolených ionizačních technik. Ionty vznikají dodáním dostatečného množství energie. Podle množství dodané energie rozdělujeme ionizační techniky na měkké a tvrdé. Při měkkých ionizačních technikách je energetický přebytek dodaný ionizované molekule malý, a proto je pravděpodobnost fragmentace malá. Nevýhodou této techniky je to, že nelze vytvářet knihovny spekter. Při tvrdé ionizaci postačuje dodaná energie k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu a tak je zajištěna reprodukovatelnost. Tento typ ionizace umožňuje tvorbu knihovny spekter.

Výběr iontového zdroje je závislý na charakteru analyzovaných složek. Mezi nejpoužívanější techniky patří elektronová ionizace (EI) [112].

### **Ionizace vzorku nárazem svazku urychlených elektronů (EI)**

Jedná se o nejčastější postup ionizace při spojení GC/MS, který je používán především pro analýzu těkavých organických, organokovových a anorganických sloučenin; naopak tato ionizace není vhodná pro stanovení netěkavých a termolabilních sloučenin. Základními součástmi iontového zdroje jsou dvě elektrody umístěné naproti sobě. První elektroda se nazývá filament (W, Re) a má tvar vlákna, druhá elektroda se nazývá trap. Ze žhaveného vlákna jsou emitovány elektrony, které jsou přitahovány protilehlou elektrodou. Díky elektrickému poli mezi elektrodami získávají emitované elektrony kinetickou energii 70 eV a interagují s neutrálními molekulami. Při této interakci dochází k vyrazení jednoho elektronu z elektronového obalu. Vzniká tak kladně nabitá částice s lichým počtem elektronů, tzv. radikalkation  $M^+$ . Vlivem velkého nadbytku energie praskají ve struktuře radikalkationu nejslabší vazby a vznikají fragmenty a neutrální ztráty. Neutrální ztrata, která nemá náboj, není ve spektru vidět, naopak fragmenty vidět jsou. Na vzniklé ionty začne působit elektrické pole další elektrody (repeleru), která je připojena na malé kladné napětí. Působící elektrické pole vypudí ionty z iontového zdroje směrem k analyzátoru. Celý proces probíhá ve vakuu, které zamezuje srážkám částic a molekul [111; 112].





Obrázek č. 13: Schéma elektronové ionizace [115]

### Další typy ionizace

Mezi další typy ionizace patří chemická ionizace (CI), termosprejová ionizace (TSI), elektrosprejová ionizace (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ionizace urychlenými atomy (FAB), ionizace polem (FI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) [112].

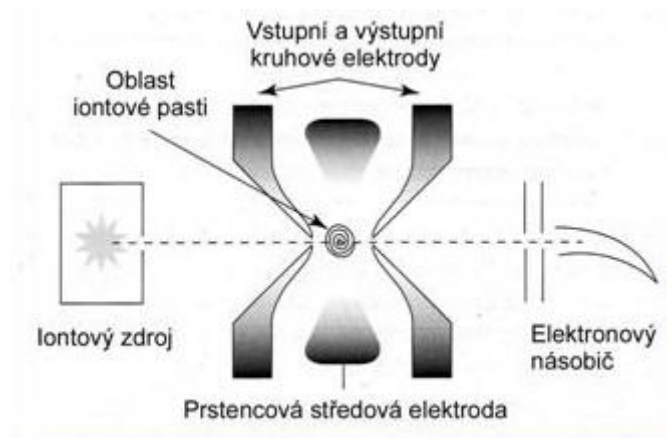
### Hmotnostní analyzátoři

Hmotnostní analyzátoři se nacházejí za ionizačním zdrojem a slouží k separaci vytvořených iontů podle poměru jejich hmotnosti a elementárního náboje  $m/z$ . Hmotnostní analyzátoři využívají různých fyzikálních mechanismů pro vlastní separaci, tj. např. doby letu (průletový analyzátoři), odchýlení trajektorie letu iontu v elektrickém a magnetickém poli (sektorové analyzátoři), oscilace iontu v elektrickém poli vytvářeném kombinací stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (dynamické analyzátoři), absorpce energie aj. Hmotnostní analyzátoři mohou pracovat ve dvou módech. Prvním módem je plný sken (full scan), kdy jsou registrována hmotnostní spektra v nastaveném hmotnostním rozsahu. Tento mód je využíván k získávání spekter pro identifikaci složek neznámých směsí. Druhým módem je sledování vybraných iontů (Selected Ion Monitoring-SIM), při kterém se sleduje intenzita jednoho nebo několika vhodně zvolených iontů v čase. Nejčastěji používaným analyzátořem je kvadrupólový analyzátoři (Q), iontová past (IT) a analyzátoři doby letu (TOF) [111; 112].

### Sférická iontová past (IT)

Sférická iontová past je analyzátoři pracující v cyklickém režimu; skládá se ze tří elektrod, z nich dvě jsou elektrody krycí a jedna je prstencová. Na prstencovou elektrodu je vkládáno střídavé radiofrekvenční napětí, čímž dochází ke změně polaritě elektrody a ionty se shromažďují v prostoru pasti, kde opisují trajektorie osmičkového tvaru. Zvyšováním amplitudy radiofrekvenčního napětí vkládaného na prstencovou elektrodu a současně pomocného napětí vkládaného na krycí elektrody dochází k tomu, že trajektorie iontů se protahují a ionty se podle své velikosti dostávají k výstupnímu otvoru a vyletují z pasti na detektor. Iontová past dále umožňuje uchovávání iontů a jejich postupné zpracování, v důsledku čeho lze s tímto analyzátořem provádět tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS). V MS/MS pracuje první MS jako separační technika, což znamená, že je v pasti ponechán jeden fragment ze všech iontů, které jsou produkovány iontovým zdrojem. Vybraný fragment (prekurzor) je dále kolizně aktivován, čímž dojde k jeho další fragmentaci. Vzniklé fragmenty (produkty) jsou analyzovány ve druhém stupni MS. Proto můžeme dále izolovat prekurzor další generace, kolizně jej aktivovat a posléze buď registrovat produktové spektrum, nebo izolovat prekurzor další generace. Díky tomu můžeme získat podrobné informace o struktuře zvoleného prekurzoru.

Hlavní výhodou sférické iontové pasti je její vysoká citlivost a proto ji lze použít při stopových environmentálních analýzách [111; 112].



Obrázek č. 14: Schéma iontové pasti [116]

### Analyzátor doby letu (TOF)

Dalším hmotnostním analyzátozem pracujícím v pulzním režimu je analyzátor doby letu (TOF). Principem tohoto analyzátoru je měření času, za který ionty dolétnou k detektoru. Tento konstrukčně velmi jednoduchý analyzátor je tvořen trubicí s vakuem, kam je pulsně vystřelen iontový oblak. Díky elektrickému poli zdroje dochází k urychlení iontů, čímž získávají všechny ionty stejnou kinetickou energii. Ionty o stejné kinetické energii s menším poměrem  $m/z$  urazí stejnou vzdálenost rychleji než ionty s poměrem  $m/z$  vyšším. Tento typ hmotnostního analyzátoru může dosahovat i vysokého rozlišení, které je dosaženo použitím tzv. iontového zrcadla neboli reflektoru. Reflektor odráží ionty zpět, čímž prodlužuje dráhu jejich letu a dále slouží k vyrovnání kinetické energie u iontů se stejnou  $m/z$ . Ionty s větší dodanou kinetickou energií proniknou hlouběji do odrazového pole reflektoru než ionty s nižší kinetickou energií, čímž dojde k vyrovnání jejich doby letu a tyto ionty dopadnou na detektor ve stejný čas [111; 112].

### Další typy hmotnostních analyzátorů

Mezi další hmotnostní analyzátozem patří např. magnetický analyzátor (MAG), elektrostatický analyzátor (ESA), iontový rezonanční cyklotron (ICR) a Orbitrap [112].

### Detektory

Funkcí detektoru je detekce iontů po průletu analyzátozem a převedení (zesílení) proudu dopadajících iontů na proud elektronů. Nejčastěji používaným detektorem v hmotnostní spektrometrii je elektronový násobič (elektronásobič), který pracuje na principu násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu elektronů. Násobičové detektory se využívají standardně u veškeré komerční instrumentace, včetně kombinovaných systémů GC-MS a LC-MS [111; 112].

### Vakuový systém

Hlavní funkcí vakuového systému je udržení dostatečně vysokého vakua, které je nutné k tomu, aby ionty udržely dostatečně dlouhou dobu letu a nedošlo k jejich srážce během letu celým hmotnostním spektrometrem. Typické uspořádání vakuového systému v hmotnostní spektrometrii je dvoustupňové, přičemž první stupeň je tvořen rotační olejovou vývěvou s rotujícími lamelami a jako druhý stupeň lze zařadit difuzní nebo turbomolekulární vývěvu [111; 112].

### **2.4.6.3 Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie může být používána jako velmi účinná identifikační technika pro řešení analytických problémů. Plynová chromatografie je zase aplikována jako separační technika, která umožňuje separaci složek směsí. Spojením plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem došlo k výraznému rozvoji hmotnostní spektrometrie. GC-MS spojení zajišťuje v důsledku plynové chromatografie vysokou separační schopnost a díky hmotnostní spektrometrii získává výborné identifikační možnosti. Jediným omezením pro analýzu směsí je to, že analyzované látky musí být dostatečně těkavé, aby mohly projít separační kolonou. Látky netěkavé lze rovněž analyzovat metodou GC-MS, avšak před vlastní analýzou je nutné provést derivatizaci. Pomocí metody GC-MS lze analyzovat složky směsí spadajících do oblasti stopové a ultrastopové analýzy. Přímé spojení náplňové kolony plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem není možné, protože by velké množství nosného plynu mohlo porušit vakuum v hmotnostním spektrometru. Porušení vakua by mělo za následek výrazný pokles citlivosti detekce, zhoršení charakteru spekter a především zkrácení životnosti součástí iontového zdroje. Proto se mezi chromatografickou kolonou a iontový zdroj zařazuje molekulový separátor nebo dělič toku, který snižuje množství nosného plynu. Molekulové separátory mají za úkol oddělit co největší část nosného plynu od eluované složky [18; 111; 112].

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Používané přístroje, zařízení a software**

#### **3.1.1 Zařízení použité k přípravě standardů a vzorků**

- Analytické váhy SCALTEC SPB31 (Scaltec Instrument GmbH, Německo)
- Zařízení pro přípravu Milli-Q vody Millipore Q GARD (Merck KGaA, Německo)
- Mikropipety s vyměnitelnou špičkou (Biohit, Finsko)

#### **3.1.2 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)**

- Magnetická míchačka s vyhříváním IKA RCT basic s teploměrem IKA ETS-D5(IKA, Německo)
- Držák na SPME(Supelco, USA)
- SPME vlákno (modré): 65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB (Supelco, USA)
- SPME vlákno (červené): 100  $\mu\text{m}$  PDMS (Supelco, USA)
- SPME vlákno (bílé): 85  $\mu\text{m}$  PA (Supelco, USA)

#### **3.1.3 Plynový chromatogram s hmotnostním spektrometrem**

- Plynový chromatogram Thermo Trace 1300 (Thermo Scientific, USA)
- Hmotnostní detektor ITQ 700 se sférickou iontovou pastí (Thermo Scientific, USA)
- Ovládací a vyhodnocovací software XCalibur verze 2.2(Thermo Scientific, USA)

### **3.2 Chemikálie a standardy**

#### **3.2.1 Standardy**

- Exaltolid [ $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v cyklohexanu] (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
- Habanolid [ $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v cyklohexanu] (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
- Ambretolid [ $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v cyklohexanu] (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
- Musk MC4 [ $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v cyklohexanu] (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
- Etylen brasylat [ $1000 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ] (SAFC, Sigma-Aldrich, USA)

#### **3.2.2 Chemikálie**

- Cyklohexan (Merck, Německo)
- Ethylacetát (Sigma-Aldrich, USA)
- Helium 6,0 (Messer, Německo)
- NaCl p.a. (Lach-Ner, ČR)
- Aceton p.a. (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina chromsírová(připravená v laboratoři)
- NaOH (Sigma-Aldrich, USA)
- Milli-Q voda(Merck KGaA, Německo)

### **3.3 Sledované analyty**

Pro experimentální část diplomové práce byly vybrány celkem 5 analytů ze skupiny makrocyclických musk sloučenin (habanolid, exaltolid, ambretolid, musk MC4, ethylen brasylat). Makrocyclické musk sloučeniny jsou velmi žádané v kosmetickém průmyslu, především vzhledem k jejich stabilitě na světle, odolnosti vůči alkáliím, velmi dobrým fixačním vlastnostem, trvanlivosti a intenzitě vůně. V porovnání s nitromusk a polycyclickým sloučeninami jsou snadněji biodegradovatelné a jsou

šetrnější k životnímu prostředí. Nevýhodou makrocyklických musk sloučenin je jejich relativně vysoká cena, což je hlavní důvod, proč makrocyklické musk sloučeniny nejsou dosud více rozšířené.

V rámci diplomové práce byly sledovány tyto analyty s cílem zjistit, zda již tyto sloučeniny nahrazují v určité míře škodlivé nitromusk a polycyklické musk sloučeniny. Makrocyklické musk sloučeniny byly zjišťovány ve vzorcích odpadní vody (přítok a odtok). Kromě toho byly tyto analyty stanovovány také v 27 vzorcích značkových parfémů, a to za účelem zjištění, zda jsou tyto sloučeniny součástí běžných produktů osobní péče.

### **3.4 Příprava roztoků standardů**

Čtyři standardy syntetických musk sloučenin pocházely od společnosti Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Německo); byly dodány ve formě roztoků o koncentraci  $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v cyklohexanu. Standard ethylen brasylat byl zakoupen od společnosti SigmaAldrich (jeho koncentrace byla  $1000 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Z těchto standardů bylo zapotřebí připravit příslušné roztoky a zjistit jejich rozpustnost v organickém rozpouštědle. Bylo prokázáno, že všechny standardy jsou rozpustné v cyklohexanu (nepolární rozpouštědlo). Rozpuštěním příslušného množství standardu v cyklohexanu byl pro každý standard zvlášť připraven zásobní roztok o koncentraci  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; z těchto zásobních roztoků standardů byl následně připraven směsný zásobní roztok o koncentraci  $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  v ethylacetátu. Protože jsou makrocyklické musk sloučeniny zjišťovány převážně ve vodě, která je polární, byly také příslušné standardy přidávány do ethylacetátu, který se s vodou bez problému mísí. Z tohoto zásobního roztoku byly dále naředěny roztoky standardů pro metodu standardního přídávku a rovněž pro stanovení mezí detekce a kvantifikace.

### **3.5 Optimalizace identifikace a kvantifikace analytů metodou GC/MS**

#### **3.5.1 Stanovení charakteristik standardů syntetických vonných látek**

Retenční charakteristiky a hmotnostní spektra jednotlivých analytů byly získány změřením zásobního roztoku připravených standardů. Směsný zásobní roztok standardu o koncentraci  $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  byl nadávkován do plynového chromatografu ( $1 \text{ } \mu\text{l}$ ); ze získaného chromatogramu byly odečteny retenční časy příslušného analytu. Hmotnostní spektra analytů jsou prezentována v příloze č. 1 a retenční časy v tabulkách č. 15 a 16. Ze získaných hmotnostních spekter musk sloučenin byly pro každou látku určeny charakteristické hmoty, které je nutné znát k nastavení měření v módu MS/MS a SIM. Tyto hmoty jsou uvedeny v kapitole 3.5.3.

#### **3.5.2 Optimalizace nastavení GC/MS**

K optimalizaci a k nastavení parametrů GC/MS byl použit směsný zásobní roztok o koncentraci  $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $1 \text{ } \mu\text{l}$ ). Pro optimalizaci teplotního programu byly ověřovány celkem 2 teplotní rampy, přičemž byla následně zvolena ta, která byla vhodnější pro separaci sledovaných analytů. Výsledky optimalizace jsou prezentovány v kapitole 4.1. Dvě makrocyklické musk sloučeniny (musk MC4, ethylen brasylat) byly stanovovány v módu MS/MS, který se v porovnání s módem, v němž se snímá celé spektrum po celou dobu analýzy, vyznačuje vyšší citlivostí. Tři další analyty (habanolid, exaltolid a ambretolid) byly stanovovány v módu SIM, protože jejich molekulové píky měly malou intenzitu a nepodařilo se u nich získat dostatečně intenzivní spektrum, abychom mohli získat jejich fragmenty. Nastavení plynového chromatografu Thermo Trace 1300/ITQ 700 je uvedeno v následujících tabulkách.

Tabulka č. 12: Nastavení plynového chromatografu

<b>Kolona:</b>	Supelco SLB <sup>TM</sup> -5ms (30 m×0,52 mm×0,25 μm)
<b>Nosný plyn:</b>	Helium
<b>Doba analýzy:</b>	27 min
<b>Typ injektoru:</b>	Split/splitless
<b>Mód:</b>	Split
<b>Teplota injektoru:</b>	240 °C
<b>Průtok nosného plynu v injektoru:</b>	50 ml·min <sup>-1</sup>
<b>Dělicí poměr:</b>	33,3
<b>Průtok nosného plynu kolonou:</b>	1 ml·min <sup>-1</sup> (konstantní průtok)
<b>Nastavení nosného plynu – vakuová kompenzace:</b>	Ano
<b>Nastavení nosného plynu – spořič nosného plynu:</b>	Ano (po 4 minutách 10 ml·min <sup>-1</sup> )
<b>Teplota tranferline:</b>	280 °C

Tabulka č. 13: Optimalizovaný teplotní program

Teplotní krok (°C·min <sup>-1</sup> )	Teplota (°C)	Izoterma (min)
-	60	3
10	280	2

### 3.5.3 Nastavení hmotnostního detektoru

Pro nastavení hmotnostního detektoru v režimu MS/MS a SIM musíme znát významné hmoty a retenční časy pro každý analyt, jelikož v každém čase jsou sledovány pouze zadané ionty, čímž se zlepšuje mez detekce. Konkrétní hmoty pro každý analyt jsou uvedeny v tabulce 15 a 16. Retenční časy se téměř shodují s retenčními časy naměřenými při optimalizaci teplotního programu GC/MS.

Tabulka č. 14: Nastavení hmotnostního detektoru

<b>Teplota iontového zdroje:</b>	200 °C
<b>Mód:</b>	SIM, MS/MS

Tabulka č. 15: Charakteristiky analytů pro nastavení MS/MS

Standard	Prekurzor	Sken produktů		Kolizní energie (V)	Retenční čas (min)
		od	do		
Musk MC4	231,1	110	270	0,88	19,61
Ethylen brasylat	227,1	115	300	0,92	20,58

Tabulka č. 16: Charakteristiky analytů pro nastavení SIM

Standard	Sledována hmota (m/z)	Retenční čas (min)
Habanolid	238,1	18,67-18,78
Exaltolid	240,0	18,78
Ambretolid	252,1	19,77

## 3.6 Optimalizace mikroextrakce tuhou fází (SPME)

### 3.6.1 Výchozí podmínky SPME

K optimalizaci SPME byly jako výchozí podmínky použity parametry, které byly publikovány v článku zabývajícím se stanovením makrocyclických musk sloučenin v odpadní vodě pomocí SPME [66]. K optimalizaci podmínek SPME a následné analýze GC/MS byl do 10 ml milli-Q vody přidán 1 ml roztoku směšného standardu o koncentraci  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Tabulka č. 17: Výchozí podmínky SPME

<b>Typ vlákna:</b>	65 $\mu\text{m}$ PDMS/DVB (modré)
<b>Provedení:</b>	Head-space
<b>Teplota sorpce:</b>	90 °C
<b>Doba ustálení rovnováhy:</b>	5 min
<b>Doba expozice vlákna:</b>	45 min
<b>Objem vialky:</b>	22 ml
<b>Objem vzorku:</b>	10 ml
<b>Rychlost míchání:</b>	750 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$

### 3.6.2 Výběr vhodného vlákna a provedení

Výběr vhodného vlákna je zásadní pro vlastní analýzu SPME, a proto byl prioritně optimalizován právě tento parametr. Celkem byla testována tři vlákna, která v již zmiňovaném článku zabývajícím se stanovením makrocyclických musk sloučenin v odpadní vodě, vykazovala nejlepší výsledky [66]. Tato vlákna měla různé stacionární fáze a různé tloušťky vrstev. Pro každé vlákno byly ověřovány oba extrakční módy, tj. ponoření vlákna do vzorku (DI-Direct Immersion), případně technika dávkování z rovnovážné plynné fáze (HS-Head-Space). Protože jsou syntetické vonné látky sloučeninami semivolatilními, byl pro analýzu zvolen mód vzorkování z rovnovážné plynné fáze. Výsledky získané v rámci této optimalizace jsou porovnávány v kapitole 4.2.2.

Tabulka č. 18: Vlákna použitá k optimalizaci SPME

	<b>Stacionární fáze</b>	<b>Zkratka stacionární fáze</b>	<b>Tloušťka vrstvy</b>
<b>Modré</b>	Polydimethylsiloxan/divinylbenzen	PDMS/DVB	65 $\mu\text{m}$
<b>Červené</b>	Polydimethylsiloxan	PDMS	100 $\mu\text{m}$
<b>Bílé</b>	Polyakrylát	PA	85 $\mu\text{m}$

### 3.6.3 Vliv vysolování

Účinnost extrakce analytů může být podpořena zvýšením iontové síly roztoku. Na podkladě této skutečnosti byl při optimalizaci SPME brán v úvahu také efekt vysolování, který byl způsoben přidávkem chloridu sodného. V rámci provedených experimentů bylo zjištěno, že optimální přírůstek je 3 g NaCl [66]. Na základě získaných výsledků bylo provedeno porovnání účinnosti extrakce bez a s přidávkem soli u všech ověřovaných vláken. Výsledky jsou následně prezentovány v kapitole 4.2.2.

Tabulka č. 19: Podmínky pro optimalizaci extrakčního módu HS-SPME s přidavkem soli (vysolování)

Vlákno	Podmínky SPME
PDMS/DVB 65 $\mu\text{m}$ PDMS 30 $\mu\text{m}$ PA 85 $\mu\text{m}$	Provedení: head-space Doba temperance: 5 min Doba sorpce: 45 min Teplota sorpce: 90 $^{\circ}\text{C}$ Přídavek NaCl: 3 g

### 3.6.4 Teplota sorpce

Pro izolaci analytu z matrice s využitím metody SPME má značný vliv teplota sorpce. V rámci prováděné optimalizace byly porovnávány teploty 70, 80 a 90  $^{\circ}\text{C}$ . Při optimalizaci volby správné teploty sorpce byly aplikovány již ověřené parametry metody, tj. vlákno 65  $\mu\text{m}$ , mód head-space, bez přídavku NaCl. Získané výsledky optimalizace teploty jsou prezentovány v kapitole 0.

Tabulka č. 20: Podmínky při optimalizaci teploty

Teplota sorpce ( $^{\circ}\text{C}$ )	Podmínky SPME
70	Vlákno: PDMS/DVB 65 $\mu\text{m}$ Provedení: head-space Doba temperance: 5 min Doba sorpce: 45 min
80	
90	

### 3.6.5 Doba sorpce

Dále byla optimalizována doba, za kterou bylo při aplikaci metody SPME dosaženo rovnováhy. Testovány byly časy 30, 45 a 60 minut. Pro optimalizaci doby sorpce bylo použito vlákno, pro které byly již zjištěny některé optimální podmínky, tj. vlákno 65  $\mu\text{m}$ , mód head-space, bez přídavku NaCl, teplota sorpce 90  $^{\circ}\text{C}$ . Získané výsledky jsou prezentovány v kapitole 4.2.4

Tabulka č. 21: Podmínky při optimalizaci doby sorpce

Doba sorpce (min)	Podmínky SPME
30	Vlákno: PDMS/DVB 65 $\mu\text{m}$ Provedení: head-space Doba temperance: 5 min Teplota sorpce: 90 $^{\circ}\text{C}$
45	
60	



### 3.6.6 Množství přidané soli (vysolování)

Na závěr bylo pro vlákno PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  (modré) optimalizováno množství přidané soli (NaCl). V rámci tohoto experimentu byly aplikovány tři přídavky, a to 1, 2 a 3 g NaCl. Výsledky jsou prezentovány v kapitole 4.2.5.

Tabulka č. 22: Podmínky při optimalizaci množství přidané soli

Přídavek soli (g)	Podmínky SPME
1	Vlákno: PDMS/DVB 65 $\mu\text{m}$ Provedení: head-space
2	Doba temperance: 5 min
3	Teplota sorpce: 90 $^{\circ}\text{C}$ Doba sorpce: 45 min

### 3.7 Stanovení analytů v reálných vzorcích

Odebrané vzorky odpadní vody byly promíchány ve vorkovnici, aby došlo k jejich maximální homogenitě; následně bylo do vialky o objemu 42 ml napipetováno 10 ml daného nefiltrovaného, neředěného vzorku odpadní vody. Po uzavření vialky byla provedena mikroextrakce analytů tuhou fází. Po ukončení izolace analytů metodou SPME bylo vlákno přeneseno do plynového chromatografu, kde byla provedena desorpce a následná analýza analytů (pětanalytů ze skupiny syntetických musk sloučenin); pro detekci byl použit hmotnostní spektrometr. Ke kvantifikaci byla použita metoda standardního přídávku, přičemž do vialky se vzorkem, který byl analyzován, bylo po vytažení SPME vlákna přidáno 10  $\mu\text{l}$  (pro přítok) a 5  $\mu\text{l}$  (pro odtok) směšného roztoku standardů o koncentraci 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Poté byly pětanalyty izolovány z matrice mikroextrakcí tuhou fází a následně proběhla analýza pomocí GC/MS. Porovnáním získaných ploch piků bylo možné určit koncentraci musk sloučenin ve vzorku odpadní vody. Každý vzorek byl proměřen dvakrát a výsledná koncentrace analytu ve vzorku byla získána jako aritmetický průměr obou těchto stanovení. Výsledky měření jsou prezentovány v kapitole 4.5.

Tabulka č. 23: Optimalizované podmínky SPME

<b>Typ vlákna:</b>	65 $\mu\text{m}$ PDMS/DVB (modré)
<b>Provedení:</b>	Head-space
<b>Teplota sorpce:</b>	90 $^{\circ}\text{C}$
<b>Doba ustálení rovnováhy:</b>	5 min
<b>Doba expozice vlákna:</b>	45 min
<b>Objem vialky:</b>	42 ml
<b>Objem vzorku:</b>	10 ml
<b>Rychlost míchání:</b>	750 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$

### 3.7.1 Metoda standardního přídavku

Metoda standardního přídavku je založena na měření stejného vzorku dvakrát, přičemž po prvé je proměřen samotný vzorek a následně je proměřen stejný vzorek se známým standardním přídavkem. Ze získaných ploch píku (bez a s přídavkem standardu), lze určit výslednou koncentraci analytu, která je obsažena v původním vzorku.

Pro stanovení koncentrace metodou standardního přídavku platí rovnice (1):

$$c_{vz} = \frac{A_{vz} \cdot c_s \cdot V_s}{A_s \cdot (V_{vz} + V_s) - A_{vz} \cdot V_{vz}} \quad (1)$$

kde:

$c_{vz}$ ..... koncentrace analytu v reálném vzorku ( $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

$c_s$  ..... koncentrace standardu v roztoku použitým jako přídavek standardu ( $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ )

$A_{vz}$  .... plocha píku v reálném vzorku

$A_s$ ..... plocha píku analytu po přídavku standardu

$V_{vz}$ ..... objem vzorku (ml)

$V_s$ ..... objem standardu přidaný k reálnému vzorku (ml)

### 3.8 Stanovení limitů detekce a kvantifikace (LOD a LOQ)

Limit (mez) detekce (limit of detection, LOD) a limit (mez) stanovitelnosti (limit of quantification, LOQ) jsou velmi důležité metrologické parametry, které spolu velmi úzce souvisí, především pokud se jedná o stopovou analýzu organických polutantů. Mez detekce udává nejmenší množství látky, jehož signál je možno detekovat, avšak nelze ho kvantitativně vyhodnotit. LOD je proto koncentrace, při které látka vyvolá odezvu měřicího přístroje větší než je trojnásobek šumu základní linie. Mez stanovitelnosti je definována jako množství analytu, které způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu desetinásobku velikosti šumu. Je to nejmenší množství analytu, jehož signál lze kvantitativně s danou pravděpodobností vyhodnotit [117; 118].

Pro výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti platí tyto rovnice:

$$LOD = \frac{3 \cdot h}{k} \quad (2)$$

kde:

LOD .. mez detekce

$h$  ..... výška šumu

$k$  ..... směrnice kalibrační křivky

$$LOQ = \frac{10 \cdot h}{k} \quad (3)$$

kde:

LOQ .. mezstanovitelnosti

$h$  ..... výška šumu

$k$  ..... směrnice kalibrační křivky

Porovnáním výše uvedených rovnic lze odvodit následující rovnici, která vyjadřuje vzájemný vztah mezi mezí detekce a mezí stanovitelnosti:

$$LOQ = \frac{10 \cdot LOD}{3} \quad (4)$$

### 3.8.1 Stanovení meze detekce

Pro stanovení LOD a LOQ pomocí GC/MS bylo připraveno celkem 5 kalibračních roztoků o různých koncentracích. Pro sestavení kalibračních křivek byl nařazen směsný pracovní roztok o koncentraci 20 µg·ml<sup>-1</sup>. Směsný pracovní roztok byl použit proto, že v reálných vzorcích se analyty rovněž vyskytují ve směsích, a proto jeho použití bude více odpovídat skutečnosti. Pro přípravu stanovení meze detekce byly použity tytéž podmínky jako pro analýzu reálných vzorků. Každé měření bylo opakováno 4krát a z průměrných hodnot ploch píků bylo provedeno vyhodnocení a byly sestaveny kalibrační grafy, a to pro každý standard zvlášť. Ze sestavených grafů byly získány potřebné směrnice kalibračních závislostí, které jsou prezentovány v příloze č. 2 na grafech č. 20-24.

*Tabulkač. 24: Kalibrační roztoky pro určení LOD a LOQ*

	<b>Koncentrace kalibračního roztoku (ng·ml<sup>-1</sup>)</b>
Kalibrační roztok 1	0,5
Kalibrační roztok 2	2
Kalibrační roztok 3	3
Kalibrační roztok 4	4
Kalibrační roztok 5	5

### 3.8.2 Stanovení mezestanovitelnosti

Mezestanovitelnosti analytů makrocyclických musk sloučenin byly vypočteny ze získaných mezí detekce použitím vztahu (4). Tyto meze stanovitelnosti jsou pro jednotlivé musk sloučeniny uvedeny v kapitole 4.4.

### 3.9 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost měření vyjadřuje těsnost shody mezi výsledky po sobě jdoucích měření stejné měřené veličiny za stejných podmínek měření. Podmínky opakovatelnosti představují stejný postup měření prováděný tou samou osobou na stejném měřicím přístroji za stejných podmínek na stejném místě. Dále musí být opakování měření provedeno v průběhu krátké časové periody, a proto musí být použity stejné chemikálie a stejné chemické standardy [119].

Opakovatelnost měření byla zjištěna tak, že byl 5krát po sobě proměřen vzorek odpadní vody z přítoku na ČOV, k němuž bylo přidáno 10 µl směsného roztoku standardu o koncentraci 20 µg·ml<sup>-1</sup>, který byl použit při aplikaci metody standardního přídávku. Rozdíly signálů pro analyty ze všech sedmi měření byly vyjádřeny jako relativní směrodatné odchylky a jsou prezentovány v kapitole 4.4.

### 3.10 Vzorkování

Pro stanovení syntetických vonných látek byly odebírány vzorky odpadní vody z čistírny odpadních vod v Brně-Modřicích. Vzorky z ČOV Brno-Modřice byly odebírány ve dnech 15.4.-21.4.2015. Voda byla vzorkována na přítoku a na odtoku ČOV s cílem zjistit účinnost čistícího procesu z hlediska změny koncentrace vonných látek. Všechny odebrané vzorky představovaly 24 hodinové slévané vzorky a byly odebírány do vzorkovnic z hnědého skla, které byly před odběrem důkladně umyty speciálním čistícím postupem, který je uveden v kapitole 3.12. Vzorkovnice byly vždy naplněny až po okraj a pevně uzavřeny víčkem opatřeným teflonem. Po odběru byly vzorky co nejrychleji dopraveny do laboratoře; sledované analyty byly z matrice v co nejkratším čase izolovány mikroextrakcí tuhou fází a následně analyzovány metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Analyty byly kvantifikovány pomocí metody standardního přídatku. V průběhu provádění jednotlivých analýz byly vzorky uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

#### 3.10.1 Specifikace vzorků z ČOV Brno-Modřice

Čistírna odpadních vod v Brně-Modřicích slouží k čištění odpadních vod z Brna a okolí. Odpadní voda je na čistírnu přiváděna systémem kanalizačních stok z města Brna a systémem soustavy čerpacích stanic z okolí Brna (Kuřim, Modřice, Želešice, Česká u Brna, Šlapanice, Ostopovice, Moravské Knínice, Lipůvka atd.)

Čistírna je v provozu od roku 1961, v letech 2001-2004 došlo k její rozsáhlé rekonstrukci. Hlavním důvodem rekonstrukce bylo její přetěžování z důvodu rozvoje města Brna a připojení okolních měst a obcí k této čistírně. Čistírna odpadních vod Brno-Modřice je založena na mechanicko-biologickém čištění s nitrifikačním a denitrifikačním stupněm a s odstraňováním fosforu simultánním srážením. Průměrné množství přitékající odpadní vody za den je přibližně  $129\,493\text{ m}^3\cdot\text{den}^{-1}$ , přičemž maximální projektová kapacita čistírny je  $137\,000\text{ m}^3$  přitékající vody za den. Čistírna je tak využívána z 95 %. Přečištěná odpadní voda je vypouštěna do řeky Svratky s průměrným průtokem  $1950\text{ l}\cdot\text{s}^{-1}$  a maximálním průtokem  $4222\text{ l}\cdot\text{s}^{-1}$  [120].

#### 3.10.2 ČOV Mikulov

Město Mikulov se nachází v jihomoravském kraji (okres Břeclav) při železniční trati ve směru Břeclav-Znojmo u státní hranice s Rakouskem. Město má vsoučasné době 7624 obyvatel. Terén je mírně vlnitý a klimatické podmínky odpovídají geografické poloze v teplé, poměrně suché oblasti. Město je průmyslově zemědělského charakteru se zaměřením na pěstování vinné révy a výrobu vína. Ve městě je vybudován jednotný kanalizační (gravitační) systém ukončený čistírnou odpadních vod. Malá část města u starého hraničního přechodu a místní část Mušlov nejsou odkanalizovány a likvidace odpadních vod je zde řešena pomocí vyvážených jímek. Čistírna odpadních vod je mechanicko-biologická s aerobním zpracováním kalu a do provozu byla uvedena v roce 1992; v roce 2009 byla rekonstruována. Vyčištěná odpadní voda odtéká do rybníka Šibeník. Průměrné množství přitékající odpadní vody za den je přibližně  $4280\text{ m}^3\cdot\text{den}^{-1}$ , přičemž maximální projektová kapacita čistírny je  $5219\text{ m}^3$  přitékající vody za den [121].

#### 3.10.3 ČOV Lednice

Obec Lednice na Moravě leží v Lednicko-Valtickém areálu, který je známou turistickou oblastí, která je zařazená mezi památky chráněné Unescem. Obec má v současné době 2200 obyvatel, zaměstnaných převážně v zemědělství a ve službách. Vybavenost obce je vzhledem k velkému množství turistů nadstandardní. V obci je vybudován jednotný kanalizační systém, který je zakončený čistírnou odpadních vod. Do kanalizační sítě jsou přečerpávány splaškové vody z obce Hlohovec a místní části

Nejdek. Čistírna odpadních vod je mechanicko-biologická s aerobní stabilizací kalu. Vyčištěná odpadní voda je vypouštěna do řeky Dyje [122].

### 3.11 Stanovení makrocyclických musk sloučenin v produktech osobní péče

V rámci diplomové práce byla zpracována screeningová studie zaměřená na zjištění obsahu makrocyclických musk sloučenin ve vybraných značkových produktech osobní péče (parfémy a toaletní vody). Celkem bylo analyzováno 27 produktů osobní péče, které byly zakoupeny v místní maloobchodní síti. Všechny vzorky byly kapalné a byly ředěny ethylacetátem v poměru 1:100 a 1:1000, v závislosti na koncentraci přítomných složek ve vzorku. Pro analýzu byl odebrán 1 µl takto zředěného vzorku a následná analýza 5 syntetických musk sloučenin byla provedena pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Pro vyhodnocení vzorků parfému bylo nutné sestavit kalibrační závislosti sledovaných analytů. Pro sestavení kalibračních závislostí byl naředěn směsný pracovní roztok o koncentraci 20 µg·ml<sup>-1</sup>. Směsný pracovní roztok byl použit z toho důvodu, že v parfémeh se analyty rovněž vyskytují ve směsích, a proto jeho použití bude více odpovídat skutečnosti. Pro přípravu měření byly použity stejné podmínky jako pro analýzu reálných vzorků. Každé měření bylo opakováno 4x a byla vypočtena průměrná hodnota; následně bylo provedeno vyhodnocení a pro každý standard zvlášť byly sestaveny kalibrační grafy. Sestavené grafy jsou prezentovány v příloze č. 3 na grafech č. 25-29. Výsledky analýzy parfémů jsou uvedeny v kapitole 4.6.1.

Tabulka č. 25: Kalibrační roztoky pro sestavení kalibrační závislosti pro stanovení analytů v parfémeh

	Koncentrace kalibračního roztoku (mg·l <sup>-1</sup> )
Kalibrační roztok 1	0,5
Kalibrační roztok 2	1
Kalibrační roztok 3	2,5
Kalibrační roztok 4	5
Kalibrační roztok 5	10
Kalibrační roztok 6	15
Kalibrační roztok 7	20

#### 3.11.1 Reálné vzorky parfémů

Z důvodu prověření přítomnosti makrocyclických musk sloučenin v produktech osobní péče (parfémy) bylo analyzováno celkem 27 značkových parfémů [123].

##### 3.11.1.1 Analyzované parfémy a toaletní vody

1. *Versace Yellow Diamond (woman)*
  - Hlava – neroli, citron, broskev, bergamot
  - Srdce – mimóza, leknín, květ pomerančovníku, frézie
  - Základ – dřevo, pižmo
2. *Versace Bright Crystal Absolu (woman)*
  - Hlava - yuzu, granátové jablko
  - Srdce – magnólie, malina, lotos, pivoňka
  - Základ - pižmo, jantar, mahagon

3. *Versace Eau Fraiche (man)*
  - Hlava – bílý citron, růžové dřevo, bergamot
  - Srdce – cedrové jehličí, estragon, šalvěj
  - Základ – smokvoňové dřevo, ambra, pižmo
4. *Hugo Boss Deep Red (woman)*
  - Hlava – klementinka, hruška, pomeranč, rybíz
  - Srdce – zázvor, pitospora, ibišek, frézie
  - Základ – mošus, cedr, vanilka
5. *Bvlgari AQVA Pour Homme (man)*
  - Hlava – květ pomerančovníku, mandarinka
  - Srdce – mořská tráva posidonie, svatolína
  - Základ - ambra
6. *Bvlgari AQVA Marine Pour Homme (man)*
  - Hlava – neroli, petit grain, grapefruit, pomeranč
  - Srdce – vodní tóny, mořské řasy, rozmarýn
  - Základ – cedr, ambra
7. *Lacoste Challenge (man)*
  - Hlava – levandule, grapefruit, ananas, jablko, bergamot, mandarinka
  - Srdce – dřevo, pižmo, ambra
  - Základ – muškátový oříšek, fialka, jalovec, jasmín, zázvor, whisky, pepř
8. *Moschino Funny (woman)*
  - Hlava – papř, pomeranč, rybíz
  - Srdce – jasmín, fialka, čaj, pivoňka
  - Základ – pižmo, mech, cedr, ambra
9. *Dolce Gabbana Tho One (women)*
  - Hlava – broskev, liči, akord slunce, bergamot, mandarinka
  - Srdce – jasmín, lilie, švestka, ovoce, konvalinka
  - Základ – pižmo, mech, vetiver, ambra
10. *Chloé Roses de Chloé (woman)*
  - Hlava – bergamot
  - Srdce – růže, magnolie
  - Základ – jantar, pižmo
11. *Yves Rocher Naturelle (women)*
  - Hlava – citron, bergamot, aksamitník, zelené jablko
  - Srdce – egyptský jasmín, broskvový květ
  - Základ – ambra, pižmo, cedr z Virginie
12. *Guerlain Aqua Allegoria Pamplelune (woman)*
  - Hlava – grapefruit, bergamot
  - Srdce – listy černého rybízu, neroli, petit grain
  - Základ – pačuli, vanilka
13. *Issey Miyake L'Eau D'Issey (woman)*
  - Hlava – lotos, meloun, růže, fialka, frézie
  - Srdce – lilie, konvalinka
  - Základ – pižmo, ambra, cedr, exotické dřeviny, santalové dřevo, jantar, tuberóza

14. *Wistful AmWay (woman)*
  - Hlava – citron, růžový pepř, malina, brusinka, švestka, jahoda, elemi, limeta
  - Srdce – růže, jasmín, liči, avokádo
  - Základ – bílé pižmo
15. *Ancestry Amway (woman)*
  - Hlava – levandule, tymián, koriandr
  - Srdce – pomerančový květ
  - Základ – cedr, pižmo, ambra
16. *Davidoff Cool Water (woman)*
  - Hlava – kdouloň obecná, lotos, citrusy, meloun, lilie, ananas, rybíz
  - Srdce – jasmín, růže, konvalinka
  - Základ – moruše, vetiver, broskev, kosatec, ambra
17. *Lanvin Eclat D'Arpege (woman)*
  - Hlava – citron, šeřík
  - Srdce – pivoňka, vistárie, osmanthus, broskev, čaj
  - Základ – cedr, ambra, pižmo
18. *Tonino Lamborghini Feroce (man)*
  - Hlava – kardamom, muškátový oříšek, skořice
  - Srdce – vetiver, dubový mech, pačuli
  - Základ – dubové a santalové dřevo
19. *Katy Perry Purr (woman)*
  - Hlava – broskev, gardénie, bambus, jablko
  - Srdce – jasmín, růže, frézie
  - Základ – santalové dřevo, jantar, pižmo, orchidej, kokos, vanilka
20. *Calvin Klein CK One (unisex)*
  - Hlava – kardamom, meloun, ananas, papája, bergamot
  - Srdce – fialka, růže, muškát, jasmín
  - Základ – jantar
21. *DKNY Be Delicious (woman)*
  - Hlava – okurka, grapefruit, magnólie, jablko
  - Srdce – tuberóza, fialka, konvalinka, růže
  - Základ – ambra, santalové dřevo, dřevo, květinové tóny
22. *Charisma No. 5 (woman)*
  - Hlava – zelené tóny, grapefruit, zelené jablko, magnólie, fialka
  - Srdce – fialka, konvalinka, růže, tuberóza
  - Základ – ambra, pižmo, santalové dřevo
23. *Diesel Only The Brave (man)*
  - Hlava – citrusy, citron amalfi, koriandr, mandarinka
  - Srdce – fialka, koriandr, růže, cedr, levandule, labdanum
  - Základ – labdanum, kůže, ambra, benzoin, dřevo, styrač
24. *Guess Seductive (woman)*
  - Hlava – černý rybíz, hruška, bergamot
  - Srdce – jasmín, orris, květ pomerančovníku
  - Základ – vanilka, kadidlo

25. *Givenchy Ange ou Demon (woman)*

- Hlava – šafrán, mateřídouška, mandarinka
- Srdce – lilie, orchidej, ylang-ylang
- Základ – tonka fazole, dubové a palisandrové dřevo, vanilka

26. *Magnificora Simply Happy (woman)*

- Hlava – zelená mandarinka, jahodové listy
- Srdce – lesní jahoda sorbet, karamelový popcorn, růžový jasmín, fialky
- Základ – pačuli, pižmo

27. *Black Suede Touch Avon (woman)*

- Hlava – zázvor
- Srdce – lístky pačuli
- Základ – kašmírové dřevo, mošus

### 3.12 Čištění laboratorního skla

Vzhledem k velmi nízkým koncentracím sledovaných analytů obsažených v reálných vzorcích je kladen velký důraz na čistotu používaného skla. Klasické mycí prostředky se nedají použít, protože by mohlo dojít ke kontaminaci vonnými látkami zčisticích prostředků. Čištění sklabylo proto prováděno následujícím způsobem. Vialky a vzorkovnice bylo nutné nejdříve zbavit popisků a etiket. Posléze byla doba 20 minut vloženy do nádoby s acetonem p.a.a tato nádoba byla umístěna do ultrazvukové lázně. Potom bylo veškeré čištěné laboratorní sklo vyjmuto z acetonu a ponecháno na vzduchu při laboratorní teplotě tak dlouho, dokud úplně neuschlo. Následně bylo toto sklo na dobu minimálně 24 hodin naloženo do kyseliny chromsírové. Po uplynutí této doby bylo důkladně opláchnuto v destilované vodě a potom přeneseno do vypalovací (muflové) pece, zahřáté na teplotu 400 °C, kde bylo ponecháno 2 hodiny.



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace teplotního programu

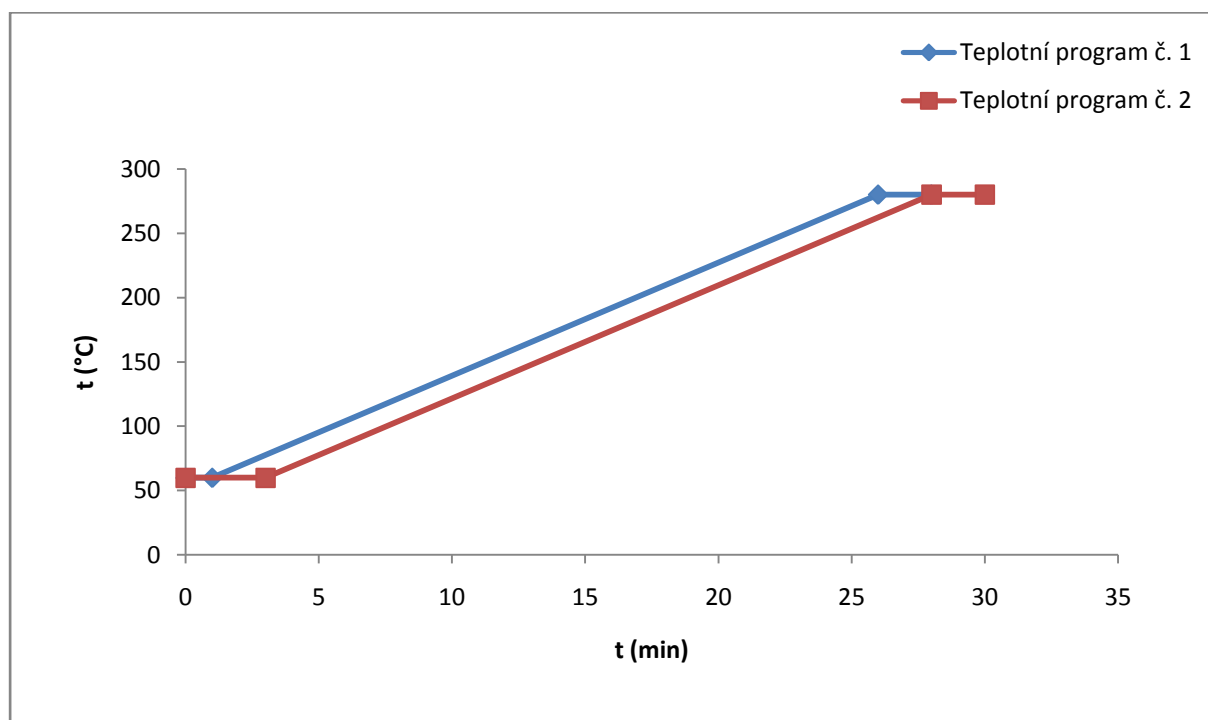
Teplotní program má značný význam pro vlastní separaci, protože při jeho použití musí docházet k co nejlepšímu rozlišení píků sledovaných analytů. Pro optimalizaci bylo použito pět standardů. Jak již bylo prezentováno v předchozí kapitole, u dvou standardů (habanolid, exaltolid) se nepodařilo pomocí optimalizovaného teplotního programu zajistit ideální rozlišení těchto analytů. Protože však analýza probíhala v módu SIM, u kterého byla pro každý standard sledována konkrétní hmota, nebylo nedostatečné rozlišení takovým závažným problémem. V rámci optimalizace byly ověřovány dva teplotní programy, jejichž charakteristiky jsou prezentovány v následujících tabulkách. Pro další analýzy byl zvolen teplotní program č. 2., pomocí kterého došlo k lepšímu rozlišení píků a také doba trvání analýzy byla přiměřená. Chromatogram analýzy s využitím teplotního programu č. 2 je uveden na obrázku č. 15; retenční časy odečtené z tohoto chromatogramu jsou prezentovány v tabulce č. 28.

Tabulka č. 26: Teplotní program č. 1

	Teplotní krok (°C/min)	Teplota (°C)	Izoterma (min)
Počátek	-	60	1
Rampa	10	280	2

Tabulka č. 27: Teplotní program č. 2

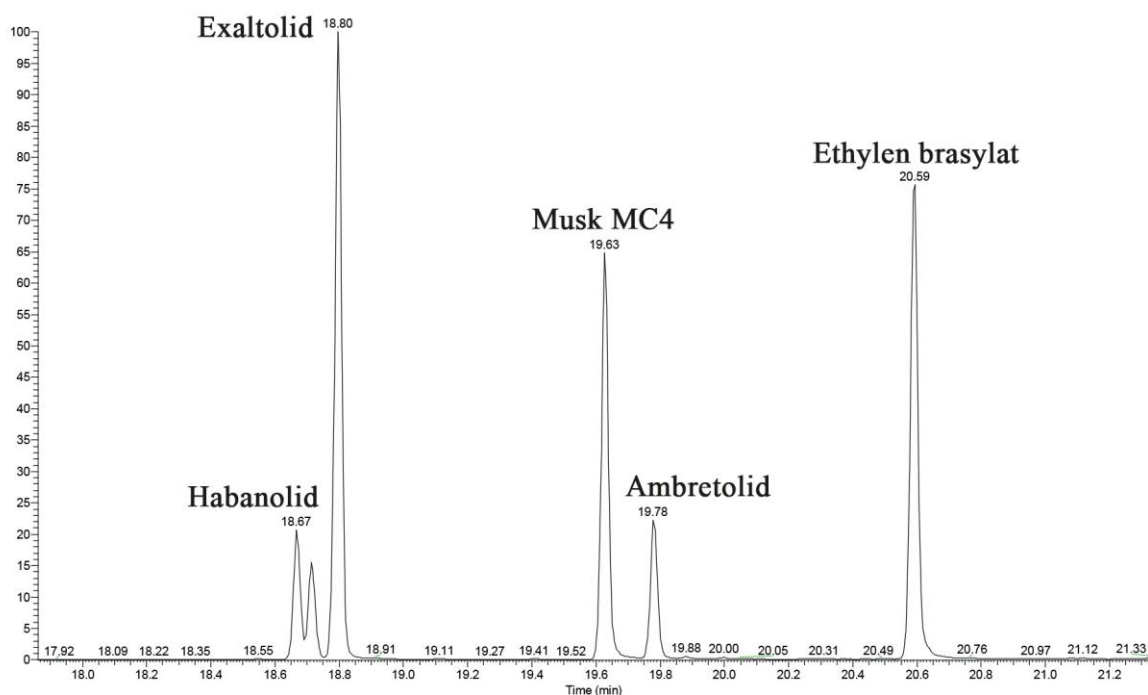
	Teplotní krok (°C/min)	Teplota (°C)	Izoterma (min)
Počátek	-	60	3
Rampa	10	280	2



Graf č. 1: Graf závislosti teploty na čase u jednotlivých teplotních programů

Tabulka č. 28: Retenční časy standardů jednotlivých musk sloučenin

Standard	Retenční čas (min)
Habanolid	18,67-18,80
Exaltolid	18,80
Musk MC4	19,63
Ambretolid	19,78
Ethylen brasylat	20,59



Obrázek č. 15: Chromatogram směšného standardu při kapalném nástřiku a teplotním programu č. 2

## 4.2 Optimalizace SPME

### 4.2.1 Aktivace vláken

Vzhledem k tomu, že použítá vlákna byla nová a dosud nepoužitá, bylo nutné před samotnou optimalizací podmínek SPME nutně provést jejich aktivaci. Postup aktivace SPME vláken spočívá v zasunutí vybraného vlákna v SPME držáku do dávkovacího zařízení plynového chromatografu, který je vyhřátý na potřebnou teplotu. Vlákno je zde ponecháno potřebnou dobu při stejných podmínkách. Podmínky aktivace jednotlivých vláken jsou prezentovány v tabulce č. 29.

Tabulka č. 29: Přehled testovaných SPME vláken

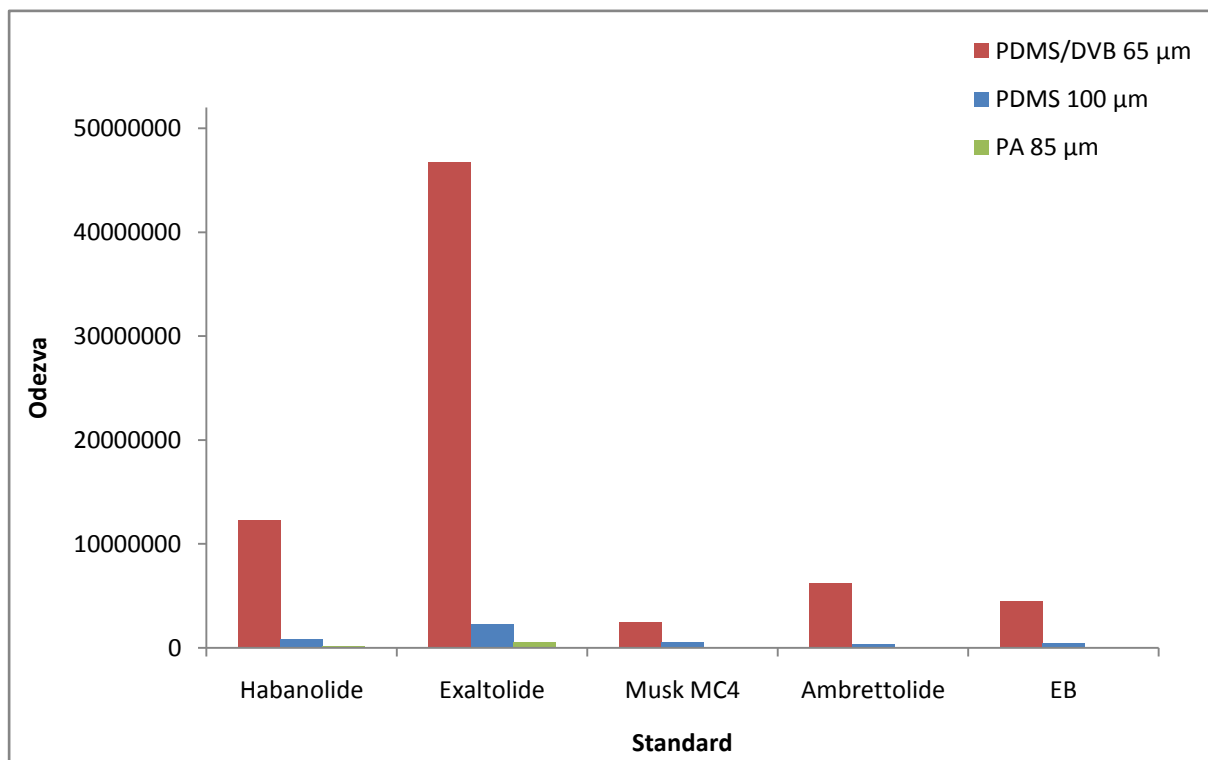
Vlákno	Barva	Tloušťka	pH	Maximální teplota (°C)	Doporučená pracovní teplota (°C)	Teplota aktivace (°C)	Doba aktivace (hod)
PDMS/DVB	Modré	65 $\mu\text{m}$	2-11	200	200-270	250	0,5
PDMS	Červené	100 $\mu\text{m}$	2-10	280	200-280	250	0,5
PA	Bílé	85 $\mu\text{m}$	2-11	320	220-300	280	1

#### 4.2.2 Výběr vlákna

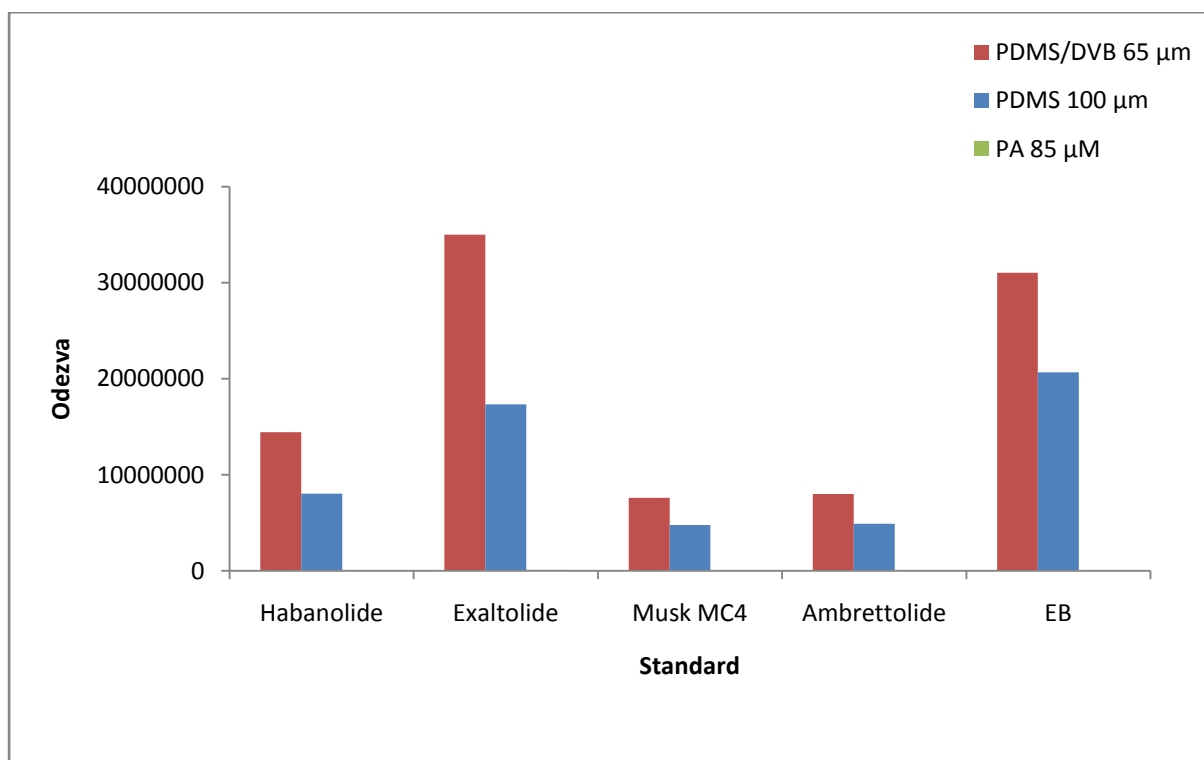
Byla posuzována vhodnost použití celkem tři druhů vláken, která se od sebe lišila svoji stacionární fází a její tloušťkou, tj. PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  (modré), PDMS 100  $\mu\text{m}$  (červené) a PA 85  $\mu\text{m}$  (bílé). Pro každé vlákno bylo testováno provedení head-space extrakce (HS-SPME), dále přímé ponoření (DI-SPME) a HS-SPME s přidavkem 3 g NaCl (vliv vysolování).

Nejlepších výsledků při head-space extrakci (HS-SPME), přímé extrakci (DI-SPME) i head-space extrakci s přidavkem soli, bylo dosaženo s použitím vlákna PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$ . Velmi dobré výsledky byly rovněž získány s vláknem PDMS 100  $\mu\text{m}$ , a to v případě přímé extrakce a také head-space extrakce s přidavkem soli. Vlákno PA 85  $\mu\text{m}$  však na rozdíl od vláken PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  a PDMS 100  $\mu\text{m}$  nám nevyhovovalo, protože při jeho použití byly výsledky analýz nedostačující. Prostřednictvím grafu č. 5 bylo provedeno porovnání obou módů extrakce, tj. HS-SPME a DI-SPME a také vlivu vysolování pro vlákno PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$ , které bylo v porovnání s ostatními testovanými vlákny nejlepší. Rovněž můžeme říci, že i mód přímého ponoření (DI-SPME) přispěl k získání nejlepších výsledků. Tento typ extrakce však není vhodný z důvodu značného znečištění vzorků odpadní vody, zejména odpadní vody odebrané na přítoku, kde se může značnou měrou projevit matriční efekt. Podobné výsledky však poskytla také aplikace módu head-space, která v porovnání s předchozím módem umožňuje při velmi dobré výtěžnosti detekovat všechny sledované analyty a vliv matričního efektu je zde zanedbatelný. Extrakce s přidavkem solin měla na sorpci analytů pozitivní vliv, a proto nebyla dále používána.

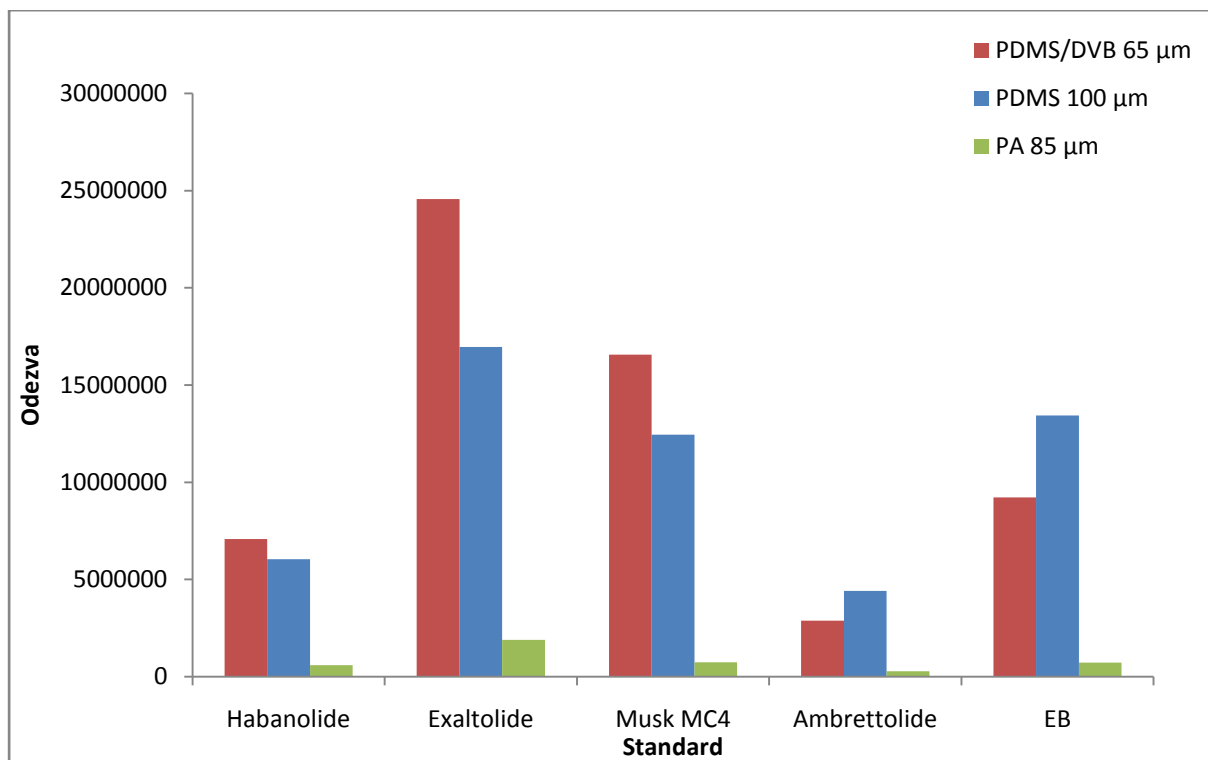
Výsledky měření jsou pro přehlednost zpracovány do grafu č. 2, 3 a 4. Porovnání ověřovaných extrakčních módů HS-SPME, DI-SPME a HS-SPME s přidavkem soli (vysolování) je prezentováno pomocí grafu č. 5.



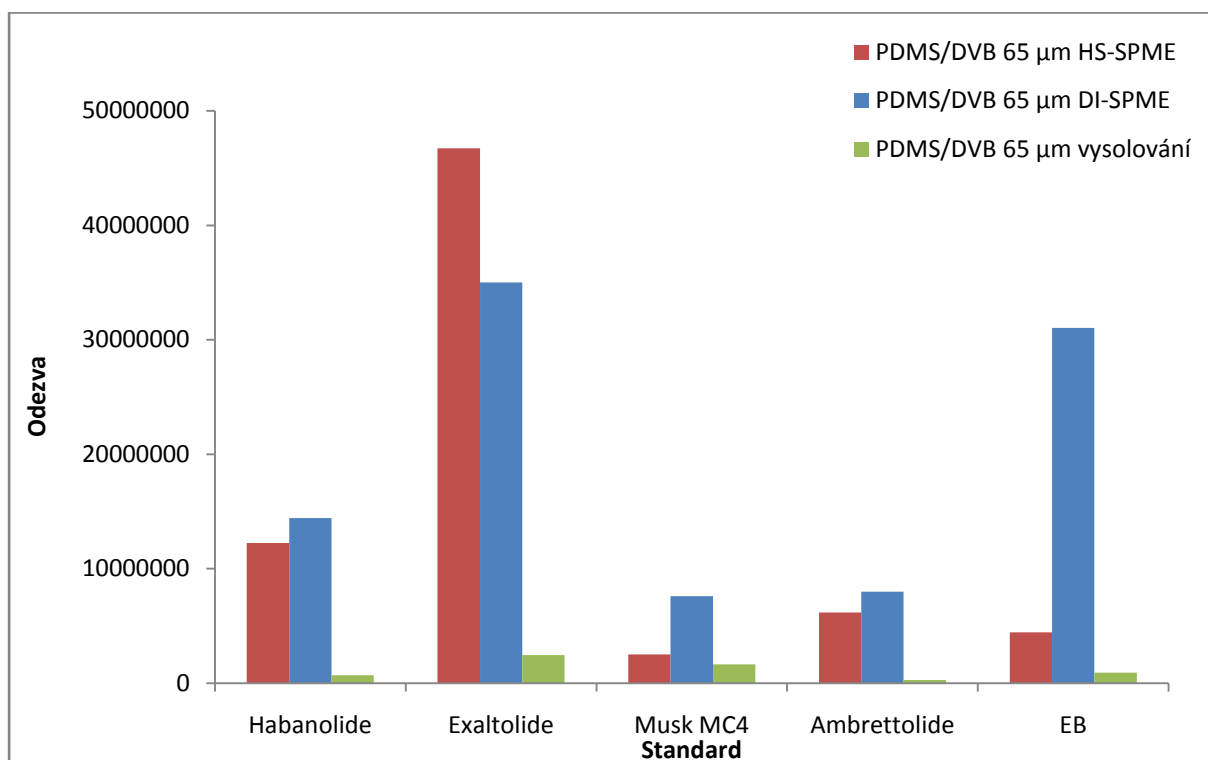
Graf č. 2: Porovnání HS-SPME pro všechny typy vláken



Graf č. 3: Porovnání DI-SPME pro všechny typy vláken



Graf č. 4: Porovnání vlivu vysolování pro všechny typy vláken



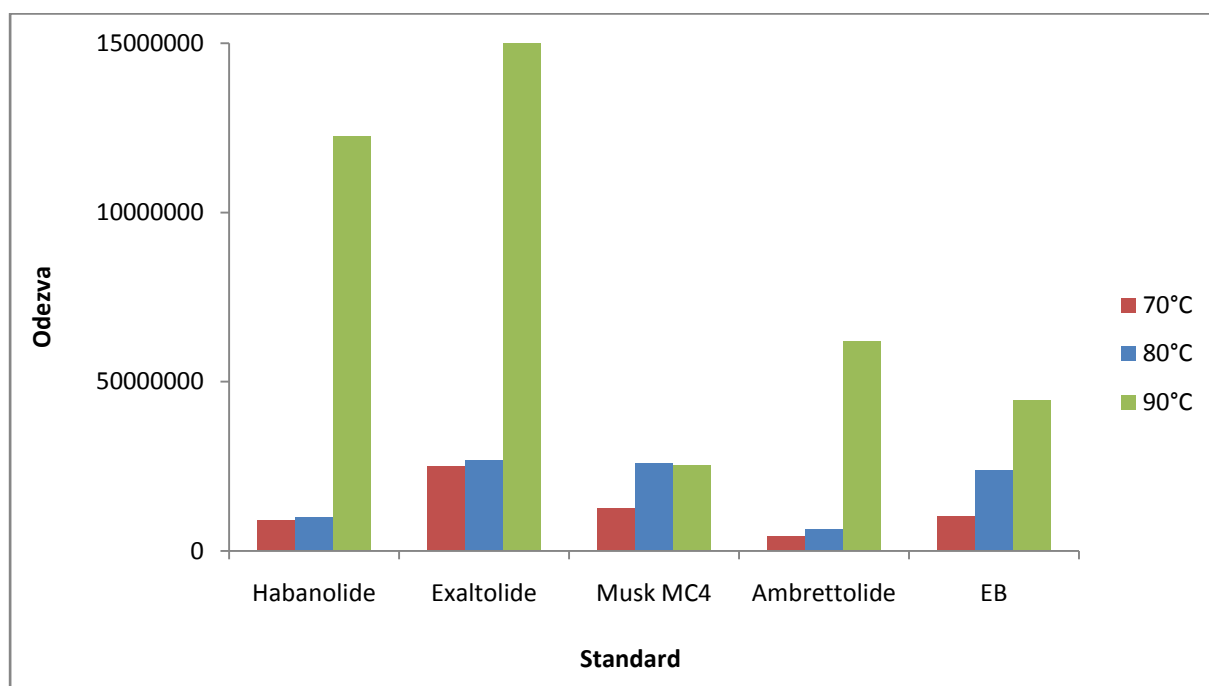
Graf č. 5: Porovnání HS-SPME, DI-SPME a vlivu vysolování pro vlákno PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$

### 4.2.3 Vliv teploty sorpce

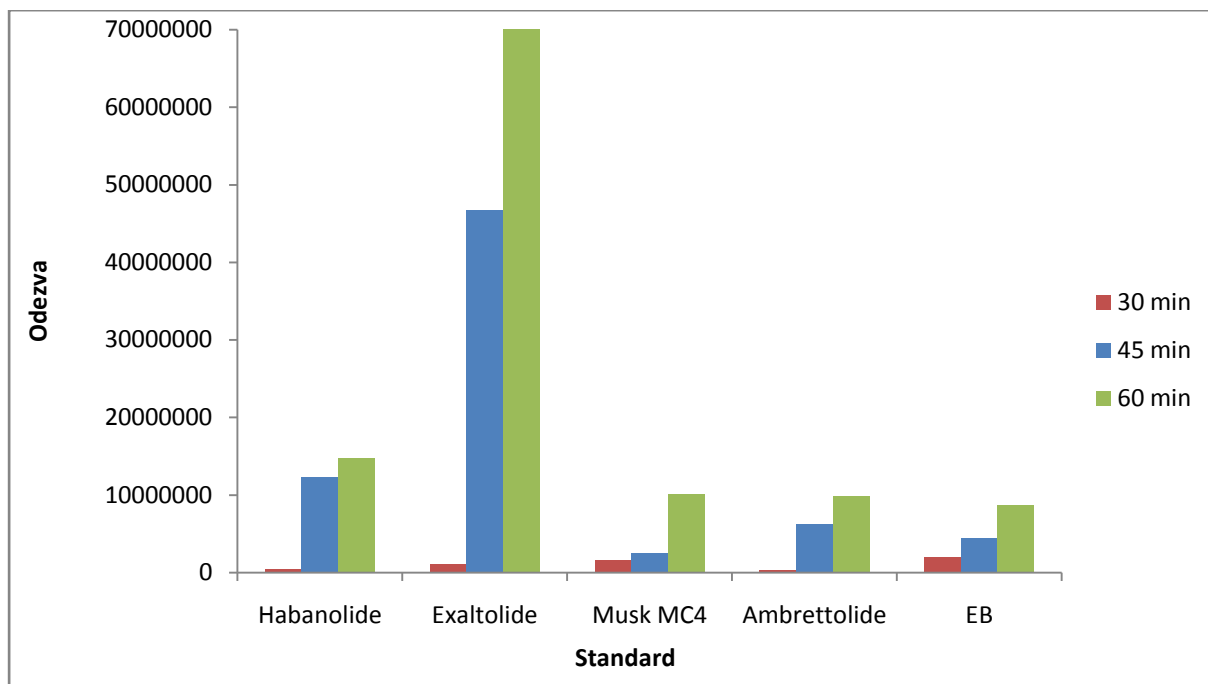
Za účelem zjištění optimální teploty sorpce pro vlákno PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  byla při třech různých teplotách, tj. 70, 80 a 90  $^{\circ}\text{C}$ , provedena veškerá potřebná měření. Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že rostoucí teplotou roste zároveň účinnost mikroextrakce sledovaných analytů. Jako optimální byla proto zvolena teplota 90  $^{\circ}\text{C}$ , která poskytovala nejvyšší odezvu. Výsledky měření jsou znázorněny v grafu č. 6.

### 4.2.4 Doba sorpce

Dalším optimalizovaným parametrem měření pro PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  (modré) vlákno byla doba sorpce analytů. Z grafické závislosti výsledků získaných při optimalizaci doby sorpce vyplývá, že s rostoucím expozičním časem roste rovněž odezva jednotlivých analytů. Při sorpci trvající 45 minut byla odezva dostatečná, a proto byla vybrána jako součást dále použitého optimálního postupu preanalytické metody. Výsledky optimalizace tohoto parametru jsou prezentovány v grafu č. 7. Při době 60 minut byly sice získány vyšší odezvy, avšak z hlediska vhodnosti aplikace pro všechny sledované analyty byla zvolena kratší doba sorpce, tj. 45 minut.



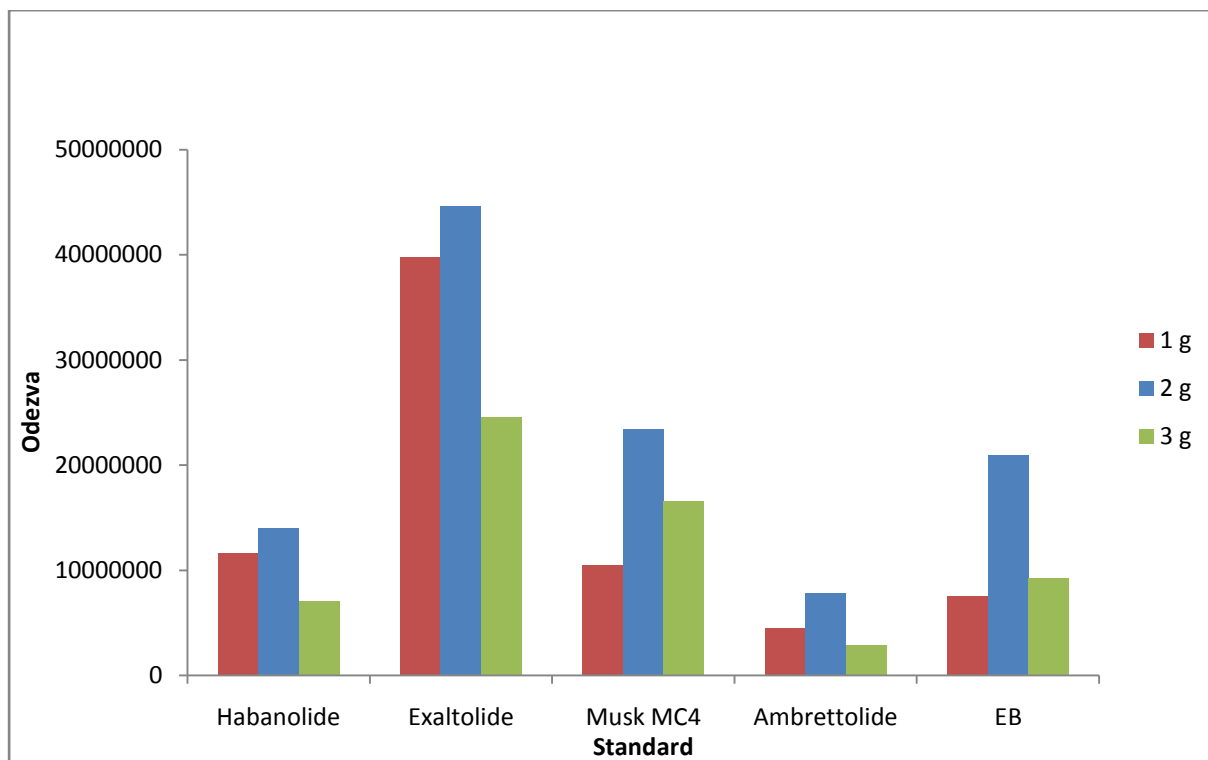
Graf č. 6: Graf závislosti odezvy sledovaných analytů na teplotě sorpce



Graf č. 7: Graf závislosti odezvy sledovaných analytů na době sorpce

#### 4.2.5 Množství přidané soli (vysolování)

Posledním sledovaným parametrem pro PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  (modré) vlákno bylo množství přidané soli (NaCl). Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.6.6, byly ověřovány tři přídavky soli, a to 1, 2 a 3 g NaCl. Vyšší odezva byla dosažena po přídavku 2 g soli, v porovnání s přídavkem 3 g, které byly aplikovány při optimalizaci vlivu vysolování pro všechna testovaná vlákna, jak již bylo prezentováno v kapitole 4.2.2. V porovnání s módem head-space (HS-SPME), který byl vybrán jako optimální pro sledované analyty, nedošlo k výraznému zvýšení odezvy jednotlivých sledovaných analytů, a proto nebyl přídavek soli aplikován a mikroextrakce byla provedena v módu head-space (HS-SPME). Výsledky optimalizace přídavku soli jsou zpracovány do grafu č. 8:



Graf č. 8: Graf závislosti odezvy sledovaných analytů na množství přidané soli

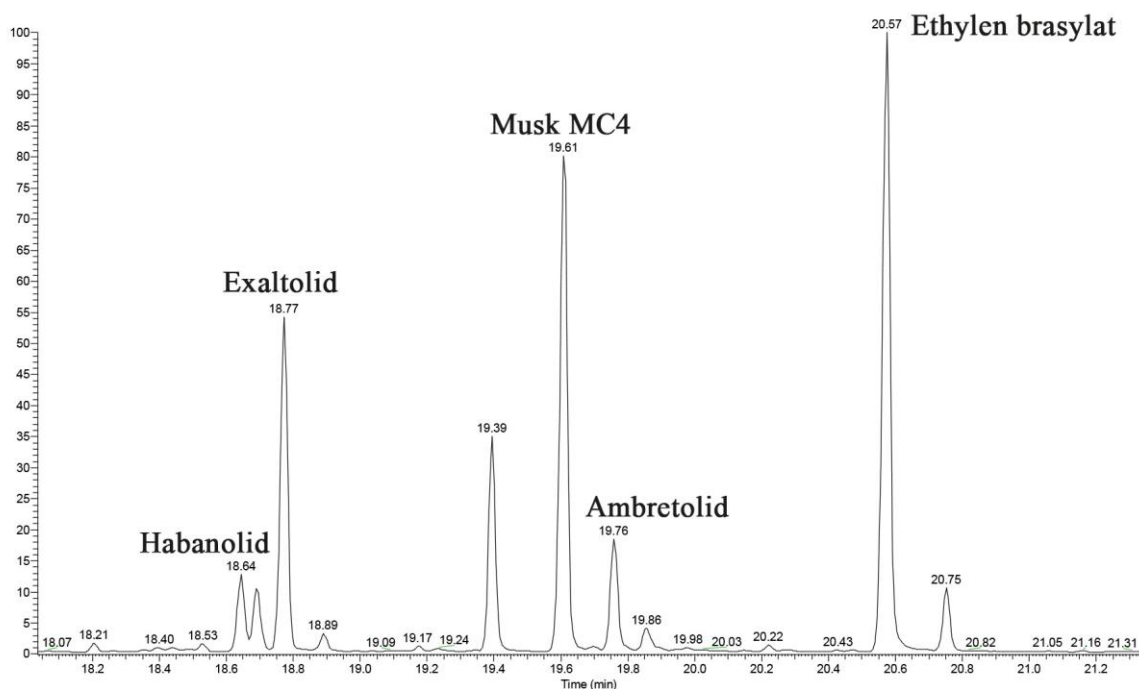
#### 4.2.6 Optimalizovaná metoda SPME

V následující tabulce č. 30 jsou prezentovány parametry optimalizované izolační techniky SPME, která byla následně použita i pro analýzu reálných vzorků odpadních vod.

Tabulka č. 30: Optimalizované podmínky SPME

<b>Typ vláknů:</b>	65 $\mu\text{m}$ PDMS/DVB (modré)
<b>Provedení:</b>	Head-space
<b>Teplota sorpce:</b>	90 $^{\circ}\text{C}$
<b>Doba ustálení rovnováhy:</b>	5 min
<b>Doba expozice vláknů:</b>	45 min
<b>Objem vialky:</b>	42 ml
<b>Objem vzorku:</b>	10 ml
<b>Rychlost míchání:</b>	750 $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$





Obrázek č. 16: Chromatogram směsného standardu při použití optimalizované SPME metody a teplotním programu č. 2

### 4.3 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

Stanovení meze (limitu) detekce (LOD) a meze (limitu) stanovitelnosti (LOQ) bylo provedeno v souladu s postupem uvedeným v kapitole 4.3. V tabulce č. 31 jsou uvedeny směrnice příslušných kalibračních závislostí jednotlivých standardů zobrazených na grafech č. 20-24, které jsou součástí přílohy č. 2. Velikost šumu byla zjišťována z chromatogramu, a to pro nejnižší bod kalibrační přímky. Jeho hodnoty jsou, spolu s vypočítanými limity detekce a limity stanovitelnosti, prezentovány v tabulce č. 31. Na základě hodnot zpracovaných do této tabulky lze konstatovat, že limity detekce a limity stanovitelnosti se pohybují řádově v rozmezí  $10^{-1}$  až  $10^{-2}$   $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Nejvyšší mez detekce byla vypočtena pro exaltolid ( $0,128 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ); u ostatních analytů byly LOD o jeden řád nižší.

Tabulka č. 31: Limity detekce a stanovitelnosti

Standard	Šum (h)	Směrnice (k)	LOD ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
Habanolid	7,97	830,09	0,029	0,096
Exaltolid	18,92	442,35	0,128	0,428
Ambretolid	3,32	435,74	0,023	0,076
Musk MC4	1,99	225,8	0,026	0,088
Ethylen brasylat	6,83	657,26	0,031	0,104

### 4.4 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost lze vyjádřit jako směrodatnou odchylku, kterou lze vypočítat na základě provedení analýzy reálného vzorku s přidávkou standardu. Reálným vzorkem byla v našem případě odpadní voda z přítoku na ČOV, do které bylo přidáno  $10 \mu\text{l}$  směsného roztoku standardu o koncentraci analytů  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Měření bylo provedeno pětikrát a následně byla ze získaných výsledků vypočtena relativní směrodatná odchylka  $S_R$ . Z tabulky č. 32 uvažující relativní směrodatné odchylky lze vyčíst, že tyto hodnoty se pro jednotlivé analyty pohybují v rozmezí od 1,6 do 9,7 %. Pokud tyto relativní

směrodatné odchytky porovnáme s literaturou, tak lze konstatovat, že vyšší hodnoty této odchytky nejsou u techniky SPME nijak neobvyklé.

Tabulka č. 32: Relativní směrodatné odchytky pro vzorek odpadní vody

Standard	S <sub>R</sub> (%)
Habanolid	2,36
Exaltolid	9,7
Ambretolid	ND
Musk MC4	ND
Ethylen brasylat	1,76

Pozn.: ND-nedetkováno

## 4.5 Vyhodnocení reálných vzorků odpadních vod

Všechny reálné vzorky byly odebírány jako slévané 24 hodinové vzorky odebírané na přítoku a na odtoku ČOV Brno-Modřice, ČOV Lednice a ČOV Mikulov. Pomocí optimalizované SPME metody byly z těchto reálných vzorků izolovány stanovované analyty, které byly potom zjišťovány pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Pro kvantifikaci analytů ve vzorcích byla použita metoda standardního přídatku.

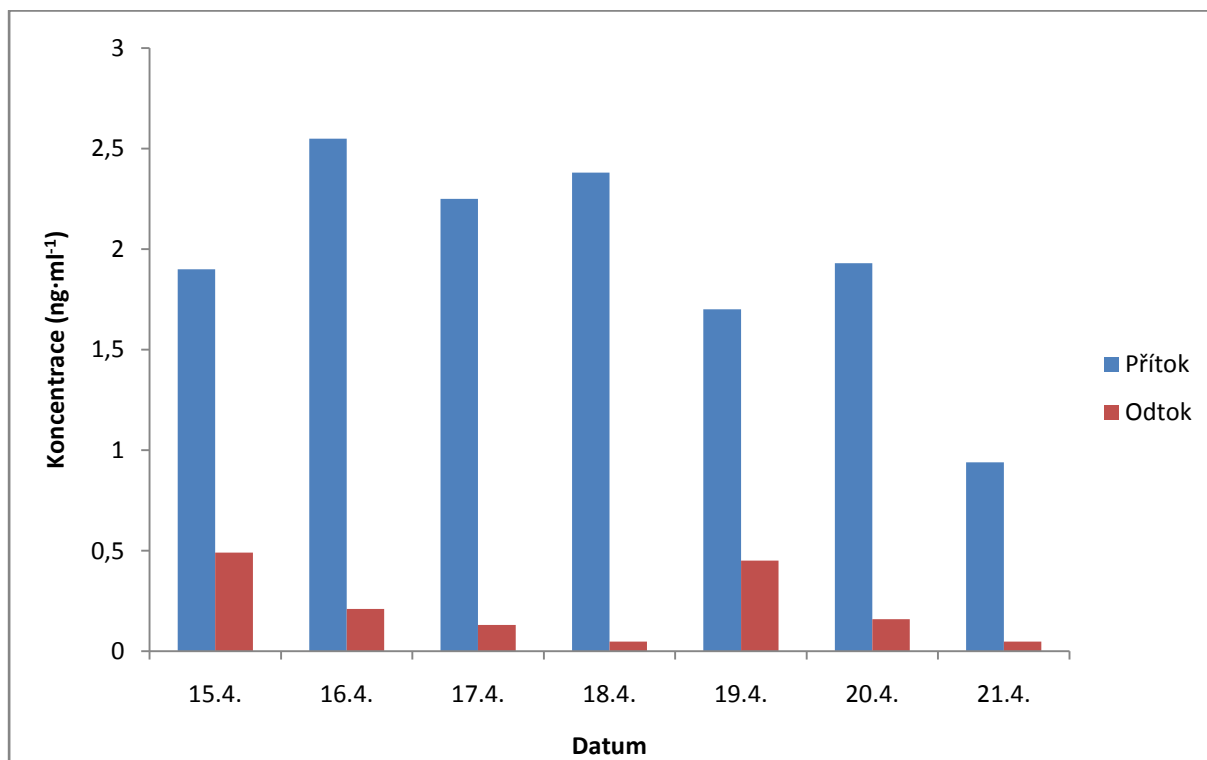
### 4.5.1 Čistírna odpadních vod Brno-Modřice

Vzorky z ČOV Brno-Modřice byly odebírány po dobu jednoho týdnu v termínu od 15.4. do 22. 4.2015. Jak vyplývá z tabulky č. 33, na přítoku ČOV Brno-Modřice byly identifikovány tři musk sloučeniny, a to habanolid, exaltolid a ethylen brasylat. Habanolid a exaltolid byly detekovány na přítoku každý den, zatímco ethylen brasylat pouze během prvních tří dnů. Na odtoku z této ČOV byl však prokázán pouze habanolid, přičemž ve dvou případech byly jeho koncentrace pod mezí stanovitelnosti. Exaltolid a ethylen brasylat nebyly na odtoku zjištěny vůbec, případně jejich koncentrace se nacházely pod mezí stanovitelnosti. Další dvě posuzované musk sloučeniny, tj. ambretolid a musk MC4, nebyly detekovány ani jeden den. Největší koncentrace byly po celou dobu této cílené depistážekvantifikovány u habanolidu a exaltolidu; nejvyšší hodnoty habanolidu byly prokázány v odpadní vodě ze dne 16. 4. 2015 ( $2,55 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a 18.4.2015 ( $2,25 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), zatímco u exaltolidu to bylo v odpadní vodě ze dne 15.4. ( $1,87 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a 18.4. 2015 ( $1,94 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Významné zastoupení habanolidu, exaltolidu a částečně také ethylen brasylatu lze odůvodnit tak, že tyto analyty bývají často součástí kosmetických i drogistických produktů obsahujících vonné látky (viz kapitola 4.6.1). Podle očekávání byly hodnoty na odtoku nižší než na přítoku. Zjištěné koncentrace sledovaných analytů na přítoku a odtoku z ČOV Brno-Modřice jsou prezentovány prostřednictvím grafů č. 9-11.

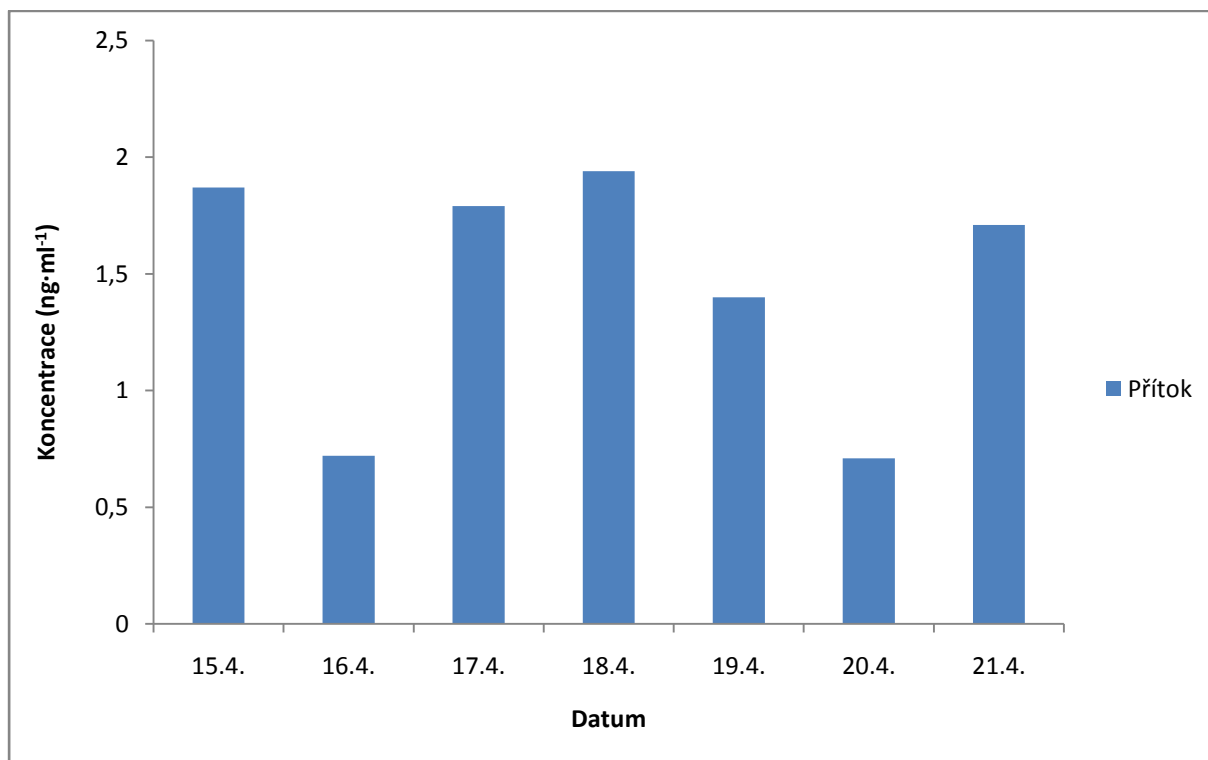
Tabulka č. 33: Výsledné koncentrace naměřené na přítoku a odtoku ČOV Brno-Modřice

Standard	Místo odběru	Výsledná koncentrace (ng·ml <sup>-1</sup> )						
		15.4.	16.4.	17.4.	18.4.	19.4.	20.4.	21.4.
Habanolid	Přítok	1,90	2,55	2,25	2,38	1,70	1,93	0,94
	Odtok	0,49	0,21	0,13	<LOQ	0,45	0,16	<LOQ
Exaltolid	Přítok	1,87	0,72	1,79	1,94	1,40	0,71	1,71
	Odtok	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	<LOQ	<LOQ
Ambretolid	Přítok	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Musk MC4	Přítok	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ethylen brasylat	Přítok	0,39	0,24	0,17	ND	ND	ND	ND
	Odtok	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND

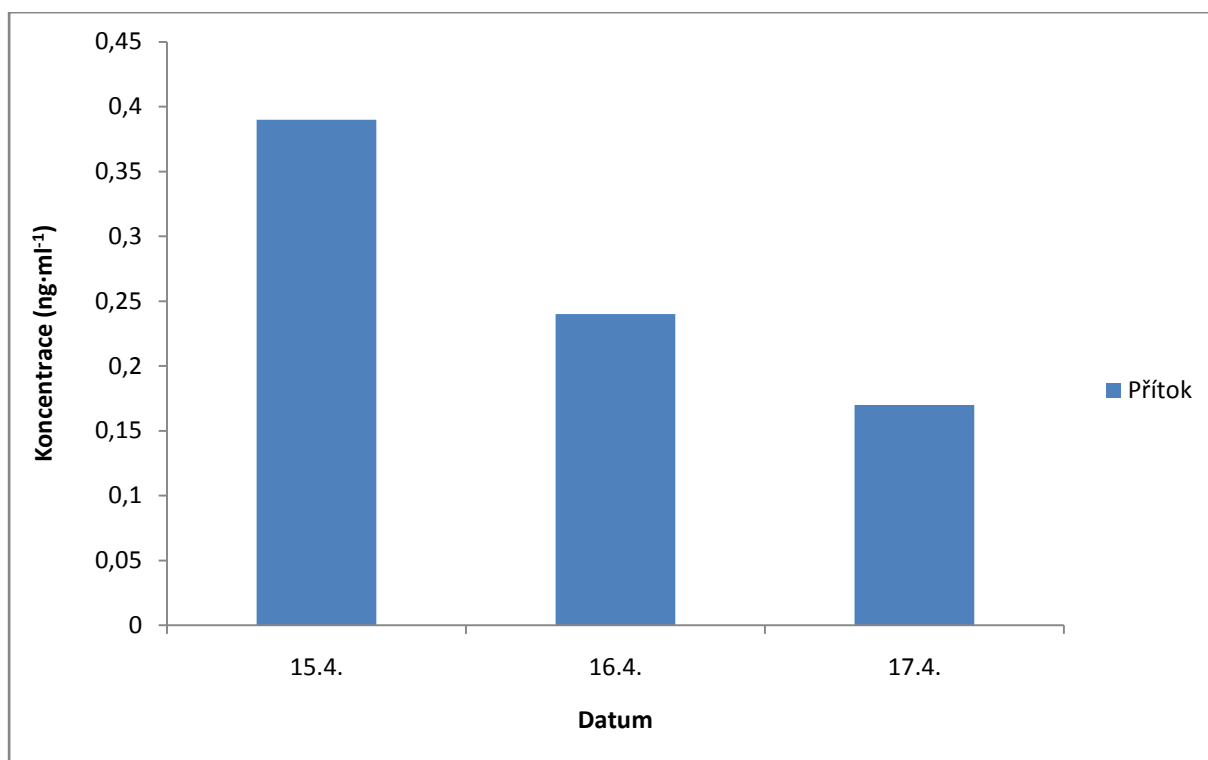
Pozn.: ND - nedetekováno; <LOQ - pod mezí stanovitelnosti



Graf č. 9: Koncentrace habanolidu na přítoku a odtoku ČOV Brno-Modřice



Graf č. 10: Koncentrace exaltolidu na přítoku ČOV Brno Modřice (odtok <LOQ)



Graf č. 11: Koncentrace ethylen brasylatu na přítoku ČOV Brno Modřice (odtok <LOQ)

#### 4.5.2 Porovnání analýz odpadní vody odebrané ze všech čistíren odpadních vod

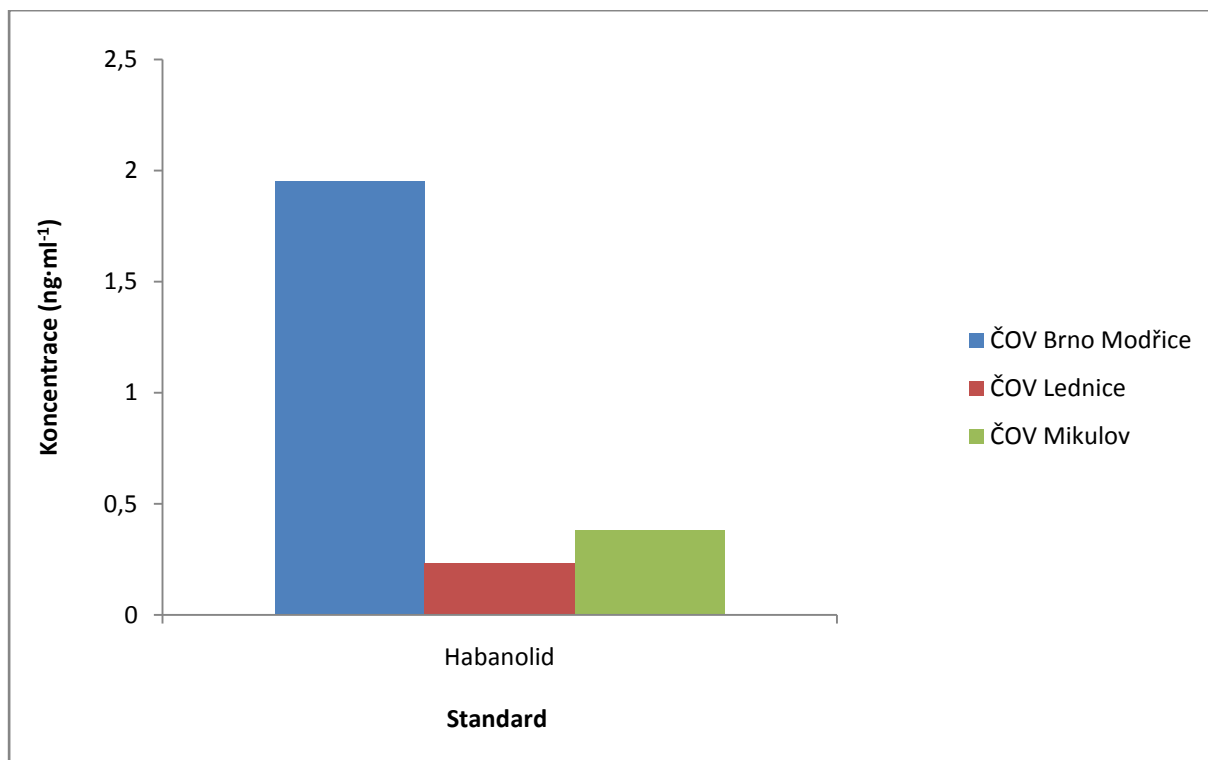
Přítomnost stejných analytů byla zjišťována kromě odpadní vody z Brna-Modřic také v odpadní vodě z Lednice a z Mikulova. Koncentrace prokázané v odpadní vodě na přítoku a na odtoku ČOV Lednice a Mikulov byly porovnány s koncentracemi naměřenými v odpadní vodě z ČOV Brno-Modřice. Hodnoty koncentrací jednotlivých analytů zjištěných v odpadní vodě z ČOV Brno-Modřice byly vypočteny jako průměrné koncentrace analytů za celé hodnocené období. Odpadní voda z ČOV Lednice a Mikulov byla odebírána dne 17.4.2015, kvantifikované koncentrace jednotlivých analytů použité k porovnání analýz ze všech tří ČOV byly brány právě z tohoto odběru vody. Koncentrace jednotlivých analytů v odpadní vodě z ČOV Brno-Modřice, Lednice a Mikulov jsou prezentovány v tabulce č. 34.

Ze sledovaných makrocyclických musk sloučenin byl v odpadní vodě na přítoku do ČOV Lednice a Mikulov detekován pouze habanolid. Koncentrace habanolidu na přítoku ČOV Lednice byla  $0,23 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , na odtoku z ČOV nebyl tento analyt detekován vůbec. Na přítoku ČOV Mikulov byl habanolid detekován v koncentraci  $0,38 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , přičemž na odtoku z této ČOV byla jeho hodnota pod mezí stanovitelnosti. Koncentrace exaltolidu bylav obou případech (ČOV Lednice a Mikulov) na přítoku pod mezí stanovitelnosti, na odtoku však nebyl vůbec detekován. Ostatní posuzované makrocyclické sloučeniny (ambretolid, musk MC4 a ethylen brasylat) nebyly v odpadní vodě identifikovány ani na jedné ČOV. Koncentrace habanolidu, která byla zjištěna v odpadní vodě z ČOV Brno-Modřice, byla v porovnání s odpadní vodou z ČOV Lednice a Mikulov mnohonásobně větší. Město Mikulov i obec Lednice však mají průmyslově zemědělský charakter, se zaměřením na pěstování vinné révy (výroba vína) a služby turistům (turistický ruch). Vzhledem k podstatně nižšímu počtu obyvatel však nelze očekávat vyšší spotřebu produktů osobní péče, a to především parfémů. Kromě toho není v těchto aglomeracích situován žádný větší průmyslový podnik, který by vyráběl produkty s obsahem syntetických musk sloučenin, a proto nebylo překvapující závěrečné zhodnocení, že se, a to až na habanolid, v odpadní vodě odebrané z těchto dvou ČOV sledované analyty nevyskytovaly. Město Brno má velký počet ekvivalentních obyvatel (380 000 obyvatel) a sídlí zde řada průmyslových firem (kosmetické závody), a proto lze v odpadních vodách předpokládat vyšší koncentrace makrocyclických sloučenin. Také se musí počítat s tím, že na ČOV Brno-Modřice je napojena celá řada dalších obytných i průmyslových aglomerací. Porovnání koncentrací habanolidu na přítoku ČOV Brno-Modřice, Lednice a Mikulov je znázorněno v grafu č. 12.

Tabulka č. 34: Výsledné koncentrace zjištěné na přítoku a na odtoku všech tří ČOV

Standard	Místo odběru	Výsledná koncentrace ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )		
		ČOV Lednice	ČOV Mikulov	ČOV Brno-Modřice
Habanolid	Přítok	0,23	0,38	1,93
	Odtok	ND	<LOQ	0,23
Exaltolid	Přítok	<LOQ	<LOQ	1,45
	Odtok	ND	ND	<LOQ
Ambretolid	Přítok	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND
Musk MC4	Přítok	ND	ND	ND
	Odtok	ND	ND	ND
Ethylen brasylat	Přítok	ND	ND	0,17
	Odtok	ND	ND	<LOQ

Pozn.: ND - nedetekováno; <LOQ - pod mezí stanovitelnosti



Graf č. 12: Porovnání koncentrací habanolidu na přítoku ČOV Brno-Modřice, Lednice a Mikulov

#### 4.6 Účinnost čistícího procesu

Účinnost čistícího procesu na ČOV Brno-Modřice lze vyhodnotit na základě porovnání koncentrací analytů na přítoku a odtoku dle rovnice (6). Vypočtené hodnoty účinnosti jsou prezentovány v tabulce č. 35.

$$U = \left(1 - \frac{c_o}{c_p}\right) \cdot 100\% \quad (6)$$

Kde

U ....účinnost čistícího procesu

$c_o$  .... koncentrace analytu na odtoku ČOV (ng·ml<sup>-1</sup>)

$c_p$  .... koncentrace analytu na přítoku ČOV (ng·ml<sup>-1</sup>)

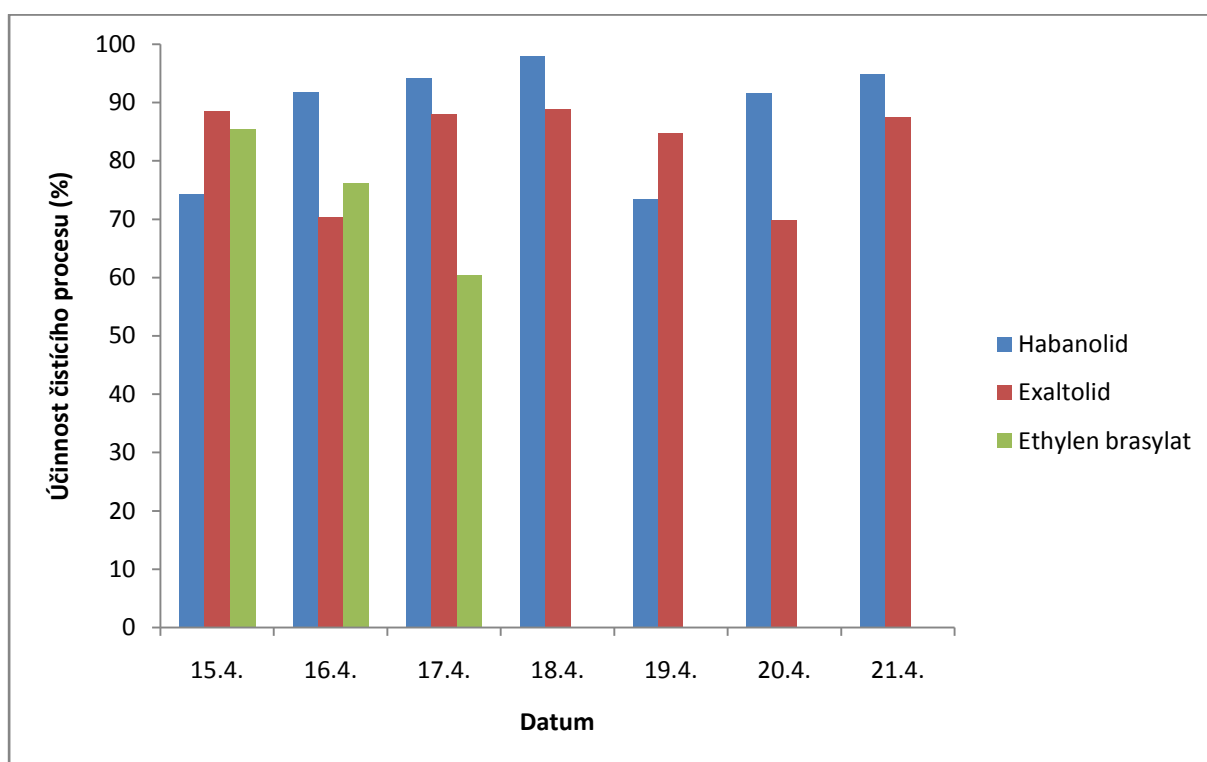
Na základě naměřených koncentrací byla vypočtena účinnost čistícího procesu, která vyjadřuje odstranění sledovaných analytů z odpadní vody. Výsledky byly zpracovány do tabulky č. 35. Z tabulky vyplývá, že čistícím procesem aplikovaným na ČOV Brno-Modřice bylo odstraněno průměrně 88,33 % habanolidu. Nejhorší byl z odpadní vody odstraněn ethylen brasylat (průměrně 76,03 %). Účinnost odstranění exaltolidu z odpadní vody odebrané na ČOV Brno-Modřice byla v průměru 82,56 %. Protože ostatní makrocyclické musk sloučeniny nebyly na této ČOV detekovány, nebyla pro ně vypočtena účinnost čistícího procesu. Účinnost eliminace habanolidu, exaltolidu a ethylen brasylatu z odpadní vody ČOV Brno-Modřice v jednotlivých dnech odběru je prezentována prostřednictvím grafu č. 13. V tabulce č. 36 jsou prezentovány vypočtené účinnosti čistících procesů na ČOV Brno-Modřice, Lednice a Mikulov. U odpadní vody odebrané z ČOV Lednice a ČOV Mikulov byla účinnost čistícího procesu vypočtena pouze pro habanolid, protože exaltolid se v odpadní vodě z těchto ČOV nacházel pod mezí stanovitelnosti a ostatní sledované analyty nebyly detekovány. Jediný kvantifikovaný analyt, tj. habanolid, byl z odpadní vody

ČOV Lednice odstraněno 79,19 % a z ČOV Mikulov z 87,37 %. Účinnosti čisticího procesu, které byly vypočtené pro habanolid na jednotlivých ČOV, jsou graficky zpracovány do grafu č. 14.

Tabulka č. 35: Vypočtené účinnosti čisticího procesu na ČOV Brno-Modřice

Standard	Účinnost čisticího procesu (%)							Průměr
	15.4.	16.4.	17.4.	18.4.	19.4.	20.4.	21.4.	
Habanolid	74,21	91,76	94,22	97,98	73,53	91,71	94,89	88,33
Exaltolid	88,55	70,28	88,04	88,97	84,71	69,86	87,49	82,56
Musk MC4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ambretolid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ethylen brasylat	85,38	76,25	60,47	ND	ND	ND	ND	76,03

Pozn.: ND - nedetekováno

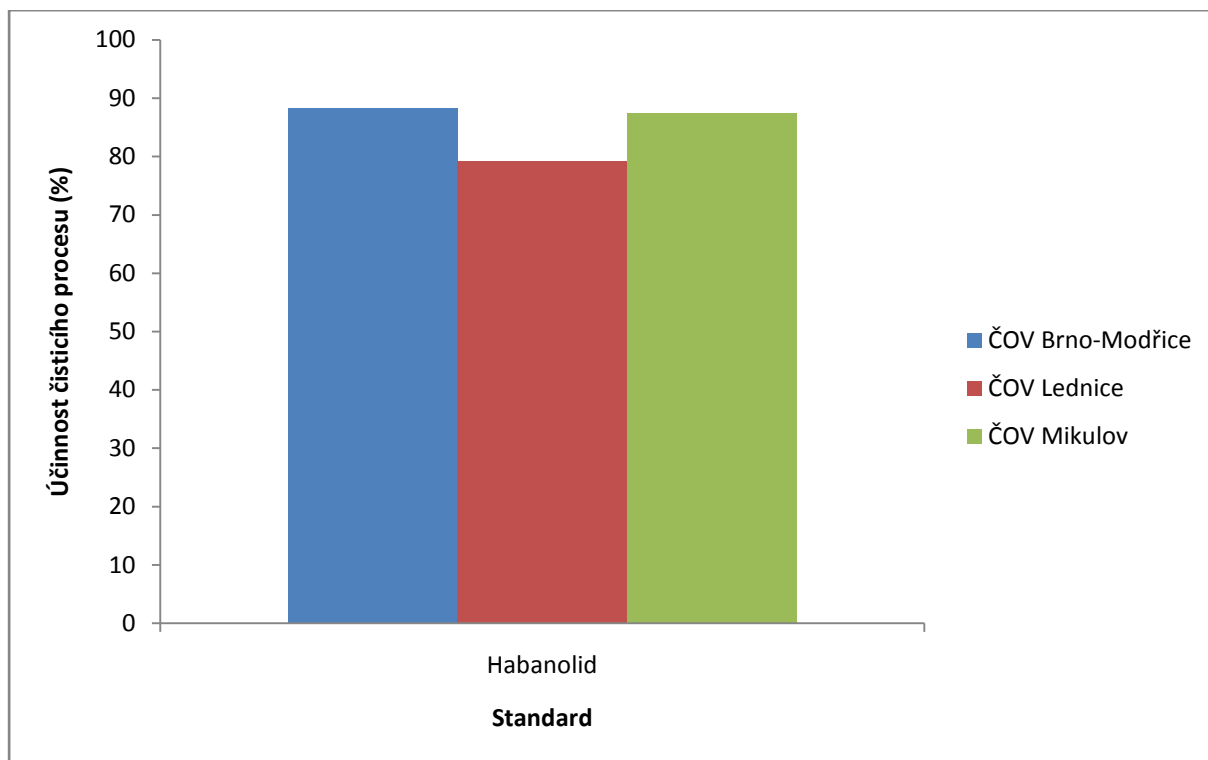


Graf č. 13: Účinnost čisticího procesu na ČOV Brno-Modřice za hodnocené období

Tabulka č. 36: Vypočtené účinnosti čisticího procesu na ČOV Brno-Modřice, Lednice a Mikulov

Standard	Účinnost čisticího procesu ČOV Brno-Modřice (%)	Účinnost čisticího procesu ČOV Lednice (%)	Účinnost čisticího procesu ČOV Mikulov (%)
Habanolid	88,33	79,13	87,37
Exaltolid	82,56	<LOQ	<LOQ
Musk MC4	ND	ND	ND
Ambretolid	ND	ND	ND
Ethylen brasylat	76,03	ND	ND

Pozn.: ND - nedetekováno; <LOQ - pod mezí stanovitelnosti



Graf č. 14: Porovnání účinnosti čistícího procesu na vybraných ČOV

#### 4.6.1 Produkty osobní péče (parfémy)

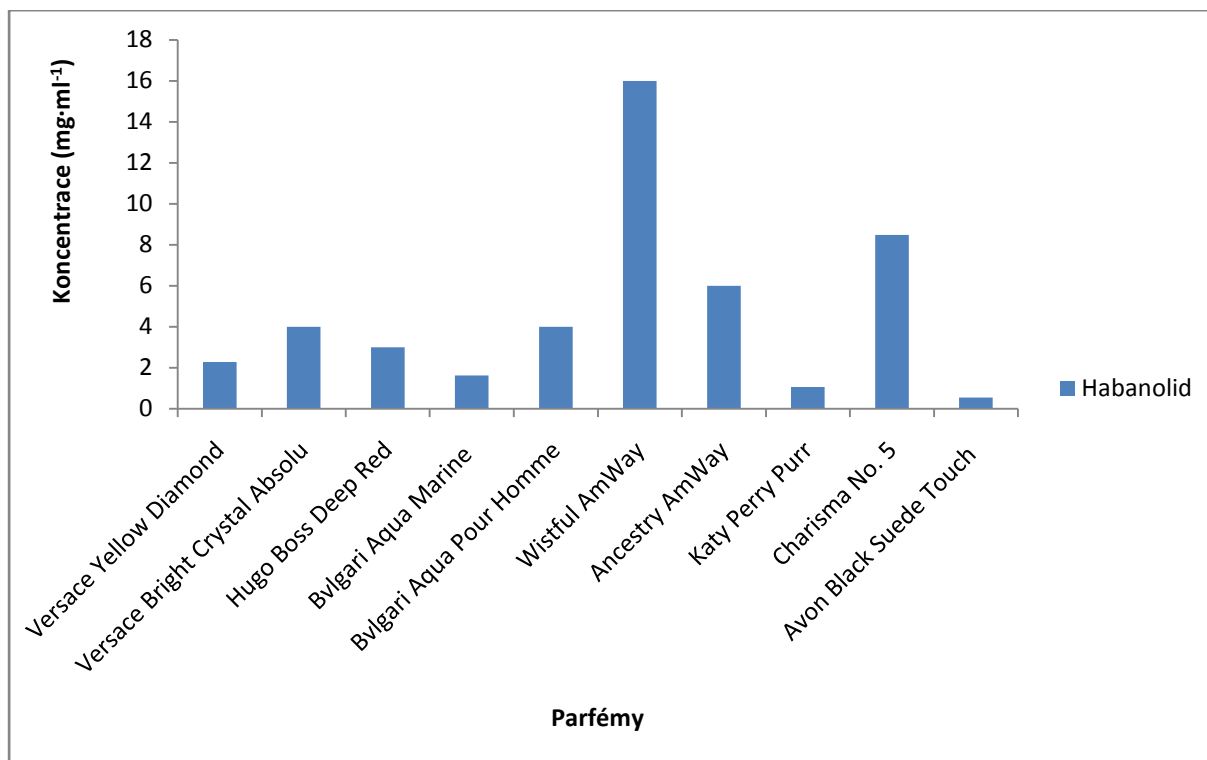
Pro screening přítomnosti makrocyclických musk sloučenin v komerčních produktech osobní péče bylo vybráno celkem 27 parfémů. Bylo zjišťováno celkem pět makrocyclických musk sloučenin. Jednotlivé parfémy, běžně dostupné na našem trhu, byly vybrány tak, aby pokrývaly různé značky v různých cenových kategoriích. Jelikož je však známo, že makrocyclické musk sloučeniny jsou po finanční stránce více nákladné a nejsou běžně rozšířeny v produktech osobní péče, byly zvoleny převážně značkové kvalitnější parfémy. Z celkového počtu 27 komerčních produktů osobní péče jich 23 obsahovalo alespoň jednu sledovanou makrocyclickou musk sloučeninu. Nejčastěji byl ve vzorcích parfémuobsažen ethylen brasylat (19 vzorků). Koncentrace ethylen brasylatu se v parfémeh pohybovala v rozmezí od 0,05 do 25,24 mg·ml<sup>-1</sup>, přičemž nejvyšší koncentrace analytu byla kvantifikována v parfému značky Bvlgari AQVA Pour Homme. Také v ostatních vzorcích parfémůse ethylen brasylat vyskytoval v poměrně vysokém množství, v porovnání s ostatními analyty. Druhou nejčastěji se vyskytující makrocyclickou musk sloučeninou byl exaltolid, který byl přítomen celkem ve 12 vzorcích, a to v koncentracích od 0,1 do 7,38 mg·ml<sup>-1</sup>. Nejvyšší koncentrace exaltolidu byla prokázána v parfému Hugo Boss Deep Red. Třetí nejčastěji detekovanou musk sloučeninou byl ambretolid, který byl přítomen celkem v 11 vzorcích. Koncentrace ambretolidu v těchto parfémeh však dosahovala nízkých hodnot, v porovnání s prvními dvěma analyty. Jeho koncentrace byla prokázána v rozmezí 0,17 až 12,12 mg·ml<sup>-1</sup>, přičemž nejvyšší hodnota, a to 12,12 mg·ml<sup>-1</sup> byla zjištěna pouze v parfému Versace Bright Crystal Absolu. Habanolid byl identifikován celkem v 10 vzorcích parfémů, v koncentracích od 0,55 do 16 mg·ml<sup>-1</sup>. Nejméněse vyskytující makrocyclickou musk sloučeninou byl musk MC4, který byl detekován pouze v 8 vzorcích, a to ve velmi nízkých koncentracích, v rozmezí od 0,07 do 0,92 mg·ml<sup>-1</sup>. Pomocí grafů č. 15-19 bylo provedeno porovnání jednotlivých posuzovaných analytů, které bylo kvantifikováno v parfémeh. Nejčastěji byl identifikován ethylen brasylat, který byl nejen prokázán v největším počtu parfémů, ale zároveň byl



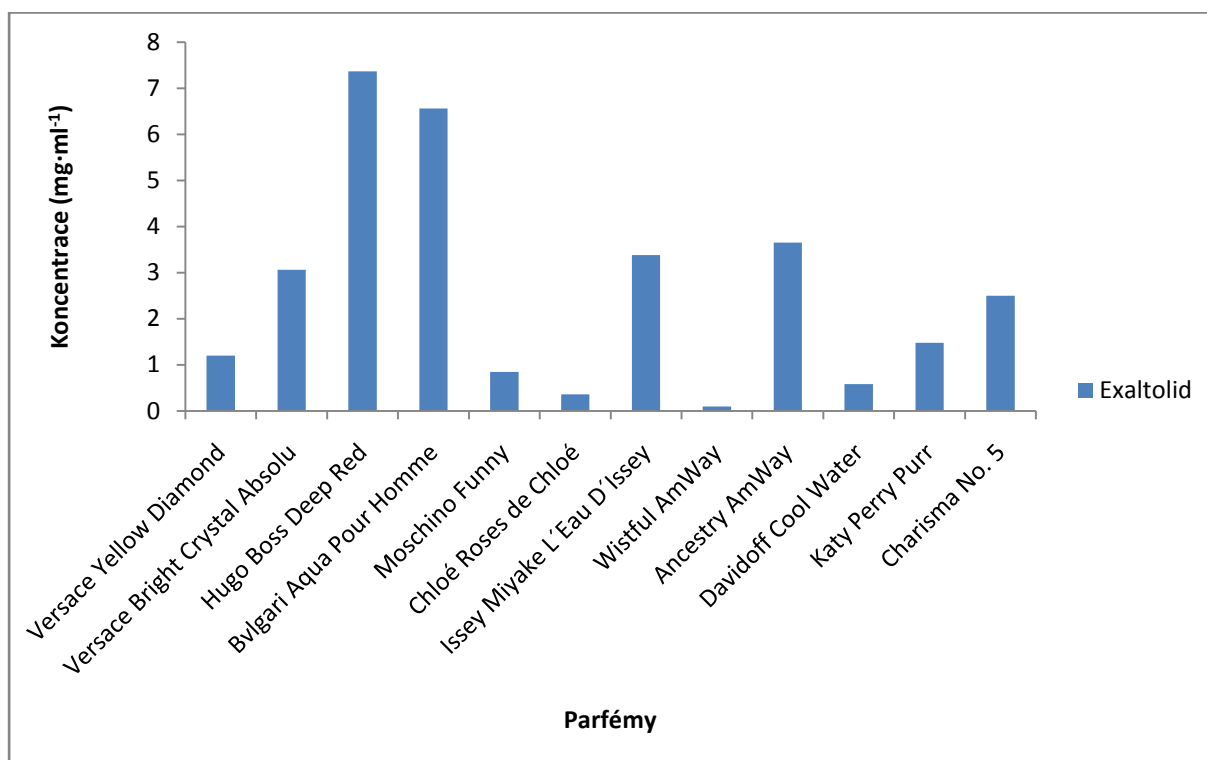
obsažen v nejvyšších koncentracích. Ethylen brasylat je nejznámějším zástupcem makrocyclických musk sloučenin, protože jeho výroba je nenákladná a cena relativně nízká. Nebylo proto žádným překvapením, že tento analyt je tak často obsažen v parfémeh. Další finančně méně nákladnou makrocyclickou sloučeninou je habanolid a jeho nenasycená verze exaltolid; i tyto analyty byly detekovány v odpadní vodě ve větším množství. Ambretolid a musk MC4 byly v parfémeh identifikovány nejméně. Pokud porovnáme výsledné koncentrace sledovaných makrocyclických musk sloučenin v produktech osobní péče s jejich výslednými koncentracemi v odpadních vodách (přítok do ČOV), je zřejmá značná podobnost. Identifikovanými makrocyclickými musk sloučeninami byly na přítoku odpadních vod právě habanolid, exaltolid a ethylenbrasylat. Ambretolid a musk MC4 nebyly v odpadní vodě zjištěny vůbec, zatímco v kosmetických přípravcích byly detekovány častěji. Porovnáme-li cenovou stránku analyzovaných parfémů, lze si povšimnout, že makrocyclické musk sloučeniny byly prokázány především v kvalitnějších značkových parfémeh (Versace, Hugo Boss, Bvlgari), zatímco v levnějších parfémeh nebyly tyto sloučeniny detekovány vůbec.

Tabulka č. 37: Výsledné koncentrace sledovaných analytů ve vybraných vzorcích parfémů

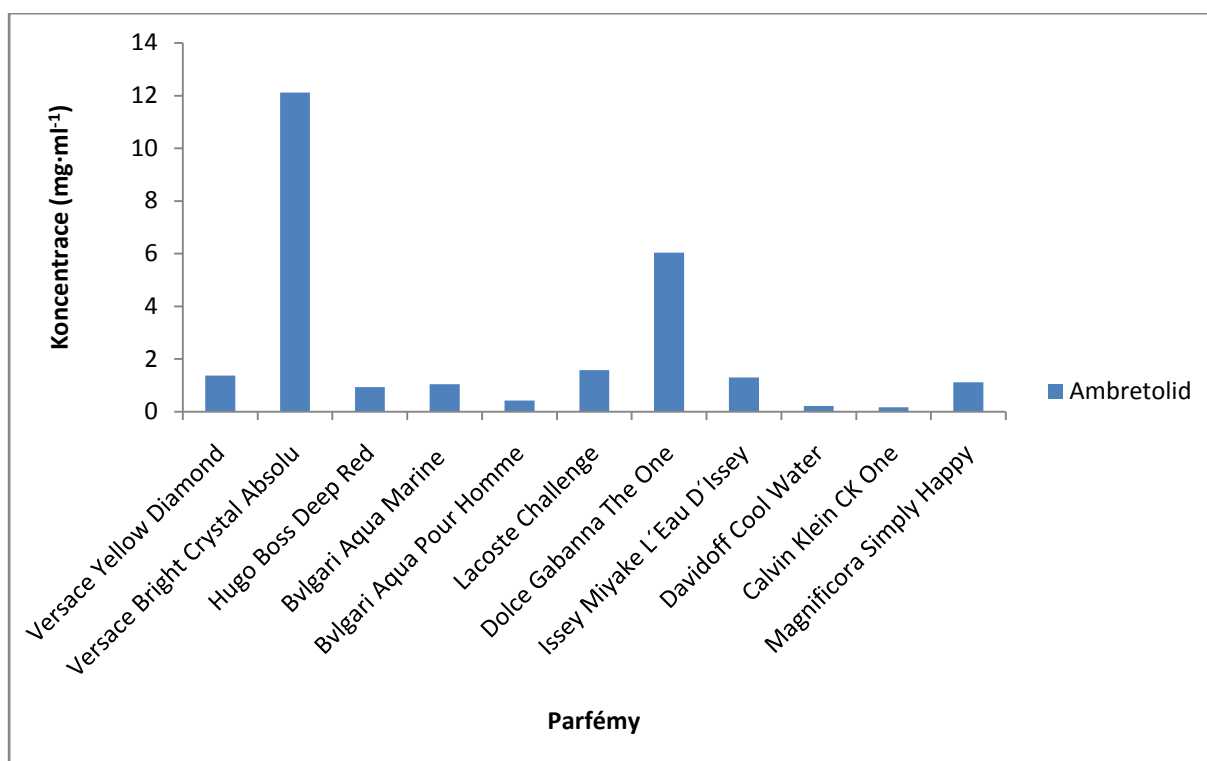
Standard	Výsledná koncentrace (mg·ml <sup>-1</sup> )				
	Habanolid	Exaltolid	Ambretolid	Musk MC4	Ethylen brasylat
Versace Yellow Diamond	2,28	1,2	1,37	ND	21,09
Versace Bright Crystal Absolu	4	3,06	12,12	0,1	17,22
Versace Eau Fraiche	ND	ND	ND	ND	5,22
Hugo Boss Deep Red	3	7,37	0,93	0,57	4,86
Bvlgari Aqua Marine	1,63	ND	1,04	ND	0,47
Bvlgari Aqua Pour Homme	4	6,56	0,42	0,79	25,24
Lacoste Challenge	ND	ND	1,58	0,06	12,76
Moschino Funny	ND	0,85	ND	0,92	12,78
Dolce Gabanna The One	ND	ND	6,04	ND	1,14
Chloé Roses de Chloé	ND	0,36	ND	ND	14,74
Yves Rocher Naturelle	ND	ND	ND	0,08	6,3
Guerlain Aqua Allegoria	ND	ND	ND	ND	0,06
Issey Miyake L'Eau D'Issey	ND	3,38	1,3	ND	ND
Tonino Lamborghini Feroce	ND	ND	ND	ND	ND
Wistful AmWay	16	0,1	ND	0,07	6,09
Ancestry AmWay	6	3,65	ND	0,1	11,28
Davidoff Cool Water	ND	0,58	0,22	ND	ND
Lanvin Eclat D'Arpege	ND	ND	ND	ND	ND
Katy Perry Purr	1,07	1,48	ND	ND	6,13
Calvin Klein CK One	ND	ND	0,17	ND	0,05
DKNY Be Delicious	ND	ND	ND	ND	ND
Charisma No. 5	8,48	2,5	ND	ND	3,74
Diesel Only The Brave	ND	ND	ND	ND	ND
Guess Seductive	ND	ND	ND	ND	ND
Givenchi Ange ou Demon	ND	ND	ND	ND	ND
Magnificora Simply Happy	ND	ND	1,12	ND	0,073
Avon Black Suede Touch	0,55	ND	ND	ND	2,48



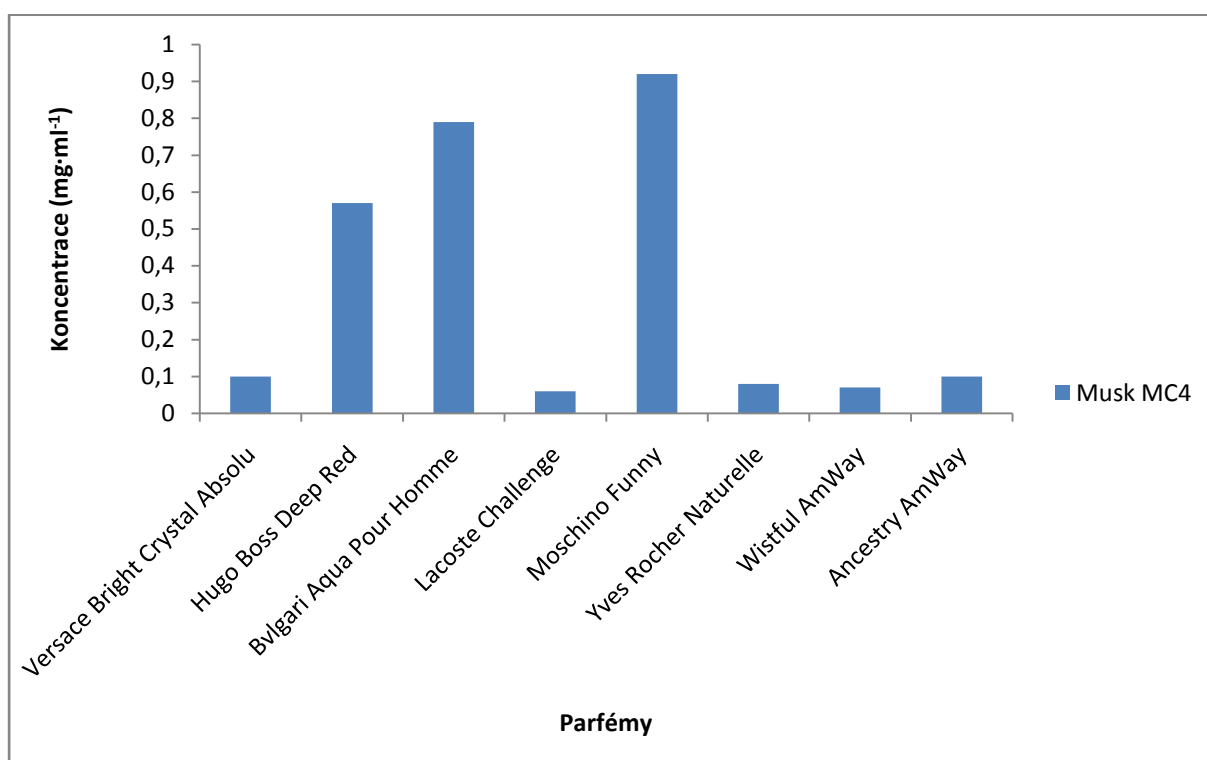
Graf č. 15: Porovnání obsahu habanolidu v produktech osobní péče



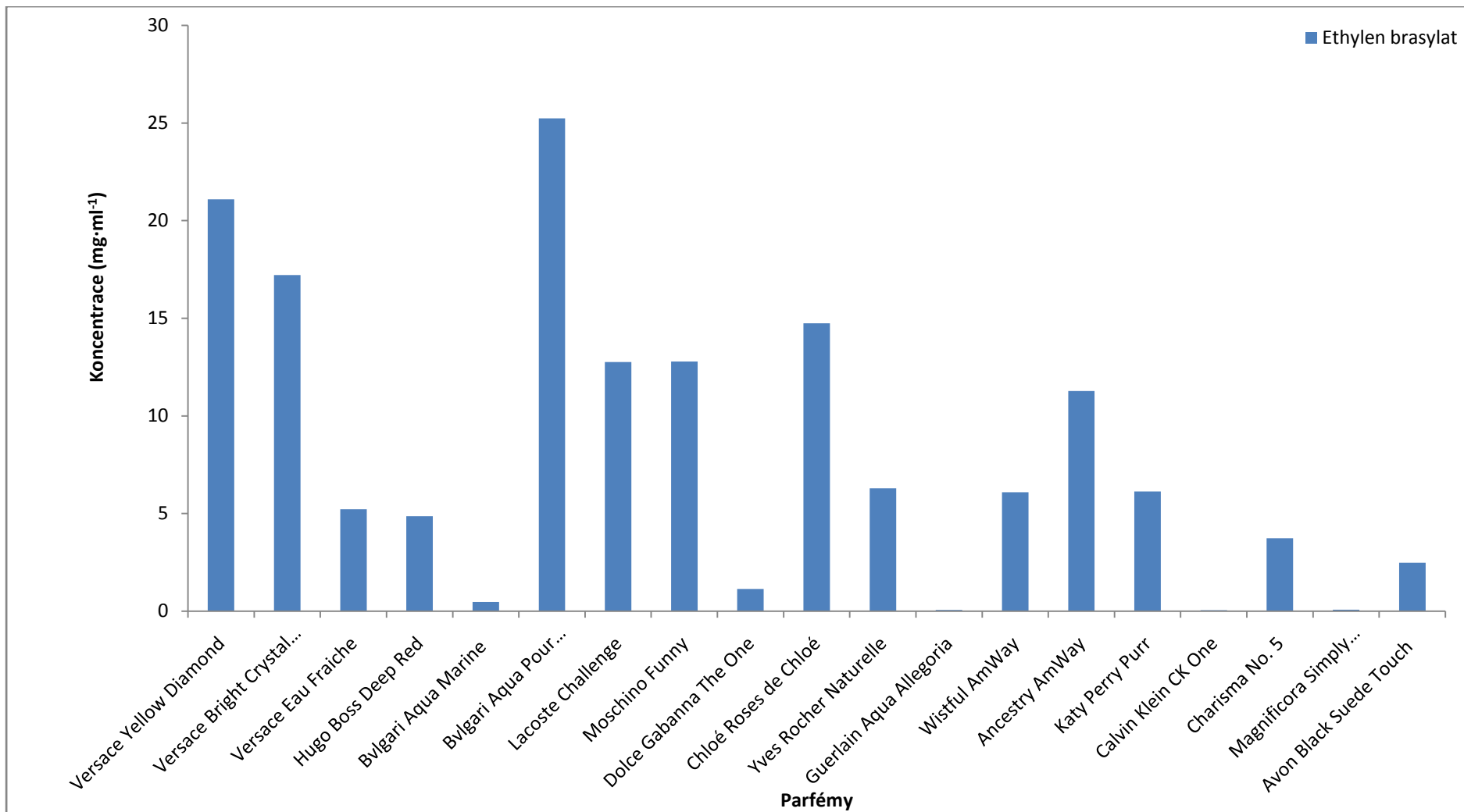
Graf č. 16: Porovnání obsahu exaltolidu v produktech osobní péče



Graf č. 17: Porovnání obsahu ambretolidu v produktech osobní péče



Graf č. 18: Porovnání obsahu Musk MC4 v produktech osobní péče



Graf č. 19: Porovnání obsahu ethylen brasylatu v produktech osobní péče

#### 4.6.2 Porovnání naměřených výsledků s údaji publikovanými v literatuře

Výsledky získané v rámci našich analýz byly porovnávány s výsledky naměřenými ve studii zabývající se stanovením osmi makrocyclických musk sloučenin (civeton, musk MC4, exaltolid, exalton, habanolid, musk NN a muskon) v odpadní vodě[66]. Analyzované vzorky odpadní vody byly v této studii odebrány po dobu 3 měsíců na přítoku a na odtoku dvou čistíren odpadních vod v oblasti Tarragony (Španělsko). Vzorky odpadní vody byly po převozu do laboratoře ihned přefiltrovány přes skleněný a nylonový filtr. Pro identifikaci a kvantifikaci byla zvolena metoda GC-MS (plynový chromatogram a hmotnostní spektrometr s detektorem iontová past). Izolace analytů ze vzorků odpadní vody byla rovněž provedena metodou SPME. Optimální parametry pro izolaci analytů byly v této studii následující: vlákno PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$ , mód head-space, teplota sorpce 100  $^{\circ}\text{C}$ , doba sorpce 45 minut, bez přídavku soli, otáčky 750rpm.

V rámci diplomové práce byly vzorky odebrány po dobu 7 dní jako 24 hodinové slévané vzorky odpadní vody z ČOV Brno-Modřice. Vzorky odpadní vody však nebyly filtrovány, protože z pokusů prováděných na našem ústavu je známo, že syntetické musk sloučeniny se velmi ochotně sorbují na pevné částice v odpadní vodě. V diplomové práci byla testována tři SPME vlákna (PDMS 100  $\mu\text{m}$ , PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  a PA 85  $\mu\text{m}$ ). Tato vlákna byla podrobena několika testům, v rámci kterých byl studován způsob provedení extrakce (HS-SPME, DI-SPME) a přídavek soli NaCl (vysolování). Bylo zjištěno, že nejlepší výsledky byly jednoznačně získány v případě použití vlákna PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$ , přičemž nejvhodnějším způsobem vzorkování byl mód přímého ponoření, tj. DI-SPME. Protože však byla analyzovaným vzorkem odpadní voda obsahujícím mnoho balastních látek, které by mohly ovlivňovat izolaci sledovaných analytů (matriční efekt odpadní vody), byl zvolen pro konečnou extrakci mód head-space (HS-SPME), s jehož pomocí bylo dosaženo téměř srovnatelných výsledků, jako při přímém ponoření vlákna (DI-SPME). Také přídavek soli nezlepšil účinnost izolace analytů z odpadní vody pro vlákno PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$ , a proto nebyla ke vzorku odpadní vody přidávána žádná sůl. Pro toto vlákno byl rovněž optimalizován vliv teploty a doby sorpce. V porovnávané studii byly nejlepší výsledky získány při teplotě 100  $^{\circ}\text{C}$ ; protože se však v našem případě nepodařilo udržet konstantní teplotu 100  $^{\circ}\text{C}$ , byly proto optimalizovány pouze teploty 70, 80 a 90  $^{\circ}\text{C}$ , přičemž nejlepší výsledky byly získány právě při 90  $^{\circ}\text{C}$ . Dalším sledovaným parametrem byla doba extrakce; na základě provedených experimentů byla jako optimální pro naše účely zvolena doba 45 minut. Konečná optimalizovaná metoda měla následující parametry: vlákno PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$ , extrakce HS-SPME, doba sorpce 45 minut, teplota sorpce 90  $^{\circ}\text{C}$ , bez přídavku soli, otáčky 750 rpm.

Pomocí tabulky č. 38 jsou porovnány koncentrace musk sloučenin zjištěné v této diplomové práci s hodnotami získanými z citované literatury. Nejčastěji detekovaným analytem byl v citované studii ambretolid, který byl v odpadní vodě kvantifikován v nejvyšších koncentracích. Naopak v odpadní vodě z ČOV Brno-Modřice nebyl tato sloučenina vůbec prokázána, zde byl nejčastěji kvantifikován habanolid a exaltolid. Tyto dvě makrocyclické sloučeniny byly rovněž zjištěny v porovnávané studii, avšak v nižších koncentracích. V odpadní vodě z ČOV Brno-Modřice byl kromě toho prokázán také ethylen brasylat, který v porovnávané studii nebyl zjišťován.

Tabulka č. 38: Provnání našich výsledků s údaji publikovanými v literatuře

Sloučenina	ČOV A (ng·ml <sup>-1</sup> )		ČOV B (ng·ml <sup>-1</sup> )		ČOV Brno-Modřice(ng·ml <sup>-1</sup> )	
	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok
Habanolid	ND-0,50	ND-0,16	0,07-1,57	ND-0,53	0,94-2,55	<LOQ-0,49
Exaltolid	ND-0,40	ND-0,16	ND-1,49	ND-0,48	0,71-1,94	ND-<LOQ
Ambrettolid	<LOQ-4,36	<LOQ-1,43	<LOQ-12,29	<LOQ-2,46	ND	ND
Musk MC4	0,04-0,82	ND-0,17	0,02-0,61	0,01-0,17	ND	ND
Ethylen brasylat	-	-	-	-	0,71-1,94	ND-<LOQ

Pozn.: ND - nedetekováno; <LOQ - pod mezí stanovitelnosti

## 5 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na studium problematiky výskytu makrocyclických musk sloučenin (habanolid, exaltolid, ambretolid, musk MC4 a ethylen brasylat) ve vodním ekosystému, konkrétně v odpadních vodách odebíraných na ČOV Brno-Modřice, ČOV Mikulov a ČOV Lednice. Jedním ze základních cílů diplomové práce byl rovněž optimalizace analytického postupu aplikovaného stanovení těchto sloučenin v odpadní vodě. Pro izolaci sledovaných analytů byla zvolena mikroextrakce tuhou fází (SPME), pro jejich identifikaci a kvantifikaci metoda plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s iontovou pastí (GC/MS-IT).

Analýza byla prováděna na slévaných 24 hodinových vzorcích odebíraných po dobu sedmi dní na odtoku a na přítoku ČOV v Brně-Modřicích. Na přítoku ČOV Brno-Modřice byly identifikovány tři sledované makrocyclické sloučeniny, tj. habanolid, exaltolid a ethylen brasylat. Jejich koncentrace se pohybovaly řádově v setinách až desetínách  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . V odpadní vodě z ČOV Mikulov a v ČOV Lednice byl detekován pouze habanolid, který dosahoval ve všech třech ČOV nejvyšších koncentrací. Naopak ambretolid a musk MC4 nebyly prokázány ani v jedné ČOV. Na odtoku z ČOV byly analyty buď kvantifikovány v minimálních koncentracích, případně nebyly detekovány vůbec, nebo jejich hodnoty byly pod mezí stanovitelnosti. Míra účinnosti eliminace sledovaných sloučenin z odpadních vod se na všech vybraných ČOV pohybovala v rozmezí od 76,03 do 88,33 %.

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na stanovení makrocyclických musk sloučenin v 27 vzorcích značkových parfémů. Nejčastěji identifikovanými makrocyclickými musk sloučeninami byl habanolid, exaltolid a ethylen brasylat. Uvedené syntetické musk sloučeniny byly v analyzovaných parfémech obsaženy v nejvyšších koncentracích. Některé z těchto sloučenin byly detekovány také ve vzorcích odpadní vody, kam se dostaly s nejvyšší pravděpodobností právě používáním kosmetických výrobků a produktů osobní péče.

Závěrem je nutné zdůraznit, že předložená diplomová práce poskytuje první ucelené informace týkající se stanovení makrocyclických musk sloučenin v odpadní vodě v České republice. Makrocyclické musk sloučeniny jsou v porovnání s ostatními skupinami syntetických musk sloučenin daleko šetrnější k životnímu prostředí a mají mnohem lepší vlastnosti. Nižší výskyt a koncentrace těchto sloučenin v produktech osobní péče je pravděpodobně způsobena jejich vysokou pořizovací cenou. V budoucnu se však očekává jejich zvýšená produkce, a to především z důvodu klesající ceny základních surovin. V odborné literatuře existuje o této skupině syntetických musk sloučenin velice málo záznamů, a proto by bylo vhodné se touto problematikou zabývat i v budoucnu.

1. VONÁŠEK, F.; TREPKOVÁ, E.; NOVOTNÝ, L.: *Látky vonné a chuťové*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1987. ISBN 04-810-87.
2. JIRÁT, E.: *Látky vonné a chuťové*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1964.
3. TOBKOVÁ, L.: *Zhodnocení výskytu musk sloučenin ve vodním ekosystému*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 60 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
4. TREPKOVÁ, E.; VONÁŠEK, F.: *Vůně a parfémy: tajemství přitažlivosti*. Praha: Maxdorf, 1997, 173 s. ISBN 80-858-0048-9.
5. AVICENNA COMPANY, spol s.r.o. *Eucalyptus Globulus* [online]. [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.avicenna.cz/item/eucalyptus-globulus-blahovicnik-kulatoplody>
6. Leccos. *Vorvaň* [online]. [cit. 2014-11-17]. Dostupné z: <http://leccos.com/index.php/clanky/vorvan>
7. Animalright. *Sředověké praktiky výrobců parfému* [online]. [cit. 2014-11-17]. Dostupné z: <http://www.animalrights.webz.cz/cibetky.htm>
8. Alatarji. *Pižmo, mošus* [online]. [cit. 2014-11-17]. Dostupné z: <http://www.alatarji.cz/alatarji-cz/5-CO-JE-DOBRE-VEDET/8-Pizmo>
9. Clipartlogo. *Bobr* [online]. [cit. 2014-11-17]. Dostupné z: [http://cz.clipartlogo.com/image/beaver-2\\_173342.html](http://cz.clipartlogo.com/image/beaver-2_173342.html)
10. DA COSTA, N. C.; ERI, S.: Identification of Aroma Chemicals. *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004-10-26, s. 12. DOI: 10.1002/9781444305517.ch2.
11. WWF-UK Panda House. *Chain of contamination* [online]. 2008 [cit. 2013-04-02]. Dostupné z: <http://www.wwf.org.uk/filelibrary/pdf/contamination.pdf>
12. KRAFT, P.: Aroma Chemicals IV: Musks. *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004-10-26, s. 143. DOI: 10.1002/9781444305517.ch7.
13. BALK, F.; FORD, A.: Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCb in the EU. *Toxicology Letters*. 1999, vol. 111, 1-2, s. 57-79. DOI: 10.1016/S0378-4274(99)00169-1.
14. BESTER, K.: Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCb and AHTN) in a typical German sewage treatment plant. *Chemosphere*. 2004, vol. 57, issue 8, s. 863-870. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.08.032.
15. SANCHEZPRADO, L.; LORES, M.; LLOMPART, M.; GARCIAJARES, C.; LOURIDO, M.; CELA, R.: Further solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry applications: “on-fibre” and aqueous photodegradation of nitro musks☆. *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1048, issue 1, s. 73-80. DOI: 10.1016/S0021-9673(04)01194-x.
16. RIMKUS, G. G.; RIMKUS, B.; WOLF, M.: Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicology Letters*. 2004, roč. 111, 1-2, s. 37-56. ISSN 03784274. DOI: 10.1016/S0378-4274(99)00191-5.
17. SOMMER, C.: The Role of Musk and Musk Compounds in the Fragrance. *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*. 2004.
18. ZOUHAR, L.: *Studium průniku musk sloučenin do abiotických a biotických složek voních ekosystémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2012/2013 . Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
19. ROWE, D. J.: *Chemistry and technology of flavors and fragrances*. Oxford: Blackwell, 2005, xiv, 336 p. ISBN 08-493-2372-X.
20. ZHAO, X.; SCHWACK, W.: Photochemical behavior of musk ambrette. *Chemosphere*. 1999, vol. 39, issue 1, s. 572-573. DOI: 10.1016/b978-0-08-023775-6.50420-3.
21. YAMAGISHI, T.; MIYAZAKI, T.; HORII, S.; KANEKO, S.: Identification of musk xylene and musk ketone in freshwater fish collected from the Tama River, Tokyo. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1981, vol. 26, issue 1, s. 656-662. DOI: 10.1007/bf01622152.



22. RIMKUS, G.; RIMKUS, B.; WOLF, M.: Nitro musks in human adipose tissue and breast milk. *Chemosphere*. 2004, roč. 28, č. 2, s. 421-432. ISSN 00456535. DOI: 10.1016/0045-6535(94)90138-4.
23. RIMKUS, G. G.; BUTTE, W.; GEYER, H. J.: Critical considerations on the analysis and bioaccumulation of musk xylene and other synthetic nitro musks in fish. *Chemosphere*. 1997, vol. 35, issue 7, s. 1497-1507. DOI: 10.1016/s0045-6535(97)00210-5.
24. SCHMEISER, H. H.; GMINSKI, R.; MERSCH-SUNDERMANN, V.: Evaluation of health risks caused by musk ketone. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2001, vol. 203, issue 4, s. 293-299. DOI: 10.1078/1438-4639-00047.
25. BESTER, K.: Analysis of musk fragrances in environmental samples. *Journal of Chromatography A*. roč. 1216, č. 3, s. 470-480. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.08.093.
26. GATERMANN, R.; BISELLI, S.; HÜHNERFUSS, H.; RIMKUS, G. G.; FRANKE, S.; HECKER, M.; KALLENBORN, R.; KARBE, L.; KÖNIG, W. A.: Synthetic Musks in the Environment. Part 2: Enantioselective Transformation of the Polycyclic Musk Fragrances HHCB, AHTN, AHDI, and ATII in Freshwater Fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2002, vol. 42, issue 4, s. 447-453. DOI: 10.1007/s00244-001-0042-1.
27. MARTÍNEZ-GIRÓN, A. B.; CREGO, A. L.; GONZÁLEZ, M. J.; MARINA, M. L.: Enantiomeric separation of chiral polycyclic musks by capillary electrophoresis: Application to the analysis of cosmetic samples. *Journal of Chromatography A*. 2010, vol. 1217, issue 7, s. 1157-1165. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.12.021.
28. MOORE, T.: *Synthesis and fragrance properties of macrocyclic musks* [online]. 2005 [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: [http://www.chemistry.illinois.edu/research/organic/seminar\\_extracts/2004\\_2005/12\\_Moore\\_Abtract\\_SP05.pdf](http://www.chemistry.illinois.edu/research/organic/seminar_extracts/2004_2005/12_Moore_Abtract_SP05.pdf)
29. WILLIAMS, A. S.: *The Synthesis of Macrocyclic Musks*. ISBN 10.1055/s-1999-3581.
30. ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; SLANINA, P.: Macrocyclic musk compounds - an absence of genotoxicity in the Ames test and the in vivo Micronucleus assay. *Toxicology Letters*. 2002, vol. 135, 1-2, s. 155-163. DOI: 10.1016/s0378-4274(02)00257-6.
31. EH, M. B.; RIMKUS, G.; WOLF, M.: New Alicyclic Musks: The Fourth Generation of Musk Odorants. *Journal of Chromatography A*. 2004, roč. 1216, č. 3, s. 470-480. ISSN 00219673. DOI: 10.1002/cbdv.200490151.
32. KRAFT, P.: Brain Aided Musk Design. *Chemistry*. 2004, vol. 1, issue 12, s. 1957-1974. DOI: 10.1002/cbdv.200490150.
33. PECK, A. M.: Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, roč. 386, č. 4, s. 907-939. ISSN 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-006-0728-3.
34. RIMKUS, G.; GERHARD, G.: *Synthetic musk fragrances in the environment*. Berlin [u.a.]: Springer, 2004. ISBN 35-404-3706-1.
35. SMYTH, S. A.; LISHMAN, L.; ALAEE, M.; KLEYWEGT, S.; SVOBODA, L.; YANG, J.; LEE, H.; SETO, H.: Sample storage and extraction efficiencies in determination of polycyclic and nitro musks in sewage sludge. *Chemosphere*. 2007, vol. 67, issue 2, s. 267-275. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.10.031.
36. ZÍMOVÁ, M.; MATĚJŮ, L.: *Kontaminace kalů z čistíren odpadních vod patogenními mikroorganismy a organickými látkami. Možnosti využití kalů z ČOV v zemědělství: Sewage sludge utilization in Agriculture. Sborník referátů z odborného semináře*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2000, 69 s. ISBN 80-238-5333-3.
37. ESCHKE, H. D.: Synthetic Musks in Different Water Matrices. *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*. 2004, s. 17-28. ISSN 1867-979X.
38. OSPAR Commission: Hazardous substances. *Musk xylene and other musks* [online]. 2004 [cit. 2013-04-02]. Dostupné z: [http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00200\\_bd%20on%20musk%20xylene.pdf](http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00200_bd%20on%20musk%20xylene.pdf)

39. FROMME, H.; OTTO, T.; PILZ, K.: Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany). *Water Research*. 2001, vol. 35, issue 1, s. 121-128. DOI: 10.1016/s0043-1354(00)00233-5.
40. LEE, I. S.; LEE, S. H.; OH, J. E.: Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment. *Water Research*. 2010, vol. 44, issue 1, s. 214-222. DOI: 10.1016/j.watres.2009.08.049.
41. YANG, J. J.; METCALFE, C. D.: Fate of synthetic musks in a domestic wastewater treatment plant and in an agricultural field amended with biosolids. *Science of The Total Environment*. 2006, vol. 363, 1-3, s. 149-165. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2005.06.022.
42. GUO, R.; LEE, I. S.; KIM, U. J.; OH, J. O.: Occurrence of synthetic musks in Korean sewage sludges. *Science of The Total Environment*. roč. 408, č. 7, s. 1634-1639. ISSN 00489697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.12.009.
43. ZENG, X.; SHENG, G.; GUI, H.; CHEN, D.; SHAO, W.; FU, J.: Preliminary study on the occurrence and distribution of polycyclic musks in a wastewater treatment plant in Guandong, China. *Chemosphere*. 2007, vol. 69, issue 8, s. 1305-1311. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.05.029.
44. RIMKUS, G. G.; WOLF, M.: Residues and contamination of fish samples. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 1993, s. 171-175.
45. ZHANG, X.; XU, Q.; MAN, S.; ZENG, X.; YU, X.; PANG, Y.; SHENG, G.; FU, J.: Tissue concentrations, bioaccumulation, and biomagnification of synthetic musks in freshwater fish from Taihu Lake, China. *Environmental Science and Pollution Research*. roč. 20, č. 1, s. 311-322. ISSN 0944-1344.
46. LEONARDS, P. E.G.; DE BOER, J.: Synthetic Musks in Fish and Other Aquatic Organisms. *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*. 2004.
47. NAKATA, H.: Occurrence of Synthetic Musk Fragrances in Marine Mammals and Sharks from Japanese Coastal Waters. *Environmental Science*. 2005, vol. 39, issue 10, s. 3430-3434. DOI: 10.1021/es050199l.
48. HAJŠLOVÁ, J.: *Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách a ekosystémech*. Praha: VŠCHT, 2001, s. 12-33.
49. KOCOUREK, V.; HAJŠLOVÁ, J.: *Sledování lipofilních kontaminantů ve vybraných profilech Labe a Vltavy technikou SPMD*. Praha: VŠCHT, 2001, s. 98-105.
50. HÁJKOVÁ, K.; PULKRABOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, T.; ŽLÁBEK, V.: Chub (*Leuciscus cephalus*) as a Bioindicator of Contamination of the Vltava River by Synthetic Musk Fragrances. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2007, vol. 53, issue 3, s. 390-396. DOI: 10.1007/s00244-006-0190-4.
51. ZOUHAR, L.; VÁVROVÁ, M.; MRAVCOVÁ, L.; KUBÍČKOVÁ, K.; VEČEŘEK, V.: Evaluation of wastewater contamination by musk compounds. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2012, roč. 21, 11a, s. 3352-3356.
52. VÁVROVÁ, M.; ČÁSLAVSKÝ, J.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; ŠUBRT, M.; RYBOVÁ, V. Musk compounds in industrial and municipal waste waters. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2014, roč. 23, č. 12B, s. 3400-3404. ISSN: 1018- 4619.
53. KOMÁRKOVÁ, P.; VÁVROVÁ, M.; KRÁLOVÁ, Z. Evaluation of the water contamination level by synthetic musk compounds. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2014, roč. 23, č. 12A, s. 3227-3231. ISSN: 1018- 4619.
54. BRUNN, H.; BITSCH, N.; AMBERG-MULLER, J.: Toxicology of Synthetic Musk Compounds in Man and Animals. *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*. 2004, s. 259-280. ISSN 1867-979X. DOI: 10.1007/b14121.
55. ROOSENS, L.; COVACI, A.; NEELS, H.: Concentrations of synthetic musk compounds in personal care and sanitation products and human exposure profiles through dermal application. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.05.072.
56. HUTTER, H.-P.; WALLNER, H.; HARTL, W.; UHL, M.; LORBEER, G.; GMINSKI, R.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KUNDI, M.: Higher blood concentrations of synthetic musks in women above fifty years than in younger women. *International Journal of Hygiene*

- and Environmental Health*. 2010, vol. 213, issue 2, s. 124-130. DOI: 10.1037/e563002006-001.
57. KANNAN, K.; REINER, J. E.; YUN, S. H.; PERROTTA, E. E.; TAO, L.; JOHNSON-RESTREPO, B.; RODAN, B. D.: Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and humans from the United States. *Chemosphere*. 2005, vol. 61, issue 5, s. 693-700. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.03.041.
  58. HUTTER, H. P.; WALLNER, P.; MOSHAMMER, H.; HARTL, W.; SATTELBERGER, R.; LORBEER, G.; KUNDI, M.: Synthetic musks in blood of healthy young adults: Relationship to cosmetics use. *Science of The Total Environment*. 2009, vol. 407, issue 17, s. 4821-4825. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.05.026.
  59. LIEBL, B.; EHRENSTORFER, S.: Nitro musks in human milk. *Chemosphere*. 1993, vol. 27, issue 11, s. 2253-2260. DOI: 10.1016/0045-6535(93)90136-s.
  60. YIN, J.; WANG, H.; ZHANG, J.; ZHOU, N.; GAO, F.; WU, Y.; XIANG, J.; SHAO, B.: The occurrence of synthetic musks in human breast milk in Sichuan, China. *Chemosphere*. 2012, vol. 87, issue 9, s. 1018-1023. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.11.068.
  61. DUEDAHL-OLESEN, L.; CEDERBERG, T.; PEDERSEN, K. H.; HØJGÅRD, A.: Synthetic musk fragrances in trout from Danish fish farms and human milk. *Chemosphere*, 2005, vol. 61, pp. 422-431.
  62. ZHANG, X.; JING, Y.; MA, L.; ZHOU, J.; FANG, X.; ZHANG, X.; YU, Y.: Occurrence and transport of synthetic musks in paired maternal blood, umbilical cord blood, and breast milk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2015, vol. 218, issue 1, s. 99-106. DOI: 10.1016/j.ijheh.2014.08.005.
  63. LU, Y.; YUAN, T.; WANG, W.; KANNAN, K.: Concentrations and assessment of exposure to siloxanes and synthetic musks in personal care products from China. *Environmental Pollution*. 2011, vol. 159, issue 12, s. 3522-3528. DOI: 10.1016/j.envpol.2011.08.015.
  64. REINER, J. L.; KANNAN, K.: A survey of polycyclic musks in selected household commodities from the United States. *Chemosphere*. 2006, vol. 62, issue 6, s. 867-873. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.10.006.
  65. ZHANG, X.; YAO, Y.; ZENG, X.; QIAN, G.; GUO, Y.; WU, M.; SHENG, G.; FU, J.: Synthetic musks in the aquatic environment and personal care products in Shanghai, China. *Chemosphere*. 2008, vol. 72, issue 10, s. 142-155. DOI: 10.1021/bk-2001-0791.ch008.
  66. VALLECILLOS, L.; POCURULL, E.; BORRULL, F.: An automated headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry method to determine macrocyclic musk fragrances in wastewater samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, vol. 405, issue 29, s. 9547-9554. DOI: 10.1007/s00216-013-7375-2
  67. VALLECILLOS, L.; POCURULL, E.; BORRULL, F.: A simple and automated method to determine macrocyclic musk fragrances in sewage sludge samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013, vol. 1314, s. 38-43. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.09.033.
  68. VALLECILLOS, L.; POCURULL, E.; BORRULL, F.: Fully automated determination of macrocyclic musk fragrances in wastewater by microextraction by packed sorbents and large volume injection gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012, vol. 1264, s. 87-94. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.09.049.
  69. BORRULL, F.; VALLECILLOS, L.; POCURULL, L.: On-line coupling of solid-phase extraction to gas chromatography-mass spectrometry to determine musk fragrances in wastewater. *Journal of Chromatography A*. 2014, s. 1-11.

70. PETERS, R. J. B.: Phthalates and artificial musks in perfumes. *TNO Environment and Geosciences*. 2005.)
71. HOLOUBEK, I.: *Chemické látky v prostředí - definice a pojmy* [online]. [cit. 2014-01-04]. Dostupné z: [http://www.recetox.muni.cz/res/file/prednasky/holoubek/chzp-i-2008/CHZP\\_I\\_04\\_Chemicke%20latky%20v%20prostredi%20-%20definice,%20pojmy.pdf](http://www.recetox.muni.cz/res/file/prednasky/holoubek/chzp-i-2008/CHZP_I_04_Chemicke%20latky%20v%20prostredi%20-%20definice,%20pojmy.pdf)
72. BUTTE, W.; SCHMIDT, S.; SCHMIDT, A.; MATTHEWS, R. W.: Photochemical degradation of nitrated musk compounds: Photochemical and Photocatalytic Processes. Degradation of Organic Compounds. *Chemosphere*. 1999, vol. 38, issue 6, s. 427-449. DOI: 10.1007/978-94-011-3396-8\_22.
73. BEHECHTI, A.; SCHRAMM, K. W.; ATTAR, A.; NIEDERFELLNER, J.; KETTRUP, A.: Acute aquatic toxicities of four musk xylene derivatives on *Daphnia magna*. *Water Research*. 1998, vol. 32, issue 5, s. 1704-1707. DOI: 10.1016/s0043-1354(97)00361-8.
74. RIMKUS, G.G.; GATERMANN, R.; HÜHNERFUSS, H.: Musk xylene and musk ketone amino metabolites in the aquatic environment. *Toxicology Letters*. 1999, vol. 111, 1-2, s. 5-15. DOI: 10.1016/s0378-4274(99)00190-3.
75. GATERMANN, R.; HÜHNERFUSS, H.; RIMKUS, G.; ATTAR, A.; KETTRUP, A.: Occurrence of musk xylene and musk ketone metabolites in the aquatic environment. *Chemosphere*. 1998, vol. 36, issue 11, s. 2535-2547. DOI: 10.1016/s0045-6535(97)10208-9.
76. MAEKAWA, A.; MATSUSHIMA, R.; ONODERA, H.; SHIBUTANI, M.; OGASAWARA, H.; KODAMA, Y.; KUROKAWA, Y.; HAYASHI, Y.: Long-term toxicity/carcinogenicity of musk xylol in B6C3F1 mice. *Food and Chemical Toxicology*. 1990, vol. 28, issue 8, s. 581-586. DOI: 10.1016/0278-6915(90)90159-k.
77. SUTER-EICHENBERGER, R.; ALTORFER, H.; LICHTENSTEIGER, W.; SCHLUMPF, M.: Bioaccumulation of musk xylene (MX) in developing and adult rats of both sexes. *Chemosphere*. 1998, vol. 36, issue 13, s. 2747-2762. DOI: 10.1016/s0045-6535(97)10234-x.
78. SCHRAMM, K. W.; KAUNE, A.; BECK, B.; THUMM, W.; BEHECHTI, A.; KETTRUP, A.; NICKOLOVA, P.: Acute toxicities of five nitromusk compounds in *Daphnia*, algae and photoluminescent bacteria. *Water Research*. 1996, vol. 30, issue 10, s. 2247-2250. DOI: 10.1016/0043-1354(96)00101-7.
79. HAWKINS, D.R.; FORD R.A.: Dermal absorption and disposition of musk ambrette, musk ketone and musk xylene in rats. *Toxicology Letters*. 1999, vol. 111, 1-2, s. 95-103. DOI: 10.1016/s0378-4274(99)00171-x.
80. EVEKORDES, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DIEZ, M.; DUNKELBERG, H.: In vitro genotoxicity of polycyclic musk fragrances in the micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1997, vol. 395, 2-3, s. 145-150. DOI: 10.1016/s1383-5718(97)00160-5.
81. SPANJERS, M.T.; TIL, H.P.; DE GROOT, A.P.: Acute oral toxicity of Tonalid in rats. *Report to RIFM*. 1985, report number 27847.
82. STEINBERG, P.; FISCHER, T.; ARAND, M.; PARK, E.; ELMADFA, I.; RIMKUS, G.; BRUNN, H.; DIENES, H. P.: Acute hepatotoxicity of the polycyclic musk 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (AHTN). *Toxicology Letters*. 1999, vol. 111, 1-2, s. 151-160. DOI: 10.1016/s0378-4274(99)00176-9.
83. LUCKENBACH, T.; EPEL, D.: Nitromusk and Polycyclic Musk Compounds as Long-Term Inhibitors of Cellular Xenobiotic Defense Systems Mediated by Multidrug Transporters. *Environmental Health Perspectives*. 2004, vol. 113, issue 1, s. 17-24. DOI: 10.1289/ehp.7301.
84. LAPCZYNSKI, A.; JONES, L.; MCGINTY, D.; BHATIA, S.; LETIZIA, C.S.; API, A.M.: Fragrance material review on isoamyl salicylate. *Food and Chemical Toxicology*. 2007, vol. 45, issue 1, s. 418-S423. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.047.
85. LETIZIA, C.S.; COCCHIARA, J.; LALKO, J.; API, A.M.: Fragrance material review on linalool. *Food and Chemical Toxicology*. 2003, vol. 41, issue 7, s. 362-503. DOI: 10.1016/b978-0-08-023775-6.50261-7.
86. LINCK, V.M.; da SILVA, A.L.; FIGUEIRÓ, M.; CARAMÃO, E.B.; MORENO, P.R.H.; ELISABETSKY, E.: Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine*. 2010, vol. 17, 8-9, s. 679-683. DOI: 10.1016/j.phymed.2009.10.002.

87. BUCHBERGER, W.W.: Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *Journal of Chromatography A*. 2011, vol. 1218, issue 4, s. 603-618. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.10.040.
88. MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M.: Fragrance material review on ethylene brassylate. *Food and Chemical Toxicology*. 2011, vol. 49, 359-S182. DOI: 10.1016/b978-0-08-023775-6.50258-7.
89. SIGMA-ALDRICH. *Sigma-Aldrich: Ethylene Brassylate* [online]. 2015 [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w354309?lang=en&ion=CZ>
90. MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M.: Fragrance material review on E- and Z-oxacyclohexadec-12(13)-en-2-one. *Food and Chemical Toxicology*. 2011, vol. 49, S152-S157. DOI: 10.1016/j.fct.2011.07.014.
91. Chemical Book. *Oxacyclohexadecan-2-one* [online]. 2010 [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB5474545.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5474545.htm)
92. Pell Wall Perfumes blog. *Musk*[online]. [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://pellwall-perfumes.blogspot.cz/2012/08/musk.html>
93. Chemical Book. *Cyclopentadecanolide*[online]. 2010 [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB9207055.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9207055.htm)
94. Chemical land 21. *Musconate*[online]. [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://chemicalland21.com/specialtychem/nd/MUSKONATE.pdf>
95. Chemical land 21. *Ambrettolide*[online]. [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://chemicalland21.com/specialtychem/NH/AMBRETTOLIDE.htm>
96. NONDEK, L.; MESTEK, O.: *Zásady správného odběru vzorků pro analýzu životního prostředí*. 2., opr. vyd. Praha: Eurachem - ČR, 1998. ISBN 80-901-8683-1.
97. ČERMÁK, J.; JANKŮ J.: *Vzorkování odpadů*. Praha: Vysoká škola chemicko technologická v Praze, 2006.
98. VFU INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ. *Inovace bakalářského a navazujícího magisterského studijního programu v oboru Bezpečnost a kvalita potravin: Preanalytická příprava vzorků homogenizace* [online]. [cit. 2015-02-14]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/pub-files/realizovane-klicove-aktivity/ls-2013-2014/h3bl/index/h3bl-preanalyticka-priprava-vzorku-homogenizace-ls-13-14.pdf>
99. ROSS, C.; PAWLISZYN, J.: EXTRACTION | Solid-Phase Microextraction. *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier, 2005, s. 608. DOI: 10.1016/B0-12-369397-7/00687-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0123693977006877>
100. ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J.: Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. 1990, vol. 62, issue 19, s. 2145-2148. DOI: 10.1021/ac00218a019.
101. YANG, X.; PEPPARD, T.; MARSILI, R.T.; BRADDOCK, R.; GOODRICH, R.; BRYAN, CH.: Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1994, vol. 42, issue 9, s. 79-91. DOI: 10.1201/9780203912812.pt6.
102. PROCHÁZKOVÁ, D.: Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy*. 2002, s. 827-852. Dostupné z: <http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin334/bulletin334.pdf>
103. Labicom s.r.o. Laboratorní přístroje a příslušenství, poradenská a servisní činnost.: *SPME* [online]. 1997-2015. [cit. 2015-02-19]. Dostupné z: <http://www.labicom.cz/spme-85/>
104. Sigma-Aldrich. *Bioanalysis with SPME* [online]. [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/bioanalysis-with-spme.html>
105. Sigma-Aldrich. *A Practical Guide to Quantitation with Solid Phase Microextraction*. [online]. 2001. vyd. [cit. 2015-02-19]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/11143.pdf>

106. Sigma-Aldrich. *Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions* [online]. [cit. 2015-02-19]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf>
107. Sigma-Aldrich. *Solid Phase Microextraction Troubleshooting Guide*. [online]. [cit. 2015-02-19].
108. LAMBDA LIFE. *SPME* [online]. [cit. 2015-02-23]. Dostupné z: <http://www.lambda.sk/pdf/metodiky/SPME.pdf>
109. POPL, M.; Fähnrich, J.: *Analytická chemie životního prostředí*. 4. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1999, 218 s. ISBN 80-708-0336-3.
110. Lékařská fakulta Hradec Králové. *Chromatografické metody* [online]. [cit. 2015-02-26]. Dostupné z: [www.lfhk.cuni.cz/chemie/documents/vseobecne/zs/zs07.doc](http://www.lfhk.cuni.cz/chemie/documents/vseobecne/zs/zs07.doc)
111. VOLKA, K.: *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 236 s. Analytical techniques in the sciences. ISBN 80-708-0227-8.
112. SOMMER, L.: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
113. Labicom. *Supelco* [online]. 1997-2005 [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.labicom.cz/supelco-199/>
114. Labicom. *Agilent* [online]. [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.labicom.cz/agilent-203/>
115. Wikipedia. *Ion source* [online]. [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Ion\\_source](http://en.wikipedia.org/wiki/Ion_source)
116. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. *Kvadrupólová iontová past (3D)* [online]. [cit. 2015-04-07]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/JVATL.htm>
117. POHANKA, M.: Základy statistiky laboratorních experimentů. *Vojenské zdravotnické listy*. 2010, roč. 79, č. 2, s. 60-63. ISSN 0372-7025.
118. PRAUS, P.; KNAPÍKOVÁ, A.: Výpočet mezi detekce a stanovitelnosti u titračních metod. *Chemické listy*. 1997, roč. 91, s. 1066-1068. ISSN 1213-7103.
119. PERNIKÁŘ, J.: *Hodnocení způsobilosti kontrolních prostředků*. VUT v Brně, Fakultastrojního inženýrství.
120. ČOV Brno - Modřice. *Brněnské vodárny a kanalizace, a.s.* [online]. 2014 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://www.bvk.cz/o-spolecnosti/odvadeni-a-cisteni-odpadnichvod/cov-brno-modrice/>
121. Vodovody a kanalizace Břeclav. *Kanalizační řád Mikulov*. [online]. 2014 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://www.vak-bv.cz/wp-content/uploads/2014/04/kan-rad-mikulov.pdf>
122. Vodovody a kanalizace Břeclav. *Kanalizační řád Lednice*. [online]. 2014 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://www.vak-bv.cz/wp-content/uploads/2014/04/kan-rad-lednice.pdf>
123. PARFUMS.CZ. *Parfémy* [online]. [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: <http://www.parfums.cz/>

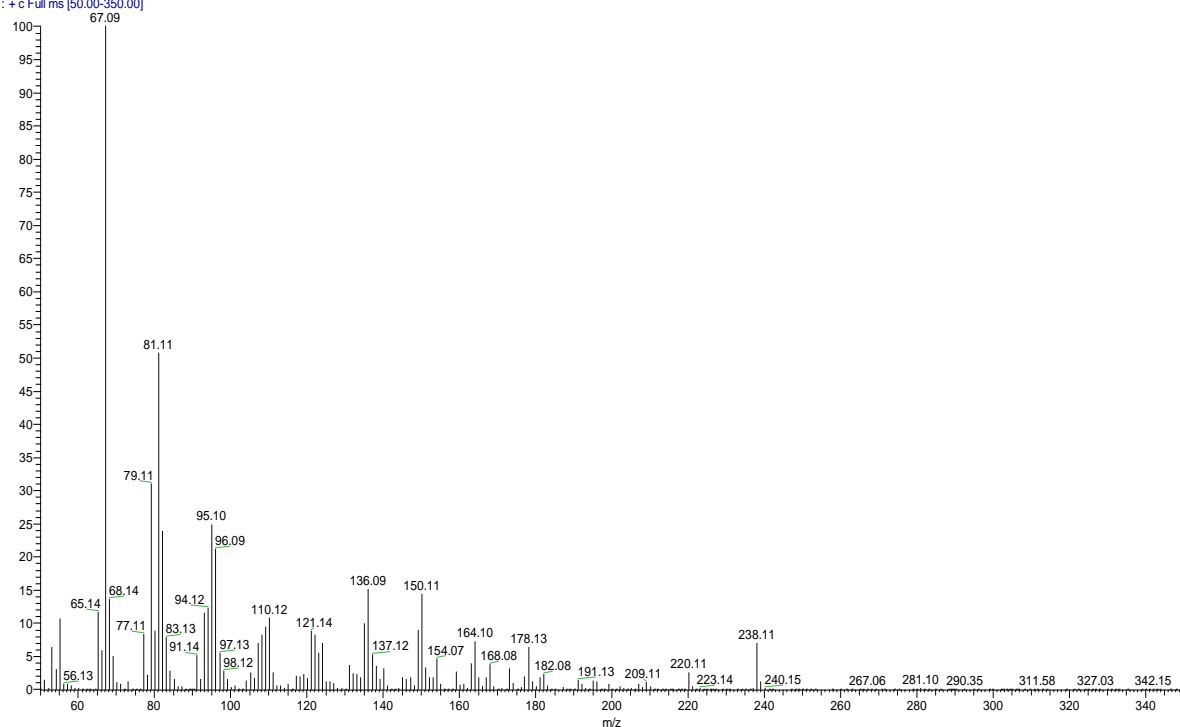
ADBI	celestolid
AHDI	phantolid
AHTN	tonalid
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ArD	argonový detektor
ATI	traseolid
BMI	body mass index
CAR	carboxen
CAS	registrační číslo CAS
CI	chemická ionizace
ČOV	čistírna odpadních vod
DI-SPME	mikroextrakce tuhou fází přímé ponoření
DLLME	disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina
EC	efektivní koncentrace
ECD	detektor elektronového záchytu
EI	elektronová ionizace
ESA	elektrostatický analyzátor
ESI	elektrosprejová ionizace
FAB	ionizace urychlenými atomy
FI	ionizace polem
FID	plamenový ionizační detektor
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
GPC	gelová permeační chromatografie
HeD	heliový detektor
HHCB	galaxolid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS	head-space
HS-SPME	mikroextrakce tuhou fází v head-space prostoru
ICR	iontová rezonanční cyklotron
IRS	infračervený spektrometr
IT	iontová past
$K_{ow}$	rozdělovací koeficient oktanol-voda
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LD	smrtelná dávka
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MAG	magnetický analyzátor
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MEPS	mikroextrakce se sorbentem umístěným v mikrostřikačce
MK	musk keton
MS	hmotnostní spektrometr
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MX	musk xylen

MXR	multixenobiotická rezistence
PA	polyakrylát
PCP	produkty osobní péče
PDMS	polydimethylsiloxan
PDMS/DVB	polydimethylsiloxan/divinylbenzen
PLOT	kolona s vrstvou sorbentu na vnitřní straně
PTV	dávkování s programově zvyšovanou teplotou vypařování vzorku
Q	kvadrupól
SBSE	extrakce na magnetickém míchadle
	kolona se zakotvenou kapalnou stacionární fází na povrchu pevného
SCOT	nosiče
SIM	sledování vybraných iontů
SPE	extrakce tuhou fází

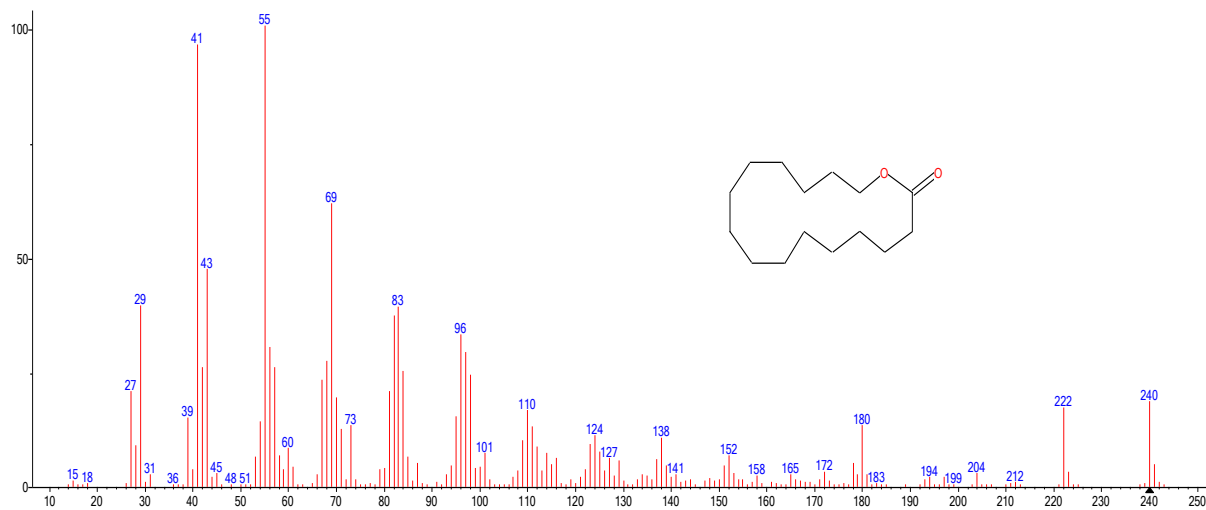


Příloha č. 1: Hmotnostní spektra analytů

Smes\_06 #2036-2054 RT: 18.64-18.74 AV: 19 NL: 9.07E4  
T: +c Full ms [50.00-350.00]



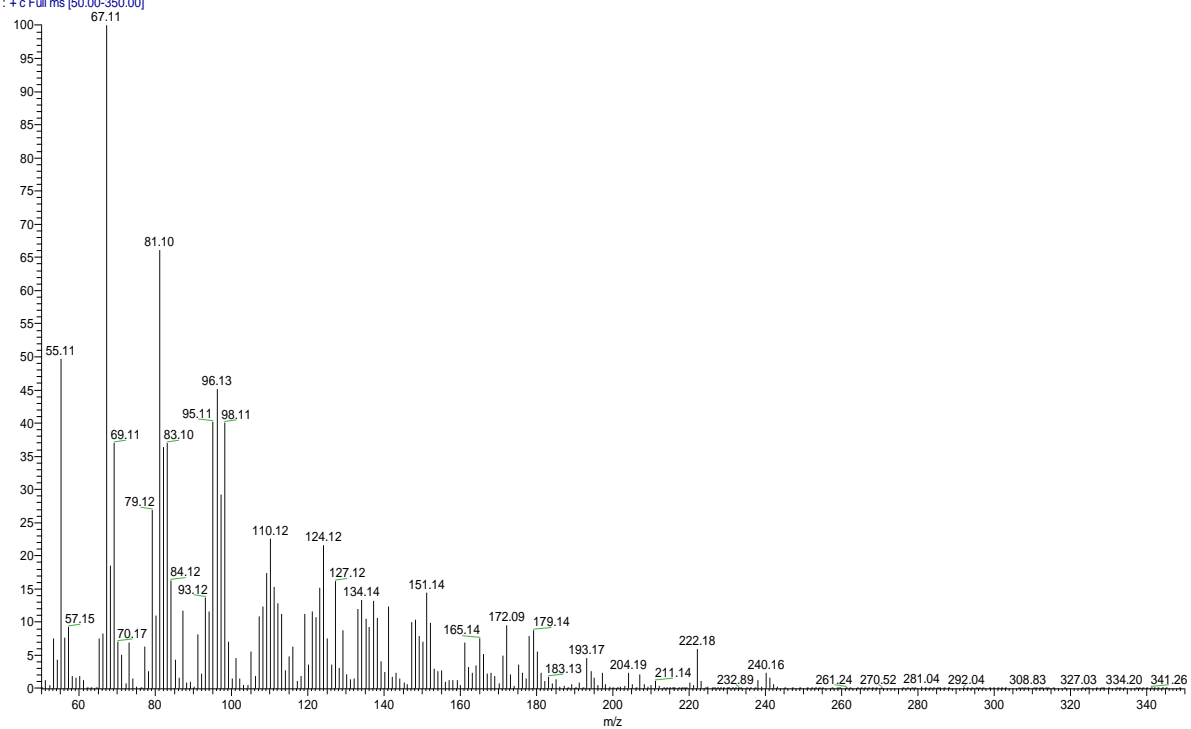
Obrázek č. 17: Experimentálně zjištěné spektrum habanolidu (v knihovně NIST toto spektrum nenalezeno)



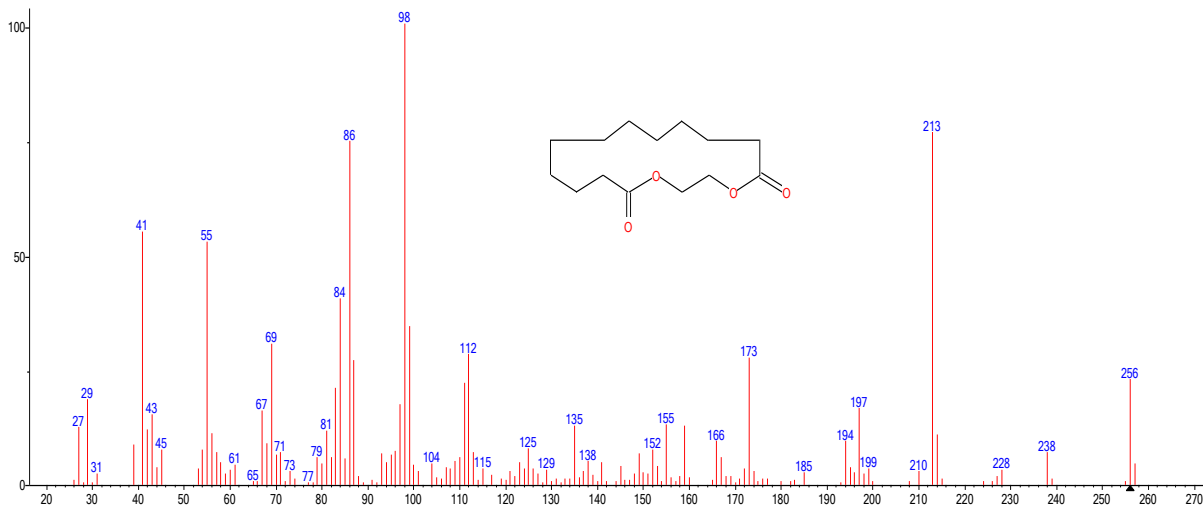
(main) Oxacyclohexadecan-2-one

Obrázek č. 18: Spektrum exaltolidu v knihovně NIST

Smes\_06 #2056-2072 RT: 18.75-18.85 AV: 17 NL: 1.46E5  
T: + c Full ms [50.00-350.00]



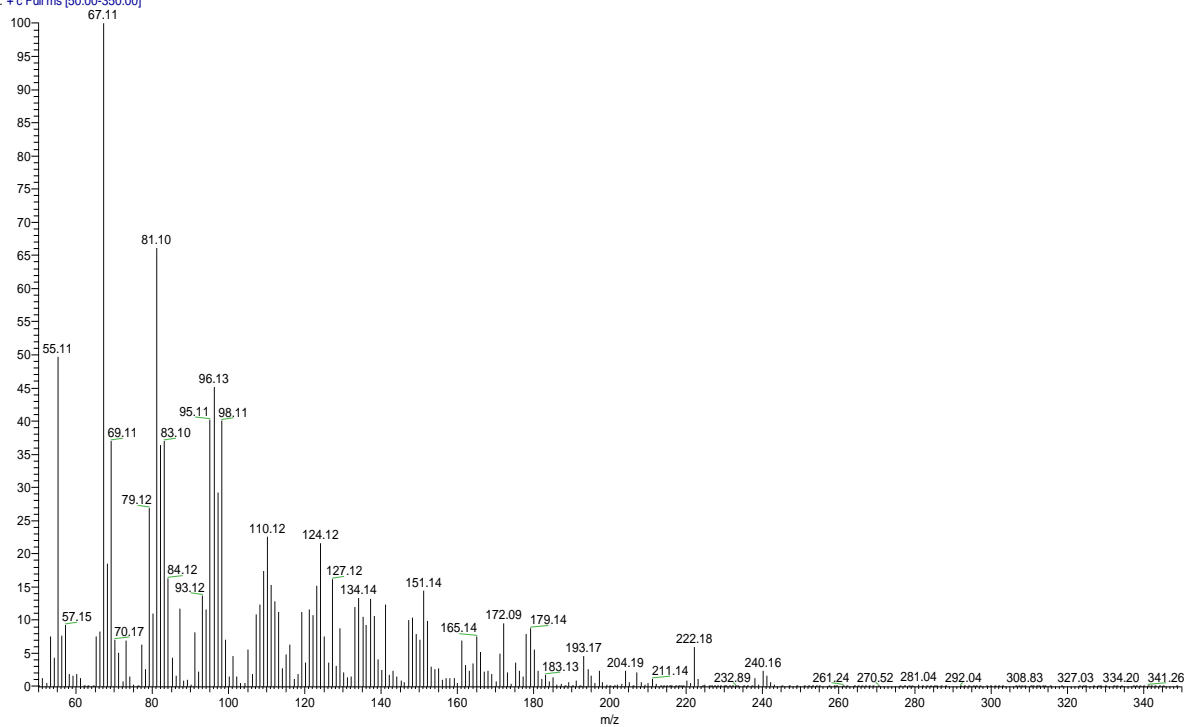
Obrázek č. 19: Experimentálně zjištěné spektrum exaltolidu



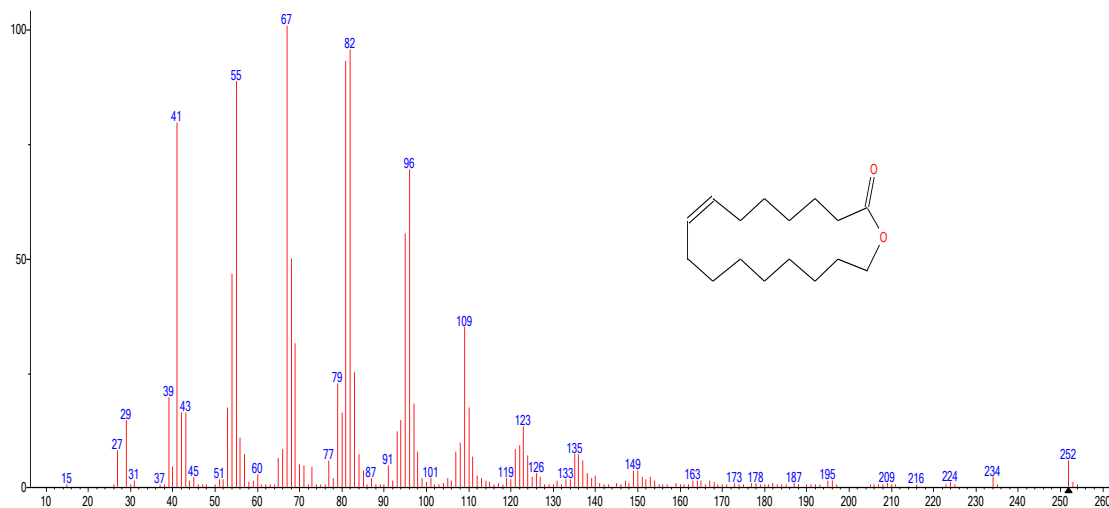
(main) 1,4-Dioxacyclohexadecane-5,16-dione

Obrázek č. 20: Spektrum Musk MC4 zjištěné v knihovně NIST

Smes\_06 #2056-2072 RT: 18.75-18.85 AV: 17 NL: 1.46E5  
T: +c Full ms [50.00-350.00]



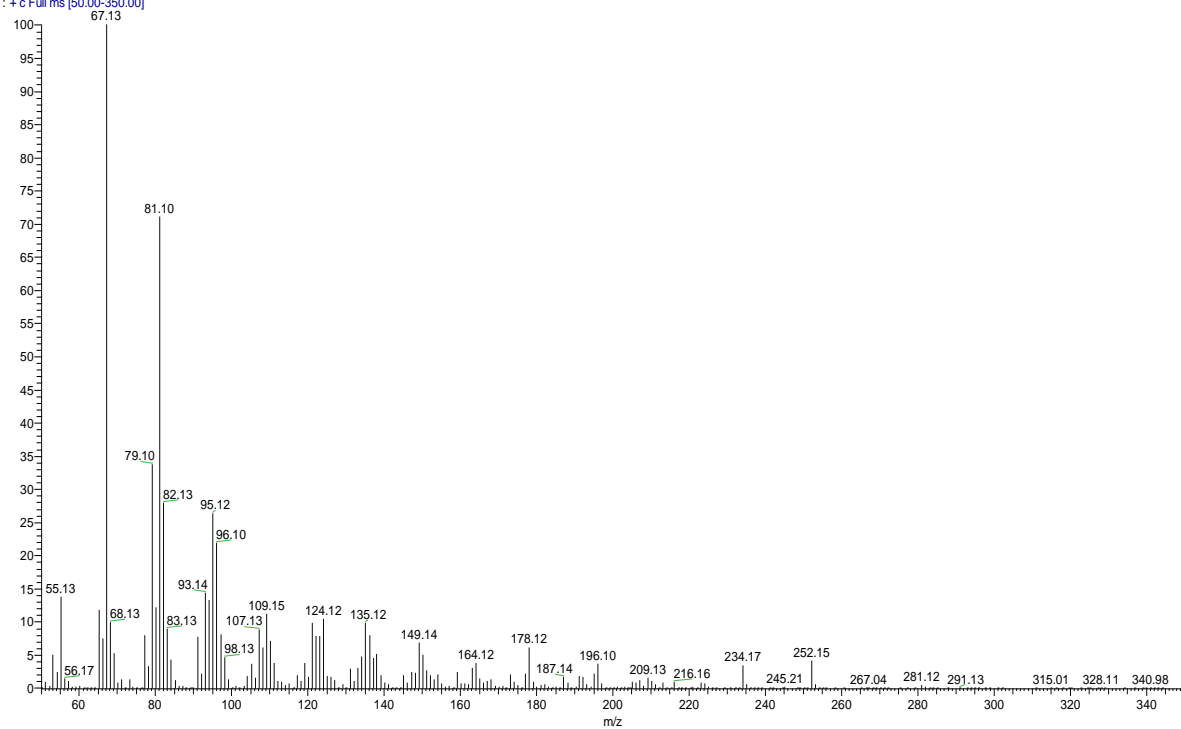
Obrázek č. 21: Experimentálně zjištěné spektrum musk MC4



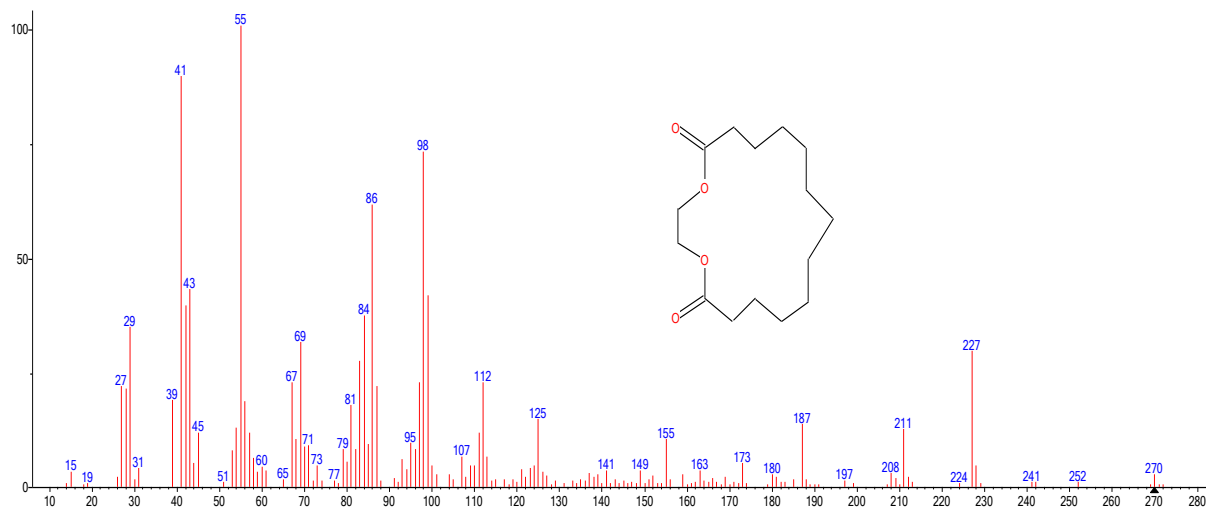
(mainlib) Oxacycloheptadec-8-en-2-one, (82)

Obrázek č. 22: Spektrum ambretolidu v knihovně NIST

Smes\_06 #2206-2216 RT: 19.75-19.81 AV: 11 NL: 9.55E4  
T: +c Full ms [50.00-350.00]



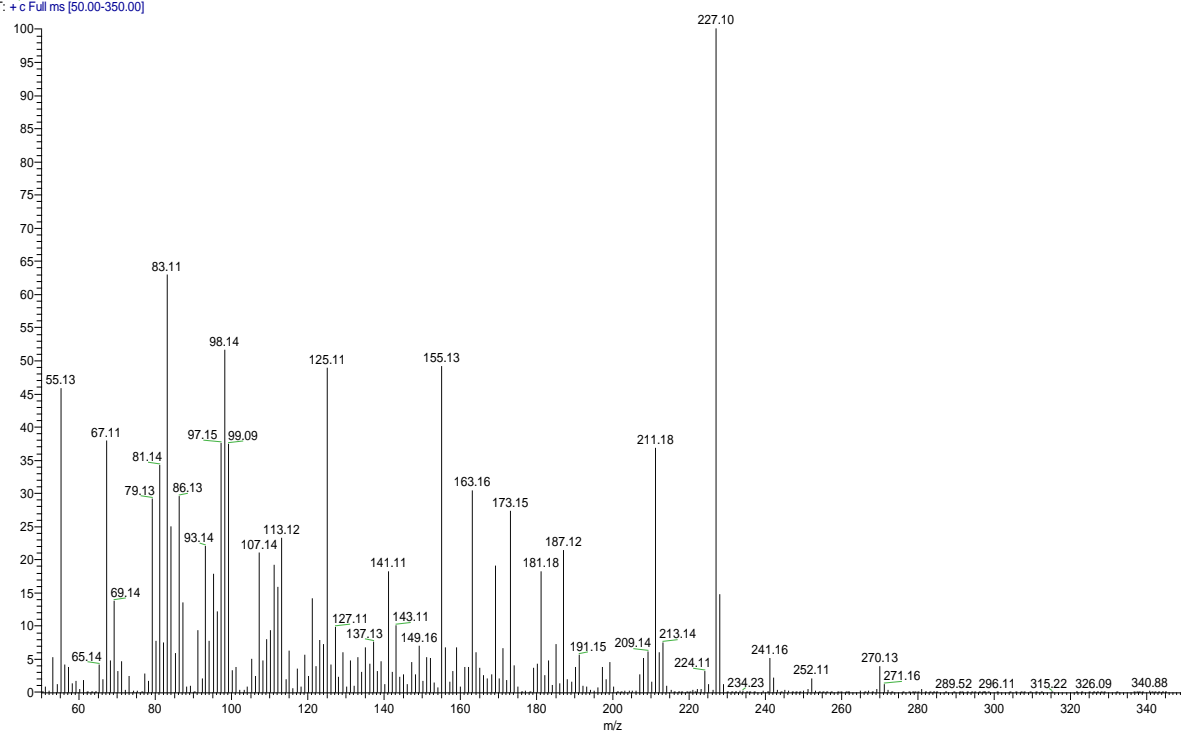
Obrázek č. 23: Experimentálně zjištěné spektrum ambretolidu



(mainly) Ethylene brassylate

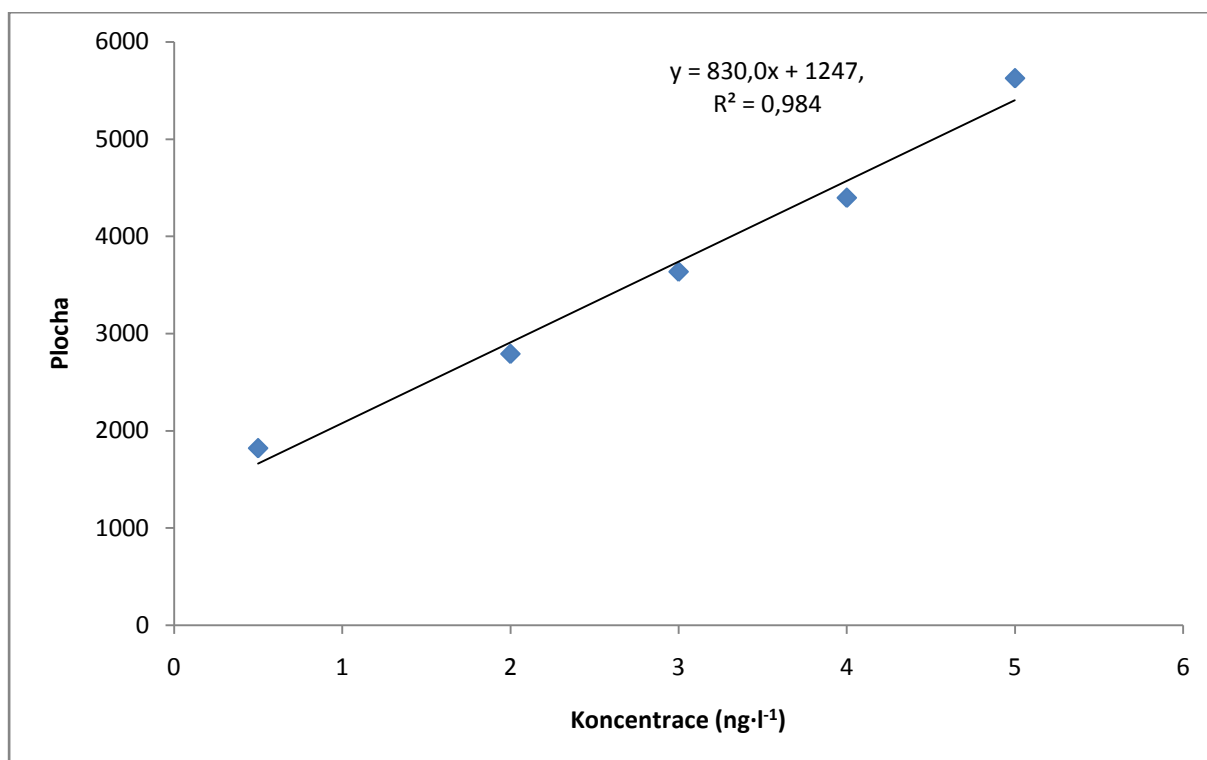
Obrázek č. 24: Spektrum ethylenu brasylatu v knihovně NIST

Smes\_06 #2324-2343 RT: 20.56-20.67 AV: 20 NL: 8.96E4  
T: + c Full ms [50.00-350.00]

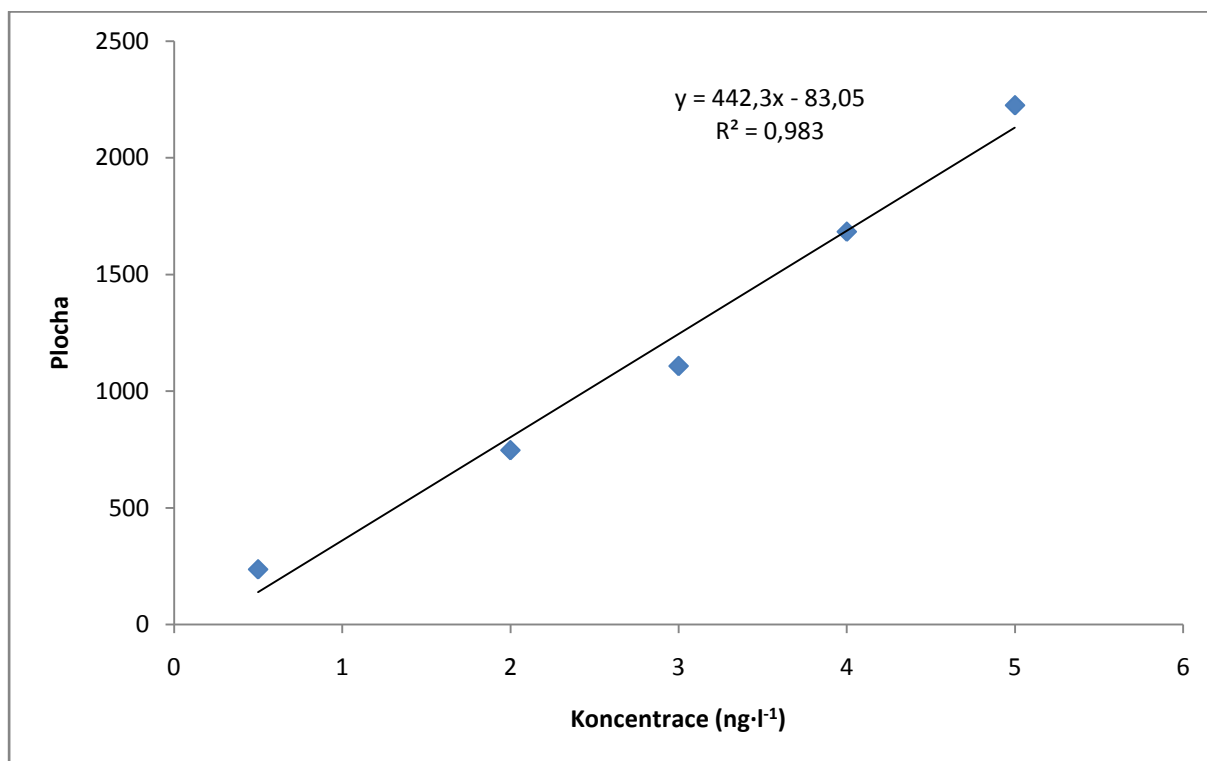


Obrázek č. 25: Experimentálně zjištěné spektrum ethylenbrasylatu

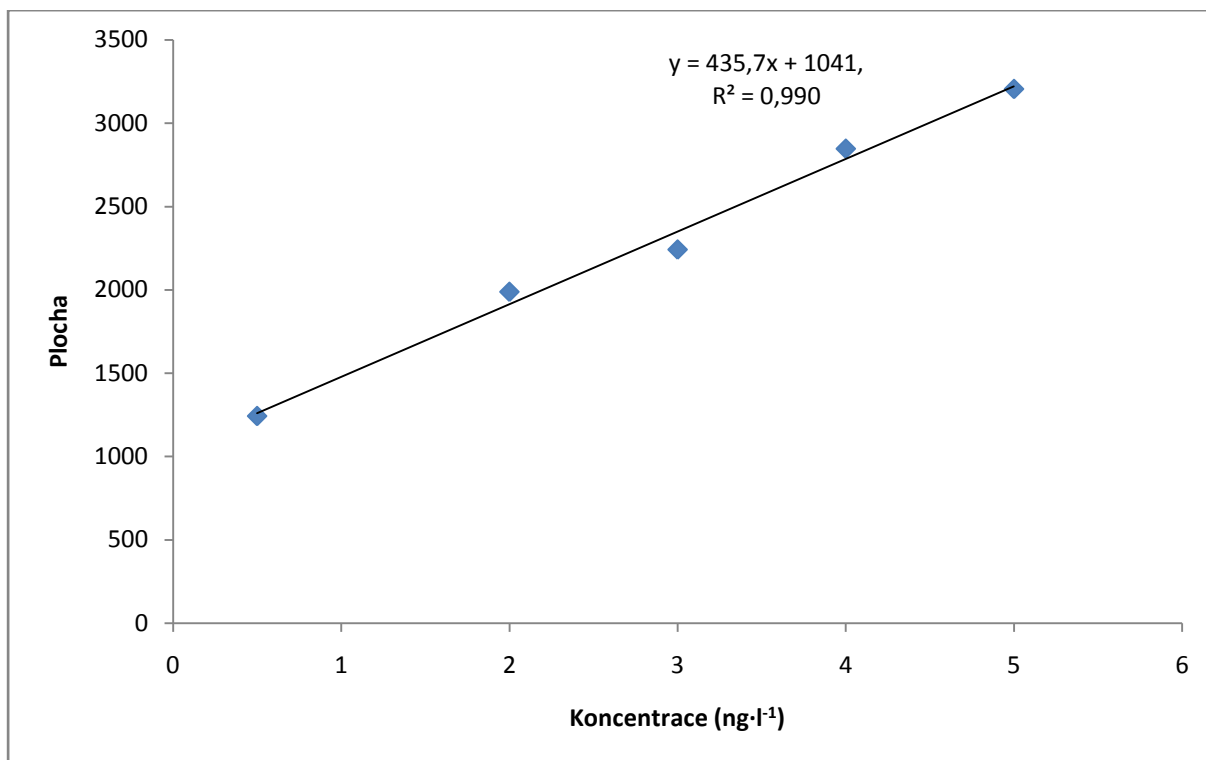
*Příloha č. 2: Kalibrační závislosti standardů pro stanovení LOD a LOQ*



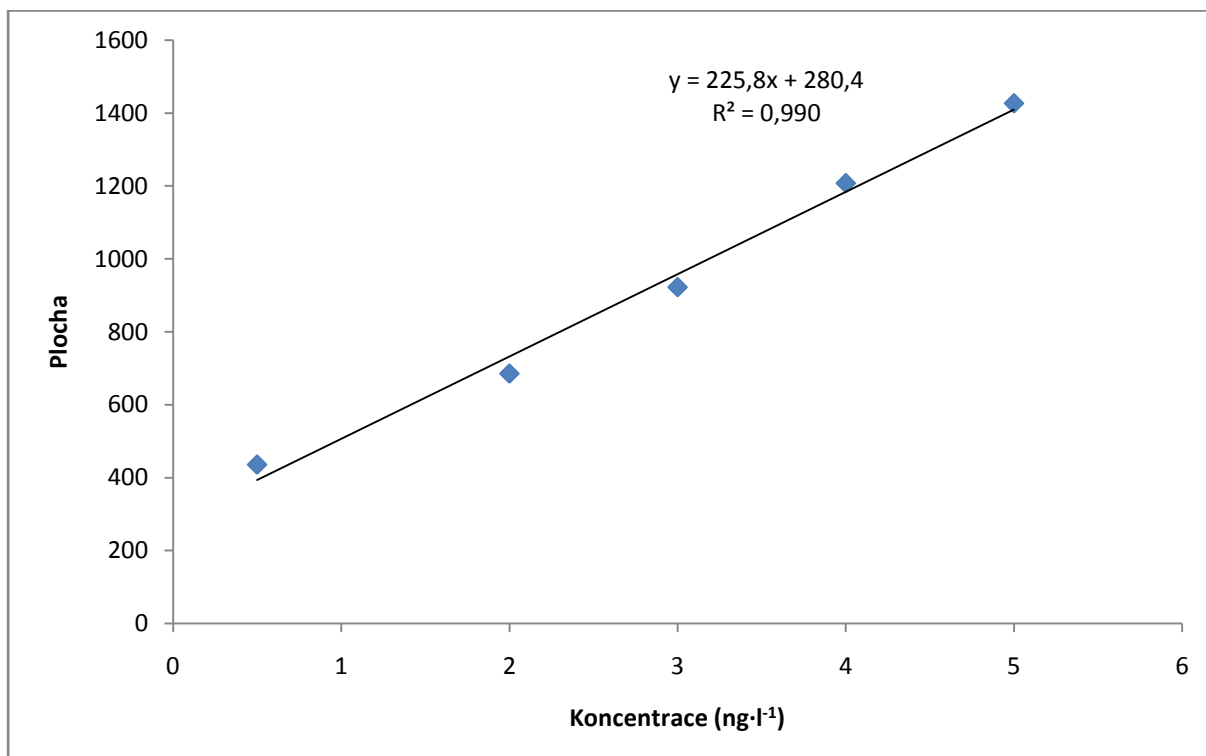
*Graf č. 20: Kalibrační závislost habanolidu*



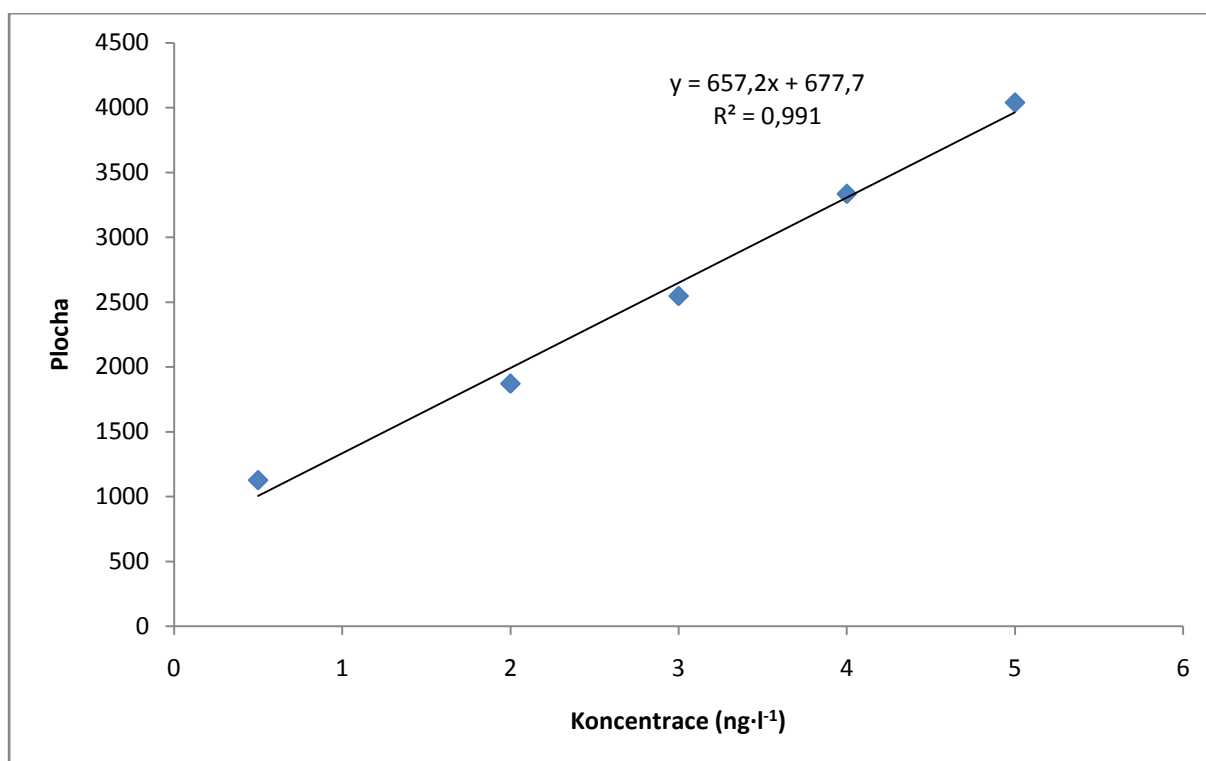
*Graf č. 21: Kalibrační závislost exaltolidu*



Graf č. 22: Kalibrační závislost ambretolidu



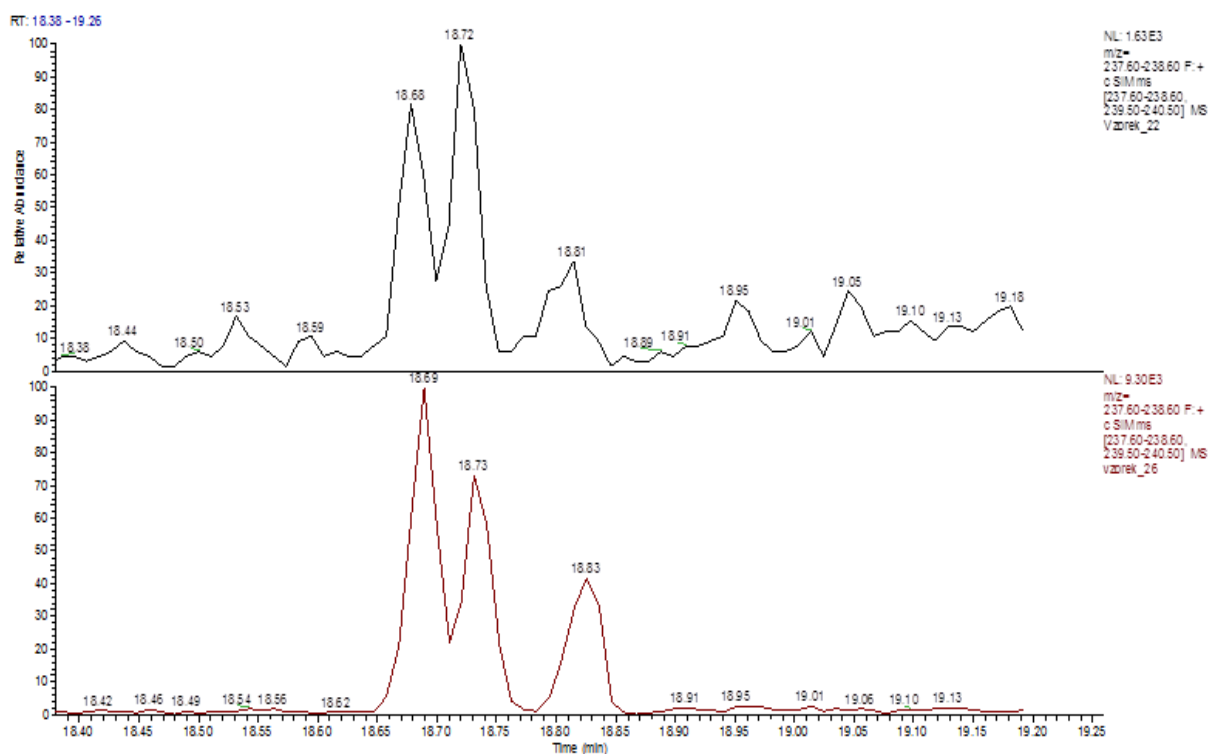
Graf č. 23: Kalibrační závislost musk MC4



Graf č. 24: Kalibrační závislost ethylenbrasylatu

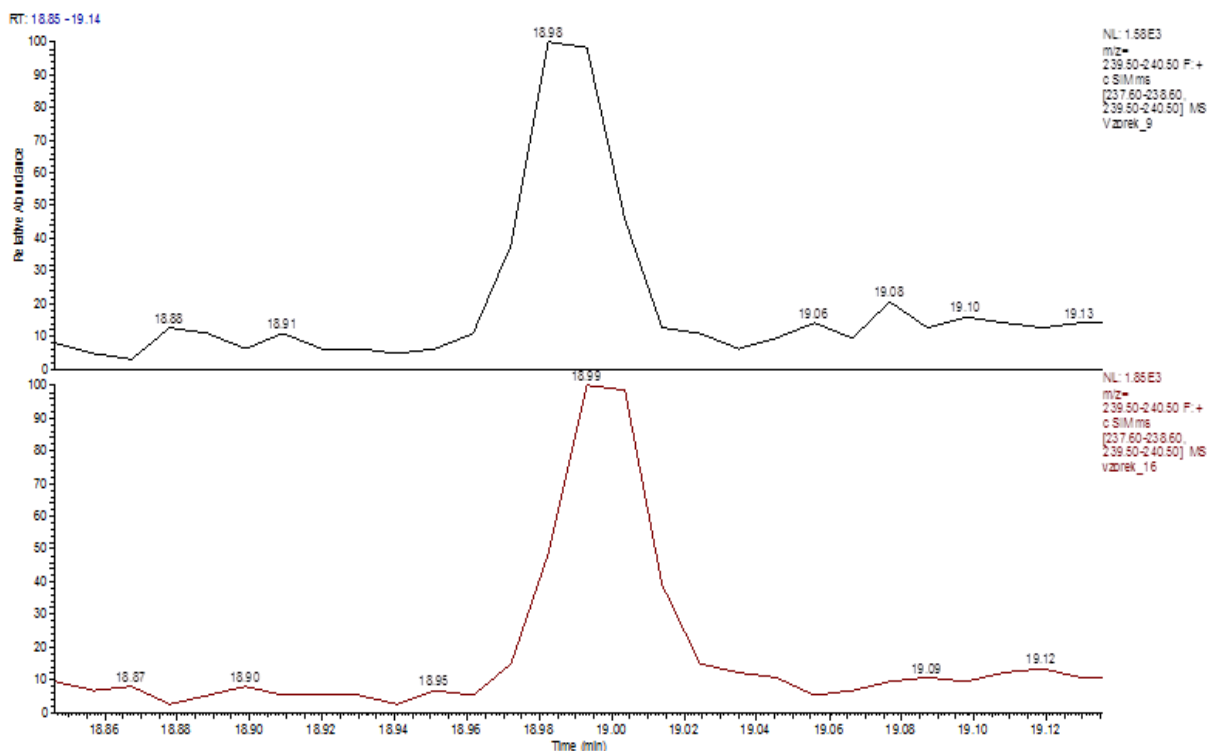
Příloha č. 3: Příklady vybraných chromatogramů reálných vzorků

Uvedené chromatogramy pocházejí z reálných vzorků odebraných na přítoku ČOV Brno-Modřice ze dne 16.4.2015

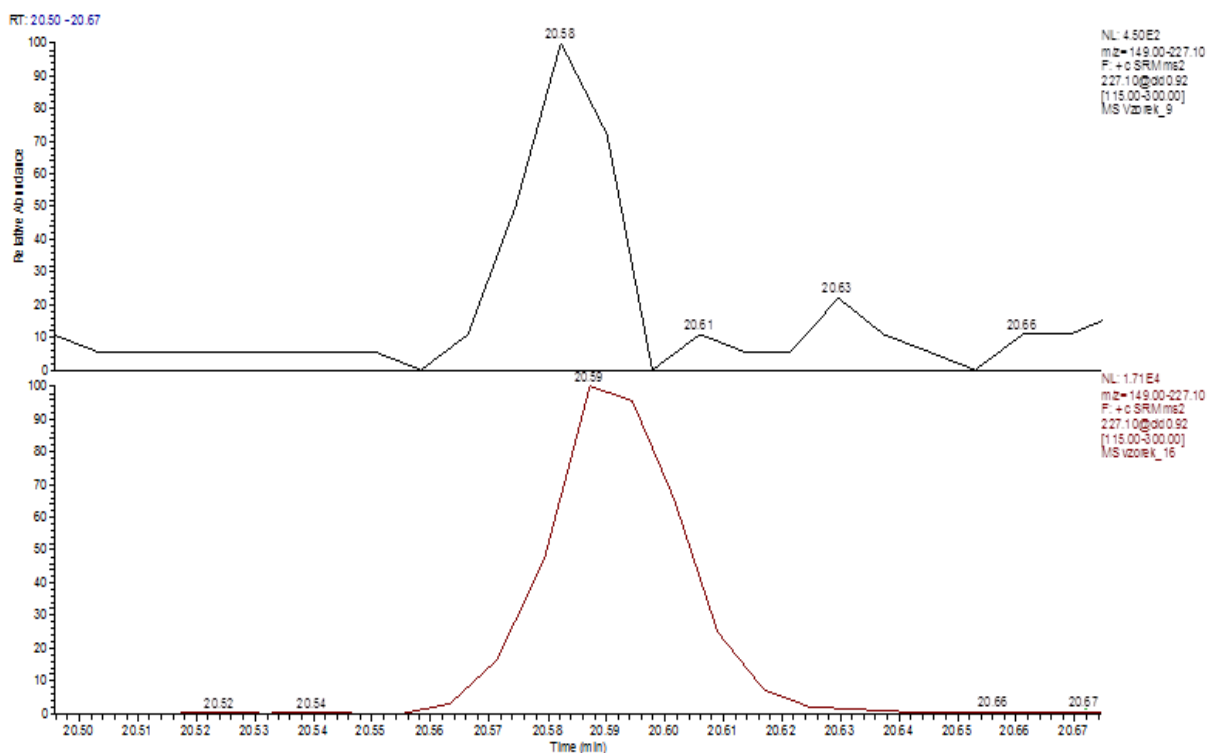


Obrázek č. 25: Příklad chromatogramu habanolidu bez standardního přídatku a se standardním přídatkem



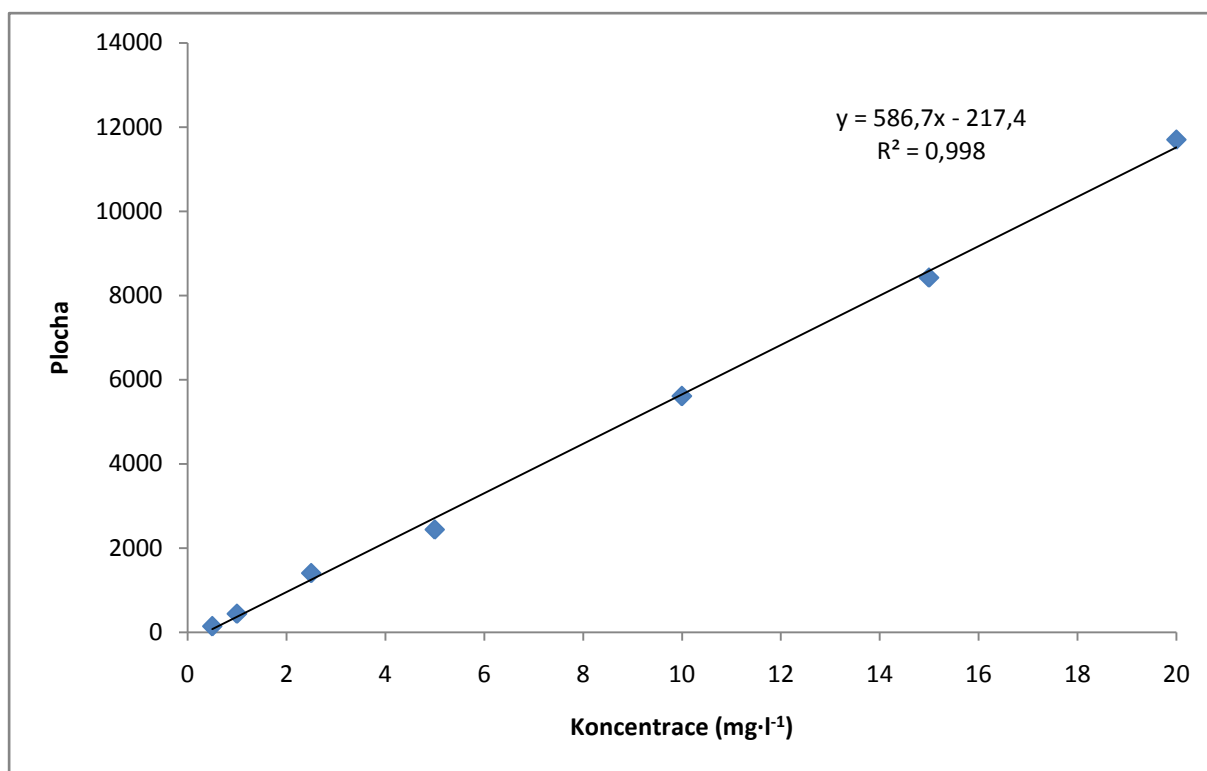


Obrázek č. 26: Příklad chromatogramu exaltolidu bez standardního přídatku a se standardním přídatkem

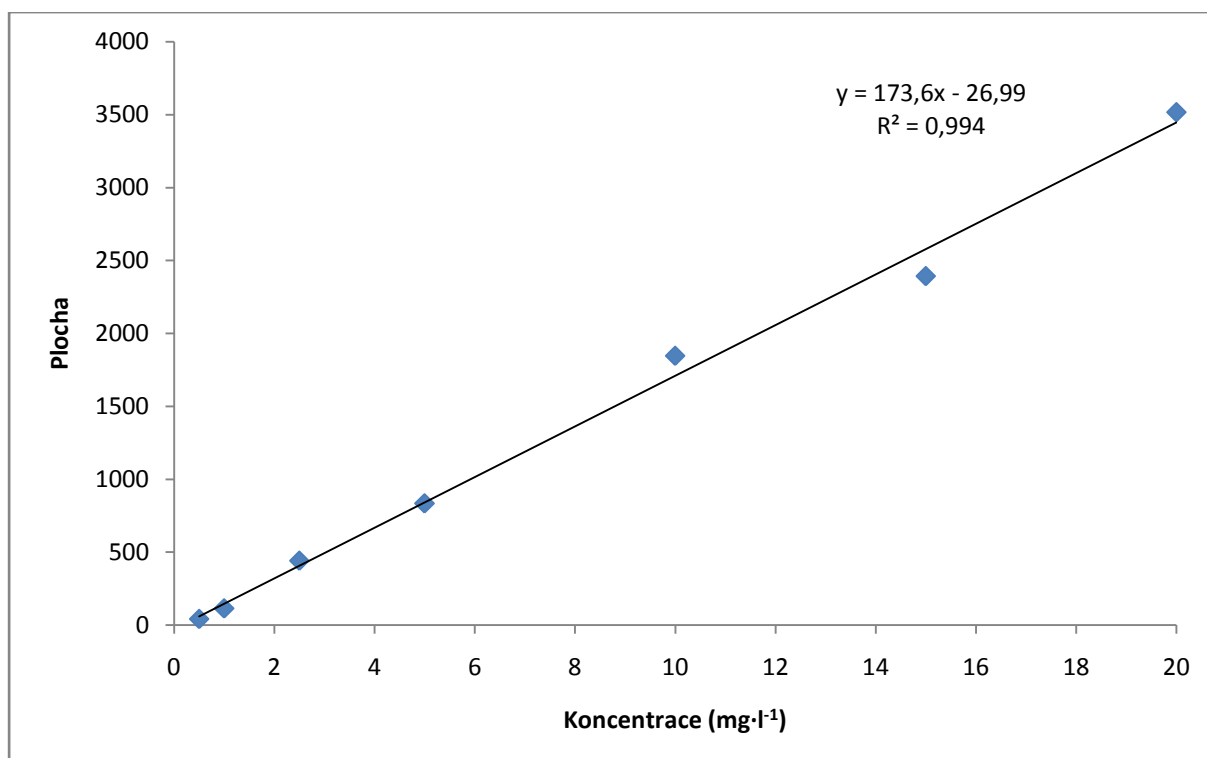


Obrázek č. 26: Příklad chromatogramu ethylen brasylatu bez standardního přídatku a se standardním přídatkem

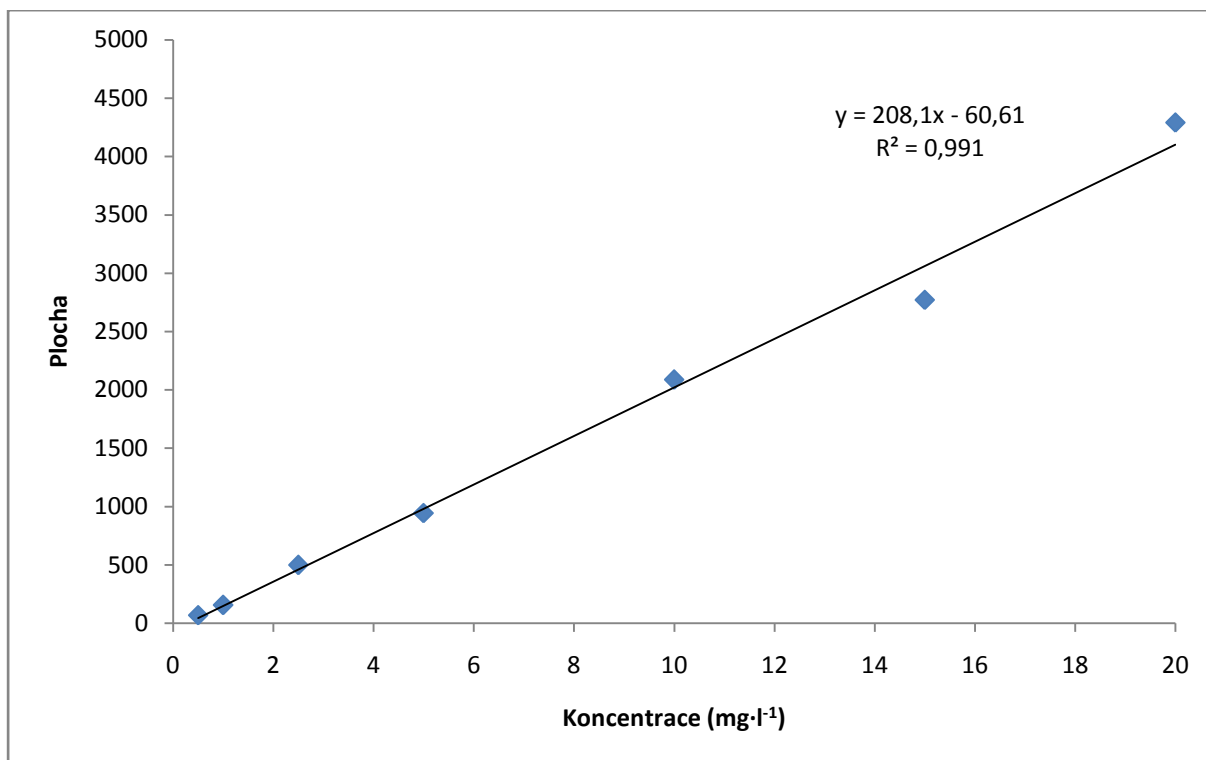
*Příloha č. 4: Kalibrační závislosti pro stanovení analytů v parfémeh*



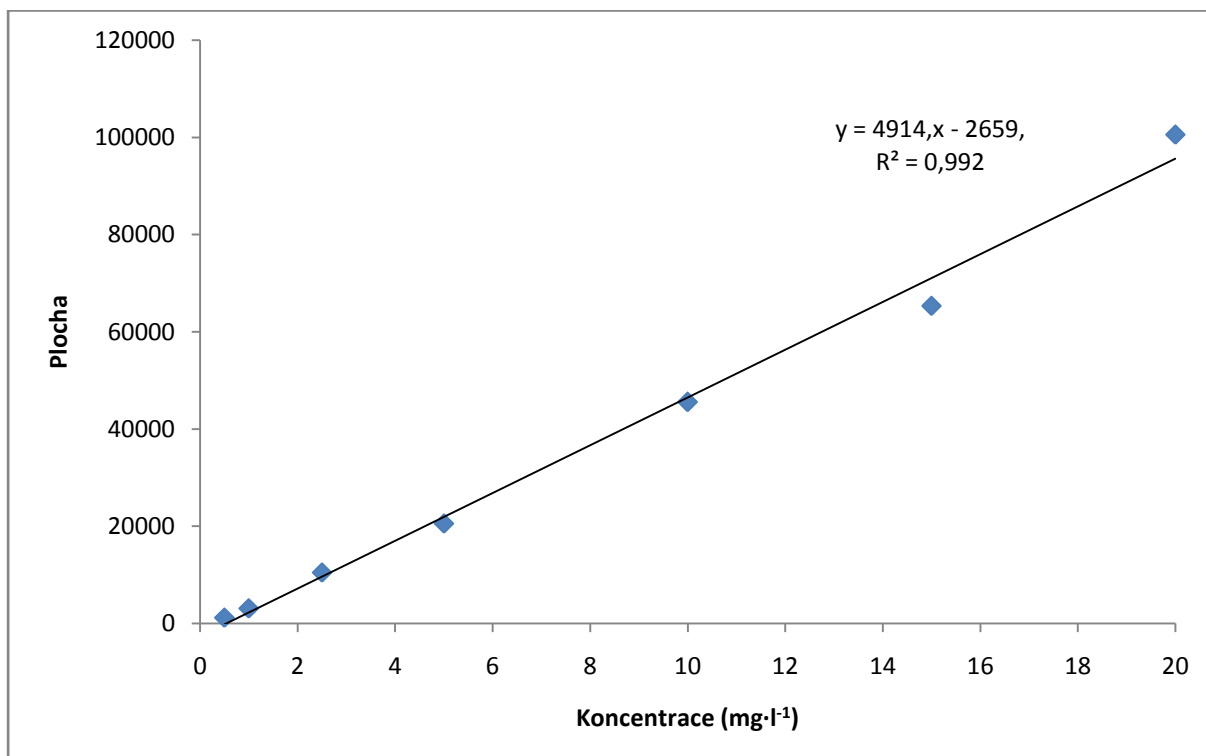
*Graf č. 25: Kalibrační závislost habanolidu*



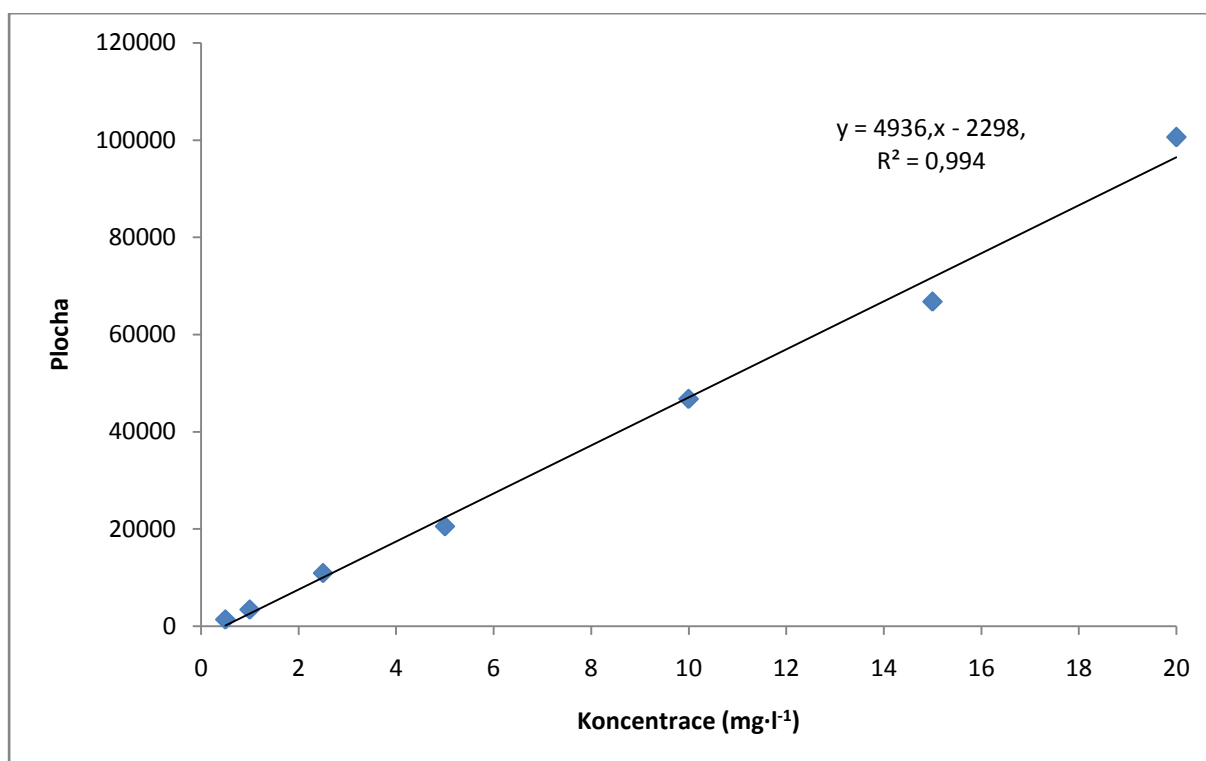
*Graf č. 26: Kalibrační závislost exaltolidu*



Graf č. 27: Kalibrační závislost ambretolidu



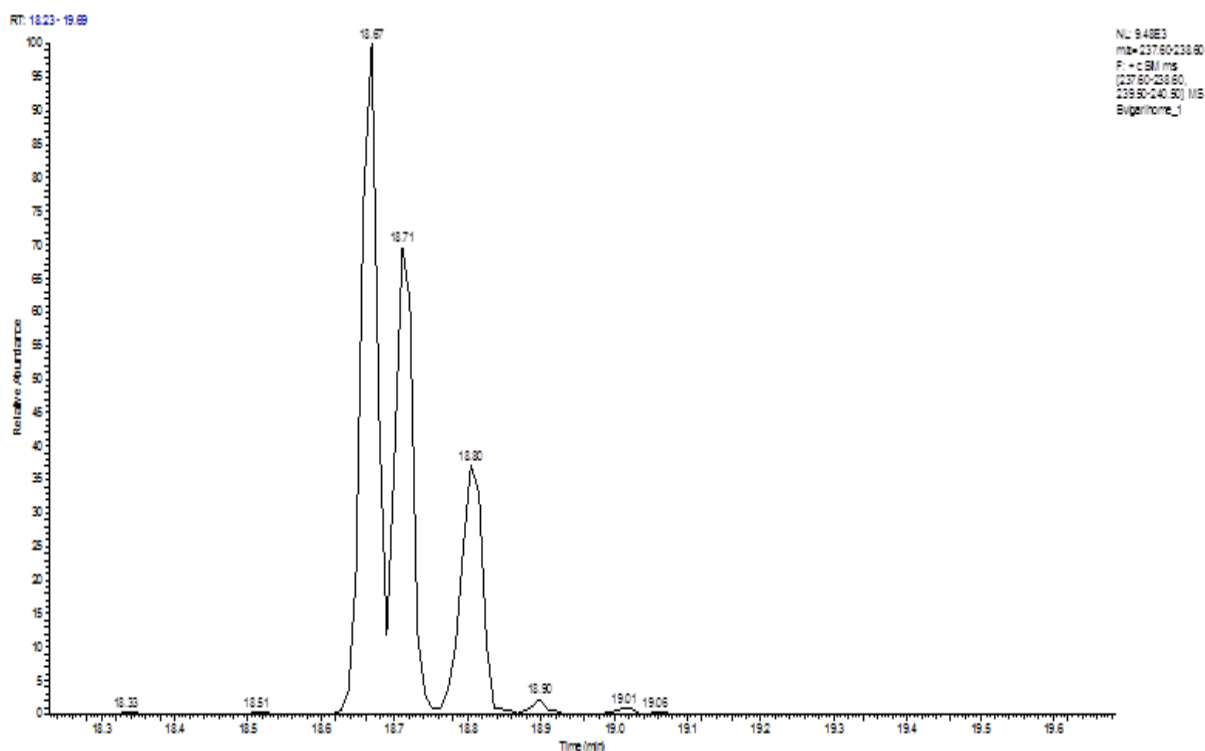
Graf č. 28: Kalibrační závislost musk MC4



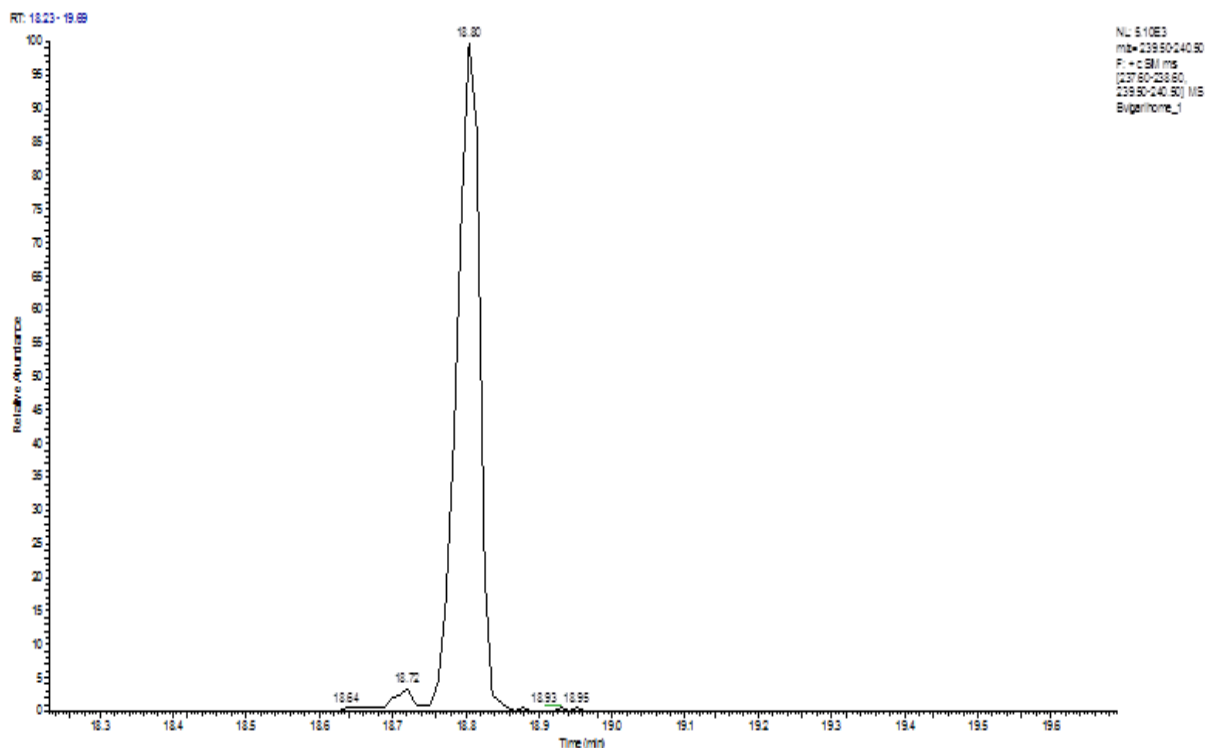
Graf č. 29: Kalibrační závislost ethylenbrasylatu

Příloha č. 3: Příklady vybraných chromatogramů reálných vzorků parfémů

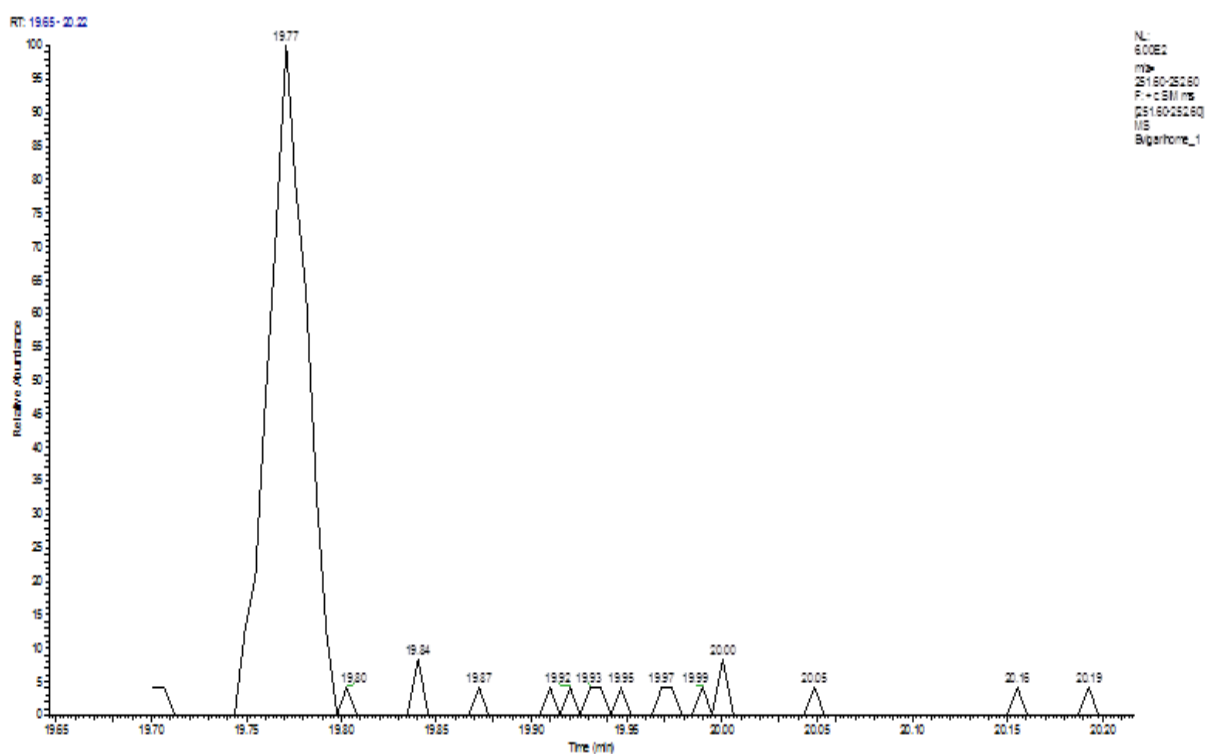
Uvedené chromatogramy pocházejí z reálného vzorku parfému Bvlgari AQVA Pour Homme



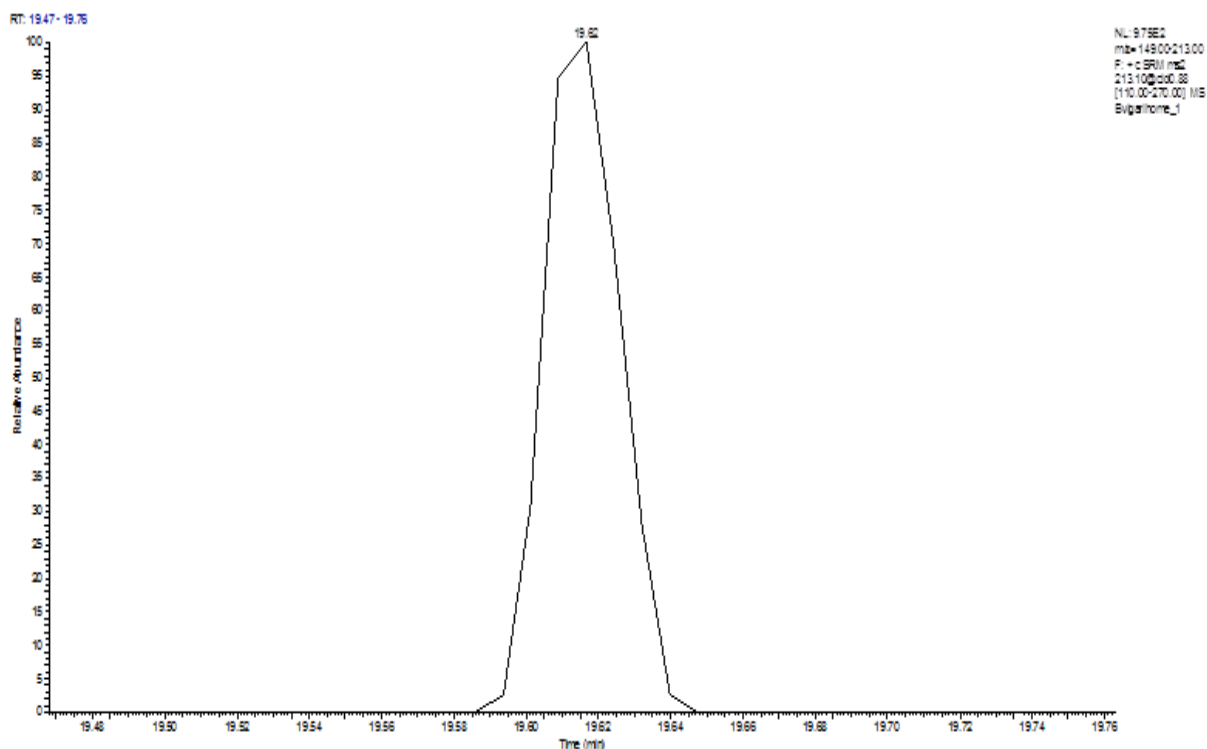
Obrázek č. 27: Příklad chromatogramu habanolidu v reálném vzorku parfému Bvlgari AQVA Pour Homme



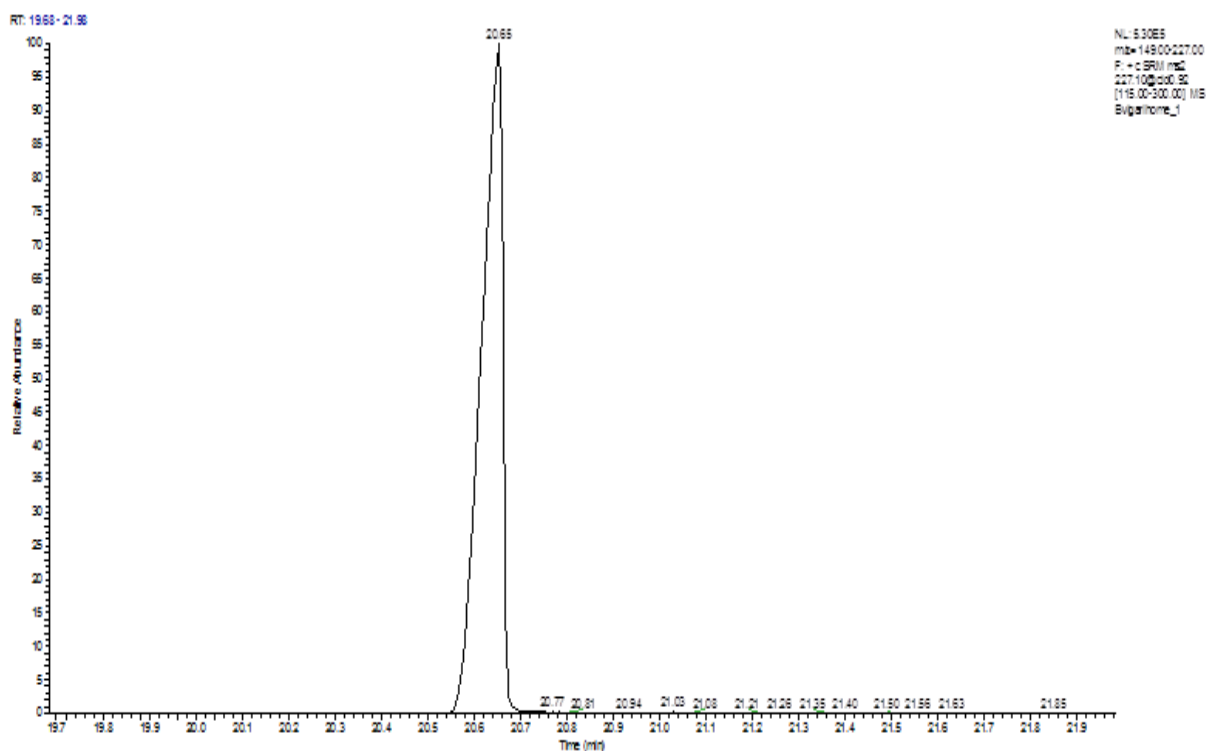
Obrázek č. 28: Příklad chromatogramu exaltolidu v reálném vzorku parfému Bvlgari AQVA Pour Homme



Obrázek č. 29: Příklad chromatogramu ambretolidu v reálném vzorku parfému Bvlgari AQVA Pour Homme

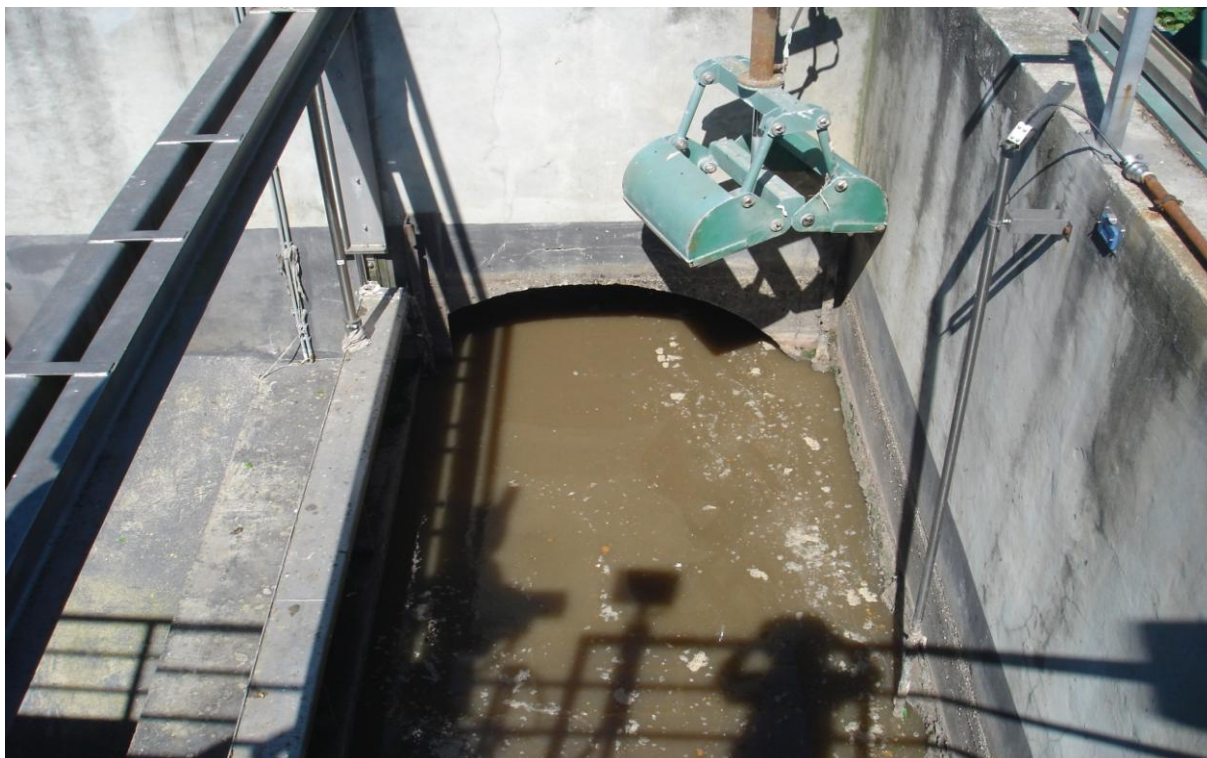


Obrázek č. 30: Příklad chromatogramu musk MC4 v reálném vzorku parfému Bvlgari AQVA Pour Homme



Obrázek č. 31: Příklad chromatogramu ethylenu brasylatuv reálném vzorku parfému Bvlgari AQVA Pour Homme

*Příloha č. 4: Fotodokumentace*



*Obrázek č. 32: Přítok odpadní vody na ČOV Brno-Modřice*



*Obrázek č. 33: Čistírna odpadních vod Brno-Modřice*

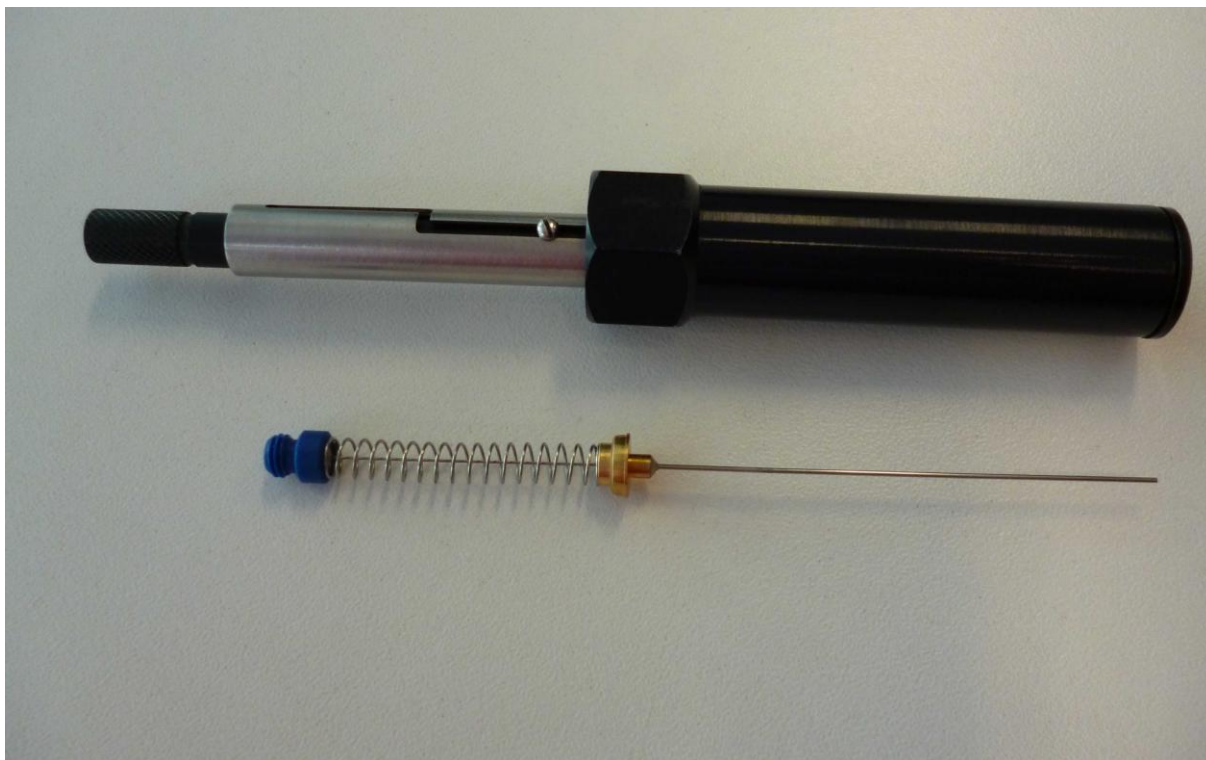


Obrázek č. 34: Letecký snímek čistírny odpadních vod Brno-Modřice

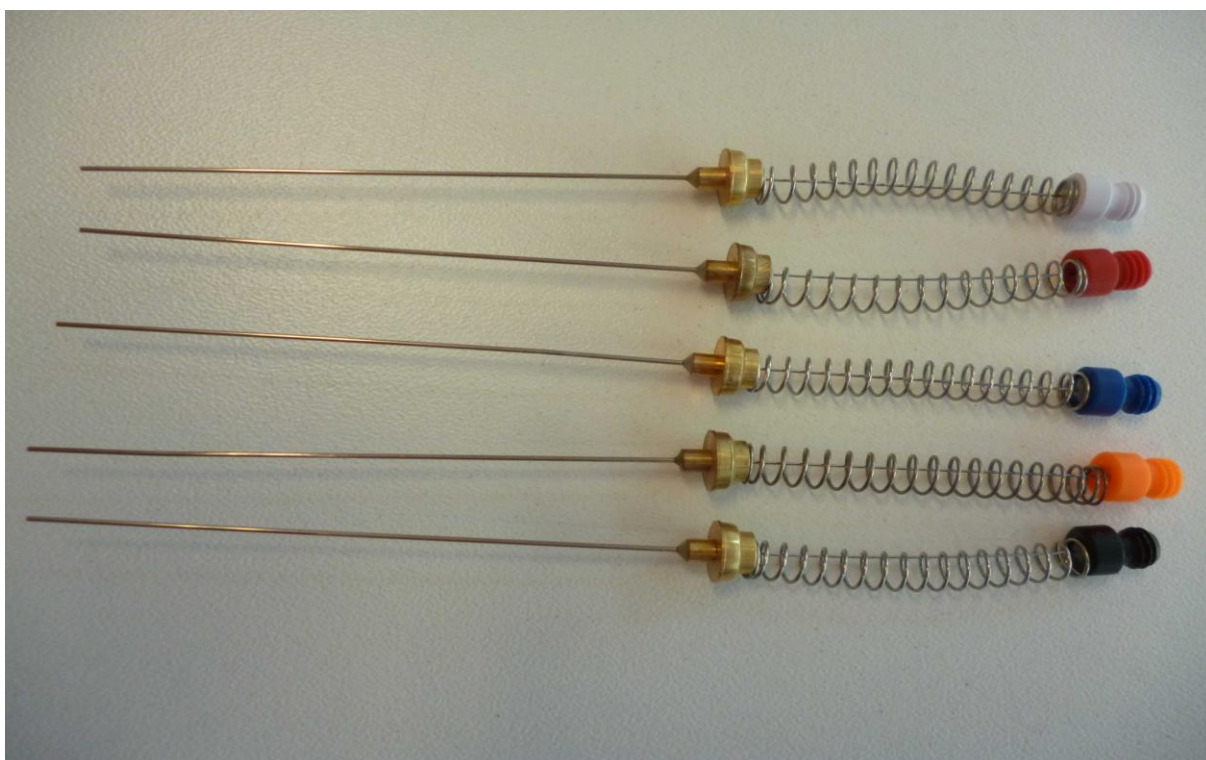


Obrázek č. 35: Plynový chromatogram Thermo Trace 1300 s hmotnostním detektorem ITQ 700 se sférickou iontovou pastí

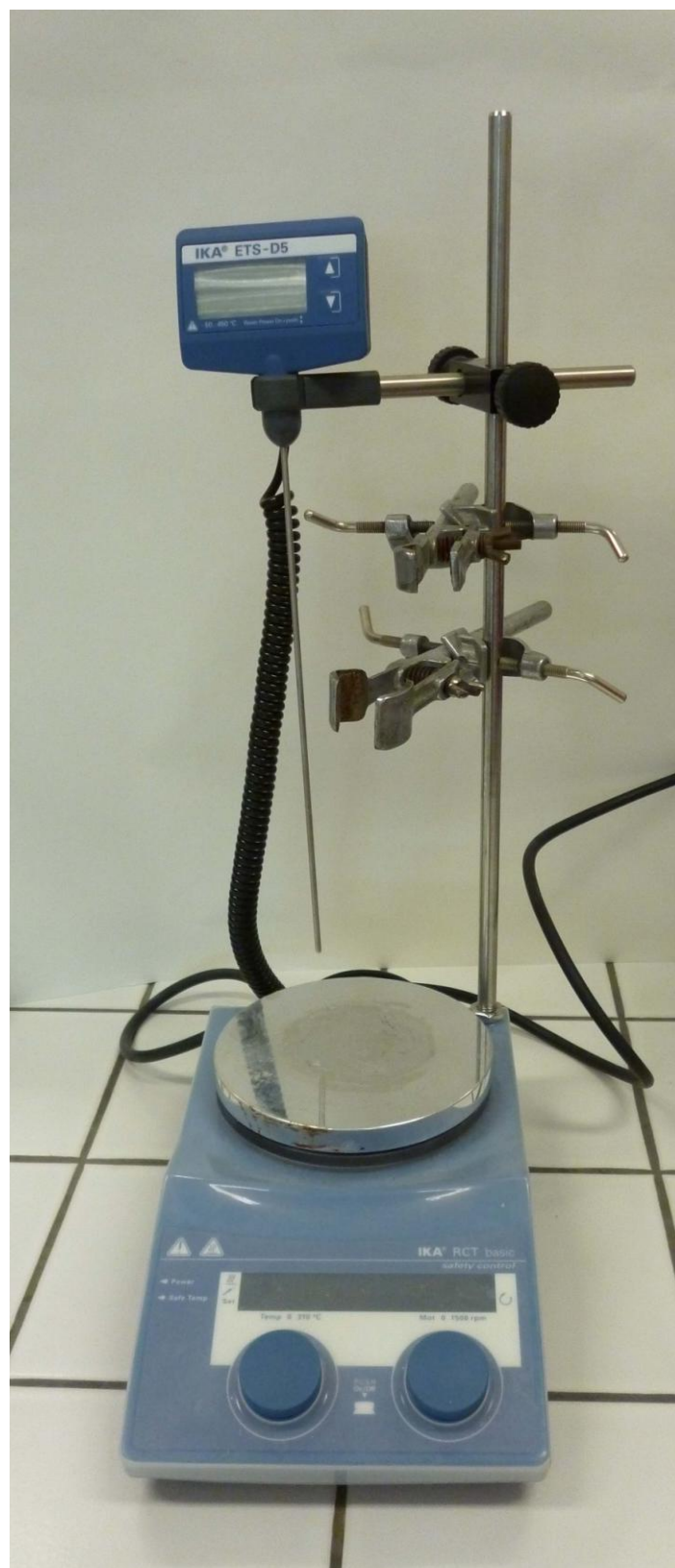




Obrázek č. 36: Vlákno PDMS/DVB 65  $\mu\text{m}$  a držák na SPME vlákna



Obrázek č. 37: Vlákna pro SPME



Obrázek č. 38: Magnetická míchačka s vyhříváním IKA RCT basic s teploměrem IKA ETS-D5