

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

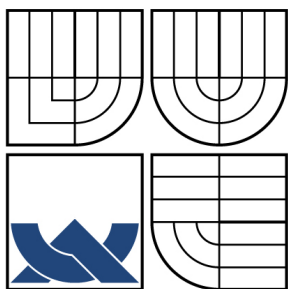
SYNTETICKÉ VONNÉ LÁTKY VE VODNÍ BIOTĚ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

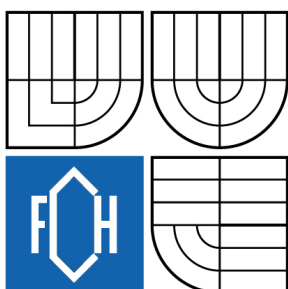
Bc. LIBOR ZOUHAR

BRNO 2009



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

SYNTETICKÉ VONNÉ LÁTKY VE VODNÍ BIOTĚ

MUSK COMPOUNDS IN WATER BIOTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

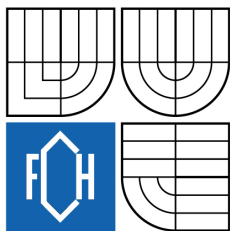
Bc. LIBOR ZOUHAR

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0294/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Bc. Libor Zouhar**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)
Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**
Konzultanti diplomové práce:

Název diplomové práce:

Syntetické vonné látky ve vodní biotě

Zadání diplomové práce:

- vypracování rešerše
- výběr sledovaných analytů
- optimalizace metody
- využití optimalizované metody pro reálné biotické matrice

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

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

Bc. Libor Zouhar
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Syntetické musk sloučeniny (MUSK) neboli syntetické vonné látky jsou organické látky běžně používané jako vonné složky parfémů, detergentů, kosmetiky a produktů osobní péče. Tyto sloučeniny jsou po použití vypouštěny prostřednictvím splaškové odpadní vody a čistíren odpadních vod do vodního prostředí. Výsledkem je akumulace v životním prostředí a výskyt v potravním řetězci zejména vodních a mořských ekosystémů. Syntetické musk sloučeniny jsou tedy nalézány v povrchové vodě, rybí tkáni a také v tělních tekutinách (krvi, moči, mléku) a tkáních lidského těla. Kvantitativní detekce a studium vlastností těchto sloučenin je důležitá činnost, protože dosud máme nízké znalosti o jejich osudu v životním prostředí (perzistence, bioakumulace) i toxicitě.

Tato diplomová práce je zaměřena na studium tří běžně používaných syntetických vonných látek – tonalidu, musk xylenu a musk ketonu. Základem této práce bylo optimalizovat metodu na stanovení vybraných sloučenin ve vodě a vodní biotě (rybách). Cílem bylo stanovení vybraných musk sloučenin v reálných vzorcích (voda, ryby) a zhodnocení výsledků. Jako extrakční technika pro izolaci analytů ze vzorků byla pro zpracování biotických vzorků použita tlaková extrakce rozpouštědlem (PSE) a pro zpracování vzorků vod mikroextrakce tuhou fází (SPME). Identifikace a kvantifikace analytů byla provedena vysokorozlišovací plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

ABSTRACT

Synthetic musk compounds (MUSK) or synthetic fragrances are organic substances commonly used as fragrant constituents of perfumes, detergents, cosmetics and personal care products. These compounds are discharged after use via domestic wastewater and sewage treatment plants to the aquatic environment. The result is accumulation in the environment and occurrence in a food chain especially of aquatic and marine ecosystems. Synthetic musk compounds are also found in surface water, fish tissues and also in body fluid (blood, urine, milk) and tissues of human body. Quantitative detection and studying properties of these compounds is an important activity because we have low knowledge about their fate in the environment (persistence, bioaccumulation) and toxicity.

This diploma thesis is focused on three commonly used synthetic fragrances – tonalide, musk ketone and musk xylene. The base of this study was to perform a method optimisation for the determination of selected compounds in water and water biota (fish). The aim was determination of selected musk compounds in real samples (water, fish) and evaluation of the results. Pressurized solvent extraction (PSE) for fish samples and solid phase microextraction (SPME) for water samples were used for isolation of analytes from samples. The identification and quantification of analytes was carried out by high resolution gas chromatography – mass spectrometry.

KLÍČOVÁ SLOVA

Musk sloučeniny, vůně, ryby, voda, izolace, separace, stanovení, GC / MS

KEYWORDS

Musk compounds, fragrance, fish, water, isolation, separation, determination, GC / MS

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

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Velmi rád bych poděkoval vedoucí práce paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za podporu, odbornou pomoc a cenné rady v průběhu řešení této práce. Dále bych velmi rád poděkoval Mgr. Kristýně Kubíčkové za obětavou spolupráci, panu doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. a paní Ing. Ludmile Mravcové za odbornou pomoc. V neposlední řadě bych rád poděkoval všem pracovnícům z VFU Brno za jejich milou a vstřícnou pomoc během doby mého experimentálního měření. Velice děkuji také svým rodičům, příbuzným a přátelům za neustálou podporu a lásku.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Vonné látky a parfémy	9
2.1.1 Historie vůní	9
2.1.1.1 Egypt, Řecko, Řím	9
2.1.1.2 Arabové a středověká Evropa	10
2.1.1.3 Francie	10
2.1.1.4 Období 19. a 20. století	11
2.1.1.5 Současný stav	12
2.1.2 Čichový orgán člověka	13
2.1.3 Čichový orgán u zvířat	14
2.1.4 Biologická aktivita aromatických látek	15
2.1.4.1 Feromony	16
2.1.5 Rozdělení vonných látek	17
2.1.5.1 Rostlinné vonné látky – silice	17
2.1.5.2 Živočišné vonné látky	18
2.1.5.3 Syntetické vonné látky	19
2.1.6 Způsoby izolace vůní	19
2.1.7 Parfémy	20
2.1.7.1 Klasifikace a kategorie vůní	21
2.1.7.2 Pyramidový systém parfému	22
2.1.7.3 Výroba parfému	23
2.1.7.4 Flakóny	23
2.1.7.5 Rozdělení vonných produktů	24
2.2 Charakteristika syntetických MUSK sloučenin	24
2.2.1 Rozdělení musk sloučenin podle struktury	24
2.2.1.1 Nitro-musk sloučeniny	25
2.2.1.2 Polycyklické musk sloučeniny	26
2.2.1.3 Makrocyclické musk sloučeniny	27
2.2.1.4 Alicyklické musk sloučeniny	27
2.2.1.5 Steroidní musk sloučenina – androstenol	28
2.2.2 Sledování zástupci	29
2.2.2.1 Musk xylen (MX)	29
2.2.2.2 Musk keton (MK)	29
2.2.2.3 Tonalid (AHTN)	30
2.2.3 Fyzikálně-chemické a environmentální vlastnosti	31
2.2.4 Degradace	31
2.2.4.1 Oxidace a fotolýza ve vzduchu	31
2.2.4.2 Degradace (fotolýza) ve vodě	32
2.2.4.3 Biodegradace v kalu	32
2.2.5 Výskyt v ŽP	33
2.2.5.1 Voda a vodní biota	33
2.2.5.2 Lidská plazma, tuková tkáň a mléko	34
2.2.5.3 Ostatní	35

2.2.6	Toxicita.....	36
2.2.7	Metabolizace	37
2.3	Analytická chemie MUSK sloučenin.....	39
2.3.1	Opatření proti kontaminaci z vnějšího prostředí	39
2.3.2	Odběr vzorku.....	40
2.3.2.1	Odběr vody	40
2.3.2.2	Vzorkování pomocí SPMD	41
2.3.3	Transport a uchování vzorku.....	43
2.3.4	Zpracování tuhých vzorků před analýzou	43
2.3.4.1	Homogenizace	43
2.3.4.2	Sušení	43
2.3.5	Izolace analytů z matrice.....	44
2.3.5.1	Soxhletova extrakce	44
2.3.5.2	Zrychlená extrakce rozpouštědlem (PSE, ASE, PFE).....	45
2.3.5.3	Extrakce ultrazvukem (sonikace).....	46
2.3.5.4	Extrakce za použití mikrovln (MASE, MAE, FMW)	46
2.3.5.5	Extrakce tekutinou v nadkritickém stavu (SFE)	47
2.3.5.6	Mikroextrakce tuhou fází (SPME)	47
2.3.6	Přečištění vzorku, předseparace a zkoncentrování analytů.....	49
2.3.6.1	Klasická extrakce	49
2.3.6.2	Dialýza	49
2.3.6.3	Extrakce pevnou fází (SPE)	49
2.3.6.4	Adsorpční sloupcová (kolonová) chromatografie.....	50
2.3.6.5	Gelová permeační chromatografie (GPC).....	50
2.3.7	Identifikace a kvantifikace analytů	51
2.3.7.1	Plynová chromatografie (GC)	51
2.3.7.2	Hmotnostní spektrometrie (MS).....	53
2.3.7.3	Spojení GC s MS.....	55
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	56
3.1	Používané přístroje, zařízení a software.....	56
3.2	Chemikálie a standardy	56
3.3	Biotická tkáň	57
3.3.1	Kalibrace pro biotickou tkáň.....	57
3.3.2	Identifikace a kvantifikace analytů pomocí GC / MS	58
3.3.3	Specifikace a zpracování biotických vzorků.....	58
3.3.4	Stanovení obsahu tuku v jednotlivých vzorcích.....	59
3.3.5	Optimalizace podmínek pro PSE	59
3.3.5.1	Stanovení výtěžnosti analytického postupu	60
3.3.6	Optimalizace gelové permeační chromatografie.....	61
3.3.7	Stanovení analytů v reálných biotických vzorcích.....	61
3.3.8	Čistící postupy.....	61
3.4	Voda	62
3.4.1	Kalibrace SPME	62
3.4.2	Podmínky SPME.....	62
3.4.3	Identifikace a kvantifikace analytů pomocí GC / MS	63
3.4.4	Specifikace vzorků vody	63

3.4.5 Stanovení analytů v reálných vzorcích vod.....	63
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	64
4.1 Biotická tkáň	64
4.1.1 Kalibrace pro biotickou tkáň.....	64
4.1.1.1 Kalibrace MX.....	64
4.1.1.2 Kalibrace AHTN	65
4.1.1.3 Kalibrace MK.....	65
4.1.1.4 Určení LOD a LOQ z kalibračních křivek.....	66
4.1.2 GC/MS analýza	67
4.1.3 Stanovené obsahy tuku v jednotlivých vzorcích.....	70
4.1.4 Optimalizace extrakčních podmínek pro PSE.....	71
4.1.5 Stanovení výtěžnosti analytického postupu	71
4.1.5.1 Identifikace deuterovaných standardů.....	72
4.1.6 Nejistoty analytických výsledků	74
4.1.7 Optimalizace gelové permeační chromatografie.....	75
4.1.8 Stanovení analytů v reálných biotických vzorcích.....	76
4.1.8.1 Musk xylen.....	76
4.1.8.2 Tonalid	77
4.1.8.3 Musk keton.....	78
4.1.8.4 Souhrn výsledků a diskuze.....	78
4.2 Voda.....	81
4.2.1 Kalibrace pro SPME.....	81
4.2.1.1 Určení LOD a LOQ z kalibračních křivek.....	83
4.2.2 Vyhodnocení reálných vzorků vod	83
5. ZÁVĚR.....	85
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	88
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	92
8. SEZNAM PŘÍLOH	94
9. PŘÍLOHY.....	95

1. ÚVOD

Důvěra v účinnou pomoc přírodních látek je stará jako lidstvo samo. Hodnověrné zprávy o přírodních vonných látkách pocházejí již ze 4. tisíciletí před naším letopočtem. Od Číny až po Egypt byly známy způsoby, jak z rostlinného materiálu získávat vůně. Zdroje a způsoby přípravy vonných látek byly přísně utajovány, protože těm, kdo je ovládali, poskytovaly značné bohatství a moc. Jemné vůně květů, bylin i trav, omamné vůně balzámů, vzácných dřev i mošusu a ambry, bohoslužebné ceremonie doprovázené dýmem spalovaných pryskyřic, to vše bylo neoddelitelnou součástí života dávných civilizací. Vůně umocňují naše vnímání a dokreslují význam všech ostatních smyslů. Díky nim jsme schopni vnímat některé informace dříve, než je zaregistrují jiné smysly. Podle nejnovějších poznatků lze prostřednictvím vůně dokonce manipulovat i s lidským myšlením. Řada přírodních vonných surovin byla dovážena z dobytých a kolonizovaných tropických oblastí. Bylo prolito mnoho krve než byl v Evropě dostatek aromatických látek. Vůně hořícího materiálu se linou z indiánských, hinduistických, katolických nebo pravoslavných chrámů dodnes. Teprve objevy chemických syntéz a výroba syntetických vonných látek zahájily období, v němž příjemné vůně jsou dostupné téměř všem vrstvám lidské společnosti. Z výroby vonných látek se stalo významné průmyslové odvětví [1, 2].

Nelze pochybovat o tom, že v moderní lidské společnosti má průmysl látek vonných své nezastupitelné místo. Spotřebitelé dostávají vonné látky ve formě parfémů, kolínských a toaletních vod, v kosmetických výrobcích, mýdlech, v pracích a čisticích prostředcích a v dalších, donedávna vůbec neparfémovaných technických výrobcích. Parfém se stal určitým reprezentativním prvkem, který hraje důležitou roli již při prvním setkání parfémovaného výrobku se zákazníkem. Do parfémových kompozic se kromě kvalitních přírodních materiálů (silic, extraktů) často používají tzv. přírodně-identické látky, tj. látek běžně se vyskytujících v přírodě, avšak vyráběných z ekonomických důvodů synteticky. Vedle toho se pak rovněž používají i látky, které se v přírodě vůbec nevyskytují a jsou vyrobeny synteticky. Použití těchto látek podléhá samozřejmě přísné schvalovací proceduře [3].

Syntetické analogy pižma (SAPŽ, tzv. „musk“ sloučeniny) představují novou, do nedávné doby nesledovanou skupinu perzistentních organických environmentálních kontaminantů. Jedná se o látky s rozsáhlým použitím v oblasti aromatizace různých typů detergentů a kosmetických přípravků, které, jak ukázaly studie kontaminace vodního ekosystému realizované v 90. letech v Německu, jsou velmi perzistentní a díky své lipofilitě mají schopnost biokoncentrace v různých typech vodních organismů; dokonce byly nalezeny také v lidské tkáni a tělních tekutinách. K průniku těchto látek do životního prostředí dochází především prostřednictvím odpadních vod, neboť při běžných čistírenských úpravách nedochází k dostatečně účinné biodegradaci nebo sorpci [19]. O osudu musk sloučenin v životním prostředí a o jejich toxicitě a vlivu na člověka existuje dosud omezené množství informací, a proto jsou nutné další studie, které by chování a vliv těchto látek blíže specifikovaly.

Cílem této diplomové práce je optimalizace analytického postupu a samotné stanovení tří vybraných klasických musk sloučenin (tonalid, musk xylen, musk keton) v reálných vzorcích ryb. Zároveň budou vybrané musk sloučeniny stanoveny i ve vodě, ze které ryby pochází. Nakonec budou získané výsledky interpretovány a bude vysloven závěr o míře výskytu daných analytů ve vodní biotě (rybách).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vonné látky a parfémy

2.1.1 Historie vůní

Můžeme přesvědčivě prohlásit, že parfémy jsou tak staré jako lidstvo samo, protože již dávno před tím, než se člověk objevil na scéně, existovaly na zemi květiny a byliny, které krásně voněly. Naše znalosti o počátcích parfémů byly nedokonalé až do nedávné doby. Historikové, kteří se zabývali tímto problémem, se domnívali, že našli pevný základ na nástěnných malbách chrámu královny Hatšepšovet v Thébách, na nichž je zobrazeno egyptské loďstvo s nákladem myrhy a jiných exotických a aromatických rostlin ze země Punt před 3 500 lety. Myrha a kadidlo, základní suroviny starověkých parfémů, se vyskytovaly pouze v Somálsku a na jihu arabských zemí. Do této oblasti historikové umísťovali i zemi Punt. V současné době se prokázalo, že egyptské lodě se plavily po řece Nilu a dostaly se dále, než by kdokoli v té době pokládal za možné. Dopluly do Ugandy, kde podél břehů Albertova jezera ležela země Punt. Ovšem v té oblasti myrha ani kadidlo není, a tak je nejranější historie parfémů dále opředena tajemstvím a mystikou. V těch dávných dobách bylo kadidlo stejně důležité jako vonné oleje. Výraz „*parfum*“ je odvozen z latinského „*per fumum*“ znamenající „prostřednictvím kouře“. Vůně kadidla unášela modlíci se prosebníky k bohům na nebesích, neméně blahodárně působila na čich a zbavovala je všeho špatného. Při západu slunce se v chrámech i v domácnostech zapalovala proslulá směs kyphi, což byla těžká směs kadidla [4]. Je známo, že i bibliční tři králové přinášeli Ježíšovi jako dar zlato, kadidlo a myrhu. V době vlády Ptolemaiovců žil v Egyptě řecký matematik Méchanikos (kolem r. 120 př. n. l.). Ten již v tehdejší době zkonstruoval automat, který po vhození mince vydal dávku voňavé vody. Tento přístroj byl umístěn před chrámem [1].

2.1.1.1 Egypt, Řecko, Řím

Kosmetika využívá nenásilnou léčivou sílu a příznivé účinky bylin. První rozkvět zažila kosmetika ve *starém Egyptě*. Vybrané orientální vonné látky (zpracovávané na masti a oleje) a drahá líčidla se staly předobrazem péče o krásu, který tato rozvinutá kultura na Nilu předala antickým kulturním národům. Už před více než 4 000 lety vyráběli Sumerové přípravek velmi podobný mýdлу [5]. Egypťané vyráběli voňavky a masti takovým způsobem, že namáčeli vonné rostliny do oleje a tekutinu potom ždímalí přes plátno, anebo namáčeli jejich okvětní plátky do tuku, který absorboval a udržel jejich vůni. V egyptských pyramidách objevili archeologové nádoby obsahující aromatické látky. Podle starých záznamů se dokonce podařilo vyrobit parfém, který používala Kleopatra [4, 6, 7].

Ve starořeckých eposech *Iliada* a *Odysea* se mluví o hrdinech natírajících si těla vonnými oleji a voňavkami. Hlavní součást antické kosmetiky tvořily přírodní látky: rostlinné oleje, včelí vosk, med, mléko, otruby, léčivé zeminy, výtažky z květů a plodů. Ve *starém Řecku* působily jako voňavkářky ženy, které rozšiřovaly a zkvalitňovaly egyptské dědictví. Kult vůně došel ve starém Řecku tak daleko, že pro každou část těla byla určena zvláštní vůně, např. vlasy se natíraly majoránkou, obličej palmovým olejem, krk břechťanovou esencí apod.

Bohatí Řekové nechávali ve svých hodovních síních létat holuby, kteří byli nejprve smočeni ve vonných vodách a při letu pak rozptylovali jemný aerosol vůně.

Později pod vládou *Římanů* se dovážela velká množství myrhy a kadidla z arabských zemí a také se dovážely nové, magické ingredience, jež byly přepravovány po moři z Indie. Bohatí Římané popustili uzdu své fantazie až do krajnosti; zdi a podlahy domů poprašovali parfémy, omývali parfémem malé koníky a psy, polévali voňavkami zástavy vítězných vojsk a do davu rozhazovali růžové lístky. Návštěvníky v římském Koloseu jemně zkrápěl umělý déšť voňavé vody. Podle příkazu císaře Caliguly nesměly na žádné hostině chybět okrasné nádoby naplněné aromatickými látkami. Vůně však přitahovaly lidskou pozornost i v mnoha jiných oblastech světa [1, 4, 5, 6].

2.1.1.2 Arabové a středověká Evropa

Velký pokrok v historii parfémů nastal v raném středověku, kdy Arabové vyvinuli techniku na destilaci rostlin ve velkém. Rozsáhlé perské oblasti sloužily k pěstování růží: staly se zdrojem růžového oleje a Bagdád se stal městem vůní. Bylo také objeveno velké množství voňavých rostlin a vonných látek, jako například pižmo, které se míchalo do malty připravované ke stavbě mešit a nových paláců. Celá století byla výroba parfémů uměním Arabů, toto umění bylo v severní Evropě už skoro zapomenuté. Až teprve křížácká vojska, když se vracela ze svých levantských tažení, přinášela s sebou v zavazadlech nádherné voňavé směsi – dárky pro své ženy a milenky. Tím se vzbudil v Evropě nový zájem o parfémy [4]. Za první spis o vonných látkách známý v západním světě lze označit spis „Nejpozoruhodnější tajemství umění parfumérského“ od Giovannioho Ventury Roseta z roku 1555 z oblasti Florencie [8].

2.1.1.3 Francie

První etapa evropského voňavkářství nastala v 16. století, kdy Kateřina Medicejská, která přišla z Itálie, aby se provdala za budoucího francouzského krále, zavedla v Paříži parfémy jako módní novinku. Hlavním městem parfémů ve světě se stalo díky svým obchodním aktivitám (např. prodej rukaviček z parfémované kůže) a rozvoji voňavkářského umění francouzské město Grass [4]. Od 16. století (období baroka a rokoka) se navíc ve francouzských horních vrstvách vyvinula originální představa hygieny: protože lidstvo bývalo stále častěji napadáno chorobami a epidemiemi, začalo se vyhýbat vodě jako údajnému šířiteli nemocí. Místo mytí překrývali tělesný zápach vůní těžkých parfémů, nečistou pleť ukrývali pod tlustou vrstvou líčidel a pudru, nepěstěné vlasy pod parukou [5]. Do této doby spadá i rok 1608, kdy vznikla první voňavkářská manufaktura. Založili ji dominikánští mniši ve Florencii. Období Francouzské revoluce (konec 18. století) ukončilo tento nepřirozený vývoj. Zvýšila se osobní hygiena a voňavky se začaly používat šetrněji, v menším množství, nikoli k zakrytí nežádoucích pachů, ale aby znásobily příjemné pocity z čistého zevnějšku. Tuto svou funkci plní dodnes [6]. Díky pátrání ve versailleských archivech se v roce 2005 podařilo vzkřísit vůni, kterou používala jedna z nejslavnějších královen, Marie Antoinetta [9].



Obrázek 1: Francouzský parfumér v 17. století
(mědirytina z roku 1695)

2.1.1.4 Období 19. a 20. století

Po staletí se v parfumerii používalo prakticky asi 150-200 přírodních vonných látek. Během posledních, necelých 200 let, byl však sortiment vonných hmot obohacen o mnoho nových, do té doby většinou neznámých látek. Jsou to syntetické neboli umělé aromatické látky, kterých dnes chemie zná již několik tisíc. Rozvoj výroby *syntetických vonných látek* navazuje na analytické práce chemiků, kteří se začali zaměřovat na izolaci a stanovení struktury vonných principů přírodních aromatických surovin. Následovalo vypracování jejich syntéz a také postupů na výrobu podobných vonných sloučenin, z nichž mnohé nebyly dosud v přírodě nalezeny. Brzy začaly vznikat také podniky, které výrobu syntetických vonných látek průmyslově realizovaly. Došlo k rychlému rozvoji jak výroby parfémů, tak i syntetických aromatických látek. Obě odvětví se tak rozvíjela v těsné spolupráci a vzájemné závislosti. V letech 1833-1834 izolovali francouzští chemici Dumas a Peligot poprvé

ze skořicové silice její nejdůležitější složku – skořicový aldehyd. V roce 1856 byl vypracován postup jeho syntézy. O málo let později byly objeveny a syntetizovány 2 vonné látky, které v tehdejší parfumerii způsobily doslova revoluci – byly to vanilin a heliotropin. První mošusově vonící látku syntetizoval Baur (1888-1891). Jedná se o nitrosloučeninu, která je známá jako Baurovo pižmo. Ještě lepší mošusovou vůni však mají další nitrované benzenové deriváty, prodávané pod názvy mošus ambret, mošus keton a mošus xylool. Několik desetiletí patřily k nejvíce používaným mošusovým fixátorům pro různé typy vůní. Dnes se od nich postupně upouští. Druhá světová válka přerušila slibný vývoj výroby vonných látek, k jehož oživení došlo až v padesátých letech. V roce 1957 syntetizovali Beets a Theimer první isochromanovou, mošusově vonící sloučeninu. Z isochromanových mošusů je nejvýznamnější galaxolid, vyráběný od počátku 60. let. Mnoho výzkumných prací bylo věnováno právě studiu a vývoji mošusově vonících látek. Modernizována byla výroba makrocyclických látek (zvláště cyklopentadekanolidu), makrocyclických esterů a ketonů. Byly vynalezeny také další látky vonící po mošusu a ambře, podstatně levnější než látky makrocyclické. Jsou to deriváty indanu (např. celestolid), deriváty tetrahydronaftalenu (např. fixolid nebo identický tonalid). Roční produkce mošusových látek dnes činí tisíce tun. Pro svou příjemnou, měkkou a mimořádně stabilní vůni jsou mošusové látky používány jak pro luxusní parfémové výrobky, tak v nejrůznějších kompozicích pro kosmetické přípravky a toaletní mýdla, avšak ve velkém množství především pro prací přípravky [1].

Na počátku 20. století dochází tedy k rychlému rozvoji kosmetického průmyslu včetně vývoje vůní. Vývoj syntetických produktů, s jejichž pomocí se dají vyrábět skvělé vůně ve velkém, umožňuje dostupnost voňavých látek i obyčejným lidem. Znalosti kosmetických účinků jednotlivých přírodních látek, dříve mezi ženami běžně rozšířené, se však začaly vytrácet. Kosmetický průmysl používal postupně stále více syntetických látek a chemických konzervačních prostředků, až konečně nastal v 70. letech protipohyb a od té doby stále více příznivců touží používat i přírodní, šetrnou kosmetiku [5].

2.1.1.5 Současný stav

Dosud bylo syntetizováno kolem 10 000 syntetických vonných sloučenin. V běžné praxi se používá kolem 2 500-3 000 vonných a aromatických surovin (přírodních a syntetických). Z nich asi 300 je všeobecně využíváno ve velkých množstvích. Výroba některých klasických vonných látek je poměrně jednoduchá, avšak většina z nich je výsledkem složitých, vícestupňových chemických syntéz. Proto jsou vonné suroviny vesměs velmi drahé. Velké podniky stále investují značné částky do výzkumu a vývoje nových atraktivních syntetik. Nově syntetizované látky se neuvádí na trh jako takové, ale je snaha podniků je co nejefektivněji uplatnit v parfémových kompozicích. Do prodeje je nová látka uváděna zpravidla až tehdy, když stejnou nebo blízce příbuznou látku začne vyrábět i jiná firma. Přestože jsou každým rokem vypracovány syntézy několika set vonných látek, úspěchu se dočká stěží 1 %. Každá nová vonná surovina je podrobena náročným toxikologickým testům. V současnosti je již také běžné sledování biologické odbouratelnosti. Důležitá jsou rovněž ekologická hlediska technologie jejich výroby. Těžiště současné parfumerie spočívá v syntetických vonných látkách. Jejich obrovský sortiment poskytuje nespočetné možnosti vzájemných kombinací. Hlavními surovinami pro výrobu syntetických aromatických látek jsou především produkty ropného průmyslu a suroviny získávané při chemickém zpracování

uhlí. Mezi výchozí látky tedy často patří: toluen, styren, fenoly, isopren, terpentýn a ricinový olej. Průmysl vonných látek je intenzivně se rozvíjejícím se oborem. Díky syntetickým vonným látkám došlo k velkému zlevnění parfémovaných produktů [1].

2.1.2 Čichový orgán člověka

Živý systém je sám sebe tvořící a sebe zachovávající velice složitý a speciálně organizovaný soubor molekul účelně vybraných během evoluce, který vyměňuje hmotu, energii a informaci s okolím. Užívá k tomu dokonale skloubenou a virtuózně řízenou síť chemických reakcí pracující na principu maximální úspornosti [10]. Lidské tělo tvoří a reaguje v něm 50 000 až 100 000 různých chemikálií. Základním kamenem každého živého organismu je buňka, v jejímž jádře je uložen genetický materiál řídící všechny děje v buňce. Lidské tělo tvoří přibližně 10^{15} buněk.

Čich patří k nejstarším smyslům a lze jej nalézt u všech živočichů. Ve srovnání se zrakem nebo sluchem je však stále trochu záhadný, protože nebylo dosud objasněno, jaká je souvislost mezi zdrojem vůně nebo zápachu a způsobem, jak jej člověk vnímá. Vztah mezi čichem a molekulární strukturou látek hledají vědci už více než 100 let. Tak jako nemají všichni lidé stejný sluch, vnímají rozdílně i vůně a pachy. Bylo zjišťováno, zda příjemný nebo nepříjemný čichový vjem je pouze subjektivním lidským pocitem, nebo má skutečný základ, kterým jsou například vlastnosti molekul. Bylo prozkoumáno 1565 výrazně aromatických látek s ohledem na vlastnosti, jako je počet atomů, počet různých typů vazeb, hmotnost a mnoho dalších. Výsledkem bylo zjištění, že těžší a kompaktnější molekuly spíše voní, zatímco lehčí spíše páchnou [11].

Každý člověk se za den nadechne průměrně 23 040krát a vydechne asi 16,2 m³ vzduchu. A v průběhu každého nadechnutí zaplaví molekuly vůně čichový orgán zvaný nos [12]. Vůně je tedy organoleptická vlastnost některých látek. Vnímáme ji čichovými smyslovými buňkami (receptory). Netrénovaný člověk rozezná asi 4 000 pachů, trénovaný až 10 000 pachů [11]. Vůně nám pomáhá se orientovat v okolním prostředí. Všeho nepříjemného se každý tvor snaží zbavit, zatímco příjemné dojmy pokládá za příznivé. Čich dodává informace o látkách nacházející se v bezprostředním okolí. Čich má mezi smysly tu výsadu, že je neustále ve střehu a prakticky ho nelze vyřadit, pokud příslušný jedinec dýchá. Většina savců má poměrně dobře vyvinutý čich. Pro prapředka člověka měl čich mimořádný význam (k identifikaci nebezpečí nebo potravy). Zásluhou postupující civilizace již čich ztrácel na významu pro zachování života člověka.

Vnější část čichového ústrojí člověka je uložena v čichovém políčku nosní sliznice. Na každé straně nosní přepážky zaujímá plochu asi 3 cm²; v čichovém políčku je více než 10 milionů čichových buněk (pes má ještě dvacetkrát více) a každá má několik vláknitých receptorů končících v povrchu sliznice, pokryté vrstvou hlenu. Látky obsažené ve vdechovaném vzduchu se v hlenu zachycují a ulpívají na těch receptorech, které mají schopnost je zadržovat. Při styku molekuly s receptorem vznikne impuls, který čichová buňka vysílá po nervovém vlákně do koncového mozku, kde je evidován jako určitá vůně. Čichové receptory jsou vybaveny proteiny, které reagují pouze na molekuly určitých vlastností. Čichové ústrojí má tolik variant receptorů, že může zachycovat až několik tisíc různých molekul. Při hojném výskytu molekul jednoho typu se ta část receptorů, která je zachycuje nasytí, nové impulsy již nevznikají a člověk přestává danou vůni vnímat. Může však dále

vnímat vůni jiných typů molekul, opět až do okamžiku nasycení příslušných receptorů. Když přes čichové políčko přestanou proudit molekuly vonné látky, čerstvý vzduch je z receptorů opět vymývá, a tak dojde k regeneraci čichových schopností. Člověk zase začne vnímat vůni látky, jejíž molekuly byly předtím z příslušných receptorů odstraněny. Velký význam pro čich má ovšem zkušenost, resp. cvik. Vytrvalým cvičením dokáží nadaní jedinci rozeznat a zapamatovat si velké množství vůní i tak jemných rozdílů, že je nelze zjistit ani nejmodernějšími dosud známými analytickými technikami. Existuje 2 000-4 000 odlišných vůní; jejich možných kombinací je však nesmírné množství. Dobrý parfumér jich prý může rozeznat až 10 000 [1].

2.1.3 Čichový orgán u zvířat

Čich a chuť patří k chemickým smyslovým vjemům. Čich patří k nejstarobylejším živočišným smyslům s mimořádným významem. Čich spolu s chutí zjišťuje požitelnost potravy. Živočichové pomocí čichu vyhledávají kořist, rozeznávají změny prostředí, identifikují možného útočníka a reagují na pachové signály umožňující komunikaci a vyhledání partnera. Živočichové si pachovými značkami také označují teritorium a páchnoucí výměšky používají jako účinnou obrannou zbraň (např. želva klapavka pižmová). Živočichové žijící ve vzduchu mají pro smysly chuti a čichu obvykle oddělené orgány. Ve vodním prostředí se však analyzují látky rozpuštěné ve vodě, a proto jsou souhrnně označovány jako chemoreceptory. Žralok dokáže zaznamenat jeden díl krve obsažený v milionu dílů vody.

Ryby čichají smyslovou sliznicí čichových jamek. V životě ryb hraje čich důležitou úlohu. Jeho pomocí vyhledává ryba potravu, navazuje kontakt v hejnu s příslušníky svého druhu; samec nabývá svatebního zbarvení, cítí-li samici, aniž ji vidí apod. Kromě toho poraněné ryby vylučují látky, jež působí úlekovou a útěkovou reakci příslušníků druhu. Mnoho ryb čichem bezpečně pozná místa nebo řeky, odkud pocházejí. Například lososi pocházející z určité řeky se po různě dlouhém, často i několikaletém pobytu v moři a po dosažení dospělosti vracejí s naprostou přesností na trdliště (místa výtěru) do řek, v nichž se narodili [13].

Čich má velký význam pro všechny *plazy*. Vedle obvyklého vnímání prostřednictvím nosu se u nich vyvinul zvláštní orgán – Jakobsonův – který umožňuje daleko jemnější a přesnější vnímání čichových podnětů. Jeho používání je nejpatrnější u ještěřů a hadů díky známému vyplazování jazyka. Zvíře tím nabírá na špičku jazyka pachy, které přenáší do dutiny ústní, kde jsou právě na horním patře ve zmíněném orgánu analyzovány. Želvy si nepotřebují napomáhat jazykem, protože orgán ústí přímo do nosních cest a vzduch se k němu dostává při dýchání. Želvy dovedou čich dobře uplatňovat i pod vodou, kdy s otevřenými ústy nasávají vodu nozdrami a ústy ji opět vypuzují ven. Toto podvodní čichání je základním zdrojem informací o potravě. Rozhodující význam má zejména při vyhledávání potravy v kalných vodách. Čich je důležitý i v procesu rozmnožování. Mnohé druhy mají na svém těle pachové žlázy produkující pižmo, takže vzájemné očichávání se stává významnou součástí sexuálního chování [14].

Tykadla *hmyzu* představují orgány čichu a hmatu. Registrují především různé vonné látky sloužící jako potravina (např. nektar z květů) a také specifické sexuální feromony – pohlavní lákadla. Tykadla některých druhů hmyzu mají zejména u samců velmi složitou stavbu, čímž se podstatně zvětšuje jejich povrch, na němž je rozmístěno velké množství vysoce

citlivých smyslových buněk. Tyto buňky jsou schopné registrovat i zcela nepatrná množství (někdy i jednotlivé molekuly) samičích sexuálních feromonů příslušného druhu. Tím umožňují najít partnera opačného pohlaví na značnou vzdálenost (výjimečně i několika kilometrů) [15].

2.1.4 Biologická aktivita aromatických látek

Studiem účinků vůní na člověka se zabývá *aromakologie*. Bylo zjištěno, že ženy jsou na vůně vnímavější než muži. Jsou však lidé, kteří některé (případně všechny) vůně nevnímají. Člověka dokonce ovlivňuje vůně více než chuť, protože většina zážitků, které člověk řadí mezi chutě, je komplexní dojem, zaznamenaný chuťovými i čichovými buňkami. Dutina ústní i nosní jsou vzadu propojeny, takže při dýchání přichází do oblasti čichového ústrojí také vzduch z úst. Nacházejí-li se vonné látky také v ústech, zvyšují koncentraci na čichovém políčku a vjem vůně je tak značně posílen. Studiu významu čichu pro člověka se v poslední době věnuje značné úsilí. Bylo zjištěno, že zvláště pro nemluvnata je čich dokonce důležitější než zrak a sluch. Dříve než začne dítě reagovat na světlo a zvuk, rozezná matku pomocí čichu. Teprve později začnou převládat dojmy zrakové a sluchové, které se snáze zachycují v lidské paměti. Čichové vjemy však mají značný vliv i na dospělého člověka. Je objektivně zjištěno, že při zachycení vůně proběhnou v lidském organismu zcela podvědomě určité reakce – zvyšování teploty pokožky (v důsledku jejího lepšího prokrvení), změna pulsu a rozšíření očních zorniček. Zaregistruje-li příslušné mozkové centrum vůni, zařadí ji nejdříve do jedné ze dvou hlavních skupin – tj. jako příjemnou nebo nepříjemnou. Příjemné vůně působí uklidňujícím dojmem. Pokud však organismus zaregistruje nepříjemnou vůni, dochází u něj ke vzniku napětí, jehož se snaží zbavit tím, že se od páchnoucí věci rychle vzdálí. Tato reakce je zásadní pro zdraví jedince, protože řada páchnoucích látek je toxická (např. sulfan) [1].

Uvedených skutečností se využívá při vývoji nesmrtících zbraní určených pro pořádkovou policii, jejichž základem jsou silně páchnoucí látky (př. kyselina máselná nebo thioly, které používá v obranné tekutině i tchoř nebo skunk). V USA byla patentována nesmrtící zbraň založená na skatolu, látce zodpovědné za zápach exkrementů. Skatol je zvláštní tím, že ve velmi malém množství může dokonce příjemně vonět. Důkazem je skutečnost, že skatol je obsažen i ve svatební květině jménem kala [11].

Každé lidské tělo má svoji charakteristickou vůni, která proniká do celého prostoru, v němž člověk žije. Pach látek vylučovaných naší kůží je natolik intenzivní a trvanlivý, že vycvičený pes je schopen jej identifikovat a najít člověka, jemuž patří součást oděvu, kterou už 14 dní na sobě neměl. Pach těla vzniká hlavně z látek vylučovaných apokrinními vyměšovacími a potními žlázami. Exkrekty žláz se pak rozkládají bakteriemi žijícími na povrchu těla a teprve přitom vznikají produkty nepříjemně páchnoucí „potem“. Různé lidské rasy mají různě rozloženy apokrinní žlázy, což ovlivňuje vůni těla. Proto je rozšířen názor, že rasová diskriminace není vyvolána ani tak zrakem, jako čichem. Na charakter vůně má vliv dále pohlaví (ženská vůně je intenzivnější a trvalejší), věk (nejméně voní děti; maximální intenzita v době pohlavní zralosti) i konzumovaná potrava (pokožka vyzařuje vůně metabolické přeměny požitého pokrmu). To je důvod, proč stejný parfém má u různých uživatelů poněkud odlišnou vůni. Některé pachy jsou zcela specifické pro určité choroby nebo otravy (např. při otravě arsenem voní dech pacienta po česneku).

Aromatické látky vykazují biologickou aktivitu, tzn. že mají schopnost působit na smyslové orgány jako atraktanty nebo repelenty; mohou však mít i účinky baktericidní, bakteriostatické, stimulační, protizánětlivé, analgetické, dráždivé, senzibilizační, karcinogenní případně teratogenní. Většina silic ničí choroboplodné mikroorganismy. Uvedené vlastnosti vonných látek člověk poznával v aromatických a léčivých bylinách již od pravěku. Používání aromatických látek kontrolují státní zdravotnické orgány ve všech vyspělých zemích.

K projevení účinku aromatické látky je nutné, aby na čichový orgán působila v optimální koncentraci. Například furylmethanthiol ve vysoké koncentraci vyvolá dojem odporného zápachu, zatímco ve zředění 1:200 000 připomíná vůni čerstvě pražené kávy. Vůně nebo zápach mnoha těkavých látek však závisí nejen na jejich koncentraci, ale i na přítomnosti dalších synergicky působících látek, které současně působí na naše čichové receptory. Mnoho aromatických látek má také schopnost působit ještě na další smysly. Například mentol nebo kafr působí na hmat tak, že vyvolávají pocit chladu a znecitlivění.

2.1.4.1 Feromony

Feromony jsou pachové látky způsobující u určitých jedinců specifické jednání. Jedná se zejména o tzv. *sexuální feromony*, které upozorňují jedince určitého živočišného druhu na přítomnost jedince stejného druhu, ale opačného pohlaví. Příroda tak přispívá k zachování i nepříliš početných druhů živočichů. Je-li feromon vylučován jiným, byť příbuzným druhem, působí odpudivě. Kromě sexuálních feromonů mají některé druhy hmyzu také feromony poplachové, shromažďovací aj. Například včela napadená v blízkosti úlu vylučuje poplašný feromon, který způsobí výpad včel bojovnic na všechny pohybující se předměty v okolí napadené včely. Také pach včelího jedu v žihadle nabádá i ostatní včely k útoku na již bodnutého tvora.

Bylo prokázáno, že vlastnosti sexuálních atraktantů mají především hormony typu estrogenů a androgenů, z nichž některé mají mošusovou vůni. Analogické chemické signály existují i u vyšších živočichů včetně člověka [1].

Zájem vědců i veřejnosti o lidské feromony zahájilo „znovuobjevení“ záhadného přídavného čichového orgánu, tzv. vomeronasálního orgánu u člověka. U dospělého člověka byl vomeronasální orgán považován za nefunkční vývojový rudiment, i když jeho existence byla známa už od začátku 18. století. Až koncem 20. století se vědcům podařilo odhalit jeho biologickou úlohu. Tento orgán mají všichni savci a vnímají jím nepatrná množství látek, jimiž si zvířata sdělují spoustu informací, například že hledají partnera, že jsou v říji, nebo dokonce, kdo je otcem jejich mláďat. Vomeronasální orgán je malá trubičkovitá struktura ústící do nosní dutiny. Její stěna je vystlaná receptorovými buňkami napojenými na přídatný čichový lalok mozku a přední část centra řídicího řadu podvědomých činností, spjatých s reprodukci a chováním. Jsou to zcela jiné oblasti mozku než je normální čichový lalok, vnímající prostřednictvím čichové výstelky nosu vůně potravy nebo pachy nebezpečí [16].

Snaha o nalezení účinného afrodiziaka nebo „nápoje lásky“ provází lidskou společnost od počátku její existence. Projevuje se i v parfumerii a vzhledem k poznatkům o feromonech je naděje, že by požadované vlastnosti mohly mít právě některé vonné látky [1].

2.1.5 Rozdělení vonných látek

Vonné látky lze rozdělit podle původu na *rostlinné*, *živočišné* a *syntetické*. Až do konce 19. století byla příprava tekutých vůní výhradně záležitostí směsí vonných olejů extrahovaných z rostlin, ačkoliv některé příměsi živočišného původu se také používaly. Je až překvapující, kolik různých rostlinných částí lze použít k získání vůně. Výtažkový olej – esence – se získává z květů, pupat nebo listů, stonků, dřeva, plodů, semen, kůry, gumy nebo oddenků. V některých případech nabízí vůni celá rostlina. Jedna rostlina však může také poskytovat různé vůně pocházející z jejich různých částí. Bílé květy mají všeobecně nejsilnější vůni [4]. Přestože člověk již umí v laboratoři vyrobit velké množství syntetických vůní, tak v živé přírodě se dokonalé a mnohem levnější syntézy uskutečňují odedávna. Každá rostlina je tou nejdůmyslnější továrnou na výrobu účinných, třeba i chemicky složitých látek. Tyto přírodní produkty jsou dílem živého organismu, a proto jsou pro člověka přirozené, biologicky přístupné [6].

2.1.5.1 Rostlinné vonné látky – silice

Všechny aromatické látky v přírodě produkují živé organismy, především rostliny. Vůni květů a často i ostatních částí rostlin tvoří **silice** (dříve označovány jako éterické oleje). Jedná se o fyziologicky účinné, olejovité a těkavé kapaliny, které se dobře rozpouští v organických rozpouštědlech a jsou nerozpustné ve vodě. Zpravidla příjemně voní (obvykle i v malém množství) a v rostlinách jsou uloženy ve zvláštních siličných buňkách, žlázkách a v mezibuněčných prostorech. Rostliny svými vůněmi přitahují hmyz a „zpříjemňují“ mu opylení a také odpuzují parazity nebo škůdce. Vonné látky (silice) patří mezi produkty sekundárního metabolismu rostlin a jsou vytvářeny při degradaci vysokomolekulárních produktů primárního metabolismu. Produkty sekundárního metabolismu rostlina vytváří za optimálních podmínek (dostatek světla, tepla, vláhy), tj. má-li k dispozici dostatek produktů primárního metabolismu (bílkoviny, cukry, tuky). Z přibližně 100 000 druhů rostlin, které jsou v současnosti popsány, obsahuje silice jen asi 1 700 druhů (pro praktické využití má význam jen 200 druhů) [1]. Silice tvoří základ průmyslové výroby vonných a chuťových látek. Z roční světové produkce silic, přes 200 tisíc tun, se asi jedna desetina uplatní v parfumerii.

Čerstvé rostliny rychle podléhají zkáze, a proto se – aby se cenné látky v nich obsažené uchovaly – musí konzervovat, nejčastěji sušením. Úspěšné pěstování aromatických rostlin samozřejmě předpokládá i dobré znalosti jejich biologie a nároků na prostředí. Především je nutné vědět, která část rostliny obsahuje hledané látky. Účinné nebo aromatické látky jsou rozloženy buď v celé rostlině, nebo jen v některých jejích částech. Dále záleží na tom, abychom sbírali a sušili rostliny vhodným způsobem a v době, kdy je v nich obsah hledaných látek co nejvyšší (např. vůně stromu ylang-ylang z Asie poskytuje vůni až 14 dní po rozvítí květů a právě tehdy musí být sbírány a současně destilovány). Bývá to většinou v době květu. Jen kořeny se sbírají časně zjara nebo na podzim. Během vegetace se množství účinných látek mění, protože je ovlivňuje nejen „stáří“ rostliny, ale i klimatické podmínky. Některé kosmeticky důležité aromatické rostliny se pěstují v oblastech s tropickým podnebím. Mnoho druhů roste v subtropickém pásmu, jiným se zase nejlépe daří v teplých oblastech mírného klimatu. I ve středoevropské flóře najdeme řadu rostlin, z nichž čerpá kosmetika i parfumerie

(např. mateřídouška, šalvěj, lípa, kopřiva, chmel). Sbírají se z porostů rostoucích planě ve volné přírodě nebo se pěstují [6].

Mezi hlavní vonné rostliny a oleje patří např. vanilka, fialka, plavuň jedlová, santalové dřevo, pačuli (bylina z Dálného východu, nejsilnější parfémová ingredience, nejjemnější fixativum), dubový mech, myrha (gumová pryskyřice z myrhového stromu rostoucí na Středním východě a v Somálsku, vynikající fixativum, jedna z nejdéle používaných vonných látek), konvalinka, citron (0,5 kg oleje z 1000 citronů), levandule, bergamot, frankincense (kadidlo = vonný dým produkující hořící aromatické substance, v dávných dobách bylo kadidlo základní používaný parfémový materiál - zejména při náboženských obřadech), balzám, tuberóza, ... Odpradávná je nejvýznamnější květinou při výrobě parfémů růže. Domovem růže jsou pravděpodobně oblasti Kavkazu a Iránu. Existuje řada odrůd, a proto bylo identifikováno 17 jejích různých vůní. K vydestilování pouhého 0,45 kg růžového oleje je zapotřebí asi 454 kg růží a výtěžek „absolut“ z tohoto množství není víc než 0,3 %. Nejméně 75 % všech klasických parfémů obsahuje růžový olej. Nejdůležitější rostlinou hned po růži je jasmín, který je obsažen ve více než 80 % parfémů. Plocha 0,4 hektaru jasmínu vydá 227 kg jasmínových květů, ale výtěžek (cca 0,1 %) je velmi slabý, a proto je jasmín nejdražší dosažitelný materiál pro výrobu parfémů. Sklizeň jasmínu musí být prováděna ručně hned po ránu, než vyjde slunce.

Rostlinné produkty guma, balzám nebo pryskyřice obvykle slouží jako fixativ parfému. Balzámy a pryskyřice jsou patologické rostlinné produkty příbuzné silicím. Vytvářejí se obvykle po poranění povrchových pletiv rostliny. Pryskyřice jsou tuhé, balzámy tekuté. Balzám se používá při výrobě parfémů pro jeho sladkou, medovou vůni [4].

2.1.5.2 Živočišné vonné látky

Kromě rostlinných vůní byli výrobci dlouho odkázáni na vzácné vonné látky pocházející z říše živočišné. Vzácné živočišné přísady patří mezi vynikající fixátory, které dávají parfému větší trvanlivost ve flakónu i na kůži. Mezi hlavní živočišné ingredience, jež byly dříve základní surovinou nejlepších parfémů, patří: **pižmo, ambra, cibet, castoreum**.

Nejznámější je *pižmo* (*mošus*), což jsou zrnka ve výměšcích žláz získávaných (bezbolestně) z těl samců kabara pižmového žijícího v Himaláji. Mošus lze získat i z ondatry pižmové. Pižmo je jednou z nejstarších součástí voňavek. Orientální panovníci i jejich harémy používali pižmo odpradávná. Do Evropy bylo pižmo dovezeno z Arábie a brzy se stalo vyhledávanou součástí drahých voňavek. Působí v nich tak, že „zaokrouhluje“ vůni parfémových kompozic, a navíc zabraňuje jejich nestálosti. Vyrobít chemicky vonné součásti pižma bylo dlouhým snem výrobců parfémů. Podařilo se to náhodně až vynálezci nylonu, který při svých pokusech objevil látku vydávající vůni pižmu velmi podobnou [4, 6]. Pižmo je velmi drahé - 1 kg stojí 50 000 eur [9]. Je to nejsilnější ingredience ze všech. Kapka pižma na kapesníku může vonět až 40 let.

Další živočišná vonná látka je *ambra*, jejíž původ byl po staletí neznámý. Je to hmota živočišného původu vylučovaná ze žaludku velryb (vorvaňů) po poranění (např. „zubem“ sépie). Hmota v chuchvalcích různé velikosti (desítky gramů až kilogramy) plave volně v mořích anebo je vyplavena na břeh ve formě ošklivé, tučné, šedé hroudy. Kromě arktických oblastí se nachází vzácně ve všech oceánech. Před použitím se musí nechat 3 roky větrat na vzduchu.

Z říše zvířat pochází také tzv. *cibet*. Je to výměšek (podobný máslu) z podocasní žlázy malých dravých šelem cibetek, žijících v Africe (Etiopie) a v Asii (Barma, Thajsko). Cibet má velmi intenzivní pach, a proto se používá ve značně zředěném stavu. Podobným zdrojem vůně je i výměšek z podocasní žlázy bobrů.

Castoreum je červenohnědý výměšek lymfatických žláz bobra; jako první ho používali arabští voňavkáři již v 9. století; jde o typický fixátor kompozic pro pánskou kosmetiku.

V původním stavu jsou tyto ingredience tak silné, že jsou až odpudivé. Musí se hodně ředit a teprve potom začnou vonět. Zdroje všech těchto přírodních látek jsou pro moderní komerční výrobu parfémů nedostatečné (kvůli vysoké poptávce došlo téměř k vyhubení jejich producentů). Vzhledem k omezené dostupnosti se jedná o vzácné a velmi drahé látky. Upotřebení těchto fixátorů se omezilo na voňavkáře specialisty, kteří používají staré výrobní metody. Parfémy obsahující tyto originální suroviny jsou nesmírně drahé. V současné době se v komerční praxi vyrábí tyto vůně synteticky [4, 6].

2.1.5.3 Syntetické vonné látky

Třetí skupinu vonných látek tvoří chemicky vyrobené (*syntetické*) látky. Syntetická vůně je laboratorně vyrobená imitace parfému nebo vůně, která v přírodě neexistuje. Z přírodních materiálů je však odvozeno mnoho syntetických vůní. Parfuméri dnes mají k dispozici několik tisíc syntetických vůní. Někdy byly objeveny náhodně, jindy vznikly jako vedlejší produkt v chemické výrobě nebo cílevědomou prací chemiků. Chemikům se podařilo vyrobit velký počet syntetických rostlinných i živočišných vůní, bez nichž se již dnes kosmetický průmysl neobejde. Vždyť i ten nejlevnější šampon musí vonět. Například v kompozicích moderních parfémů se užívají aldehydy objevené koncem 19. století. Umocňují aroma určitých rostlin a samy mají svou zvláštní, silnou a individuální vůni, která parfém obohatí a zesílí. Například decylic aldehyd vydává vůni fialek. Aldehydy se používají mimořádně opatrně a v nepatrném množství. Poprvé byly použity v Chanelu No. 5, který je nyní nejslavnějším parfémem. Traduje se, že po druhé světové válce byl tento parfém pro americké vojáky ve Francii nejžádanější „kořistí“ a že se nejednou dopouštěli i krádeží jenom proto, aby svým ženám za oceánem mohli přivést tento vzácný dárek. Přes nepopíratelné úspěchy chemické výroby však zůstávají přírodní vonné látky rostlinného nebo živočišného původu stále v oblibě a jsou nenahraditelné [4, 6].

2.1.6 Způsoby izolace vůní

Odedávna se lidé snažili podstatu vůně rostlin získat a co nejdéle ji uchovat. K nejstarším způsobům izolace vonných látek (olejů) z rostlinného materiálu patří extrakce, nejvíce silic se však získává destilací vodní párou, což je základní metoda pro získávání vonných olejů z rostlin. Destilaci znali už Arabové v 8. století před Kristem.

Při *destilaci s vodní parou* se rostlinný materiál vloží do vařící vody a podstatná část vonného oleje se odpaří; pára se zkapalní a vrací se v kapalném stavu do vody, olej zůstává na povrchu a sbírá se. Proces se opakuje tak dlouho, dokud se nezíská co nejčistší esence.

Při *vyluhování pomocí těkavých rozpouštědel (extrakci)* se vonný materiál umístí na perforované kovové pláty do „extraktorů“, jimiž prochází těkavé rozpouštědlo (př. ether).

Pak se přivádí do destilačního přístroje, kde kondenzuje do polotuhé hmoty zvané „beton“. Beton je směs vonného oleje a voskové substance zvané stearopten. Tyto 2 složky se oddělují pomocí další techniky s použitím alkoholu, až zůstane olej (olejová esence z voňavých květů a jiných aromatických částí rostlin) v nejméně a nejkonzentrovější formě zvané „absolut“. Je to neobyčejně drahý produkt. Tuberóza absolut je například dražší než její vlastní hmotnost ve zlatě (výtěžek: 200 g oleje na 1 179 kg květů).

Třetí způsob, kterého se používá při výrobě silic, je *lisování*. Tohoto postupu se používá při výrobě silic z oplodí citrusových plodů. Slupky se drtí mezi válci a olej se získá odstředivou silou (dřeň se roztočí tak, až z ní olej začne vystřikovat). Silice vyrobené destilací nebo lisováním se pro některé účely dále technologicky upravují odstraněním terpenických a seskviterpenických uhlovodíků, které polymerací a vzdušnou oxidací snižují kvalitu silice a navíc brání bezproblémovému rozpuštění v organické fázi s nízkým obsahem alkoholu. Deterpenované silice jsou mnohonásobně vydatnější.

Mezi používané techniky izolace vonných olejů patří i *enfleurage*. Tato technika byla používána již ve starém Egyptě a pracuje se s ní i nyní. Květinové hlavičky se vkládají do oleje nebo tuku a ten vůni absorbuje. Výrobci parfémů využívají skutečnosti, že některé květiny vydávají vůni ještě dlouho po tom, co byly sesbírány. Ve Francii se tato metoda komerčně využívala již od 17. století, speciálně pokud šlo o jasmín [1, 4].

Teprve nedávno byl vyvinut jiný způsob, jak získávat vonný materiál pro voňavkářské účely. Je to systém zvaný „*technologie živých květů*“ anebo „*prostorová technologie*“, podle níž se teoreticky může získat vůně z čehokoliv. V podstatě se vloží voňavý předmět (např. květina) do speciální nádoby a vyvolá se vakuum. Po chvíli květina vyloučí svou vůni do vakuu. Asi po půlhodině se vše odčerpá do dávkovače plynového chromatografu, který přesně analyzuje a identifikuje podstatné části vyloučené vůně. Tato technologie je někdy neuvěřitelně drahá, avšak poskytuje výrobcům parfémů možnost nových způsobů výroby a mnoho současných parfémů obsahuje vůně vyrobené tímto způsobem.

V průmyslové výrobě se musí velmi opatrně zacházet se silnými aromatickými oleji; přísady musí odpovídat mezinárodním předpisům, které se týkají ŽP nebo zdraví, a většina materiálů včetně syntetik nemůže být dlouho používána bez chemické úpravy; někdy se musí kompletně nahradit, protože v těch starých by se mohly najít toxické stopy [4].

2.1.7 Parfémy

Voňavky byly oblíbené odedávna. Vůně parfémů vždy obestíral závoj tajemství. Mají schopnost vyvolávat pocity, sny a touhy, změnit náladu a působit na chování lidí [7]. Dokud lidé neznali výrobu a přípravu neprechavých voňavek, v nichž se vonné látky vážou např. na alkohol, používali různé rostlinné výtažky s příjemnou vůní. Tyto přípravky ovšem velmi rychle vyprchávaly, a proto se často nastýlaly na stoly, na lože nebo i na zem čerstvé nebo usušené květy. Vůně jsou v současné době velmi rozšířený obchod. Jsou nejen v parfémeh, ale uplatňují se ve všech přípravcích pro domácnost, od mýdel až po prostředky na čištění klozetů. Parfémy mají pro kosmetické i jiné přípravky nesmírný význam v tom, že jim propůjčují příjemnou vůni. Vyrábějí se jak z přírodních silic, tak z vonných látek synteticky vyrobených. Toto voňavkářské umění vzniklo asi před 300 lety ve Francii. Z jednotlivých vonných látek sestavují parfuméri kompozice. Kombinací různých vůní lze dosáhnout nové vůně. Dnešní kosmetické přípravky jsou pouze na úrovni našich současných

znalostí a při jejich výrobě se využívá všech nejnovějších technických vymožeností. Parfémy se vyrábějí ze čtyř typů vonných látek: ze základních, které mají nejtrvalejší vůni, z upravovaných (nuancelů), jimiž se základní vůně zjemňuje, z působivých látek, které propůjčují vůni určitou originalitu a nenapodobitelnost, a konečně z látek ustalovacích, spojujících vše v harmonický a stabilní, vůni neměnicí celek [6].

Vůně útočí na naše smysly, na dobrou náladu, může ovlivnit vzájemné city a zvláště – může v nás probudit vzpomínky na minulost. Vůně se používají i při léčebné metodě zvané aromaterapie, kdy se aplikují vonné oleje z aromatických rostlin při masážích nebo inhalaci. *Aromaterapie* se stala důležitou alternativní léčebnou metodou. Slouží nejen přímo k léčení, ale také k uvolnění a relaxaci. Je známo, že má nezanedbatelné a prověřené psychoterapeutické účinky, a to díky svému blahodárnému působení na tělesnou, emocionální a duševní složku člověka.

Parfumér, který s mimořádným nadáním rozumí vonným materiálům, dokáže této schopnosti využít k vytvoření té či oné nálady a fantazie a je schopen vytvořit kouzelnou atmosféru, nostalgii anebo pouhou radost. Parfém působí často tajemně. Správné používání vůně vyžaduje vkus, cit a hlavně míru [2, 4].

Nejznámější a nejvýznamnější výrobci vonných látek jsou západoevropské a severoamerické firmy, které vznikaly v 19. století, některé z nich dokonce již v 18. století. Mezi významné však patří i firmy japonské, čínské, indické, indonéské, vietnamské, korejské, egyptské, marocké a brazilské. K nejstarším a nejznámějším výrobcům aromatických látek patří podniky francouzské. Ve Francii patří tento obor k nejefektivnějším odvětvím národního hospodářství. Také v českých zemích má výroba vonných látek, parfémových kompozic a v souvislosti s tím i výroba kolínských vod a parfémů více než 100letou tradici.

V první čtvrtině minulého století se používaly převážně vůně jedné květiny. Květinové směsi začaly být možné teprve s novými metodami extrakce a fixace. Dnešní parfémy stárnou a vycházejí z módy mnohem dříve, než tomu bylo ještě před několika málo desítkami let. Parfém v současnosti vyrobený se dnes stává nemoderní zhruba po 3-4 letech, zatímco v dřívějších dobách se značkový parfém udržel v popředí zájmu 10 i více let. Souvisí to jednak s celkovým způsobem života dnešních lidí, jednak s tím, že světové trhy jsou do jisté míry přesyceny. Na konci 80. let našeho století bylo na světových trzích přibližně 500 značkových dámských parfémů a asi 300 pánských toaletních a kolínských vod. Parfumerie zaznamenala v průběhu svého předlouhého vývoje období rozkvětu, překonala i období hospodářských depresí [1]. V současnosti produkují stovky firem na světě tisíce druhů parfémů (v roce 2005 je na trhu přes 20 000 různých parfémů) [9]; ročně se objeví na trhu 200-300 nových druhů parfémů. Prosadit se však není lehké, protože uvést parfém na trh je finančně velmi nákladné [4].

2.1.7.1 Klasifikace a kategorie vůní

Přesná charakteristika vůně je obtížná, takže klasifikace a hodnocení vůní nebylo jednoduché. Byla vymyšlena řada systémů (např. podle stupně odpařování vonných materiálů). Obvykle se vůně třídí do tzv. rodových skupin (skupin vůní). Již dlouho jsou známé čtyři základní rodové skupiny – květinová, chypre (cypřiš), ambra (orientální) a fougère – které se dále člení. Dále se k nim řadí skupiny citrusové a levandulové. Univerzální kategorizace však neexistuje. Pro běžné klasifikační účely se používají názvy vžitě během let,

takže známe vůně např. aromatické, balzamické, kafrové, citrusové, jehličnaté, zemité, květinové, ovocné, luční, bylinné, mořské, sladké, dřevité, kořeněné, mechové, těžké a lehké [4]. Je známo, že vůně působí bezprostředně na psychickou rovnováhu a náladu. Bylo dokázáno, že výběr vůně souvisí s typem osobnosti. Například extrovertně orientovaní lidé dávají přednost lehkým, svěžím a květinovým vůním, zatímco introvertní osobnosti mají v oblíbě vůně orientální a balzamické s nádechem tajemnosti [1].

2.1.7.2 Pyramidový systém parfému

Stupeň odpařování vonných olejů je klíčovou informací v moderní parfumerii; podle ní se parfémové komponenty komponují. V průběhu dějin až do konce 19. století vyráběli voňavkáři parfémové (z jedné vůně) – tedy jednotónovou vůni z určité rostliny nebo z kytice květů. Změnu vůně při vypařování způsobovaly různé oleje, které rychle nebo pomalu slábly, což se označovalo jako proces „stárnutí“ vůně. Brzy přišel nápad vyrábět parfémové na odstupňovaném základu. Od roku 1889 se proto většina parfémů pro komerční účely vyrábí podle **pyramidového** (třívrstvého, klasického) **systemu**. Je to svrchní tón, střed a báze. *Svrchní tón* (hlava, odstupující tón) je nejtěkavější část parfému. Vůně trvá jenom chvíli – v řádech minut (15 minut) – a má upoutat pozornost. *Střední tón* (srdce) vytlačí první vůni a představuje podstatnou část parfému, což je základní vůně umocněná bázovými tóny. Vůně trvá až 4 hodiny. *Spodní tón* (základ) voní nejdéle (tzn. nejdéle se odpařuje) – projevuje se přibližně za 3-4 hodiny. Je fixativem parfému a vůně by měla vydržet den i déle. Při odpařování parfému téká vždy mnohosložková směs, jejíž složení se plynule mění, a tím se mění i její vůně. Tato změna má být co nejméně nápadná a během odpařování nemá nikdy vynikat vůně některé komponenty, což bývá při tvorbě vonné kompozice jeden z nejobtížnějších úkolů.

Práce parfuméra je velmi náročná – kromě dokonalé paměti na vůně, kombinačních schopností a invence, vyžaduje i rozsáhlé odborné znalosti, velkou píli a trpělivost. Parfumér se musí vyznat například i v botanice, protože má k dispozici 500-600 různých použitelných rostlinných vůní. Ovšem toto množství voňavých ingrediencí není téměř nic ve srovnání s ohromným množstvím syntetických vůní s komplikovaným chemickým označením, které dnes může parfumér používat. Má jich k dispozici několik tisíc. Chemické ingredience tvoří dnes převážnou část trvalých složek parfému, poskytují nejen vůni, ale jsou i prostředkem k vylepšení vůní dalších a dobře působí na jejich sloučitelnost, případně jsou stimulem k delší trvanlivosti. Jsou to tzv. fixátory. Fixativ parfému je ingredience, která prodlouží retenci parfému na kůži a působí i na další ingredience. Zvláště náročná je práce parfuméra, který vyvíjí kompozice pro parfemaci mýdel, čistících prostředků a jiných přípravků bytové chemie. Zatímco alkohol, který tvoří prostředí v parfémových a kolínských vodách, je prakticky inertní, ostatní přípravky působí na mnohé vonné látky nepříznivě. Proto je zde třeba fundovanější výběr vonných surovin (obvykle levnějších) a mnohem více zkoušek v příslušném prostředí. Vůně výsledné kompozice musí tvořit s vůní přípravku harmonický celek, případně ještě musí zakrýt nepříjemný pach přípravku. Navíc musí kompozice zachovat nezměněnou vůni po celou záruční dobu přípravku [4].

2.1.7.3 Výroba parfému

Profesionální parfuméri („nosy“) konstruují neobvykle komplikované směsi. V dobře vybavené laboratoři má parfumér k dispozici přibližně 2 000 různých základních vonných látek. Parfumér ručí za to, že vůně čerstvého parfému odpovídá přesně vůni originálu bez ohledu na to, jak na úrodu působilo sucho nebo nějaké choroby. Většina parfémů obsahuje 50-100 složek, avšak některé jich mají mnohem více; počet 200 přísad je poměrně běžný. Mnoho z nich je chemických substancí, četné jsou rostlinné výtažky, jiné mají zase původ v dehtu, v naftě a v jiných zdánlivě nepravděpodobných zdrojích [4]. Nejmodernější parfémy vyžadují vysoké množství ingrediencí. Každá z nich musí být maximálně stabilní, aby nenarušovala ostatní, což býval vždy problém. Nyní již téměř všechny ingredience jsou nebo mohou být syntetizovány. Většina parfumérů současnosti považuje syntetické látky za stejně důležité jako přírodní složky [17]. V současné době je na této planetě pouhých 15 světově uznávaných „nosů“. Vytvoření nové kompozice jim zabere několik měsíců i let [12].

Výroba v parfémovém průmyslu začíná přípravou nejrůznějších vonných olejů. Všechny ingredience parfému se podle receptury smíchají dohromady, vzniklý koncentrát se nechá několik týdnů uležet, aby se „sladil“; nato se rozpustí v alkoholu o požadované síle a ponechává se v měděných kontejnerech, kde dozrává. Poté se parfém testuje. Žádný parfém nesmí být testován rychle. Po pár vdechnutích se čich vyčerpá, takže mezi dalším testem musí uplynout hodiny, někdy i několik dní. Odborné testy se dělají proto, aby se potvrdilo, že vůně zůstává dostatečně dlouho na kůži. Parfém se doporučuje zkoušet zásadně na vlastní kůži. Parfém vydrží nejdéle na pulzujících místech (př. zápěstí). Teprve po všech procedurách, které mohou zabrat i mnoho měsíců, se naplní do flakonů a je připraven k uvedení na trh [4]. Pokud chce zákazník vyrobit parfém na míru, bude ho to stát kolem 50 000 Kč. Mezi nejnákladnější vůně se řadí dodnes parfém Joy (30 ml stojí 28 000 Kč) [9]. Zajímavé je, že vůně nelze patentovat.

2.1.7.4 Flakóny

Jakmile dokázal člověk izolovat nějakou vonící směs, vyskytl se problém s uchováváním dané směsi. Asi ve čtvrtém tisíciletí před našim letopočtem přišli Egypťané na to, jak vyrobit sklo a v roce 1 500 př. n. l. se již používaly dovedně vyrobené skleněné nádoby na parfémy [4]. O důležitosti přikládání vonným látkám a jejich skladování ve starém Egyptě svědčí nálezy objevené v tehdejších hrobkách – dózy na parfémy byly uzavírány natolik pečlivě, že i po třech tisících let si uchovaly něco z původního obsahu. Nádoby bývaly především hliněné, ale našly se i nádherné alabastrové a skleněné dózy [18].

Asi 50 let př. n. l. byla v Sýrii zavedena nová technologie, což bylo foukání skla. Stejně si pak počínali i staří Řekové a Římané. Římské flakonky na voňavky byly z průhledného skla s barevnými ornamenty a množství nejrozmanitějších tvarů svědčilo o vysoké úrovni řemeslné dovednosti Římanů. Sklo zůstalo až do současnosti materiálem číslo jedna na výrobu flakonů, přestože již v minulosti byla používána i keramika, porcelán nebo kamenina. Do 19. století se parfémy prodávaly v jednoduchých nádobách a doma se stáčely do malých parfémových lahviček. Moderní parfémy již musí být plněny u výrobce v továrně. V současné době je vzhled flakónu absolutně nezbytný faktor při prodeji parfému.

Vzduch, teplo a světlo mají na parfémů velmi nepříznivý vliv, a proto se mají skladovat v chladnu a temnu. Není-li flakón s používaným parfémem vystaven účinku denního světla a teplotám vyšším než asi 20 °C, vydrží půl roku i déle. Uzavřený parfém vydrží i několik let (až 20 let), ale jakmile se k parfému dostane vzduch, tak se začne kazit a kysnout a jako první „odcházejí“ svrchní, jemné tóny [4].

2.1.7.5 Rozdělení vonných produktů

Parfém (extrakt) je směs vonných olejů rozpuštěná ve vysoce kvalitním alkoholu – konkrétně 20-30 % koncentrované esence rozpuštěné v 90-95% alkoholu (vydrží obvykle až 6 hodin). Směs s nižší koncentrací oleje (koncentrované esence) v alkoholu je tzv. voda – např. *parfémová voda* (eau de parfum; 8-15 %, vydrží 3-5 hodin), *toaletní voda* (eau de toilette; 4-8 %, vydrží přibližně 2-4 hodiny), *kolínská voda* (eau de cologne; 3-5 % ve slabším alkoholu – 70%, vůně vydrží kolem 2 hodin) [4].

2.2 Charakteristika syntetických MUSK sloučenin

Syntetická analoga pižma (SAPŽ) [*syntetické musk sloučeniny*] se používají jako náhražka přirozených vůní a mají tedy rozšířené používání v kosmetice, parfémoch, produktech osobní hygieny a prostředcích pro domácnost, např. v pracích a čisticích práscích. Nejdůležitější skupiny syntetických analogů pižma jsou nitro-deriváty (např. musk xylen, musk keton), polycyklické (např. Galaxolid, Tonalid) a makrocyclické (např. Exaltolid, Musk MC4) sloučeniny. První dvě skupiny se vyznačují vysokou lipofilitou, s následnou biokoncentrací v akvatickém prostředí. Sladkovodní ryby tvoří základ potravinových řetězců, odkud se sloučeniny pižma dostávají do lidského těla a zde se akumulují (zejména v tukové tkáni a mateřském mléku). Hlavní cesty expozice lidského organismu jsou dermální (kosmetika), dietární (sladkovodní ryby a rybí výrobky) a inhalační (proces výroby) [19]. K nejnámějším sloučeninám patří musk xylen (MX) a musk keton (MK), i když tyto látky jsou stále více nahrazovány polycyklickými pižmy jako tonalid (AHTN) a galaxolid (HHCB). Vzhledem ke své persistenci a rozsáhlému používání pronikají tyto musk sloučeniny stále více do životního prostředí [34]. Přestože zaznamenáváme rozsáhlé použití syntetických musk sloučenin a jejich ubikvitární výskyt v životním prostředí, tak máme dosud o jejich chování a účincích minimum informací.

2.2.1 Rozdělení musk sloučenin podle struktury

Syntetické vonné látky lze nalézt téměř ve všech hlavních skupinách organických sloučenin, ať jsou to uhlovodíky, halogenderiváty, alkoholy a fenoly, thioly, ethery, sulfidy, dusíkaté deriváty, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny a jejich deriváty, především estery a laktony, heterocyclické sloučeniny a další. Některé z těchto látek se používají ve velkém počtu různých kompozic a to i v relativně vysokém množství a jejich celosvětová produkce se

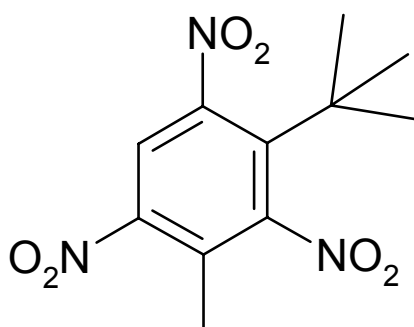
pohybuje v mnoha tisících tun za rok (v důsledku ovšem širšího využití i mimo oblast látek vonných), jiné, především speciality jednotlivých firem, postačují v kilogramových množstvích [3].

Protože přírodním živočišným zdrojům musk sloučenin hrozí vyhubení a navíc jsou živočišné výměšky velmi drahé, obtížně dostupné a objemově zcela nedostačující, tak téměř všechny mošusově vonící přísady v parfumérském průmyslu jsou již syntetické (nazývány "white musk"). V roce 1987 činila celosvětová produkce syntetických musk sloučenin asi 7 000 tun ročně [26]. Musk sloučeniny mohou být rozděleny do tří hlavních skupin – *aromatické nitro-musk sloučeniny*, *polycyklické musk sloučeniny* a *makrocyclické musk sloučeniny*. První dvě skupiny jsou široce využívány od kosmetiky až po detergenty. Již provedené detekce sloučenin náležících do těchto skupin, a to ve tkáních člověka a ve složkách životního prostředí, případně jejich potenciální karcinogenní vlastnosti, stejně jako nedostatek informací o jejich osudu v ŽP způsobuje obavy, které rezultují v omezené používání až zákaz v mnoha oblastech světa. Používání makrocyclických musk sloučenin postupně roste na úkor sloučenin z předchozích dvou skupin, protože jejich prokázané účinky a vlastnosti jsou pro životní prostředí bezpečnější. Limitujícím faktorem plného rozšíření makrocyclických musk sloučenin zůstává především cena.

2.2.1.1 Nitro-musk sloučeniny

Historie nitro-musk sloučenin začíná rokem 1891, kdy Baur při vývoji výbušnin objevil, že konkrétní trinitro-sloučenina (Baurovo pižmo) poskytuje mošusový zápach. Brzy následovaly syntézy podobných sloučenin. Nízká cena a relativní snadnost výroby způsobila jejich masivní nasazení do řady vonných produktů. Až objev polycyklických musk sloučenin znamenal určitý pokles v produkci nitro-musk sloučenin [22].

Vybraní zástupci: baur musk, musk xylen, musk keton, musk ambrette



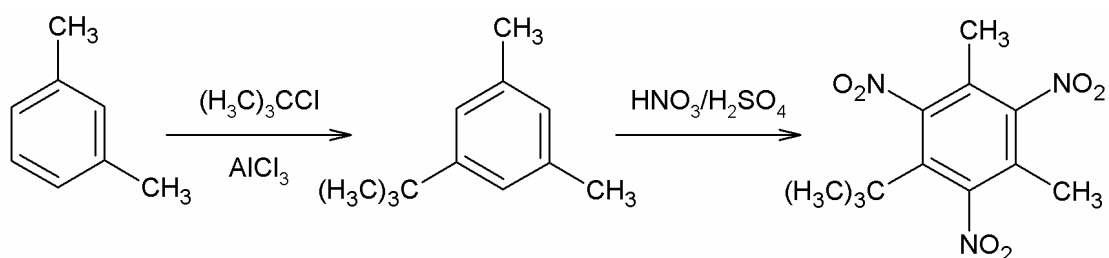
Obrázek 2: Baurovo pižmo.

Nitro-musk sloučeniny byly po svém objevu široce používány jako náhražky přírodního pižma. V kosmetice a parfémeh sloužily jako fixativum a své použití si v určité míře uchovaly až do dnešní doby. Od poloviny 80. let 20. století však razantně klesá jejich používání, a to v důsledku nebezpečnosti (výbušnost) a možnosti environmentálních rizik

(toxicita). Světová produkce nitro-musk sloučenin byla roku 1987 přibližně 2 500 tun. Začátkem 90. let však spadla produkce na 1 000 tun.

Musk xylen byl nejvíce používaná nitro-musk sloučenina (tvořil 2/3 produkce). Do výrobků denní potřeby se používal v setinách až tisícinách hmotnostních procent (do parfémů i v desetínách procent). Musk xylen začal být v ŽP sledován od 80. let 20. století, kdy byla detekována rezidua musk xyleny v rybách z řeky Tama (blízko japonského Tokya) a ve vodě samotné (zejména za ČOV). To vedlo k ukončení používání MX v Japonsku (1982). Obdobná rezidua byla nalezena i v evropských vodách (v Německu roku 1993 byl detekován MX a MK v mateřském mléce a tukové tkáni [26]). Typické koncentrace musk xyleny byly větší než 0,001 µg/l v mořské vodě, 0,001-0,01 µg/l v říční vodě a 0,01-0,1 µg/l (někdy i větší) v odpadní vodě na odtoku z ČOV. Tato zjištění vedla k poznání, že musk xylen není v ČOV kompletně odstraněn z odpadní vody (záleží na konkrétním uspořádání ČOV - např. podle německých studií je účinnost odstranění na dvou konkrétních ČOV 82 %, respektive 58 %). Od 90. let minulého století proto hledali výrobci parfémů nové alternativní sloučeniny a nitro-musk sloučeniny, zejména musk xylen, byly ve výrobcích postupně omezovány nebo zakazovány. Hlavním dodavatelem musk xyleny do EU je v současnosti Čína; v roce 2000 bylo do Evropy dovezeno pouze 67 tun MX.

Musk xylen je syntetizován z m-xylynu Friedel-Craftsovou alkyací pomocí *tert*-butyl chloridu a AlCl₃. Následuje nitrace a rekrystalizace surového produktu z 95% ethanolu [23].



Obrázek 3: Schéma přípravy musk xylynu z m-xylynu [23]

2.2.1.2 Polycyklické musk sloučeniny

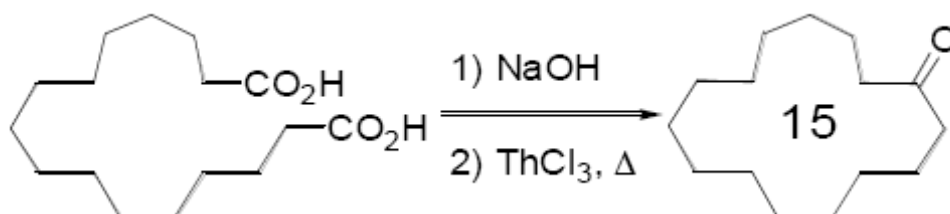
Tyto musk sloučeniny se staly populární po druhé světové válce a pomalu nahradily nitro-musk sloučeniny vzhledem k jejich negativním vlastnostem. V letech 1987-1996 klesala poptávka po nitro-musk sloučeninách z 23 % na 12 %. Ve stejném období vzrostla poptávka po polycyklických musk sloučeninách, a to až na 85 % [26].

Vývoj této skupiny byl stimulován potřebou vyrábět musk sloučeniny bez nitroskupin, které vykazují fotochemickou reaktivitu a způsobují nestabilitu daných sloučenin (v alkalickém médiu). Nicméně v devadesátých letech 20. století bylo objeveno, že tyto sloučeniny jsou potenciálně nebezpečné, protože mohou narušovat celulární metabolismus. Mnoho těchto sloučenin našlo použití např. jako vonné přísady pracích prostředků, kam jsou přidávány ve velkých množstvích [22].

Vybraní zástupci: galaxolid (HHCB), tonalid (AHTN), celestolid

2.2.1.3 Makrocyclické musk sloučeniny

Makrocyclické sloučeniny odpovídají za mošusový zápach některých živočišných výměšků (např. z kabara pižmového pochází muscon nebo z cibetky civeton). Toto zjištění provedl Růžička roku 1926. Ve stejném roce provedl první syntézu makrocyclické musk sloučeniny; konkrétně syntetizoval Exalton pyrolýzou hexadekandiové kyseliny v přítomnosti thorité soli (výtěžek 2 %).



Obrázek 4: Příprava Exaltonu Růžičkou - první makrocyclické musk sloučeniny

Následně byly vyvinuty metody pro syntézy nových látek poskytujících vyšší výtěžky. Makrocyclické musk sloučeniny obsahují v molekule více než šest uhlíků (často 10-15), které jsou propojeny do jednoduchého cyklu a navíc obsahují ketonovou nebo laktonovou skupinu (makrocyclické ketony [živočišný původ] nebo laktony [rostlinný původ]). V porovnání s nitro-musk sloučeninami a polycyklickými musk sloučeninami jsou mnohem snadněji biodegradovatelné. Makrocyclické musk sloučeniny jsou však dosud málo prostudovány a kvůli jejich relativně vysoké ceně nejsou ještě běžně rozšířené. V roce 1998 bylo z celkového celosvětového množství vyrobených musk sloučenin méně než 25 % makrocyclických; v roce 2008 stoupl toto číslo již na 60-65 % [24]. Je však známo, že asi polovina populace není schopna cítit tento typ sloučenin, pravděpodobně vzhledem k jejich vyšší molekulové hmotnosti [22]. V souvislosti s bioakumulací polycyklických a nitro-musk sloučenin se jeví používání makrocyclických sloučenin jako vhodnější, takže do budoucna lze očekávat zvýšenou produkci i zájem o tento typ sloučenin.

Vybraní zástupci: Muscon, Ambrettolid, Globalid

2.2.1.4 Alicyklické musk sloučeniny

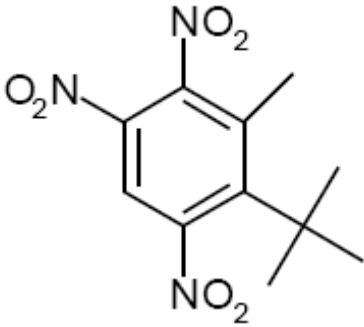
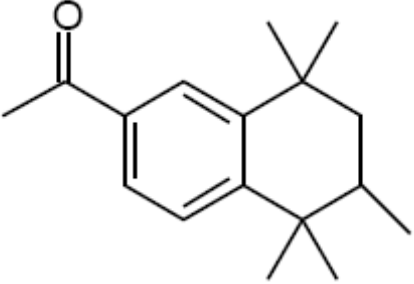
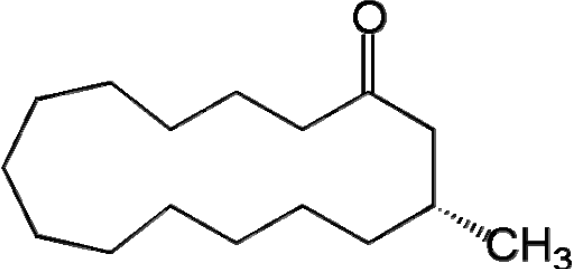
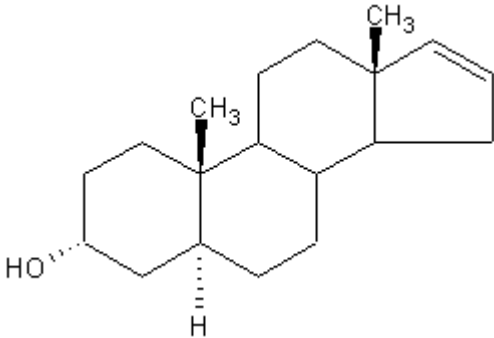
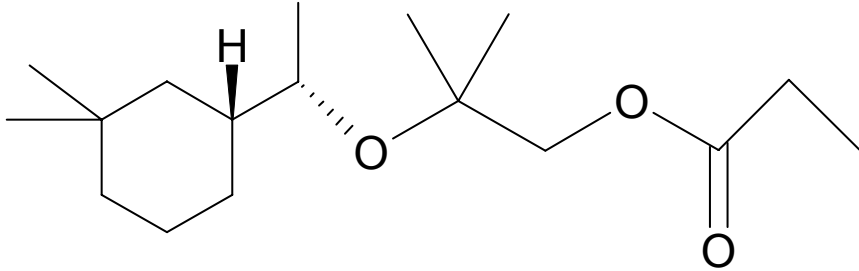
Sloučeniny z této skupiny jsou známy jako cykloalkyl estery nebo lineární musk sloučeniny. Jedná se o relativně novou skupinu musk sloučenin - první sloučenina z této skupiny (cyklomusk) byla syntetizována v roce 1975. Alicyklické sloučeniny se výrazně strukturně odlišují od předchozích skupin [22]. Tyto látky zatím nejsou moc rozšířené, ale do budoucna mohou představovat zajímavou alternativu k výše zmíněným skupinám.

Vybraní zástupci: cyklomusk, helvetolid, romandolid

2.2.1.5 Steroidní musk sloučenina – androstenol

Mezi látky poskytující pižmovitý zápach patří i látka se steroidní strukturou - androstenol, která se nachází u lidí v malém množství v potních žlázách. Tato látka je sexuálním feromonem u vepřů. Androstenol nebo jeho chemický derivát se vyskytuje i v lanýžích, takže schopnost vepřů nalézt lanýže i hluboko pod zemí lze přičíst „feromonové aktivitě“ této sloučeniny [25].

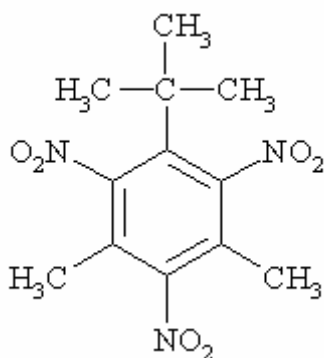
Tabulka 1: Zástupci z jednotlivých skupin musk sloučenin.

	
<p>Bauerovo pižmo nitro-musk sloučenina</p>	<p>tonalid polycyklická musk sloučenina</p>
	
<p>muscon makrocyclická musk sloučenina</p>	<p>androstenol steroidní musk sloučenina</p>
	
<p>D-helvetolid alicyklická musk sloučenina</p>	

2.2.2 Sledování zástupci

V této práci bylo studováno zastoupení MUSK sloučenin v rybách. Pro sledování byli vybráni významní zástupci MUSK sloučenin, kterými jsou musk xylen (MX) a musk keton (MK) reprezentující tzv. nitroaromatické analogy pižma a dále tonalid (AHTN) ze skupiny polycyklických musk látek.

2.2.2.1 Musk xylen (MX)

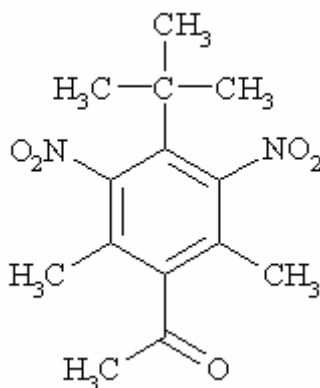


Obrázek 5: Strukturální vzorec musk xylenu

Tabulka 2: Vybrané vlastnosti musk xylenu [33]

IUPAC název	1- <i>tert</i> -Butyl-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzene
CAS	81-15-2
Molekulový vzorec	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₆
Vzhled	světle žluté krystalky
Molekulová hmotnost	297,27 g/mol
Rozpustnost ve vodě	0,15 mg/l
Tlak nasycených par	0,000 03 Pa
Teplota tání	114 °C
Log K _{ow}	4,9

2.2.2.2 Musk keton (MK)

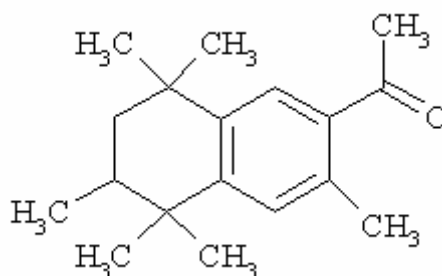


Obrázek 6: Strukturální vzorec musk ketonu

Tabulka 3: Vybrané vlastnosti musk ketonu [33]

IUPAC název	4- <i>tert</i> -butyl-2,6-dimethyl-3,5-dinitroacetophenone
CAS	81-14-1
Molekulový vzorec	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅
Vzhled	světle žluté krystalky
Molekulová hmotnost	294,31 g/mol
Rozpustnost ve vodě	0,46 mg/l
Tlak nasycených par	0,000 04 Pa
Teplota tání	137 °C
Log K _{ow}	4,3

2.2.2.3 Tonalid (AHTN)



Obrázek 7: Strukturální vzorec tonalidu

Tabulka 4: Vybrané vlastnosti tonalidu [33]

IUPAC název	6-acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetralin
CAS	1506-02-1
Molekulový vzorec	C ₁₈ H ₂₆ O
Vzhled	bílé krystalky
Molekulová hmotnost	258,40 g/mol
Rozpustnost ve vodě	1,25 mg/l
Tlak nasycených par	0,072 7 Pa
Teplota tání	57 °C
Log K _{ow}	5,4

2.2.3 Fyzikálně-chemické a environmentální vlastnosti

Syntetické musk sloučeniny patří mezi semivolatilní organické sloučeniny, jejichž ubikvitární výskyt v životním prostředí a environmentální vlastnosti z nich činí potenciálně nebezpečné látky. Vlastnosti SAPŽ ovlivňují jejich distribuci a chování v ŽP i v živých systémech. SAPŽ jsou poměrně špatně rozpustné ve vodě (díky nepolárnímu charakteru), avšak dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech, a to díky své lipofilitě i v tucích a olejích. Relativní molekulová hmotnost syntetických musk sloučenin se většinou pohybuje v rozmezí 200-300. Tlak par MX i MK je při pokojové teplotě velmi nízký. Pokud jsou však součástí nějaké kapalné vonící směsi (parfému), tak její lehce se odpařující se složky mohou fungovat jako nosič a mohou velmi zvýšit schopnost odpařování MX či MK. Tlak par AHTN (HHCb) je přibližně tisíckrát vyšší než u zmínovaných nitro-musk sloučenin. Protože nitro-musk sloučeniny patří mezi analogy nitrolátek, u nichž jsou známé explozivní vlastnosti, tak bylo jejich použití umožněno až po prověření jejich stability. Například musk xylen patří přímo mezi analogy výbušniny trinitrotoluenu (TNT). Ke vznícení, explozi, samozahřátí a především k viditelnému rozkladu však u musk xyleny nedochází, ani pokud je zahříván až na teplotu 75 °C po dobu 48 hodin. Přesto je Evropskou unií klasifikován jako výbušnina, protože v průmyslovém měřítku může představovat zdroj rizika [23].

Z chemické struktury nitro-musk sloučenin a polycyklických musk sloučenin vyplývá jejich velká stabilita. Tato stabilita respektive stabilita jejich vůně je žádoucí při produkci parfumérských a dalších produktů, ovšem pro životní prostředí představuje omezená schopnost degradace zdroj rizika. *Environmentální vlastnosti* SAPŽ vyplývají z jejich fyzikálně-chemických charakteristik. V prostředí mají SAPŽ obecně schopnost perzistence, a proto je řada látek zařazována mezi perzistentní organické polutanty (POPs). Díky svým lipofilním vlastnostem a snadné adsorpci na organickou hmotu se snadno bioakumulují (biokoncentrují) nejen v živých organismech (zejména v jejich tukové tkáni), ale zejména v sedimentech a kalcích. Jejich vysoká schopnost bioakumulace koreluje s vysokými hodnotami rozdělovacích koeficientů n-oktanol/voda.

2.2.4 Degradace

Přestože musk sloučeniny nejsou snadno degradovatelné, tak za přispění přírodních podmínek (teplota, přítomnost radikálů v ovzduší, sluneční záření) k určité degradaci dochází. Stejně tak je možná i biodegradace některých musk sloučenin pomocí bakterií nebo hub.

2.2.4.1 Oxidace a fotolýza ve vzduchu

Díky své semivolatilitě se syntetické musk sloučeniny v atmosféře (z různých vonných produktů) běžně vyskytují, ovšem brzy podléhají fotodegradacím reakcím s ozonem nebo také s radikály přítomnými v ovzduší (např. hydroxylovými). Byla dokázána souvislost mezi koncentrací musk sloučenin ve vzduchu a množstvím (hustotou) populace - ve městech jsou zjišťovány vyšší koncentrace než ve vesnicích. Software US EPA (AOPwin) spočítal poločas života MX na 12,8 dní. Byla však předpokládána intramolekulární reakce s ozonem a hydroxylovými radikály, na což daný software není zcela vhodný. Poněvadž se však MX

nevyskytuje v ovzduší v žádném rozpouštědle, je chování této sloučeniny srovnatelné s výskytem v nepolárním rozpouštědle, např. v cyklohexanu. Naopak ve vodě dochází k urychlení reakcí, protože voda funguje buď jako donor, případně jako akceptor vodíku. Pokud zohledníme fakt, že poločas života v cyklohexanu je 8,3 hodin při kontinuálním záření, tak lze předpokládat, že intramolekulární reakce ve vzduchu neposkytne poločas života kratší než 1 den. Takže poločas života MX ve vzduchu lze očekávat v rozmezí 1-12,8 dní [27]. Tyto relativně krátké poločasy života zamezují významnému šíření musk sloučenin na větší vzdálenosti. Přesto však atmosféra slouží jako hlavní médium pro přestup kontaminantů mezi různými složkami životního prostředí. Vzhledem k velmi nízkému zastoupení musk sloučenin v ovzduší však nepovažujeme atmosféru za významný zdroj těchto sloučenin.

2.2.4.2 Degradace (fotolýza) ve vodě

SAPŽ se do hydrosféry dostávají zejména prostřednictvím odpadní vody z průmyslu nebo domácností. Aromatické nitro-(musk) sloučeniny obsahují funkční skupiny, které jsou rezistentní k hydrolyze. Při studiu fotolýzy MX v laboratorních podmínkách (ponorná UV lampa) bylo zjištěno, že rozkladná reakce běží v iniciační fázi kinetikou prvního řádu ($k = 0,344 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 2,0 \text{ min}$). Následuje fáze s delší dobou života dané sloučeniny. Pomocí GC/MS byly jako metabolity identifikovány 3,3,5,7-tetramethyl-4,6-dinitro-3H-indole a 3,3,5,7-tetramethyl-4,6-dinitro-2-indolinon. Poločas života ve vodě byl v laboratorních podmínkách stanoven na 9,4 min. Degradace bývá ve venkovních podmínkách pomalejší, protože sloupec vody snižuje intenzitu UV záření a navíc přítomné sloučeniny (humínové kyseliny) a řasy pohlcují velkou část dopadajícího záření. Míra fotolýzy závisí i na sluneční aktivitě a rovněž také na ročním období - v zimě je poločas života několikanásobně delší než v létě [27]. V jiné publikované studii byl prokázán 95% úbytek MX po 60 minutách, a to při ozařování světlem s vlnovou délkou vyšší než 280 nm. Byla také studována rychlost rozkladu v závislosti na typu rozpouštědla. Zjištěné poločasy života byly následující: cyklohexan (8,3 hod), methanol (4,1 hod), cyklohexen (51 minut) a voda (10 min). Přestože řada studií poskytuje různé výsledky, lze považovat nitro-musk sloučeniny (musk xylen) za fotodegradabilní. Fotodegradace ve vodním prostředí však nemá významný vliv na setrvání nitro-musk sloučenin v životním prostředí [27].

Musk xylen je velmi perzistentní polutant v přírodních vodních systémech. Patří také mezi velmi bioakumulativní sloučeniny, což souvisí s tím, že hodnota jeho rozdělovacího koeficientu n-oktanol / voda je velmi vysoká ($\log K_{ow} = 4,9$) [23]. Experimentálně stanovené hodnoty biokoncentračních faktorů MX vykazují široké rozpětí hodnot (př. 60-5 000). Přesto lze říci, že MX je více bioakumulativní než AHTN [38].

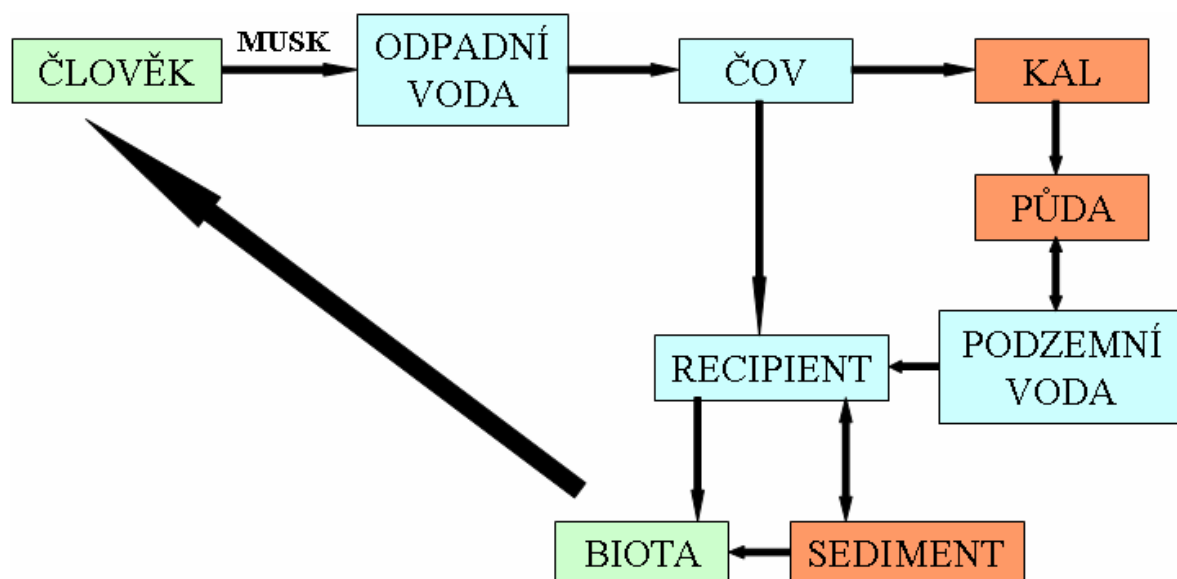
2.2.4.3 Biodegradace v kalu

Řada studií dokazuje razantní úbytek MX během procesu čištění odpadní vody (až 98,7 %), což se vysvětluje sorpcí na kal a zároveň (bio)degradací. Tento úbytek je nejspíš částečně způsoben anaerobním (redukčním) prostředím v aktivovaném kalu, které způsobuje redukci nitroskupin. Proto byly v efluentu z ČOV detekovány příslušné aminometabolity. Stejně tak dochází k degradaci nitro-musk sloučenin (MX) v anaerobní části (mořského)

sedimentu (poločas života do 60 dní); v aerobních podmínkách se naopak chovají perzistentně (poločas života pro biodegradaci v mořské vodě je vyšší jak 150 dnů) [27].

2.2.5 Výskyt v ŽP

Syntetické musk sloučeniny se ve stopových koncentracích většinou vyskytují ve všech složkách životního prostředí a také v potravním řetězci (např. MX byl detekován v Severním moři, řekách, městské i průmyslové odpadní vodě, efluentu z ČOV, ve vzorcích ovzduší z Norska, v lidské tukové tkáni a mateřském mléku, v potkanech, rybách, mlžích nebo krevetách) [28]. Výskyt musk sloučenin v ŽP je dlouhodobě studován zejména ve vodních ekosystémech (hydrosféře), protože za hlavní vstup musk sloučenin do životního prostředí je považována odpadní voda. Kontaminace říční vody, ryb a sedimentů syntetickými analogy pižma je nejvyšší pod velkými městskými aglomeracemi a dále po proudu klesá [29].



Obrázek 8: Zjednodušené schéma průniku MUSK sloučenin do životního prostředí

2.2.5.1 Voda a vodní biota

V rámci rozsáhlé pilotní studie [19] byla použita metoda pro sledování nejvýznamnějších zástupců „musk“ sloučenin, kterými jsou musk keton (MK) a musk xylen (MX) reprezentující tzv. nitroaromatické analogy pižma a dále galaxolidu (HHCb) a tonalidu (AHTN) ze skupiny polycyklických musk sloučenin. Již předběžné analýzy ryb odchycených v Labi v Hřensku v roce 1996 poukázaly na značný rozsah kontaminace ichtyofauny v této lokalitě na německé hranici. V následujících letech byla realizována vyšetření více než 650 vzorků ryb a sedimentů získaných v 11 lokalitách na Labi, Vltavě a Tiché Orlici. Výsledky ukazují, že syntetické analogy pižma představují všudypřítomné kontaminanty českých řek (v lokalitách po proudu od významných městských nebo průmyslových aglomerací jsou hladiny těchto kontaminantů významně vyšší než nad nimi). Nejrozsáhlejší kontaminace musk sloučeninami byla opakovaně zjištěna v lokalitě Klecany (pod Prahou) zhruba 3 km

od vypusti odpadních vod městské čistící stanice. Úroveň zátěže byla srovnatelná s německými daty pro řeku Ruhr, považovanou za nejvíce kontaminovaný tok v SRN. Typické koncentrační spektrum jednotlivých musk sloučenin v rybách je následující: HHCB > AHTN >> MX ≥ MK. Absolutní hodnoty nálezů musk sloučenin často převyšovaly koncentrace organochlorových kontaminantů (PCB a OCP). Rozsah biokoncentrace musk sloučenin v různých druzích ryb je rozdílný, nejvyšší biokoncentrační faktor a současně nejmenší rozsah biotransformace byl prokázán u cejna velkého (*Abramis brama*) [tento druh je doporučen jako vhodný bioindikátor pro zjišťování přítomnosti odpadních vod ve vodách povrchových a byl používán i v experimentální části této práce]. Ve vyšetřovaných rybách byla prokázána přítomnost aminoderivátů musk sloučenin, zejména 4-NH₂-MX, často v koncentracích vyšších než mateřská látka, ze které vznikají biotransformací (redukcí nitro skupiny). Tato skutečnost (možnost dietárního příjmu) je závažná z hlediska toxikologického, a to zejména pro konzumenty sladkovodních ryb. Je obecně známo, že koncentrace polutantu stoupá s vyšším postavením živočicha v potravní pyramidě. V rámci vodního ekosystému jsou na vrcholu potravní pyramidy dravé ryby, v rámci celé živočišné říše je to člověk [19].

Ve všech říčních profilech jsou zjišťovány nejvyšší hladiny u galaxolidu a tonalidu, a to jak v rybách (0,3 - 7,8 mg/kg), tak i v SPMD membránách (0,1 - 2,4 mg/kg). Koncentrace syntetických analogů pižma jsou silně závislé na vzdálenosti od zdroje znečištění - směrem po proudu od městských aglomerací klesají v důsledku zředování, degradace nebo sorpčních jevů. SPMD představuje vhodnou techniku integrálního pasivního vzorkování použitelného pro porovnání úrovně kontaminace vody v různých říčních profilech a zejména pak pro odhad relativní zátěže vodních organismů [29]. Studie ukazují, že koncentrace polycyklických musk sloučenin jsou v evropské vodní biotě dvakrát vyšší než v americké a kanadské vodní biotě. Naopak nitro-musk sloučeniny se nachází v americké a kanadské vodní biotě ve vyšších koncentracích než v Evropě [30].

2.2.5.2 Lidská plazma, tuková tkáň a mléko

Syntetické musk sloučeniny a jejich metabolity jsou u lidí nalézány v moči a faeces. Nejpravděpodobněji je to způsobeno průnikem (a absorpcí) musk sloučenin přes pokožku. Kvůli rozšířenému používání v nejrůznějších produktech denní spotřeby má téměř každý měřitelnou koncentraci musk sloučenin v krevním řečišti [30]. Kontaminace člověka prostřednictvím potravního řetězce (zejména konzumací ryb) nebyla jednoznačně prokázána, nicméně se lze domnívat, že i tato forma kontaminace je možná.

V německé studii z roku 1993 byl nalezen v **lidské plazmě** musk xylen (MX) v koncentracích < 0,1-1,12 µg/l (medián: 0,24 µg/l) [72 % pozitivních vzorků]. Studie z roku 1998 uvádí pouze 12 % pozitivních vzorků s koncentracemi MX v rozmezí < 0,1-0,29 µg/l (medián: < 0,1 µg/l). Nebyly nalezeny žádné korelace mezi koncentrací MX v plazmě a pohlavím nebo způsobem života vyšetřovaných osob. Ze srovnání obou studií lze vyvozovat závěr, že obsah MX v lidech (lidské plazmě) klesá díky omezování používání MX ve výrobcích osobní péče.

Německá studie z roku 1994 odhalila musk xylen (MX) v lidské **tukové tkáni** v koncentracích 20-90 µg/kg tuku u mužů a 20-220 µg/kg tuku u žen (vzorky tuku odebrány v letech 1992/3). Jiná studie z roku 1996 analyzovala vzorky tukové tkáně ze Švýcarska (z let 1983/4 a 1994) a nalezené koncentrace se pohybovaly v rozmezí 6,7-69 µg/kg tuku [31].

V roce 1998 byla provedena studie, která stanovovala obsah syntetických musk sloučenin v **mateřském mléce** (108 žen). Mléko obsahovalo průměrně 3,67 % tuku. Bylo prokázáno, že průměrná hodnota MX v mléce je 7,43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tukové složky mléka (zjištěné hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0-68,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tukové složky mléka). U žen nebyla zjištěna přesvědčivá korelace mezi obsahem musk sloučenin a věkem, tělesnou hmotností, používáním kosmetických produktů a konzumací ryb. Byla provedena řada dalších studií, které často stanovily i vyšší průměrné koncentrace MX v mléce (např. 78 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tukové složky). Byly nalezeny i velmi vysoké koncentrace MX: až 1220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tukové složky. Z uvedených studií lze vyvodit závěr, že musk sloučeniny se díky své lipofilítě často vyskytují v mateřském mléce, takže malé děti jsou v řadě případů vystaveny definovatelné expozici musk sloučenin. Pokud budeme uvažovat průměrnou hodnotu koncentrace MX 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tukové složky mléka (obsah tuku 3,5 %) a průměrný příjem dítěte (do 3 měsíců života) 120 gramů mléka na kilogram živé hmotnosti, tak vychází průměrný denní příjem dítěte 0,42 μg MX / kg živé hmotnosti / den [31].

Při rozbořech krve prováděných Greenpeace Nizozemí [34] byly MK a MX nalezeny v 9ti a 6ti vzorcích z 91. Přítomnost HHCB (nalezeno ve všech vzorcích) a AHTN (nalezeno v 88 z 91 vzorků) byla ovšem daleko častější a ve vyšších koncentracích. HHCB bylo také nejobvyklejším a nejvíce zastoupeným syntetickým pižmem zjišťovaným v současné studii. Koncentrace HHCB a AHTN zjištěné v krvi matek a pupečnickové krvi jsou víceméně srovnatelné. Jelikož používání těchto látek v kosmetickém průmyslu je v EU zakázáno od roku 1995, naznačují tato zjištění jejich dlouhodobé přetrvávání v životním prostředí [34].

2.2.5.3 *Ostatní*

Hlavní cestu vstupu musk sloučenin do ŽP představuje odpadní voda. Ve vodním prostředí se ustavuje rovnováha musk sloučenin mezi vodou, kalovými částicemi (tvořící po usazení sediment), sedimentem a biotou. *Sedimenty* patří spolu s tukovou tkání organismů mezi rezervoáry musk sloučenin. Je to způsobeno tím, že částice sedimentu mají vysoký specifický povrch a díky organickému charakteru částic se na ně musk sloučeniny snadno sorbují. V těchto "rezervoárech" musk sloučeniny setrvávají dlouhou dobu, protože díky přítomnému anaerobnímu prostředí je zamezeno možnosti oxidace a vzhledem ke vzdálenosti od hladiny (absenci slunečního záření) i možnosti fotodegradace. Na druhou stranu anaerobní prostředí umožňuje metabolizaci, zejména nitro-musk sloučenin, a přítomné mikroorganismy se mohou podílet na biodegradaci (mikrobiální degradaci). Sedimenty představují riziko pro ŽP, protože při erozi nebo mechanickém rozrušení sedimentu se z něj mohou kontaminanty, včetně musk sloučenin, zpětně uvolnit a sekundárně kontaminovat vodní prostředí. Z vodního prostředí se musk sloučeniny mohou dostat buď pomocí potravního řetězce (někteří suchozemští živočichové včetně člověka používají vodní biotu jako zdroj obživy), nebo díky semivolatilním vlastnostem musk sloučenin. *Ovzduší* poté funguje jako hlavní transportní médium pro přestup do dalších složek (velmi nízké zastoupení v ovzduší však při tomto způsobu transportu nepředstavuje zdroj rizika). Mnohem závažnější je používání kalů z ČOV na hnojení zemědělské půdy, protože musk sloučeniny se v průběhu čistícího procesu na kal relativně snadno adsorbují. V *půdě* poté setrvávají naadsorbovány na organickou složku (humus), případně se postupně vymývají, avšak jejich pohyb s půdní vodou je vzhledem k jejich hydrofóbnosti relativně omezen. Osud musk sloučenin v pedosféře je závislý

na vlastnostech konkrétní půdy (např. obsahu organického uhlíku, půdní vlhkosti, teplotě, přítomnosti mikroorganismů).

2.2.6 Toxicita

V současné době se studiu toxických vlastností musk sloučenin věnuje řada vědců, protože navzdory rozšíření SAPŽ máme dosud minimum informací o jejich toxicitě. Bylo zjištěno, že některá pižma patří mezi endokrinní disruptory a mohou tedy interferovat např. s hormonálním komunikačním systémem ryb, obojživelníků a savců [34].

Akutní toxicita musk xylenu (MX) je nízká: LD₅₀ (potkan, orálně) > 10 g/kg; LD₅₀ (králík, dermálně) > 15 g/kg. MX také dráždí pokožku (5 mg na lidské pokožce způsobí po 48 hodinách slabé podráždění). Z pokusu na morčeti lze předpovědět, že MX způsobuje u lidí slabou fotoalergickou reakci [37]. U myši byl po dlouhodobém příjmu MX prokázán karcinogenní účinek na játra (s bezprahovou závislostí). MX byl identifikován jako induktor enzymů v játrech potkanů. MX je znám jako ko-mutagenní látka pro řadu polycyklických aromatických sloučenin a aromatických aminů [32]. Doba potřebná k eliminaci poloviny množství MX z těl potkanů se pohybuje v řádu několika málo dní. Toto zjištění kontrastuje s pomalou eliminací MX a poločasem života 80 dní u člověka [28]. Při studiu toxikokinetiky u ryb bylo zjištěno, že 3. den po aplikaci (MX, MK) je dosahováno maximální koncentrace metabolitů nitro-musk sloučenin v hemoglobinu. Následuje exponenciální úbytek s poločasem života 1-2 dny [32].

Musk xylen je tedy klasifikován Evropskou unií jako karcinogen 3. třídy. V této kategorii jsou látky, u nichž jsou informace o karcinogenitě nedostačující pro uspokojivé posouzení; existují však některé důkazy a indicie (na základě studií na zvířatech), ze kterých vyplývá podezření na karcinogenní účinky. Uvedená klasifikace MX je založena na studii orálního příjmu MX u myši. Byl pozorován zvýšený výskyt rakoviny jater při příjmu 170 mg/kg ž.h. (samci) a 192 mg/kg ž.h. (samice). Musk xylen není genotoxický. Má však negativní efekty na činnost jater (inhibicí cytochromů). Nejnižší orální dávka způsobující rakovinu byla u myši 70 mg/kg ž.v./den. Dá se očekávat, že s přibývajícimi znalostmi bude mezi karcinogeny 3. třídy zařazen i musk keton, který má srovnatelné vlastnosti s MX.

Další komplikací je metabolizace musk xylenu, respektive nitro-musk sloučenin. V organismu může docházet k redukci jedné nebo více nitroskupin (pomocí střevní mikroflóry) na aromatické aminy (např. p-NH₂-musk xylen), které mají odlišnou hepatotoxicitu [23]. Vzniklé metabolity nitro-musk sloučenin mohou mít schopnost atakovat DNA.

Polycyklické musk sloučeniny se zdají být ve srovnání s nitro musk sloučeninami relativně méně nebezpečné, avšak např. i u AHTN bylo dle testů na laboratorních hlodavcích identifikována schopnost akutně poškozovat játra [33].

Tabulka 5: Toxikologická data [38]

MX	NOEC (21 dní, <i>Daphnia</i>) = 0,056 mg/l [nejnižší zjištěná]
MK	NOEC (21 dní, ryby) = 0,063 mg/l [nejnižší zjištěná]
AHTN	NOEC (32 a 36 dní, ryby) = 0,035 mg/l [nejnižší zjištěná]

Z poznatků, že MX může při vyšší expozici způsobovat rakovinu u myši, zpřísnila vědecká komise pro kosmetické přípravky EU unijní normy pro obsah MX v kosmetických přípravcích [34]. V současné době neexistují vědecky dostatečně podložené údaje (kvůli omezenosti toxikologické databáze SAPŽ), které by umožnily spolehlivý odhad možného environmentálního a zdravotního rizika z látek pižma v potravinových řetězcích. Nicméně příjem SAPŽ v mateřském mléku u novorozenců a expozice SAPŽ dermální (kosmetika) nebo dietární cestou (ryby) může vést k překročení předběžného tolerovatelného denního příjmu (pTDI) daných sloučenin u jednotlivých skupin obyvatelstva, takže negativní nebo toxické působení nelze vyloučit. S ohledem na všeobecnou přítomnost a nízkou biodegradabilitu syntetických látek pižma v životním prostředí je vhodné pro rizikové hodnocení a regulaci těchto kontaminantů aplikovat „princip opatrnosti“ (cautionary principle). Cílem je přesvědčit výrobce o nezbytnosti dobrovolně redukovat koncentrace analogů pižma v kosmetických a hygienických výrobcích na technologicky nejnižší možnou úroveň [35].

V odborných studiích byla již prokázána i schopnost musk sloučeniny negativně působit na vodní biotu – konkrétně mlže. Je známo, že *mlži* mají v žábách speciální proteiny, které hrají klíčovou roli v obraně proti toxickým látkám vyskytujícím se ve vodách. Mlži (např. slávka kalifornská) mohou přes své žábry přečerpávat více než 20 litrů vody za hodinu. Ochranný mechanismus sestává z transportních bílkovin v buněčné membráně, která funguje jako molekulární „čerpadlo“ a brání tomu, aby se jedovaté látky hromadily v buňce (jedovaté látky jsou transportovány mimo buňku). Tento obranný mechanismus proti toxickým chemickým látkám je nazýván multi-xenobiotická rezistence (MXR). Sloučeniny, které inhibují mechanismus MXR („blokace čerpadla“), jsou nazývány chemosenzibilizéry; příkladem může být galaxolid ze skupiny syntetických musk sloučenin. Takové látky otevírají brány dalším chemickým látkám, které pak mohou proniknout do buněk. Jde dokonce o chemické látky, které podle běžných standardů dosud nebyly považovány za toxické, ale mohou zvyšovat toxicitu jiných sloučenin. Dosud známé látky tohoto typu patří do velmi odlišných chemických skupin. To by mohlo být známkou toho, že vzájemné působení mezi environmentálními látkami a živým systémem je obecně rozšířené. Zatím se o vlivech těchto látek, které zvyšují škodlivost jiných sloučenin, ví jen velmi málo. Chemosenzibilizační účinky proto zatím nehrají podle současné legislativy roli v posuzování nebezpečných látek [36].

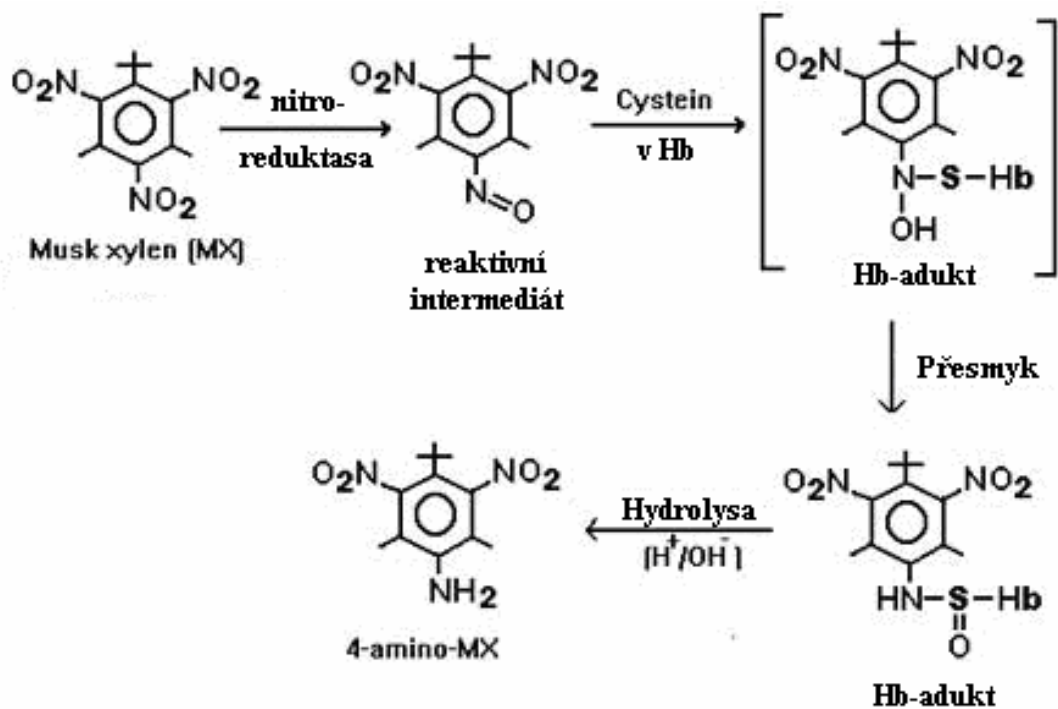
2.2.7 Metabolizace

Bylo potvrzeno, že musk sloučeniny mohou v různé míře podléhat metabolizaci. Podílejí se na ní buď fyzikálně-chemické podmínky prostředí, nebo zejména aktivita mikroorganismů nebo biotransformační reakce v živých organismech včetně člověka. Z primárních (mateřských) sloučenin tedy vznikají metabolity, jejichž toxicita a fyzikálně-chemické i environmentální vlastnosti mohou být zcela odlišné. Například při testu v oceánu [27] bylo určeno, že mateřská sloučenina MX vytěká, zatímco její metabolity zůstávají ve vodě (díky mnohem lepší rozpustnosti). O vlastnostech a chování různých metabolitů existuje velmi omezené množství informací. Živé systémy uskutečňují obecně biotransformační reakce za účelem zvýšení polaritativy přítomných kontaminantů a tedy usnadnění vyloučení (to však často také zvyšuje toxicitu a schopnost šíření v buňce). Principem metabolizace nitro-musk

sloučenin je převedení (redukce) nitro skupiny na amino skupinu. MX se tedy v živém organismu metabolizuje na 4-amino-MX (4-AMX). Méně se vyskytuje 2-AMX; jen ojediněle je možný i výskyt 2,4-diamino-MX. Metabolizace polycyklických musk sloučenin často spočívá v přeměně na polárnější produkty (např. na laktony a hydroxykyseliny u HHCB [33]), které již jsou snadno degradovatelné různými mikroorganismy.

K indikaci expozice různými xenobiotiky (tedy i musk sloučeninami) se používá měření rozličných biomarkerů. Biomarkery se nacházejí v moči, slinách, vlasech nebo v krvi (krevních bílkovinách). Nejprůkaznější biomarker expozice nitroaromáty je krevní hemoglobin (Hb). Nitroaromáty a jejich metabolity tvoří s hemoglobinem adukty. Po jejich hydrolyze lze stanovovat přímo vzniklé metabolity. Výhodou je, že výsledek stanovení odráží naakumulované množství za delší dobu (vzhledem k dlouhé životnosti erytrocytů - přes 100 dní). Proto lze provést průkaznější hodnocení rizika než z pouhého stanovení metabolitů v moči [28].

Nitroareny (nitro-musk sloučeniny) jsou v živém organismu enzymaticky redukovány a jejich metabolity nitrosoareny reagují s thiolovou skupinou aminokyseliny cysteinu v hemoglobinu za vzniku Hb-aduktu. Tyto adukty mohou podléhat hydrolyze za vzniku aromatických aminů, které patří mezi ultimativní karcinogeny (mohou atakovat DNA). Laboratorní stanovení využívá jako analytickou koncovku GC-SIM-MS. Podle americké studie obsahu 4-amino-MX (4-AMX) v Hb ryb (kapři z oblasti Las Vegas, Nevada) byly stanoveny koncentrace 6,0-30,6 ng 4-AMX / g. Zároveň bylo dokázáno, že absence laboratorní hydrolyzy Hb-aduktu vede k nulovým výsledkům 4-AMX. Na základě tohoto zjištění lze konstatovat, že v rybím organismu probíhá daná hydrolyza velmi omezeně, respektive směr této hydrolyzy je posunut směrem k Hb-aduktu [28].



Obrázek 9: Metabolická cesta biotransformace MX na 4-amino-MX [28]

Uvedené biotransformaci podléhají obdobným způsobem i ostatní nitroareny, respektive nitro-musk sloučeniny, takže může např. vznikat i 2-AMX či 2-AMK. Je známo, že rychlost vzniku (výtěžek) 4-AMX aduktu je asi 100krát vyšší než u 2-AMX či 2-AMK [32].

2.3 Analytická chemie MUSK sloučenin

Kvůli ubikvitárnímu výskytu syntetických musk sloučenin v životním prostředí je nutné jejich správné analytické stanovení, jehož výsledky umožní poznat vlastnosti a distribuci těchto látek v prostředí. Sama analytická kontrola nepřinese snížení kontaminace, ale je nutným výchozím bodem pro jakékoliv rozhodnutí. Konečným cílem je proto správné vyhodnocení zdravotních rizik pro živé systémy. Obecně lze říci, že znečišťování životního prostředí kontaminanty se stalo celosvětovým problémem. Postup kontaminace se projevuje malými, často neviditelnými změnami, nicméně je nutno přijmout fakt, že tyto změny negativně ovlivňují živé systémy včetně člověka. Analytická chemie životního prostředí je relativně novým směrem, který využívá nejprogresivnějších známých metod a jejich kombinací ke spolehlivému stanovení škodlivin ve stopových koncentracích [39].

Musk sloučeniny jsou semivolatilní organické látky, které se v životním prostředí nachází ve stopových množstvích. Těmto skutečnostem musí být podřízen celý proces jejich analýzy. Je však nutné si uvědomit, že důsledná analytická kontrola výskytu musk sloučenin je složitý a nesnadný úkol, jehož řešení je případ od případu komplikováno specifickými vlastnostmi prostředí, ve kterém se nacházejí, a množstvím a typem ostatních kontaminantů.

Stanovení musk sloučenin lze rozdělit do následujících kroků:

- Odběr vzorku
- Transport do laboratoře
- Uchování vzorku
- Izolace analytů z matrice
- Přechištění a zkoncentrování vzorku s analyty
- Analýza (identifikace a stanovení).

Volba metod v jednotlivých krocích je ovlivněna druhem vzorku, cíli, které jsou analýzami sledovány, a především vybavením laboratoře. V určitých případech lze některý z kroků vypustit. Jednotlivé kroky mohou být při nevhodném provedení zdrojem významných chyb a nejistot, které přímo ovlivní výsledky zejména kvantitativní analýzy [40]. Proces optimalizace metody proto přizpůsobuje metodu daným analytům a matrici, ale dalším cílem je časové zkrácení analýzy a minimalizace chyb v jednotlivých krocích postupu.

2.3.1 Opatření proti kontaminaci z vnějšího prostředí

Je nutné si uvědomit, že musk sloučeniny se vyskytují všude okolo nás – zejména jako přísada v detergentech a čistících prostředcích, parfémeh, kosmetických přípravcích nebo vypraných látkách. Proto během vykonávání analytického postupu musíme na tyto skutečnosti myslet za účelem vyloučení kontaminace z vnějšího prostředí. Při práci je nutné

používat bezpudrové rukavice, protože vonné složky mýdel jsou na pokožce stálé. Vhodné je používání neparfémovaných mýdel. Z laboratoře je nutno vyloučit osvěžovače vzduchu a jiné parfémované prostředky; je vhodné dostatečně větrat (za účelem naředění případných přítomných musk sloučenin) a rovněž je nezbytné použití klimatizace za účelem snížení teploty v místnosti, protože vyšší teplota v laboratoři usnadňuje těkání vonných látek. Samotný analytik by v době měření neměl mít na sobě aplikovány žádné kosmetické parfémované přípravky. Laboratorní sklo by se nemělo umývat v myčce, ale ručně za použití speciálního čistícího postupu, který zahrnuje dostatečné proplachování čistou vodou, propláchnutí vhodným rozpouštědlem a vysušení při vyšší teplotě. Se standardy je nutno pracovat v zapnuté digestoři. Lahvičky standardů by měly být otevírány jen na nezbytně nutnou dobu, poté je nutné je vrátit do chladu a temna v lednici, kde musí být skladovány odděleně od případných vzorků. Se standardy a vzorky je nutno manipulovat tak, aby nedocházelo k odpařování musk sloučenin a následné kontaminaci prostředí laboratoře.

2.3.2 Odběr vzorku

Odběr vzorku je stěžejním krokem celé analýzy. Cílem je odebírat takové „reprezentativní“ vzorky (série vzorků), které po konečném vyhodnocení budou vypovídat o zastoupení analytů v celé sledované lokalitě. Pokud je vzorek odebrán chybně, tak následný analytický postup již nemá smysl. Způsob vzorkování se volí podle skupenství vzorku a povahy analytů. Vzhledem k výskytu musk sloučenin v prostředí se nejčastěji odebírají vzorky vody nebo složky (sediment, kal) a biota (ryby), které pocházejí z vodního prostředí.

2.3.2.1 Odběr vody

Při vzorkování vody je nutné dbát na získání reprezentativního vzorku, protože hodnoty difúzních koeficientů ve vodě jsou zhruba o čtyři řády menší při porovnání se vzduchem, z čehož vyplývá, že sledovaný analyt nemusí být rovnoměrně rozdělen v celém vzorkovaném objemu. Většinou je nutné vzorkovat na více místech a potom smícháním získat průměrný vzorek, nebo analýzou většího počtu vzorků získat informace o distribuci analytu v celém vzorkovaném objemu. U toků musíme počítat s nehomogenitou v příčném profilu, s negativním vlivem břehů a s přítomností tuhých suspendovaných částic, na jejichž povrchu může být sorbována značná část kontaminantů. U stojatých vod je třeba počítat s vertikální stratifikací, takže je často vhodné vzorkovat z nejhlubšího místa [39]. Vzorkování vody se provádí do skleněných vzduchotěsných vzorkovnic z hnědého skla s uzávěrem ze skla nebo teflonu (nutná je těsnost víčka). Hnědé sklo zabraňuje možnosti případné fotodegradace analytů. Vzorkovnice by měly být umyty speciálním postupem tak jako laboratorní nádoby. Většinou pro analýzu postačuje 0,1-2 litry kontaminované vody. Je nutné co nejdříve vzorek umístit do temna v lednici (4 °C) a během několika málo dní analyzovat, protože jinak může hrozit sorpce analytů na skleněnou stěnu vzorkovnice. Jinou možností je použití plastových neprůsvitných nádob. Nádoby se vždy plní až po horní okraj, aby bylo sníženo množství přítomného vzduchu (kyslíku), který může urychlovat rozklad (oxidaci) analytů, případně umožňuje intenzivnější metabolismus aerobních mikroorganismů (jsou-li přítomny). Pokud by nebyly vzorkovnice plněny až po okraj, tak by se navíc těkavé analyty uvolňovaly

nad hladinu a po otevření vzorkovnice by došlo k jejich úniku do ovzduší a tedy ke ztrátám. Samozřejmostí při vzorkování je zjištění podmínek (charakteristik) odběru, protože řada abiotických faktorů ovlivňuje přítomnost daných analytů v odebraném vzorku (např. intenzivní sluneční svit v letních měsících zvyšuje úbytek musk sloučenin fotodegradací); vyšší intenzita srážek způsobuje vyšší naředění musk sloučenin ve vodním toku a naopak déletrvající sucha mohou způsobit zakoncentrování atd.).

2.3.2.2 Vzorkování pomocí SPMD

Pokud odebíráme vzorek vody z toku nebo nádrže v určitém místě a čase, lze tento odběr označit jako „bodový“. Nevýhodou tohoto postupu je, že získané výsledky [analytického stanovení nebo testů (eko)toxicity] mohou být často zavádějící, protože nevystihují nepravidelnosti přísunu kontaminantů (sledované analyty mohou do vodního toku přicházet nárazově, případně periodicky).

Této skutečnosti se dá předejít používáním pasivního vzorkování. Jedná se o odebírání vzorků z recipientů takovým způsobem, kdy jsou pokusná zařízení exponována v recipientu po dlouhou dobu (kontinuálně). Perspektivní alternativou, založenou na chemicko-fyzikálních principech s analytickou nebo toxikologickou koncovkou, je použití semipermeabilních membrán – SPMD.

Semipermeabilní membrány (SPMD – Semipermeable Membrane Device) jsou ve světě stále více používány (od roku 1990) k monitoringu organických kontaminantů. Mohou být použity ke stanovení mnoha lipofilních sloučenin ve vodě, v sedimentech, zemině a také ve vzduchu. SPMD jsou určeny především ke stanovení organických polutantů, ale existují i typy pasivních vzorkovačů určené pro stanovení stopových množství kovů. Použití SPMD pro monitoring hygienicky a environmentálně nepříznivých škodlivin je velmi vhodné zejména ve vodárenství, ale rovněž v citlivých oblastech životního prostředí.

Základní předností je model expozice, popsateľný fyzikálně-chemickými parametry. Jelikož akumulací schopnosti tohoto modelu jsou podobné jako u vodních živočichů (s výjimkou vlivu faktorů, charakteristických pro živý organismus: nezávislost na druhu, pohlaví, bez metabolizace, akumulace není prahová pro přežití organismu), označuje se model často jako „virtuální ryba“. Systém umožňuje přepočít koncentraci kontaminantu na základě kalibračních dat a stanovit tak koncentraci sledovaných látek ve vodě.

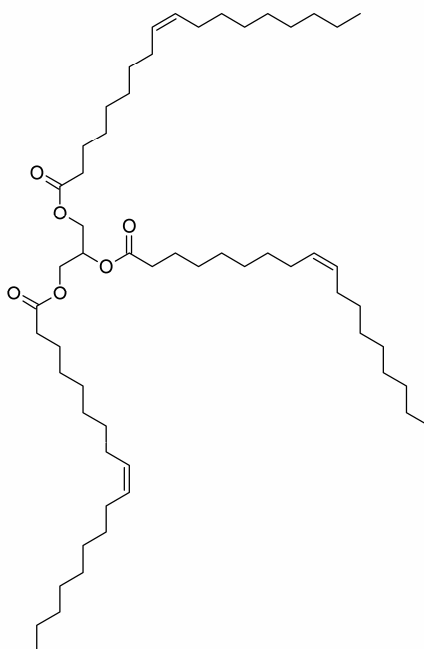
Systém SPMD se skládá z polopropustné membrány (tloušťky 75-95 μm), charakteristických rozměrů 94 x 2,5 cm (exponovaná plocha je cca 420 cm^2), s póry specifického rozměru do 10^{-9} m, což je rozměr odpovídající biologickým membránám rybích buněk. Uvnitř membrány je uzavřen syntetický lipid – triolein vysoké čistoty (97 %). Jedná se o neutrální triglycerid 1,2,3-tri(*cis*-9-oktadecenoyl)glycerol o molekulové hmotnosti do 600 Daltonů. Volba tohoto sequestrantu je dána jeho přítomností v mnoha vodních organizmech. SPMD membrány jsou základem pro vzorkování vod i ovzduší. Expozice trioleinu v membránách je řízena difúzí, jejíž základní odvození vychází z Fickova zákona. SPMD jsou vyráběny ze syntetických materiálů, které zajišťují větší jednotnost a reprodukovatelnost než použití živých organismů.

Provedení i manipulace je velmi jednoduchá. Membrány (naplněné trioleinem) jsou předčištěny dialýzou v hexanu. Poté jsou napnuty do vhodného vzorkovacího držáku (patra). Patro je vloženo do ochranné ocelové klece. Tento systém je opatřen teplotním datalogerem

a umístěn do vzorkovaného prostředí (příp. se měří i další podmínky expozice). Zpočátku roste koncentrace analytu v SPMD lineárně s časem, poté následuje exponenciální růst. Expozice probíhá zpravidla 28-30 dnů, protože po této době již většinou nastává rovnovážná fáze, kdy se koncentrace analytu výrazněji nemění. Při expozici dochází k akumulaci všech lipofilních kontaminantů do prostředí trioleinu (sequestrantu), nezanedbatelná část zůstává „rozpuštěná“ v membráně. Po dané době jsou membrány z prostředí vyjmuty, extrahovány a výsledné dialyzáty jsou použity k chemické analýze nebo zkouškám toxicity.

Vzorkování pomocí SPMD závisí na době vzorkování, ploše membrány, vzorkovaném prostředí (na membráně se vytvoří biologický film) a rychlosti vzorkování. Rychlost vzorkování závisí přímo úměrně na teplotě; její hodnoty se stanovují experimentálně a jsou dostupné v publikacích. Samozřejmě schopnost zachycení analytu v trioleinu závisí také na vlastnostech daného analytu (např. $\log K_{ow}$). Konečná koncentrace analytu ve vodě se určí výpočtem z koncentrace analytu v SPMD, (efektivní) rychlosti vzorkování a době vzorkování.

Metoda SPMD zaručuje dosažení velké přesnosti vzorkování při velmi nízké úrovni kontaminace. SPMD zachytí širokou škálu chemikálií, včetně takových, které jsou organizmy metabolizovány. Výhodou SPMD vzorkování je, že eliminuje epizodické výkyvy kontaminace (expozice membrány poskytuje časově zprůměrovanou informaci o množství i periodicky se vyskytujících polutantů). Další výhodou tohoto typu vzorkování je, že výsledky přímo odráží biotickou expozici (biodostupnost) v konkrétní lokalitě. Je to tím, že užití SPMD dobře simuluje proces difúze přes biomembrány (např. epitel rybích žaber). Difúze přes biomembrány je považována za rozhodující při biokoncentraci polutantů v živých organismech. SPMD proto dokáže simulovat i proces biokoncentrace v živém organismu [41, 42].



Obrázek 10: Strukturní vzorec trioleinu [21]

2.3.3 Transport a uchování vzorku

Protože lokality odběru vzorků jsou často značně vzdáleny od laboratoře, je nutno při transportu a uchování vzorku dodržovat určité zásady, které minimalizují nepříznivé vlivy na obsah analytů ve vzorku.

Transport do laboratoře by měl být uskutečněn bez zbytečných průtahů; během transportu je nutné zajistit, aby byl vzorek v temnu (zabránění fotodegradace) a pokud možno i v chladu (omezení těkání, biodegradace, příp. termodegradace). Nutné je také zkontrolovat těsnost víčka na vzorkovnici, aby se vyloučily ztráty vzorku, příp. kontaminace z vnějšího prostředí.

Po dopravení vzorků do laboratoře by v ideálním případě měly být ihned, nebo v co nejkratším čase analyzovány. Toto však často není možné, z hlediska technickým podmínek zajistit, a proto je nutné vzorky určitý čas *skladovat*. Skladování má probíhat za podmínek, které co nejvíce omezují ztráty analytu. Čím delší dobu však vzorek skladujeme, tím větší je riziko, že analyt bude podléhat degradaci (fotodegradaci, mikrobiální biodegradaci, oxidaci atd.), metabolizaci, sorpci na stěnu vzorkovnice, odpařování atd. Skladování se většinou provádí přímo v nádobách, do kterých byl vzorek odebrán (vzorkován), protože každá manipulace se vzorkem může znamenat ztráty nebo kontaminaci z vnějšího prostředí. Vzorky se proto obvykle skladují v temnu (zabránění fotodegradace) a chladu (omezení odpařování a biodegradace) v lednici nebo mrazničce (teploty od +4 °C do -20 °C); důležité je zabránit přístupu kyslíku ke vzorku. Biologické vzorky je vhodné uchovávat při ještě nižších teplotách, nejlépe v hluboko mrazících boxech při teplotě -70 °C.

2.3.4 Zpracování tuhých vzorků před analýzou

2.3.4.1 Homogenizace

Homogenizace je rozmělnění větších kusů vzorku za účelem zvětšení aktivního povrchu (příp. i narušení biologických tkání) pro efektivnější izolaci (extrakci) analytů z matrice. Účelem homogenizace je také vytvoření homogenní směsi s rovnoměrným zastoupením analytů. To je velmi důležité, protože pro další postup se často odebírá jen malý zlomek původního vzorku. Homogenizace se provádí buď ručně (např. v třecí misce), nebo pomocí různých zařízení (např. mlýnků a mixérů).

2.3.4.2 Sušení

Sušení patří k běžným úkonům předúpravy pevného vzorku. Cílem je co nejvíce snížit množství vody, protože řada analytických přístrojů je na vodu velmi citlivá. Snížení množství vody omezuje i biologickou degradaci a hydrolytické reakce a navíc umožňuje lepší separaci nebo homogenizaci vzorku. Existuje řada způsobů sušení – volba konkrétní metody závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech vzorku, respektive analytů.

Klasickou metodou je sušení vzorku volně na vzduchu. Při tomto způsobu nedochází k výraznějším ztrátám, vyskytuje se však zde riziko kontaminace pocházející z vnějšího prostředí. Proto tento způsob sušení je nutno provádět v čisté a větrané místnosti.

Sušení pomocí vhodných sorpčních materiálů (např. silikagel, Na_2SO_4) se využívá při analýze volatilních a semivolatilních látek a také u těch sloučenin, u nichž při volném sušení hrozí kontaminace z vnějšího prostředí. Tento způsob se využívá i pro odstranění vody (vlhkosti) z kapalných vyextrahovaných vzorků, které kromě analytů v rozpouštědle obsahují i vlhkost nebo malý podíl vody.

Odstranění krystalické (chemicky vázané) vody je možné pouze za zvýšené teploty ($105\text{ }^\circ\text{C}$) v peci nebo sušárně, případně lze použít sušení pomocí plamene. Tyto způsoby jsou však naprosto nevhodné pro volatilní a semivolatilní látky, protože způsobují únik analytů; plamen navíc způsobuje oxidaci (příp. termodegradaci) organických látek [43].

2.3.5 Izolace analytů z matrice

K izolaci analytů z pevných matric se používají různé extrakční techniky. Vhodná metoda izolace by měla být efektivní (kvantitativní), rychlá, levná, jednoduchá na provedení a prováděná s minimální spotřebou rozpouštědel. Pro extrakci kapalinou se volí takové rozpouštědlo, ve kterém je analyt co nejlépe rozpustný. Někdy je však analyt vázán nebo naadsorbován na matrici tak, že nemá schopnost proniknout do rozpouštědla. Výtěžek lze poté zvýšit rozkladem vzorku během extrakce (hydrolytickou reakcí; např. použitím alkoholického roztoku KOH) nebo změnou pH [zalkalizováním, případně okyselením extrakčního činidla nebo celého vzorku pomocí minerální kyseliny, respektive Na_2SO_4 či $\text{Ca}(\text{OH})_2$]. Úprava pH ovlivňuje výtěžnost extrakce zejména u analytů s acidobazickými vlastnostmi, může však kladně působit i na změnu charakteru celého vzorku. Často je upřednostňováno takové rozpouštědlo, které je co nejvíce selektivní pro daný analyt a naopak do sebe extrahuje jen minimum ostatních látek a nečistot přítomných v matrici. Látky tepelně labilní je třeba extrahovat za pokojové nebo i za snížené teploty. Tepelně stabilní látky se rychleji a účinněji extrahují za zvýšené teploty. Pro látky náchylné k oxidaci je vhodné provádět extrakci v inertní atmosféře. Látky citlivé na světlo se extrahují tak, že extrakční aparatura se celá zakryje před světlem [39]. Po extrakci je většinou nutné analyty z kapalného vzorku zakoncentrovat, k čemuž se běžně využívá rotační vakuová odparka. Toto zařízení využívá odpařování za sníženého tlaku (tj. při nižší teplotě než je bod varu rozpouštědla), takže ji lze využít i pro termolabilní látky. Rotace baňky vytváří tenký film po obvodu baňky, což zaručuje větší odpařovací plochu, takže je celý proces odpařování urychlen. Při odpařování si lze navolit teplotu vodní nebo olejové lázně, tlak a rychlost otáček.

2.3.5.1 Soxhletova extrakce

Klasickou metodou izolace analytů z pevné matrice je Soxhletova extrakce. Ve varné baňce se vaří rozpouštědlo, jehož páry kondenzují v chladiči na kapalinu, která stéká na vzorek umístěný v patroně; po naplnění prostoru s patronou dojde k samovolnému vypuštění směsi zpět do varné baňky. Tato extrakce je tedy složena z neustále se opakujících cyklů, přičemž v každém cyklu je vzorek extrahován vždy čerstvým rozpouštědlem, zatímco ve varné baňce se shromažďují netěkavé složky vyextrahované ze vzorku. Tato metoda se nehodí pro tepelně labilní látky. Nevýhodou je velká časová náročnost (např. 6-24 hod), velká spotřeba rozpouštědla a omezená možnost použití směsných rozpouštědel. Výhodou je

jednoduchost a nízká cena aparatury. Novější verzi Soxhletova přístroje je extraktor Soxtec, který provádí extrakci ve 3 fázích [39].

2.3.5.2 Zrychlená extrakce rozpouštědlem (PSE, ASE, PFE)

Metoda extrakce podporovaná tlakem (PSE – Pressurized Solvent Extraction, ASE – accelerated solvent extraction, PFE – Pressurized Fluid Extraction) je určena pro extrakci ve vodě nerozpustných nebo mírně rozpustných organických sloučenin z tuhé matrice – konkrétně zejména z půdy, sedimentu, kalu a pevných odpadů. Tato metoda využívá vyšších teplot (do 200 °C) a tlaků (4-20 MPa), takže ve srovnání s klasickou Soxhletovou extrakcí dochází k velké úspoře času a k nižší spotřebě rozpouštědel. Další velkou výhodou oproti Soxhletově extrakci je to, že při použití směsného rozpouštědla známe přesné poměrové (koncentrační) zastoupení všech jeho složek (u Soxhletovy extrakce nelze zajistit přesné složení extrakční směsi, protože složení kondenzujících par z chladiče je neznámé). Metoda PSE je použitelná pro extrakci semivolatilních organických sloučenin, pro organofosfátové nebo organochlorované pesticidy, chlorované herbicidy, polychlorované bifenyly (PCB), polychlorované dibenzo-p-dioxiny (PCDDs) a polychlorované dibenzofurany (PCDFs), případně pro složky nafty. Získaný extrakt je poté obvykle analyzován pomocí chromatografie. Metoda byla validována pro tuhé matrice obsahující hledané sloučeniny, a to nejčastěji v řádech µg/kg. Pro efektivní extrakci je třeba mít tuhou matici v suchém stavu a ve formě malých částic, aby byla zaručena dostatečně velká účinná plocha pro styk rozpouštědla s maticí.

Provedení extrakce je relativně jednoduché a zaručuje dobrou reprodukovatelnost. Vzorek (vysušený nebo rozetřený s Na₂SO₄) smíchaný s matrix se umístí do extrakční patrony a ta je zasunuta do extrakční cely PSE přístroje. Následně je ke vzorku načerpáno rozpouštědlo (nebo směs rozpouštědel) a celá směs se prohřeje na zadanou extrakční teplotu. Obvykle se doporučuje teplota extrakce jako teplota varu rozpouštědla zvýšená o 50 % (je však nutno ověřit, zda nedochází k tepelné degradaci analytu). Při vyšší teplotě se zvyšuje difúzní rychlost, rozpustnost analytu a prostupnost hmoty, klesá viskozita a povrchové napětí rozpouštědla. Tyto změny zlepšují kontakt matrice (analytu) s rozpouštědlem, takže celá extrakce je ve srovnání s klasickými metodami efektivnější (nižší čas a spotřeba rozpouštědla). Poté je zvýšen tlak podle nastavení. Vysoký tlak zatlačuje rozpouštědlo do pórů matrice vzorku a také udržuje rozpouštědlo v kapalném skupenství při dané teplotě. Po dosažení navolených podmínek probíhá samotná extrakce po zvolenou dobu zádrže, potom je extrakt vypuštěn do sběrné vialky. Celý cyklus lze několikrát opakovat a na konci se provádí proplach vzorku rozpouštědlem. Výsledný extrakt se často zahušťuje (např. na rotační vakuové odparce) a převádí se do rozpouštědla potřebného pro analytickou koncovku.

Optimalizací extrakčního procesu se musí vytvořit metoda nejvhodnější pro extrakci sledovaných analytů z daného materiálu. Běžně se optimalizace provádí tak, že jeden z proměnných parametrů se mění a ostatní zůstávají konstantní. Základem optimalizace je volba rozpouštědla. Zvolené rozpouštědlo musí být schopné extrahovat daný analyt, ovšem bez zbytečných příměsí a znečišťujících látek (většinou rozhoduje polarita - pro polární analyty se volí polární rozpouštědlo a pro nepolární analyty se volí nepolární rozpouštědlo). Často se však používá směs vzájemně mísitelných rozpouštědel, z nichž jedno je mísitelné s vodou, což celkově usnadňuje extrakci (průnik rozpouštědla do pórů matrice přes vrstvičku

vody na povrchu vzorku) u nedokonale vysušených vzorků. Pro semivolatilní látky se obvykle používá například směs $\text{CH}_3\text{COCH}_3 / \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1, v/v) nebo aceton / hexan (1:1, v/v). Dále je při optimalizaci velmi důležitá volba teploty. Kromě toho se optimalizuje doba zádrže a počet cyklů - zde rozhoduje mechanismus extrakce analytu. Pokud se analyt extrahuje do rozpouštědla zejména díky rozpustnosti, zvyšuje účinnost extrakce vyšší počet cyklů. Pokud naopak převládá difúze analytu do rozpouštědla, je klíčovým parametrem doba zádrže. Dále lze optimalizovat i množství a skladbu vzorku, nebo tlak, který se však na zvýšení účinnosti extrakce významně nepodílí [45].

2.3.5.3 Extrakce ultrazvukem (sonikace)

Při průchodu prostředím způsobuje ultrazvuk expanzi a stlačování molekul média. V kapalinách dochází při expanzi k vytvoření tlaku, který v nich velmi rychle podporuje vznik bublin a dutin. Protože bubliny a dutiny nemohou účinně absorbovat ultrazvukovou energii, dochází k jejich implozi (zániku). Přítomnost pevné látky v kapalině při průchodu ultrazvukových vln způsobuje to, že rozpad bublin je v okolí pevné látky asymetrický, čímž v kapalině vzniká proudění. Tyto proudy jsou velice rychlé; tím, že naráží do pevné látky, umožňují průnik rozpouštědla do vzorku. Účinek extrakčního činidla na povrch pevné látky je tedy velmi silný a rychlý, a proto je tato metoda extrakce často používána. Výhoda sonikace spočívá v jednoduchosti provedení, nízké ceně zařízení a relativní rychlosti provedení [49].

2.3.5.4 Extrakce za použití mikrovln (MASE, MAE, FMW)

Mikrovlnná extrakce s použitím rozpouštědla (MASE – Microwave-assisted Solvent extraction) je založena na působení mikrovln na rozpouštědlo nebo přímo na samotný vzorek s analyty. Mikrovlnná energie je neionizující záření o frekvenci 300-300 000 MHz, které způsobuje rotaci dipólů a migraci iontů (tedy molekulární pohyb). Platí, že čím je látka polárnější (má vyšší dielektrickou konstantu), tím větší má schopnost absorbovat mikrovlny. Uvolnění tepla probíhá díky neustálým změnám v seřazení molekul látek (v souvislosti s účinky elektrického pole a rotací dipólů). Podmínkou provedení MASE je proto přítomnost dielektrické látky.

Existují dvě varianty provedení extrakce – uzavřený (MAE) a otevřený systém (FMW). Při prvním způsobu se extrakce provádí v uzavřené nádobě, kde je umístěn přítomný vzorek s extrakčním rozpouštědlem, které silně absorbuje mikrovlny (vysoká dielektrická konstanta). Během extrakce se v nádobě prudce zvýší tlak i teplota, což vede k zefektivnění extrakce. Při druhém způsobu se používá otevřená nádoba a rozpouštědlo, které neabsorbuje mikrovlny. Mikrovlny zde absorbuje přímo vzorek s analyty (podmínkou je jeho vysoká dielektrická konstanta). Protože dochází k extrakci do chladného rozpouštědla; tato metoda je vhodná i k extrakci termolabilních látek. Při MASE je nutné používat nádoby, které neabsorbují mikrovlny (např. z teflonu). Výhodou extrakce MASE je její rychlost (15-30 minut), nízká spotřeba rozpouštědla a relativně vysoká efektivita [43].

2.3.5.5 *Extrakce tekutinou v nadkritickém stavu (SFE)*

Metoda extrakce tekutinou v nadkritickém stavu (SFE – Supercritical Fluid Extraction) patří mezi atraktivní postupy pro izolaci organických kontaminantů z tuhých matric (např. půd). K extrakci lze použít několik zkvalněných plynů (CO_2 , N_2O , SF_6), z nichž nejpoužívanější je nepolární CO_2 , který se často modifikuje přidavkem až 10 % methanolu (zejména pro extrakci polárních látek). Významnou předností tekutiny v nadkritickém stavu je její dobrá rozpouštěcí schopnost pro širokou paletu látek. Nízká viskozita bezprostředně souvisí s vysokou hodnotou difúzních koeficientů, které příznivě ovlivňují kinetiku extrakce. Rozpouštěcí schopnost tekutiny v nadkritickém stavu stoupá s tlakem. Oxid uhličitý má kritickou teplotu 31 °C a kritický tlak 7149 kPa. Prakticky se pracuje s tlaky 40-70 MPa a teplotami 60-150 °C. Použití CO_2 je výhodné kvůli snadné dosažitelnosti kritického bodu, netoxicitě, bezpečnosti a nízké ceně. Vzorek musí být suchý, aby se zabránilo tvorbě emulzí. Při extrakci se umístí tuhý vzorek k extrakci v malé kolonce. Vysokotlaké čerpadlo naplní kolonku pod velkým tlakem extrakčním činidlem a vzorek je ponechán v kontaktu s extrakčním činidlem po zvolenou dobu (při nastavené nadkritické teplotě a tlaku v kolonce). Změnami teploty a tlaku v extraktoru lze měnit jeho rozpouštěcí sílu a řídit tak selektivitu extrakce. Po skončení extrakce se extrakt vypouští ven přes restriční kapiláru, která ústí do nádoby s vhodným rozpouštědlem, ve kterém se analyty rozpouští. Extrakční činidlo se hned po expanzi vypaří, což je velká výhoda. Zařízení je možné spojit kombinovat s GC či HPLC [39, 40, 44].

2.3.5.6 *Mikroextrakce tuhou fází (SPME)*

Mikroextrakce tuhou fází (SPME – Solid Phase Microextraction) je účinná sorpčně-desorpční technika izolace a zakoncentrování analytu, která nevyžaduje rozpouštědla nebo komplikované aparatury. Nedochozí přitom k úplné extrakci, ale k ustálení rozdělovací rovnováhy analytu mezi maticí vzorku a stacionární fází vlákna. Principem je expozice malého množství extrakční fáze nadbytkem vzorku. Metoda je použitelná pro extrakci analytů z kapaliny i z plynné fáze (head space). Technika head space je použitelná pro volatilní a semivolatilní analyty, netěkavé sloučeniny je většinou nutné sorbovat přímo z kapalného roztoku. Analyty jsou sorbovány na SPME vlákne, dokud není dosaženo rovnováhy. Množství extrahovaného analytu závisí na hodnotě rozdělovacího koeficientu. Metoda je použitelná ve spojení s plynovou (tepelná desorpce v injektoru při teplotě okolo 300 °C) i kapalinovou chromatografií. Dává lineární výsledky v širokém koncentračním rozsahu.

Sorpční vlákno je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v ochranné duté ocelové jehle. Touto jehlou se propíchne septum v zátce vialky se vzorkem a posunutím pístu se vlákno vysune do kapalného vzorku, případně do prostoru nad jeho hladinou. Analyt se poté sorbuje do vrstvy pokrývající vlákno. Po dosažení sorpční rovnováhy (obvykle po 2- 30 minutách) se vlákno opět zasune dovnitř jehly a spolu s ní je vytaženo z nádoby se vzorkem.

Vlákno bývá vyrobené z křemene, který je potažen vrstvou chemicky vázané stacionární fáze (sorbentu). Volbou vhodného typu vlákna (polarita, tloušťka) se dosáhne efektivního zakoncentrování pro různé typy analytů a reprodukovatelných výsledků i pro nízké koncentrace. Tloušťka vrstvy vlákna bývá 7-100 μm . Silnější vrstva je schopna extrahovat větší množství analytu než vrstva tenká. Proto se vlákno se silnější vrstvou používá

pro zachycení těkavějších látek a následnou bezztrátovou desorpci v nástřiku plynového chromatografu, zatímco tenká vrstva naopak zajišťuje rychlou difúzi a uvolnění výševroucích látek během tepelné desorpce. Silná vrstva účinněji extrahuje i výševroucí složky ze vzorku, ale desorpce je dlouhotrvající proces. Pro nepolární a těkavé analyty jsou vhodná polydimethylsiloxanová (PDMS) vlákna, pro polární látky pak polyakrylátová nebo vlákna z divinylnbenzenu.

Mechanismus sorpce zahrnuje absorpci i adsorpci (podle typu vlákna). Sorpci často příznivě ovlivňuje zvýšená teplota vzorku. Mícháním vzorku lze extrakci zlepšit a urychlit, obzvláště u molekul s vyšší molekulovou hmotností a s vysokým difúzním koeficientem. Pro usnadnění přechodu analytů do plynné fáze (head space) lze použít techniku vysolování. Mezi výhody SPME patří rychlost, citlivost, eliminace použití rozpouštědel a možnost využití pro screening. Výhodou je také snadná manipulace a reprodukovatelnost. Nové vlákno je nutné vždy aktivovat při určité teplotě po určitou dobu. Poté již ho lze používat opakovaně na mnoho desítek extrakcí, protože v horkém injektoru GC vždy dojde k úplné desorpci látek z vlákna, které je poté „čisté“ a tedy připraveno k další sorpci. Sorpce ze znečištěných roztoků (např. odpadní vody) zkracuje životnost vlákna. Základní podmínkou vhodného provedení SPME je dodržení shodných podmínek během celého měření (při kalibraci i měření reálných vzorků), protože i malé nepřesnosti mohou významně ovlivňovat míru sorpce [40].



Obrázek 11: Zařízení pro SPME

2.3.6 Přečištění vzorku, předseparace a zkoncentrování analytů

V extraktu izolovaném ze vzorku se nachází kromě analytů, které mohou tvořit jen nepatrný podíl, i celá řada dalších sloučenin (koextrahovaných složek), které mohou rušit nebo zcela znemožnit vlastní analýzu. Je proto nezbytné přistoupit k izolaci analytů. K odstranění nežádoucích látek se používají extrakční nebo chromatografické postupy. Tento krok předseparace a zkoncentrování významně ovlivňuje úspěch analytické koncovky [40].

2.3.6.1 Klasická extrakce

Cílem je oddělit analyty na jedné straně od kyselých, bazických (postupnou extrakcí) a polárních látek, na druhé straně pak od případných lipidů. Konečnou fází je jejich převedení do těkavého rozpouštědla tak, aby byl po odpaření získán dostatečně koncentrovaný vzorek. Kyselé a zásadité sloučeniny jsou ze vzorku odstraňovány vytřepáním roztokem NaOH, KOH, K₂CO₃, HCl nebo H₂SO₄. Takovým způsobem je možno ze vzorku postupně odstranit bazické a kyselé podíly. Klasické extrakční postupy předseparace jsou pracné, náročné na množství a zvláště na čistotu rozpouštědel, jsou zdlouhavé a rovněž vyžadují relativně větší množství vstupního materiálu. Proto se v oblasti předseparace a zkoncentrování vyvinula řada dalších metodik [40].

2.3.6.2 Dialýza

Dialýza se používá pro oddělení analytů od koextrahujících se tuků nebo olejů, jejichž přítomnost v měřicích přístrojích je nepřijatelná. Separace probíhá pomocí semipermeabilní membrány (definovaných rozměrů), přes kterou mohou pronikat malé molekuly analytů do okolního čistého rozpouštědla. Velké molekuly tuků zůstávají koncentrovány v původním místě (zatavené „trubici“), kam byl nadávkován extrakt. Výhodou je získání čistého roztoku s analyty, který lze po zahuštění použít pro konečné stanovení. Nevýhodou však je větší spotřeba rozpouštědla a velká časová náročnost (i několik desítek hodin) [49].

2.3.6.3 Extrakce pevnou fází (SPE)

Extrakce pevnou fází (SPE – Solid Phase Extraction) je v současné době nejvýkonnější technika dostupná pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Podstatou SPE je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu (obsaženém v SPE kolonce; částice velikosti v průměru 50 μm), přes který protéká vzorek. SPE využívá pro separaci mezimolekulových interakcí mezi analyty, vzorkem a sorbentem. Mezi běžně uplatňované interakce patří van der Waalsovy síly (nepolární interakce), vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce (polární interakce) a kation-aniontové interakce. Každý sorbent nabízí specifickou směs těchto vlastností, z nichž jedna je vždy dominující. Sorbenty jsou založené nejčastěji na bázi

chemicky modifikovaných částic silikagelu. Vlastnosti chemicky vázané fáze přímo ovlivňují vlastnosti sorbentu. Běžně se používají nepolární vázané fáze (př. C18, C8), polární vázané fáze (př. Silica, CN) a iontově-výměnné vázané fáze (př. NH₂, SAX). Mechanismus sorpce může být podle vlastností tuhé fáze adsorpce, rozpouštění, afinita nebo iontová výměna. Výhodou SPE je vysoká selektivita a úspora organických rozpouštědel. SPE je univerzální metoda použitelná pro čištění vzorku, zakoncentrování stopových množství analytů, výměnu rozpouštědel i derivatizaci.

Instrumentace je relativně jednoduchá – základem je použití extrakčních kolonek na jedno použití, které obsahují různou náplň. Přes kolonku se nechá protékat kapalný vzorek, z něhož jsou na pevné fázi zachyceny analyty. Správně zvolenými rozpouštědly mohou být následně selektivně odstraněny nežádoucí příměsi. Nakonec mohou být z kolonky žádoucí analyty znovuzískány elučním rozpouštědlem v podobě vysoce čistého extraktu. Alternativně může být extrakční kolonka vybrána k tomu, aby zadržovala příměsi ze vzorku, ale analytům aby dovolila projít. Průtok kapaliny přes kolonku lze urychlit (vakuum na výstupu z kolonky, tlakem na vstupu kolonky, centrifugací) [44].

2.3.6.4 Adsorpční sloupcová (kolonová) chromatografie

Princip adsorpční sloupcové chromatografie je totožný s principem SPE. Opět se jedná o kolonu naplněnou sorbentem, přes který necháváme protékat kapalný vzorek. Správná separace je rovněž závislá na mezimolekulových interakcích mezi analytem a sorbentem. Jediný rozdíl je v provedení – při této metodě si musíme skleněnou kolonu naplnit sorbentem sami. Jako sorbenty lze použít silikagel, florisil, aluminu, aktivní uhlí, celulózu aj. Obecně platí, že nepolární analyty jsou eluovány nepolárními rozpouštědly a polární polárními. Průtok kolonou regulujeme kohoutovým uzávěrem kolony. Mobilní fáze protéká kolonou pouhou gravitací. Výhodou metody je možnost kombinace sorbetů, jednoduchost provedení a dostupnost a nízká cena aparatury (kolony). Metoda je však pracná a náročná na čas. Vzhledem k možnému riziku nevratné sorpce musk sloučenin se na přečištění převážně používá metoda gelové permeační chromatografie [49].

2.3.6.5 Gelová permeační chromatografie (GPC)

Gelová permeační chromatografie (GPC – Gel Permeation Chromatography; SEC – Size Exclusion Chromatography) separuje molekuly podle velikosti (molekulárně síťovým efektem). Dochází k rozdělování látek mezi pohyblivou část mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrny gelu, a nepohyblivou část mobilní fáze, nacházející se uvnitř pórů gelu. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zadržovány v důsledku svého pronikání (permeace) do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají hlouběji, a proto jsou déle zadržovány, než větší molekuly. Velké molekuly proto opouští kolonu jako první. Gel se volí podle vlastností separovaných látek. Pro látky ve vodě rozpustné se používají hydrofilní gely (př. Sephadex). Mobilní fází je voda s případným přídavkem organického rozpouštědla. Pro látky nerozpustné ve vodě se používají hydrofobní gely (př. Styragel).

Mobilními fázemi mohou být aromatické, chlorované a některé heterocyklické uhlovodíky. Univerzální gely na bázi silikagelu a porézních skel jsou vhodné pro separaci hydrofobních i hydrofilních látek. Kolony mají průměr až 8 mm a délku v desítkách centimetrů. Metodu lze využít pro oddělování interferujících látek (např. lipidů, proteinů) z extraktů mnoha typů matric [44].

2.3.7 Identifikace a kvantifikace analytů

Protože jsou musk sloučeniny semivolatilní látky, lze k jejich konečné separaci použít plynovou chromatografii. V reálných vzorcích se musk sloučeniny vyskytují ve stopových množstvích, takže jejich detekce vyžaduje použití detektoru, který je schopen detekovat co nejmenší množství analytu. Tento požadavek splňuje hmotnostně spektrometrický detektor, který je schopen detekovat až jednotky pikogramů.

2.3.7.1 Plynová chromatografie (GC)

Chromatografie je separační metoda, která využívá k dělení složek směsi mnohonásobného opakovaného vytváření rovnovážných stavů složek mezi dvěma fyzikálně odlišnými (nemísitelnými) fázemi. Jedna fáze je nepohyblivá (stacionární), druhá je pohyblivá (mobilní). Vzorek se umísťuje na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se složky postupně od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované. Rovnovážné stavy se vytvářejí na základě různých (kvantitativně i kvalitativně) fyzikálně-chemických interakcí mezi složkou a mobilní fází, složkou a stacionární fází, případně mobilní a stacionární fází. Z makroskopického hlediska může jít o adsorpci, rozpouštění, chemisorpci, srážení, tvorbu komplexů nebo síťový efekt, přičemž výsledné interakce jsou často kombinací různých procesů. Při těchto interakcích se uplatňují různé intermolekulární síly (např. hydrofilní, hydrofobní, elektrostatické, dipól-dipól, ion-dipól). Podle převažujícího mechanismu rozlišujeme chromatografii adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou permeační a afinitní. Chromatografické separace umožňují vedle separace komponent také jejich současnou identifikaci. U kolonových technik jsou proto jednotlivé zóny separovaných komponent vzorku unášeny do detekčního systému, který poskytuje signál (odezvu) jako důsledek fyzikální nebo fyzikálně-chemické vlastnosti analytu. Souhrn všech signálů poskytuje chromatogram, což je soubor píků. Poloha píků na časové ose chromatogramu je kvalitativní charakteristikou látky za daných podmínek, plocha píku (příp. výška) je úměrná kvantitě [46].

Plynová chromatografie využívá k dělení směsi látek dynamického systému s plynou mobilní fází. Složky vzorku se v takovém systému dělí po převedení do plynné fáze. Vzorek se dávkuje do proudu nosného plynu, který jej dále unáší kolonou, která je naplněná

stacionární fázi. V koloně se složky separují na základě různé schopnosti poutat se na stacionární fázi. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. Pro nutnost přeměny analytů v plyny můžeme separovat takové látky, které mají dostatečný tlak syté páry (bod varu do 400 °C), jsou tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000. Obecně může být plynová chromatografie použita k separaci plynů, většiny nedisociovatelných kapalin, pevných organických molekul a mnoha organokovových látek. Není použitelná pro separaci makromolekul, organických a anorganických solí. Častým postupem je chemická změna analytů (derivatizace) nevyhovujících vlastností na deriváty, které mohou být v analýze plynovou chromatografií použitelné. V GC se nejčastěji používá eluční technika vnášení vzorku po jednorázovém nástřiku na kolonu. Jednotlivé složky vzorku jsou separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fázi a jsou postupně vymývány (eluovány) inertním nosným plynem. Nosný plyn slouží pouze k transportu složek kolonou, sám neinteraguje se separovanými složkami a stacionární fázi.

Zařízení pro plynovou chromatografii se skládá ze zdroje nosného plynu, čistícího zařízení, regulačního systému, nástřikového bloku (injektoru), chromatografické kolony umístěné v termostatu, detektoru a vyhodnocovacího zařízení.

Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon. Volba nosného plynu je často určena druhem kolony a detektoru. *Čistící zařízení* zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu (např. kyslíku, který nevratně poškozuje stacionární fázi).

Regulační systém zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu. Elektronickou regulací lze docílit stanoveného průtoku i při změnách teploty během separace.

Injektor slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Technika *dávkování* musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase. Roztoky dávkuje injekčními stříkačkami přes pryžové septum. Převážně nástřikované množství je 1 µl. Nástřik vzorku můžeme provádět ručně (stříkačkou) nebo pomocí autosampleru. Existují různé metody nástřiku. Nástřik do kolony (on column) je základní metodou u náplňových kolon. Dávkuje se 1-10 µl vzorku. Je preferován i pro kapilární kolony větší světlosti (od průměru 0,25 mm) s použitím nástřikovací jehly pro 0,2-2 µl vzorku. Horní část kolony je zahřívána na teplotu o 10-30 °C nižší než je teplota varu příslušného rozpouštědla. Vzorek musí být rychle nástřiknut a vytvořit kapalnou film na stěně koloně. Po 30-60 sekundách se teplota kolony prudce zvýší, aby nastalo odpaření. Nástřik pomocí děliče toku (split injection) se používá v případě vzorků obsahujících velké množství analyzovaných komponent. Vzorek se po vypaření a smíchání s nosným plynem rozdělí na dvě části, přičemž pro vlastní analýzu je používána podstatně menší část (0,1-10 %; 0,1-2 µl) a zbytek je oddělen do odpadu. Tento způsob se používá především při kvalitativní analýze, je-li hlavním požadavkem velké rozlišení zón separovaných složek. Nástřik bez děliče toku (splitless injection) se používá u zředěných roztoků (při ultrastopové analýze). Metoda je vhodná pro relativně velké objemy (0,5-5 µl). Používá se totéž zařízení jako s dělením toku, ale odvod děliče je uzavřen, takže je analyzováno celé nástřiknuté množství.

Termostat zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru, aby byl vzorek udržen v plynném stavu. Dávkovač a detektor mají zpravidla vlastní řízené zahřívání. Konstantní teplota pro izotermický proces je využitelná, pokud se analyty příliš neliší svými teplotami varu. Je-li přítomno široké spektrum složek s různými teplotami varu, separace by byla časově náročná. Teplota kolony se proto může programově měnit. Běžně se pracuje při teplotách 50-300 °C. Zvýšení teploty kolony vede ke zvýšení tlaku par složky a k snížení retenčního času. Dosáhne se tak zkrácení doby analýzy a rovnoměrné eluce jednotlivých zón.

Kolona je část chromatografu, ve které je umístěna stacionární fáze. V koloně nastává separace složek. *Náplňové kolony* jsou trubice naplněné sorbenty (na bázi silikagelu, grafitizovaných sazí, aluminy) [GSC] nebo nosiči (na bázi křemeliny) pokrytými kapalnou fází [GLC]. Zakotvená fáze musí mít nepatrnou tenzi par při pracovní teplotě, jinak se v průběhu analýzy vypařuje. Vnitřní průměr kolony je 2-3 mm, délka 1-3 metry. Vzhledem k horšímu rozlišení se náplňové kolony používají tehdy, je-li požadován větší objem stacionární fáze, pro preparativní účely nebo k separaci nízkovroucích, málo zadržovaných plynů. K nejpoužívanějším kolonám v plynové chromatografii patří *kapilární kolony*. Vesměs se jedná o křemenné kapiláry potažené vrstvou polyimidu o vnitřním průměru 0,1-0,6 mm a délce do 60 m. Vnitřní stěna kapiláry je potažena stacionární fází. Z hlediska charakteru stacionární fáze rozlišujeme kolony WCOT s kapalnou stacionární fází, kolony SCOT s kapalnou stacionární fází zakotvenou na povrchu pevného nosiče na vnitřní stěně kapiláry a kolony PLOT s vrstvou pevného aktivního sorbentu na vnitřním povrchu kapiláry. Sorbenty jsou aktivní uhlí, silikagel, molekulová síta a porézní polymery, kapalnou stacionární fází např. polyethylenglykoly, estery, siloxany, uhlovodíky aj.

Nosný plyn z kolony protéká *detektorem*, který reaguje na přítomnost analytu a vysílá signál, jenž je zaznamenáván v závislosti na čase. Detektor sleduje takovou vlastnost plynu vycházejícího z kolony, která závisí na druhu a koncentraci složek (analytická vlastnost). Musí mít dostatečnou citlivost (nízký detekční limit) a jeho odezva by měla být lineární funkcí obsahu analytu. Důležitým požadavkem je vysoká selektivita pro stanovované analyty. Nejpoužívanější jsou v GC tepelně-vodivostní detektor (TCD; univerzální), plamenový ionizační detektor (FID; univerzální), detektor elektronového záchyty (ECD; pro elektronegativní atomy) a hmotnostní spektrometr (MS; univerzální). Dále lze využít plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem (AFID; organické látky s dusíkem a fosforem), fotoionizační detektor (PID; aromatické sloučeniny) a atomový emisní detektor (AED; univerzální).

Zpracování signálu a vyhodnocení analýzy je dnes již záležitostí výpočetní techniky se speciálními softwarovými programy, které jsou dodávány spolu s přístroji [44, 46].

2.3.7.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda založená na interakci iontů s elektrickým a magnetickým polem. Výstupem je hmotnostní spektrum, což je dvourozměrný graf závislosti intenzity naměřeného signálu na poměru hmoty a náboje (m/z). Iont vzniklý ionizací celé molekuly poskytuje informaci o molekulové hmotnosti analyzované sloučeniny, ionty fragmentové pak poskytují informaci o její struktuře. Tato technika je využívána pro organické molekuly i pro anorganické prvky a sloučeniny. V současnosti je MS nejpoužívanější spektrometrickou technikou. Nejčastěji se používá se spojením s některou ze separačních metod, např. GC nebo HPLC. Hmotnostní spektrometrie je metoda, při níž se z neutrálních molekul nebo prvků v iontovém zdroji vytváří ionty, které se při přebytku vnitřní energie získané při ionizaci dále štěpí na fragmentové ionty, radikály a neutrální částice. Nabitě částice (molekulární a fragmentové ionty) jsou pak separovány v analyzátoru podle poměru hmotnosti k náboji (m/z) a nakonec jsou zaznamenány v detektoru. Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, analyzátor a detektor.

Iontový zdroj je místo, kde dochází k ionizaci analyzovaných atomů, sloučenin a molekul. Úspěšná ionizace je klíčovým krokem pro úspěch celé hmotnostně spektrometrické analýzy. Při spojení GC/MS je nejčastěji využívána elektronová ionizace. Elektrony, emitované žhaveným kovovým (W, Re) vláknem, udržovaným na záporném potenciálu, jsou urychleny elektrostatickým polem (na energii 70 eV) a při jejich interakci s cílovou neutrální molekulou dochází k „vyrazení“ jednoho (příp. více) elektronu za vzniku jednou nebo vícenásobně nabitých molekulových iontů (kladně nabitých). Při interakci však dochází k přenosu větší energie ionizujících elektronů na molekulový ion, než je ionizační energie, což následně způsobí fragmentaci molekulového iontu. Vznikající hmotnostní spektra jsou u této jediné metody ionizace reprodukovatelná (existují knihovny spekter), a proto je EI ionizace základní technikou při identifikaci neznámého analytu pomocí MS. Vzhledem k tomu, že některé typy analytů nelze touto cestou ionizovat (nebo jen velmi obtížně s malým výtěžkem), byly vyvinuty další techniky ionizace – chemická ionizace (CI), ionizace polem (FI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI), ionizace urychlenými atomy (FAB), termosprej (TSI), elektrosprej (ESI).

Analyzátor slouží k rozdělení iontů podle poměru m/z , přičemž jsou využívány různé fyzikální principy (př. měření doby letu, odchýlení trajektorie v magnetickém a elektrickém poli). Nejčastěji využívaným hmotnostním analyzátozem je kvadrupólový hmotnostní filtr.

Kvadrupólový analyzátor (Q) obsahuje 4 rovnoběžné tyčové elektrody. Na každou tyč je přiváděna stejnosměrná složka napětí (stovky voltů) a současně složka radiofrekvenčního pole. Nastavení parametrů (napětí, amplituda a frekvence radiofrekvenčního pole) předurčuje trajektorie drah, po kterých se mezi tyčemi budou pohybovat ionty s určitou hodnotou m/z . Při daném nastavení mají stabilní trajektorii vedoucí k detektoru ionty právě určité hodnoty m/z . Ostatní ionty k detektoru neprojdou. Nastavení veličin kvadrupólu se postupně mění a detektor zachycuje ionty o různých hodnotách m/z .

Kromě kvadrupólového analyzátoru lze použít také analyzátor magnetický, elektrostatický, průletový (TOF), iontovou past (IT), analyzátor s dvojitou fokusací (HRMS) a iontovou cyklotronovou rezonancí (ICR).

Hmotnostní analyzátozem mohou pracovat ve 2 základních módech – SCAN a SIM. Při SCAN módu jsou registrována hmotnostní spektra v nastaveném rozsahu m/z (využití pro identifikaci); v SIM módu se sleduje intenzita jednoho nebo několika zvolených iontů v čase (o 2 řády nižší mez detekce; využití pro ultrastopovou analýzu). Důležitým parametrem analyzátozem je jejich rozlišovací schopnost (RP). Nízkorozlišovací analyzátozem jsou schopny stanovit molekulovou hmotnost analyzovaných látek s přesností na jednotky či desetiny, vysokorozlišovací systémy umožňují přesnost na 3 až 4 desetinná místa.

Detektor registruje ionty po průletu analyzátozem. Tok iontů je tedy převáděn na elektrický signál. Základními typy detektorů jsou elektronový násobič a fotonový násobič. *Datasystém* slouží pro sběr dat a rovněž i řízení analýzy a kontrolu všech funkcí přístroje. *Vakuový systém* zajišťuje udržení vysokého vakua (10^{-4} - 10^{-8} Pa), které zabraňuje srážce iontu s jinou částicí během celé jeho cesty hmotnostním spektrometrem. Typický vakuový systém hmotnostních spektrometrů bývá dvoustupňový. První stupeň tvoří standardní rotační olejová vývěva, druhý difuzní nebo turbomolekulární čerpadlo.

Hmotnostní spektrometry mohou být spojeny jako tandemové hmotnostní spektrometry (MS/MS). První reakce generuje ionty, z nichž se separuje požadovaný ion, ten se podrobí další reakci a z něj vzniklé ionty jsou analyzovány. MS je všestranná, rychlá a citlivá analytická metoda, která je často využívána ke kvalitativní i kvantitativní chemické analýze, protože poskytuje velké množství informací o vzorku a jeho složení. Významně napomáhá k identifikaci, určení struktury organické látky i její relativní molekulové hmotnosti [44, 46].

2.3.7.3 Spojení GC s MS

Přímé spojení náplňové kolony GC s hmotnostním spektrometrem není možné, neboť velké množství nosného plynu by porušilo vakuum v hmotnostním spektrometru. Mezi chromatografickou kolonu a iontový zdroj se tedy zařazuje molekulový separátor nebo dělič toku, který snižuje množství nosného plynu. Průtok mobilní fáze kapilární kolonou je podstatně nižší, takže konec kapilární kolony lze umístit přímo do iontového zdroje. Spojení GC-MS je v současnosti technicky zvládnuto a je to nejobvyklejší aplikace MS, uplatňující se při sledování technologických procesů, jakostních parametrů surovin nebo výrobků nebo při analýze a identifikaci složek životního prostředí. Nepostradatelné je spojení GC-MS tam, kde se provádějí identifikace neznámých složek směsí. Pro každou složku lze získat její hmotnostní spektrum a identifikovat ji porovnáním jejího spektra s knihovnou spekter sloučenin uloženou v počítači [46].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Používané přístroje, zařízení a software

Přístroje a zařízení

- Ultrazvuková lázeň Sonorex RK52H (Bandelin, Německo)
- Přístroj pro zrychlenou extrakci rozpouštědlem *onePSE* (Applied Separations, USA)
- Míchačka RCT basic (Kika Werke, Německo)
- Analytické váhy PM 400 (Mettler, Švýcarsko)
- Analytické váhy AB265-S (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Rotační vakuová odparka BÜCHI Rotavapor R-200 s vodní lázní B-490 a vakuovým systémem (Švýcarsko)

Mikroextrakce tuhou fází

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

Gelová permeační chromatografie

- HPLC 1100 Series (Agilent Technologies, USA)
- *Kolona*: Bio-Beads S-X3, 8×500 mm (Tessek, Praha)
- UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou

Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem

- GC Hewlett-Packard 6890N (Agilent, USA)
- *Kolona*: kapilární, stacionární fáze: DB-5MS; rozměry: 20 m × 0,180 mm × 0,18 μm ; limit teplot: -60 °C-325 °C (Agilent Technologies, USA, katalogové číslo: 121-5522)
- Hmotnostní detektor MSD 5973N (Agilent, USA) [elektronová ionizace, kvadrupól]
- Automatický dávkovač vzorků HP 7683 (Agilent, USA)

Software

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

3.2 Chemikálie a standardy

Technické plyny

- Helium 6,0 (Messer, ČR) [pro GC]
- Dusík 5,0 (Messer, ČR) [pro PSE]

Standardy

Tonalid [10 ng/μl v cyklohexanu] (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
Musk xylen [10 ng/μl v cyklohexanu] (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
Musk keton [10 ng/μl v cyklohexanu] (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
Tonalid (D3) [100 ng/μl v isooktanu] (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
Musk xylen (D15) [100 ng/μl v acetonu] (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Německo)
Tonalid (100 %) [pouze pro optimalizaci GPC] (Aroma, Roudnice nad Labem, ČR)
Musk xylen (100 %) [pouze pro optimalizaci GPC] (Aroma, Roudnice nad Labem, ČR)
Musk keton (100 %) [pouze pro optimalizaci GPC] (Aroma, Roudnice nad Labem, ČR)

Chemikálie

cyklohexan (Merck, Německo)
chloroform (Merck, Německo)
petrolether (Merck, Německo)
aceton (Sigma-Aldrich, Německo)
Spe-ed PSE matrix (Applied Separations, USA)
undekan
Na₂SO₄ (bezv.)

3.3 Biotická tkáň

3.3.1 Kalibrace pro biotickou tkáň

Cílem bylo sestavit osmibodovou kalibraci sledovaných musk sloučenin, která bude použitelná pro vyhodnocování reálných biotických vzorků. Pro sestavení kalibrační křivky byla připravena sada roztoků; koncentrační rozmezí kalibrace bylo voleno dle předběžných výsledků z reálných vzorků. Protože jsou standardy rozpuštěné v cyklohexanu, bylo toto rozpouštědlo zvoleno i pro přípravu kalibračních roztoků. Vzhledem k velmi nízké koncentraci standardů nebyl připravován zásobní roztok, ale jednotlivé standardy byly dávkovány přímo do vialek pomocí stříkačky (na 10 μl), kde bylo předtím mikropipetou nadávkováno vypočítané množství cyklohexanu. Pro vyšší koncentrace bylo nutné použití insertů, které zabezpečily nižší spotřebu standardů. Protože v reálných vzorcích se často vyskytují směsi různých musk sloučenin, tak i kalibrační roztoky byly připravované ve formě „mixu“, tj. v každém kalibračním roztoku byly zastoupeny všechny tři sledované musk sloučeniny (MX, AHTN, MK). Tento způsob více přibližuje kalibrační standard k reálnému vzorku, než kdyby byly kalibrovány jednotlivé analyty odděleně.

Pro MX a AHTN bylo zvoleno koncentrační rozmezí 0,02-1,80 μg/ml [0,02; 0,04; 0,10; 0,20; 0,60; 1,00; 1,40; 1,80 μg/ml], pro MX se ukázalo dostačující rozmezí 0,02-0,5 μg/ml [0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50 μg/ml]. Jednotlivé koncentrace byly voleny tak, aby pokryly rovnoměrně koncentrační rozmezí; pouze u nízkých koncentrací bylo provedeno „hustější“ měření, protože se dalo očekávat, že řada reálných výsledků se bude vyskytovat právě v této oblasti. Výsledné kalibrační křivky jsou uvedeny v kapitole 4.1.1.

Příklad přípravy kalibračního standardu s koncentrací analytů 0,1 µg/ml:

Do vialky (s hnědým sklem) bylo napipetováno 970 µl cyklohexanu, poté byla vialka uzavřena. Následně bylo mikrostříkačkou přidáno 10 µl standardu MX (= 100 ng) + 10 µl standardu AHTN (= 100 ng) + 10 µl standardu MK (= 100 ng). Roztok byl promíchán a okamžitě analyzován.

3.3.2 Identifikace a kvantifikace analytů pomocí GC / MS

K identifikaci a kvantifikaci sledovaných musk sloučenin byla používána plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (elektronová ionizace, kvadrupólový analyzátor). Protože se sledované sloučeniny nacházely ve vzorcích ve stopových koncentracích, bylo nutné k jejich identifikaci používat režim SIM, který má až o 2 řády nižší mez detekce než režim SCAN, který byl pro vyhodnocení nedostačující. Identifikace analytů byla prováděna pomocí retenčních časů (po extrakci dané hodnoty m/z z chromatogramu) – případně nalezený pík v příslušném retenčním čase indikoval přítomnost daného analytu; pík byl poté ručně zintegrován a byla odečtena jeho plocha. Kvantifikace byla založena na metodě vnějšího standardu pomocí vícebodové kalibrační křivky, která je závislostí plochy píku na koncentraci (viz kap. 4.1.1). Retenční časy byly zjištěny změřením roztoku směsi sledovaných analytů (MX, AHTN, MK) o koncentraci každého analytu 1 µg/ml. Používaný měřicí program, určené retenční časy i jednotlivá hmotnostní spektra jsou uvedena v kapitole 4.1.2.

3.3.3 Specifikace a zpracování biotických vzorků

Reálné vzorky tvořily ryby s následující specifikací:

Místo odlovu: Brněnská přehrada (vodní dílo na řece Svatce)

Datum odlovu: listopad 2007

Způsob skladování: hluboce zamrazeny (-25 °C)

Datum zpracování: únor 2009

Tabulka 6: Soupis analyzovaných vzorků

Číslo vzorku ryby	Druh ryby (česky)	Druh ryby (latinsky)	Poznámka
1	Plotice obecná	<i>Rutilus rutilus</i>	nezbyly vnitřnosti
2	Cejn velký	<i>Abramis brama</i>	vnitřnosti = jikry
3	Cejn velký	<i>Abramis brama</i>	vnitřnosti = střeva
4	Cejn velký	<i>Abramis brama</i>	////
5	Cejn velký	<i>Abramis brama</i>	////
6	Lín obecný	<i>Tinca tinca</i>	nezbyla svalovina

Ryby byly odloveny pracovníky Povodí Moravy, kteří jsou pro tuto činnost akreditováni. Ryby byly vykuchány a byla oddělena svalová tkáň od kůže. Pro další postupy prováděné analýzy byly vzaty vzorky svaloviny, kůže i vnitřností. Jednotlivé vzorky byly po rozmrazení zhomogenizovány, odváženy na analytických vahách a poté byl pro zjišťování množství 3 vybraných musk sloučenin použit analytický postup vedoucí k jejich identifikaci a kvantifikaci v příslušných maticích; navíc bylo v každém vzorku stanoveno množství tuku. Homogenizace byla prováděna v třecí misce, u kůže bylo navíc třeba použít nůžky na její rozdělení na malé kousky.

3.3.4 Stanovení obsahu tuku v jednotlivých vzorcích

Ke stanovení byla používána Soxhletova extrakce; jako rozpouštědlo byl používán petrolether, který je nejvhodnějším extrakčním činidlem pro získání tuku z biotické matrice. Zhomogenizovaná rybí tkáň byla pro tento účel rozetřena v třecí misce s bezvodým Na_2SO_4 v poměru 1:4; tj. 4 g tkáň a 16 g Na_2SO_4 , a to z důvodu dehydratace vzorku. Vzniklá směs byla kvantitativně převedena do papírových extrakčních patron a ty byly uzavřeny smotkem odtučněné vaty; směs byla následně podrobena Soxhletově extrakci. Všechny baňky používané při extrakci byly předem zváženy. Celková doba Soxhletovy extrakce činila 6 hodin; k extrakci bylo používáno cca 100 ml petroletheru. Po extrakci byl petrolether odpařen na rotační vakuové odparce a zbylý tuk v baňce byl zvážen. Nakonec bylo provedeno vyhodnocení a určení procentického zastoupení tuku v dané tkáni. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.1.3.

Poznámka: Vzhledem k malému množství vzorků (malé ryby) a spotřebě materiálu na vlastní analytický postup pro stanovení musk sloučenin nezbyly ke stanovení tuků následující vzorky: ryba č. 1 (kůže), ryba č. 3 (vnitřnosti), ryba č. 4 (vnitřnosti), ryba č. 6 (svalovina).

Poznámka: Před stanovením tuku ve všech vzorcích byl proveden pokus, jak závisí množství vyextrahovaného tuku na době extrakce (2, 4, 6, 8 hod). K pokusu byla používána svalovina z ryby č. 4. Bylo prokázáno, že množství vyextrahovaného tuku je už po 2 hodinách (2,94 %) velmi srovnatelné s obsahem tuku po 6 hodinách extrakce (3,00 %) [po 8 hod: 3,31 %]. Přesto byly všechny vzorky extrahovány 6 hodin, aby byly výsledky průkaznější.

3.3.5 Optimalizace podmínek pro PSE

Pro extrakci analytů byla používána metoda PSE, a to zejména s ohledem na její efektivitu a rychlost. Jako rozpouštědlo byl zvolen cyklohexan, protože jsou v něm stanovované analyty velmi dobře rozpustné a protože i při kalibraci analytů bylo toto rozpouštědlo používáno. Tlak byl volen maximální možný, a to kvůli podpoře těsnosti. Byla nastavena zádrž 8 minut a celý cyklus PSE se nechal probíhat dvakrát. Hlavní parametr ovlivňující výtěžek extrakce je teplota, a proto byla tato veličina optimalizována. Ověřování výtěžnosti celého postupu bylo prováděno pomocí 2 deuterovaných standardů (AHTN-D3, MX-D15), které byly přidávány ke vzorku (reálné tkáni) jako vnitřní standard. Optimalizace byla prováděna při teplotě 80 °C (blízká teplota teplotě varu cyklohexanu) a při teplotě 110 °C [při každé teplotě byly

proměřeny 3 vzorky – určené výtěžnosti jsou uvedeny v kapitole 4.1.5]. Vyšší výtěžky se obecně očekávají při použití vyšších teplot, avšak v tomto případě je zapotřebí vyloučit riziko termodegradace. Optimalizovaný extrakční postup je uveden v kapitole 4.1.4. Cyklohexan jako nepolární rozpouštědlo extrahuje kromě sledovaných analytů i další látky (zejména lipidy), takže je nutné další přečištění vzorku (voleno přečištění na GPC), aby nedocházelo ke znečištění kolony GC při závěrečném stanovení pomocí rozhodčí metody.

Homogenní vzorek biotické tkáně (3 g) byl navážen na analytických vahách a poté byl rozetřen v třecí misce s PSE matrix (5 g), která slouží k odstranění vody ze vzorku a k vytvoření sypké směsi. Tato směs byla potom kvantitativně vpravena do kovové extrakční patrony (22 ml) a do směsi bylo naspikováno 10 μl roztoků obou deuterovaných standardů. Na přístroji byl zvolen extrakční program (viz kapitola 4.1.4 – teplota 80 °C, resp. 110 °C). Extrakt byl jímán do vialky. Protože bylo ve vzorku přítomno určité malé množství vody, měly získávané extrakty mléčný zákal. Proto byly za účelem odstranění zbytkové vody extrakty přefiltrovány přes bezvodý Na_2SO_4 , čímž došlo k vyčiření extraktu. Roztoky byly poté odpařeny na rotační vakuové odparce přibližně na objem 1 ml a do vzorku bylo přidáno 20 μl undekanu jako keeperu; roztoky byly odpařeny až na keeper a byly rozpuštěny v 0,5 ml chloroformu (mobilní fáze pro GPC). Vzorek byl umístěn do vialky z hnědého skla a byl připraven na přečištění pomocí GPC [nástřik: 100 μl] (viz kapitola 3.3.6). Po přečištění byl vzorek odpařen cca na objem 1 ml, bylo k němu přidáno 20 μl undekanu (keeper) a byl odpařen až na keeper na rotační vakuové odparce. Poté byl vzorek rozpuštěn v 0,5 ml cyklohexanu a přemístěn do vialky (z hnědého skla) a co nejdříve byl zanalyzován na GC/MS (viz kapitola 3.3.2).

Poznámka: Stejný analytický postup byl prováděn i při extrakci reálných vzorků ($t = 110\text{ °C}$), pouze již nebyly dávkovány deuterované standardy. Používaný optimalizovaný extrakční program je uveden v kapitole 4.1.4.

3.3.5.1 Stanovení výtěžnosti analytického postupu

Pro stanovení výtěžnosti byl využíván postup, při kterém jsme naspikovali kontaminovanou biotickou tkáň známým množstvím deuterovaných standardů. Pro vyhodnocení výtěžnosti celého analytického postupu (při použití 2 různých teplot při PSE) bylo proto nutné zjistit odezvu hmotnostního detektoru (plochu píků) obou deuterovaných standardů, která odpovídá ideální situaci, tj. že výtěžnost je 100 %, nebo-li že oba naspikované deuterované standardy (v množství 10 μl) projdou celým analytickým postupem beze ztrát. Proto byl připraven třikrát stejný kalibrační roztok „mixu“ obou deuterovaných standardů, jejichž koncentrace odpovídá 100% výtěžnosti.

Při výpočtu je nutné zohledňovat ředění vzorku během analytického postupu, který je popsán v kapitole 3.3.5. Při naspikování 10 μl deuterovaného standardu (o koncentraci 100 ng/ μl) je absolutní dávkované množství 1 000 ng. Toto množství při 100% výtěžku projde PSE extrakcí, přejde přes Na_2SO_4 , beze ztrát se zakoncentruje na rotační vakuové odparce a před GPC se vyskytuje v roztoku o objemu 520 μl . Nastříkávané množství je 100 μl , tj. 192,308 ng od každého deuter. standardu. Toto množství se poté beze ztrát (po GPC a následném odpařování) dostane do vialky (v objemu 520 μl), odkud je k závěrečné analýze použit 1 μl , tj. 0,3698 ng od každého standardu. Proto bylo cílem připravit do vialky

roztok, kde bude koncentrace obou deuterovaných standardů 0,3698 ng/μl; tzn. k přípravě 1 ml (1 000 μl) tohoto roztoku bylo použito 3,7 μl MX-D15 + 3,7 μl AHTN-D3 + 992,6 μl cyklohexanu.

Pro závěrečné vyhodnocení (GC/MS) byla používaná metoda prezentovaná v kapitole 4.1.2, pouze do režimu SIM byly zahrnuty navíc 2 hodnoty m/z: 246 (pro identifikaci AHTN-D3) a 294 (pro identifikaci MX-D15). Naměřená spektra i chromatogram obou standardů (pomocí režimu SCAN) jsou uvedena v kapitole 4.1.5.1. K měření byl použit směsný roztok obou standardů o koncentraci 20 ng/μl. Výsledné výtěžnosti jsou uvedeny v kapitole 4.1.5.

3.3.6 Optimalizace gelové permeační chromatografie

Pro optimalizaci GPC byl vytvořen standardní roztok všech sledovaných analytů (MX, AHTN, MK) v chloroformu o koncentraci 400 μg/ml. Roztok byl připraven (s použitím pevných standardů) kvantitativním převedením 4 mg MX + 4 mg AHTN + 4 mg MK do odměrné baňky (V = 10 ml), která byla doplněna chloroformem po rysku. Připravený roztok byl nastříknut na kolonu GPC a byl zjištěn retenční čas směsi musk sloučenin. Poté byl stejným způsobem proměřen reálný vzorek (svalovina) s obsahem tuku. Oba získané chromatogramy byly překryty a z porovnání retenčního času musk sloučenin a příměsí z reálného vzorku bylo určeno vhodné časové rozmezí pro sběr frakce musk sloučenin. Podmínky GPC i zjištěné časové rozmezí odebrání frakce musk sloučenin jsou uvedeny v kapitole 4.1.7.

3.3.7 Stanovení analytů v reálných biotických vzorcích

Jednotlivé vzorky ryb (viz kap. 3.3.3) byly podrobeny analytickému postupu (viz kap. 3.3.5) a následně v nich byly stanovovány pomocí GC/MS 3 vybrané musk sloučeniny (MX, AHTN, MK) podle postupu uvedeného v kap. 4.1.2. Každý vzorek byl zanalyzován třikrát a výsledná hodnota byla spočítána jako aritmetický průměr z těchto stanovení (v některých případech byla prováděna vzhledem k malému množství vzorku pouze 2 stanovení). Dosažené výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.1.8.

3.3.8 Čistící postupy

Na čištění skla i veškerých použitých pomůcek byl kladen velký důraz, aby byla vyloučena kontaminace z vnějšího prostředí. Použité laboratorní sklo bylo umyto vodou a propláchnuto destilovanou vodou. Poté se sklo nechalo stát minimálně 12 hodin v chromsírové kyselině. Následně bylo sklo opět vypláchnuto alespoň dvakrát vodou (vodovodní i destilovanou) a nechalo se vysušit v sušárně podobu 120 minut při teplotě 250 °C. Třecí misky s tloučky a nástroje na zpracování vzorku byly opláchnuty vodou, osušeny, opláchnuty cyklohexanem a sušeny v sušárně min. 120 minut při 250 °C. Patrony po PSE (+ součástky po PSE – skleněné kuličky, matky, frity) byly propláchnuty vodou, acetonem a cyklohexanem; potom

byly ponechány v ultrazvukové lázni (v cyklohexanu) minimálně 15 minut. Následně byly opět propláchnuty cyklohexanem a v sušárně byly sušeny při 250 °C min. 120 minut.

Čistící postup byl několikrát ověřován proměřením slepého pokusu (včetně skla použitého pro SPME). Protože ve spektrech byla absence sledovaných píků jednotlivých analytů, lze tento postup označit za dostatečně účinný a z tohoto důvodu vhodný.

3.4 Voda

3.4.1 Kalibrace SPME

Pro vyhodnocení vzorků vod bylo nutné sestrojít kalibrační křivky sledovaných analytů (MX, AHTN, MK). Pro sestrojení kalibrační křivky byla připravena sada roztoků; koncentrační rozmezí kalibrace bylo opět voleno dle předběžných výsledků z reálných vzorků. Protože jsou standardy rozpuštěné v cyklohexanu, musel být vyřešen problém mísitelnosti, protože sorpce na SPME vlákno musela být prováděna z vodného roztoku (tak jako v případě reálných vzorků). Cyklohexan je s vodou nemísitelný, takže celý problém byl vyřešen pomocí acetonu – standardy byly dávkovány do 1 ml acetonu, čímž došlo ke smísení, a poté se přidalo odpovídající množství destilované vody (směs acetonu, vody a cyklohexanu je mísitelná a za podmínek sorpce čirá). Vzhledem k velmi nízké koncentraci standardů nebyl připravován zásobní roztok, ale jednotlivé standardy byly dávkovány přímo do vialek pro SPME. Protože v reálných vzorcích vod se často vyskytují směsi různých musk sloučenin, tak byly i kalibrační roztoky připravované ve formě „mixu“, tj. v každém kalibračním roztoku byly zastoupeny všechny tři sledované musk sloučeniny (MX, AHTN, MK). Tento způsob více přibližuje kalibrační standard k reálnému vzorku, než kdyby byly kalibrovány jednotlivé analyty odděleně. Podmínky pro SPME jsou uvedeny v kapitole 3.4.2.

Pro sledované analyty bylo zvoleno koncentrační rozmezí 0,05-5,00 ng/ml [0,05; 0,10; 1,00; 2,50; 4,00; 5,00 ng/ml]. Jednotlivé koncentrace byly voleny tak, aby pokryly rovnoměrně koncentrační rozmezí; pouze u nízkých koncentrací bylo provedeno „hustější“ měření, protože se dalo očekávat, že řada reálných výsledků se bude vyskytovat právě v této oblasti. Výsledné kalibrační křivky jsou uvedeny v kapitole 4.2.1.

Příklad přípravy kalibračního standardu s koncentrací analytů 0,01 µg/ml:

Do vialky na SPME bylo napipetováno 1000 µl acetonu, poté bylo přidáno do vialky mikrostříkačkou 10 µl standardu MX (= 100 ng) + 10 µl standardu AHTN (= 100 ng) + 10 µl standardu MK (= 100 ng). Roztok byl promíchán a ještě doplněn 8970 µl destilované vody. Připravený roztok byl co nejdříve zanalyzován.

3.4.2 Podmínky SPME

Při volbě podmínek sorpce se vycházelo z optimalizovaných podmínek uvedených v práci [33]. Tyto podmínky byly ověřeny a vyhodnoceny jako vhodné, a proto byly následně používány pro celé měření. Pro jednotlivá měření bylo nutné zajistit konstantní podmínky provedení, protože metoda SPME je závislá i na malých změnách. Vzhledem k semivolatilitě

sledovaných analytů byla prováděna sorpce z plynné fáze nad roztokem (tzv. head space). Po sorpci následovala okamžitě analýza na GC/MS.

Podmínky exponování vlákna:

- ❖ Vlákno: PDMS/DVB; 65 μm
- ❖ Provedení: head space
- ❖ Objem vialky: 22 ml
- ❖ Objem roztoku: 10 ml
- ❖ Teplota: 80 $^{\circ}\text{C}$
- ❖ Ustalování rovnováhy: 5 min
- ❖ Expoziční čas: 20 min
- ❖ Rychlost míchání: 900 ot/min

3.4.3 Identifikace a kvantifikace analytů pomocí GC / MS

K identifikaci a kvantifikaci sledovaných musk sloučenin byla používána plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Způsob vyhodnocení a identifikace analytů byl již popsán v kapitole 3.3.2. K měření byl používán shodný program jako pro analýzu biotických vzorků (viz kapitola 4.1.2), pouze v teplotní rampě byla počáteční teplota 50 $^{\circ}\text{C}$ držena 3 minuty (kvůli desorpci z vlákna) místo 1 minuty, čímž se prodloužila doba analýzy na 24 minut. Proto i retenční časy analytů byly cca o 2 minuty posunuty [MX: 14,780 min; AHTN: 14,816 min; MK: 15,873 min].

3.4.4 Specifikace vzorků vody

Voda pro stanovení sledovaných analytů (metodou SPME) byla odebrána 10. 5. 2009 z Brněnské přehrady (ze stejné lokality, odkud pochází odlovené ryby – biotické vzorky). Konkrétně byly odebrány 3 vzorky z míst s těmito GPS souřadnicemi (zaznačení na mapě – viz příloha I v kap. 9):

- Vzorek č. 1: 49° 15' 07,741'' N; 16° 28' 56,426'' E
- Vzorek č. 2: 49° 14' 58,995'' N; 16° 29' 14,763'' E
- Vzorek č. 3: 49° 14' 57,661'' N; 16° 29' 14,725'' E

Voda byla odebrána do vzorkovnic (z hnědého skla) o objemu 0,5 litru. Vzorkovnice byly skladovány v lednici a voda byla co nejdříve po odběru analyzována.

3.4.5 Stanovení analytů v reálných vzorcích vod

Jednotlivé vzorky vod (viz kap. 3.4.4) byly promíchány a do vialky na SPME, kde bylo 1 ml acetonu, bylo dále napipetováno 9 ml vzorku (aceton byl použit kvůli zachování identických podmínek, jaké byly použity při kalibraci). Poté byla provedena metoda SPME podle kapitoly 3.4.2 a po desorpci analytů z vlákna v GC byly stanovovány 3 vybrané musk sloučeniny (MX, AHTN, MK) podle kapitoly 3.4.3. Každý vzorek byl analyzován třikrát a výsledná hodnota koncentrace analytu byla spočítána jako aritmetický průměr z těchto tří stanovení. Dosažené výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.2.2.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Biotická tkáň

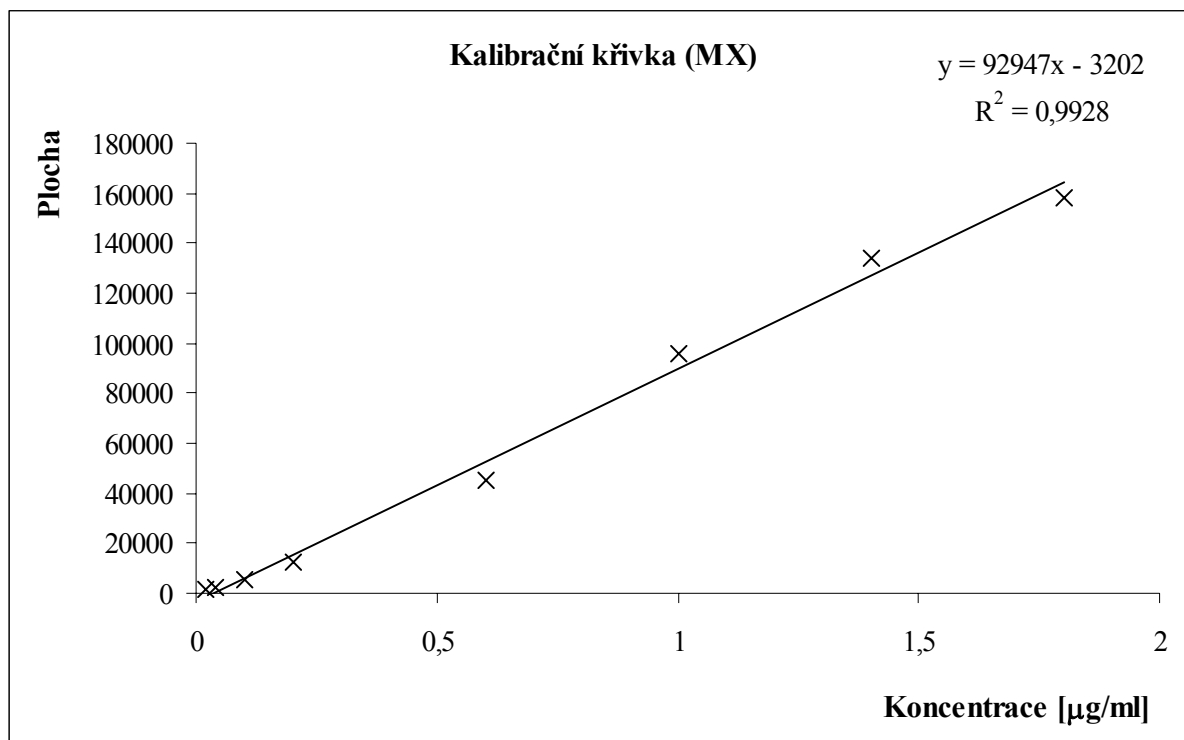
4.1.1 Kalibrace pro biotickou tkáň

Kalibrační křivka byla sestrojována jako závislost koncentrace daného analytu v kalibračním roztoku na velikosti signálu hmotnostního detektoru. Signálem byla plocha píku (po zintegrování) příslušející danému analytu. Jednotlivé získané body byly proloženy regresní přímkou; získané rovnice regrese byly používány k vyhodnocování obsahu daných analytů v reálných biotických vzorcích. Dosažené hodnoty spolehlivosti vypovídají o vysoké spolehlivosti daných kalibrací. Způsob přípravy jednotlivých kalibračních roztoků je uveden v kapitole 3.3.1.

4.1.1.1 Kalibrace MX

Tabulka 7: Data pro sestrojení kalibrační křivky musk xylenu

Koncentrace $\mu\text{g/ml}$	Plocha píku
0,02	1278
0,04	2154
0,10	5115
0,20	12291
0,60	45195
1,00	96051
1,40	134095
1,80	157812

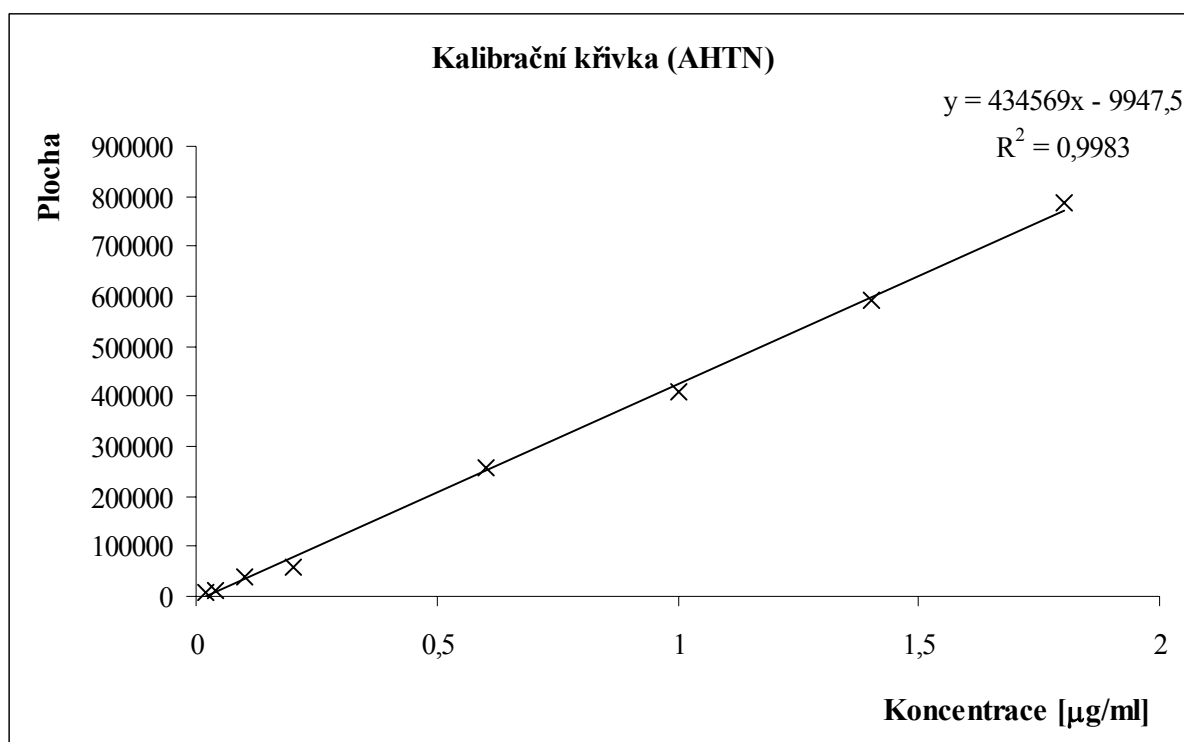


Graf 1: Kalibrační křivka musk xylenu

4.1.1.2 Kalibrace AHTN

Tabulka 8: Data pro sestavení kalibrační křivky tonalidu

Koncentrace μg/ml	Plocha píku
0,02	7038
0,04	13078
0,10	39175
0,20	59646
0,60	259049
1,00	408032
1,40	590330
1,80	786449

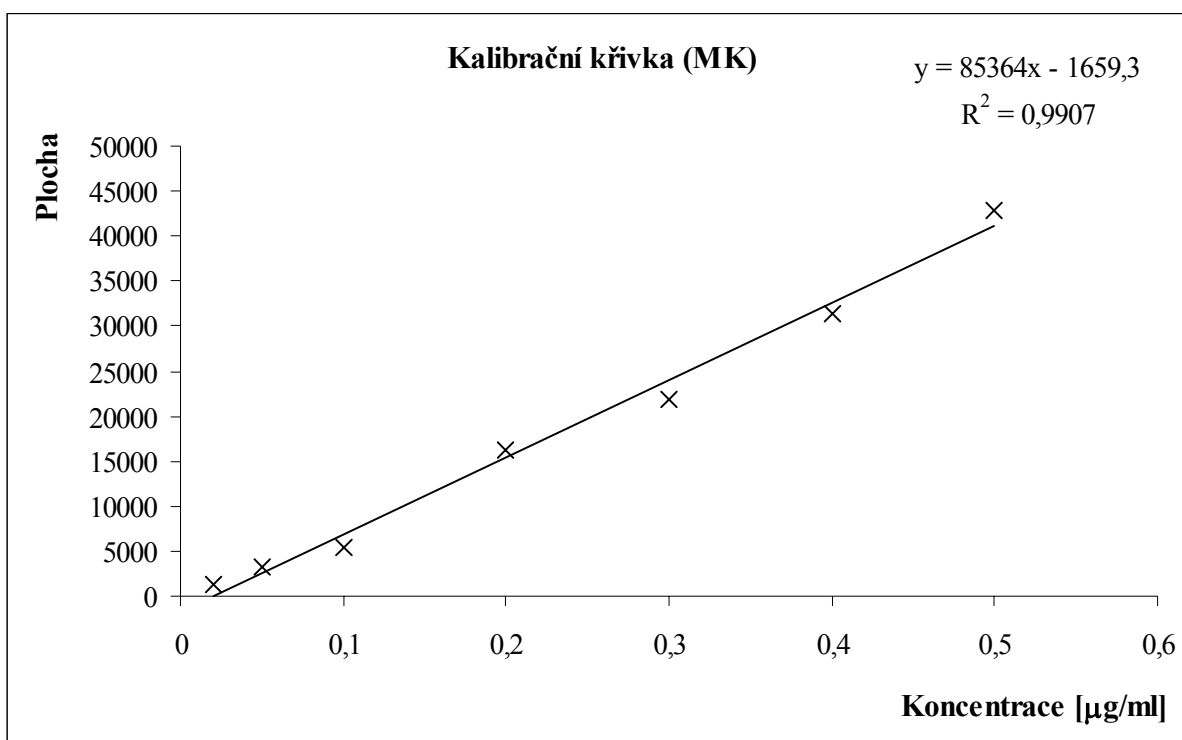


Graf 2: Kalibrační křivka tonalidu

4.1.1.3 Kalibrace MK

Tabulka 9: Data pro sestavení kalibrační křivky musk ketonu

Koncentrace μg/ml	Plocha píku
0,02	1316
0,05	3155
0,10	5413
0,20	16229
0,30	21910
0,40	31433
0,50	42951



Graf 3: Kalibrační křivka musk ketonu

4.1.1.4 Určení LOD a LOQ z kalibračních křivek

Pro stanovení LOD (mez detekce) a LOQ (mez stanovitelnosti) existuje několik metod. V separačních metodách se mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie. Používané vztahy jsou:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot h_n}{m} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot h_n}{m} \quad (2)$$

kde h_n je šum na základní linii a m je směrnice kalibrační křivky. Tyto vztahy byly použity pro výpočet LOD a LOQ i v této práci [33].

Tabulka 10: Meze detekce a meze stanovitelnosti pro analýzu biotické tkáně

Látka	Směrnice KK	Šum z KK	LOD	LOQ
			[ng/ml]	[ng/ml]
MX	92947,14	20	0,6455	2,1518
AHTN	434569,13	40	0,2761	0,9205
MK	85364,38	8	0,2811	0,9372

Poznámka: Šum byl vždy odečítán z chromatogramu příslušející nejnižší koncentraci v KK.

4.1.2 GC/MS analýza

Nastavený program pro měření biotické tkáně:

Kolona: DB-5MS

Nosný plyn: He

Nástřikové množství: 1 μ l

Injektor: Splitless

Teplota injektoru: 250 °C

Tlak nosného plynu v injektoru: 118 kPa

Průtok nosného plynu v injektoru: 28,5 ml/min

Doba analýzy: 22 minut

Průtok nosného plynu: 0,8 ml/min

Lineární rychlost nosného plynu: 40 cm/sec

Teplota iontového zdroje: 230 °C

Teplota kvadrupólu: 150 °C

Režim analyzátoru: SIM (sledované m/z: 282, 243, 279, 159, 294, 297)

Teplotní rampa:

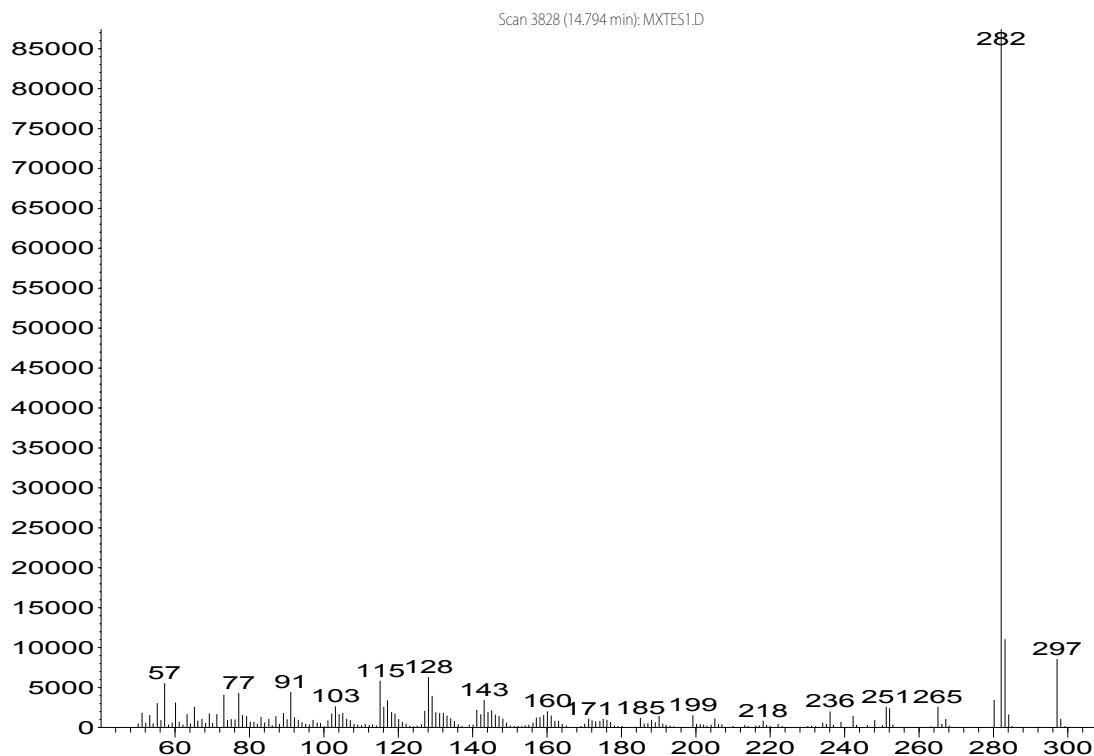
Rampa	Teplota	Drženo	Čas analýzy
počátek	50 °C	1 min	1 min
15 °C/min	170 °C	0 min	9 min
10 °C/min	280 °C	2 min	22 min

Analýzou roztoku vytvořeného z jednotlivých standardů sledovaných analytů (1 μ g/ml) byly určeny retenční časy jednotlivých musk sloučenin. Charakteristiky jednotlivých analytů nutných pro identifikaci jsou prezentovány v tabulce 11. Hmotnostní spektra jednotlivých analytů jsou znázorněny na obrázcích 12-14.

Tabulka 11: Charakteristiky analytů nutné pro identifikaci

Analyt	Identifikační ionty (m/z)	Kvantifikační ion (m/z)	Retenční čas [min]
MX	282, 283, 297	282	12,73
AHTN	159, 187, 243	243	12,76
MK	279, 280, 294	279	13,81

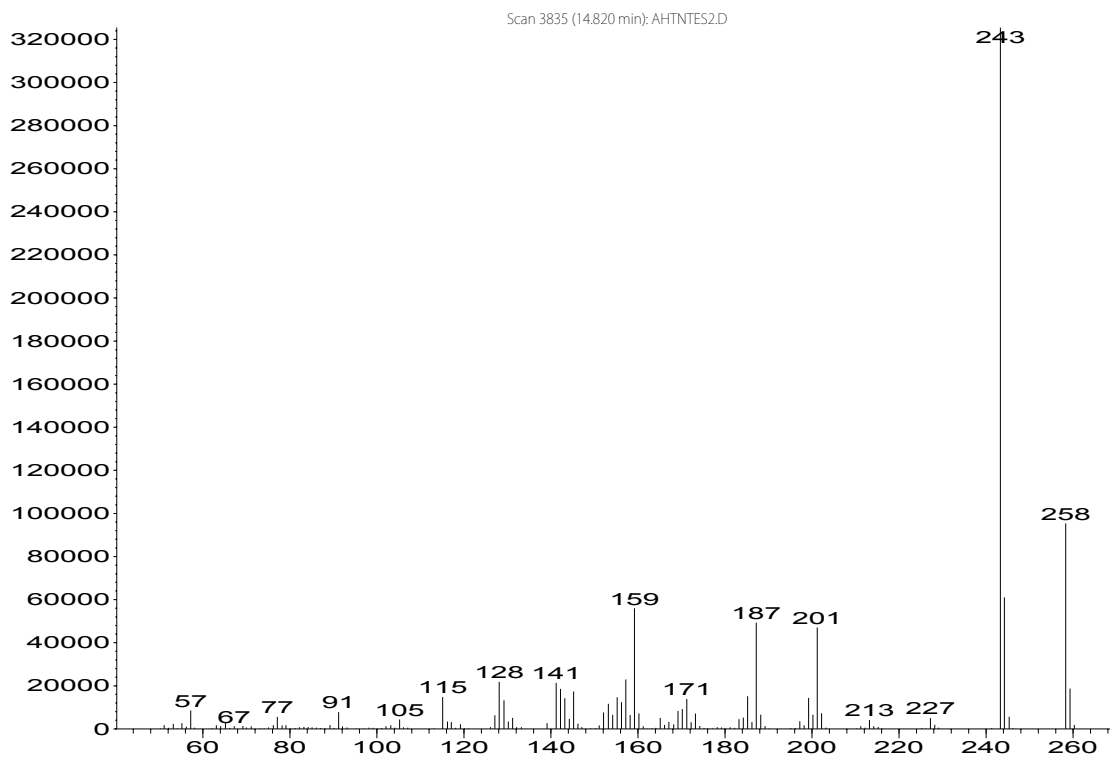
Abundance



m/z-->

Obrázek 12: Hmotnostní spektrum musk xylenu

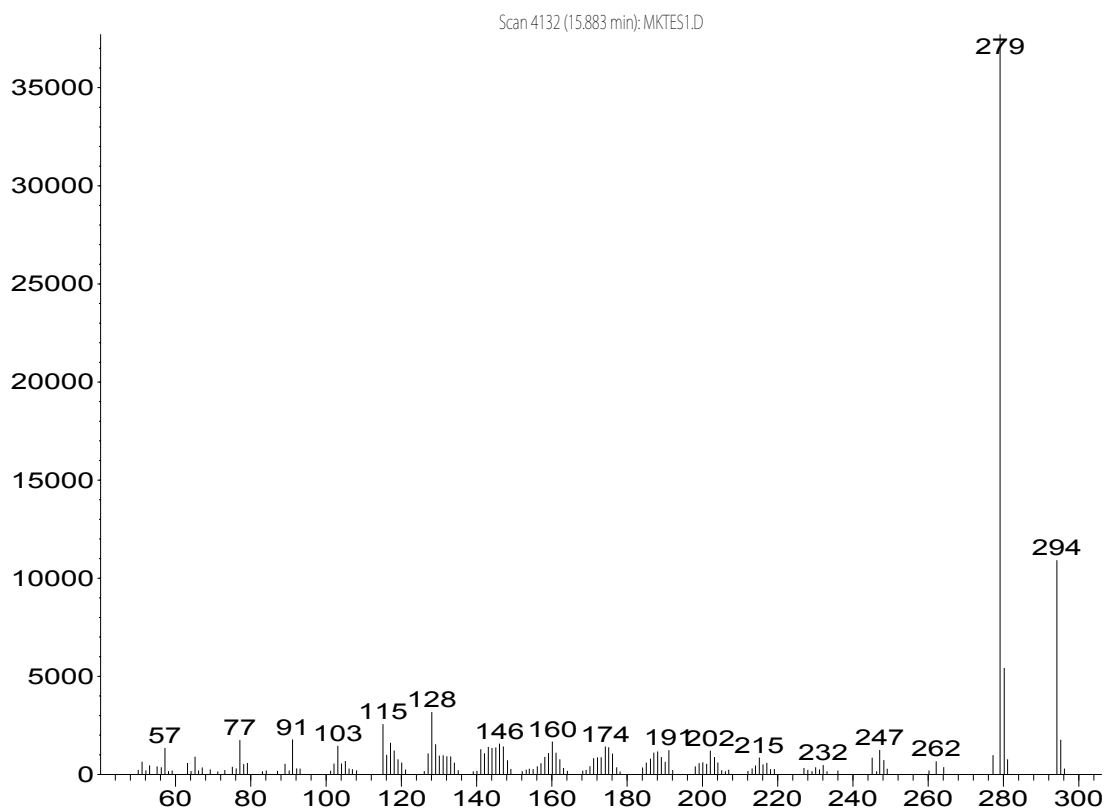
Abundance



m/z-->

Obrázek 13: Hmotnostní spektrum tonalidu

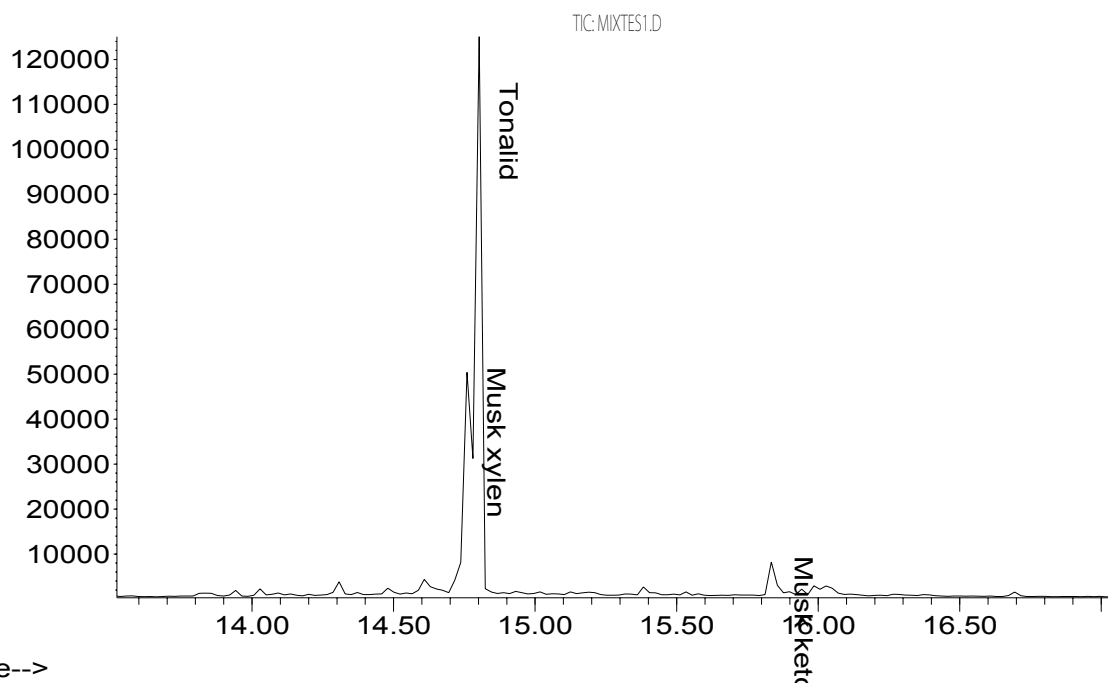
Abundance



m/z-->

Obrázek 14: Hmotnostní spektrum musk ketonu

Abundance



Time-->

Obrázek 15: Chromatogram (kalibrace SPME, 10 ng/ml) ukazující rozdělení musk sloučenin

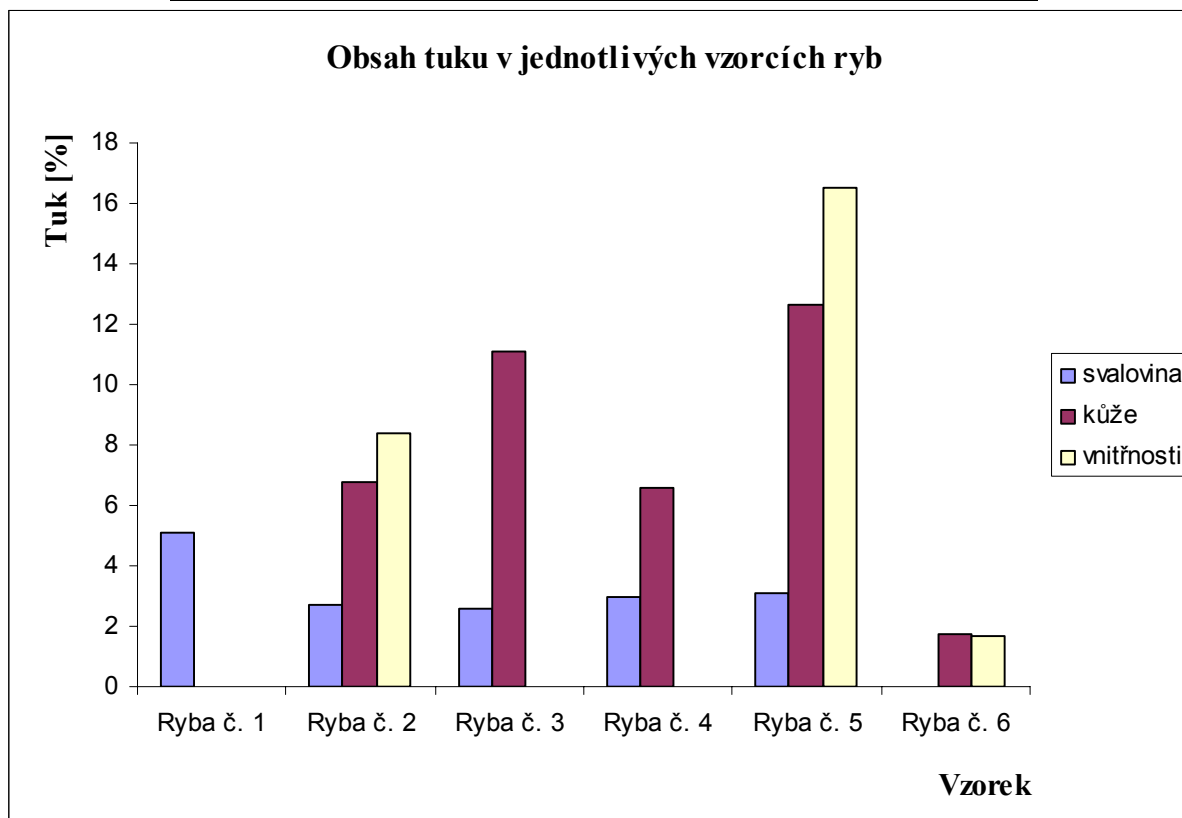
Obrázek 15 znázorňuje chromatogram (z kalibrace SPME) dokumentující míru rozdělení sledovaných musk sloučenin při plynově chromatografické analýze. Z chromatogramu je patrné, že musk xylen a tonalid mají velmi podobný retenční čas, takže pouhá GC separace by byla v tomto případě nedostačující pro jejich kvantitativní vyhodnocení, a to vzhledem k nedokonalému rozdělení píků. Ve spojení s hmotnostně spektrometrickým detektorem však po výběru příslušné hodnoty m/z dostáváme samostatné „ostré“ píky jednotlivých musk sloučenin vhodné pro kvantifikaci. Tento postup vyhodnocení bylo nutné používat jak při měření SPME, tak i při měření kalibrace na biotickou tkáň a při stanovování reálných biotických vzorků.

4.1.3 Stanovené obsahy tuku v jednotlivých vzorcích

Obsah tuku v jednotlivých vzorcích byl stanoven postupem uvedeným v kapitole 3.3.4.

Tabulka 12: Procentické zastoupení tuku v jednotlivých vzorcích

Vzorek	Obsah tuku [%]		
	svalovina	kůže	vnitřnosti
Ryba č. 1	5,10	////	////
Ryba č. 2	2,73	6,79	8,40
Ryba č. 3	2,61	11,12	////
Ryba č. 4	3,00	6,58	////
Ryba č. 5	3,08	12,63	16,54
Ryba č. 6	////	1,71	1,70



Graf 4: Obsah tuku v jednotlivých vzorcích ryb

Z dosažených výsledků (vzorek č. 2-5; tj. cejn velký) je patrné, že obecně se v kůži nachází mnohem více tuku než ve svalovině. Toto zjištění koreluje s biologickou funkcí tuku – v kůži tuk tvoří bariéru, která chrání organismus před mechanickým poškozením a navíc funguje jako izolační vrstva proti ztrátám tepla, případně je zde tuk uložen jako zásobárna energie. Svalovina u všech 4 vzorků (č. 2-5) vykazuje konstantní obsah tuku, v kůži a vnitřnostech je pozorován vyšší rozptyl hodnot. Také lze pozorovat, že největší množství tuku se nachází ve vnitřnostech, avšak i zde velmi záleží na konkrétním vzorku (typu vnitřnosti). Vzorek ryby č. 6 (lín obecný) obsahuje malé množství tuku.

4.1.4 Optimalizace extrakčních podmínek pro PSE

Optimalizace byla prováděna postupem uváděným v kapitole 3.3.5. Z výsledných hodnot výtěžností (viz kap. 4.1.5) analytického postupu při použití 2 různých teplot pro extrakci PSE lze vyčíst, že při 110 °C je výtěžnost MX-D15 srovnatelná s výtěžností při teplotě 80 °C (je o 6,83 % nižší); u AHTN-D3 je naopak výtěžnost při 110 °C vyšší (o 14,52 °C) než při 80 °C. Na základě těchto výsledků byla pro extrakci PSE biotických vzorků zvolena teplota 110 °C.

Optimalizovaný extrakční program PSE pro biotickou tkáň:

- ❖ Rozpouštědlo cyklohexan
- ❖ Teplota 110 °C
- ❖ Tlak 150 bar
- ❖ Doba statické fáze 8 minut
- ❖ Počet cyklů 2
- ❖ Proplach rozpouštědlem 15 sec
- ❖ Sušení dusíkem 1 min

4.1.5 Stanovení výtěžnosti analytického postupu

Tabulka 13: Plochy píků při 100% výtěžnosti naspikovaných standardů

Standard	Plocha píku			
	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr
MX-D15	34167	31103	28840	31370
AHTN-D3	126702	112403	115737	118281

K uvedených plochám, které byly získány po proměření připravených kalibračních roztoků podle kapitoly 3.3.5.1, byly lineární úměrou vztahovány naměřené plochy z vyextrahovaných a proměřených vzorků podle kapitoly 3.3.5. Výsledné hodnoty výtěžností uvádí tabulka 14.

Optimalizovaný program PSE extrakce byl pro měření všech biotických vzorků nastaven na 110 °C, takže výtěžnost celého analytického postupu činí 53,96 %, respektive 78,75 %.

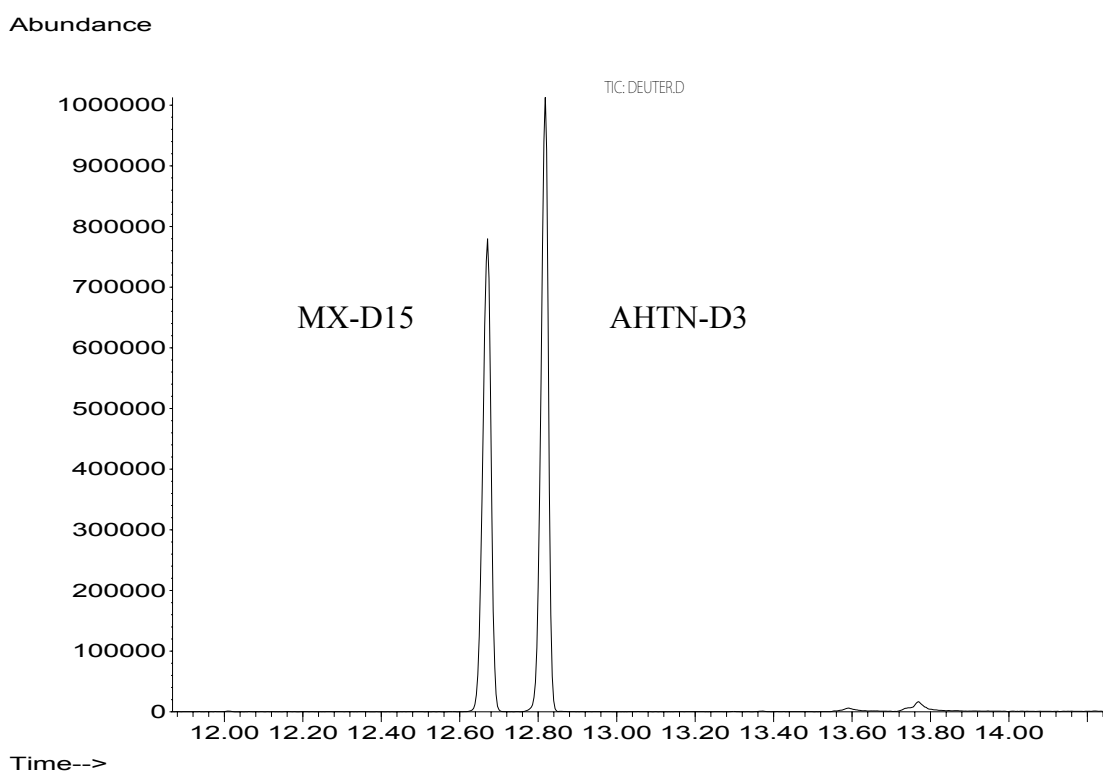
Tabulka 14: Výtěžnost analytického postupu při 2 různých teplotách PSE extrakce

Teplota	Číslo měření	Výtěžnost [%]	
		MX-D15	AHTN-D3
80 °C	1. měření	57,61	64,04
	2. měření	67,95	65,88
	3. měření	56,80	62,77
	Průměr	60,79	64,23
	RSD [%]	10,23	2,44
110 °C	1. měření	45,15	83,10
	2. měření	55,10	77,75
	3. měření	61,64	75,41
	Průměr	53,96	78,75
	RSD [%]	15,39	5,00

4.1.5.1 Identifikace deuterovaných standardů

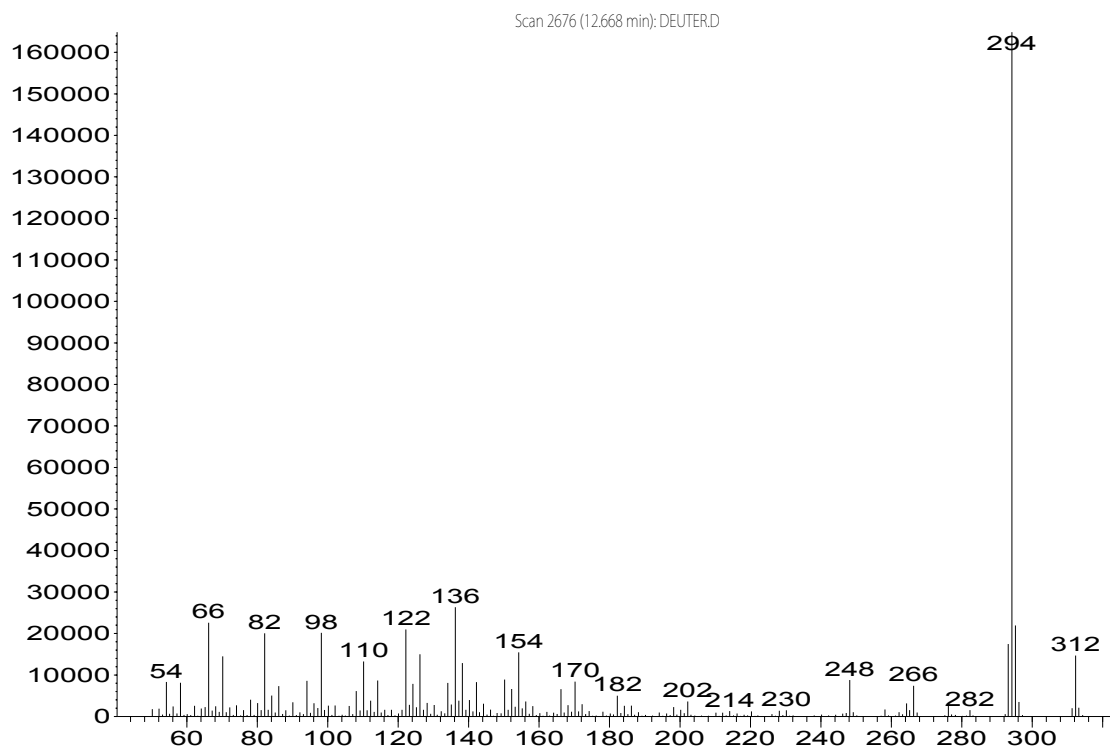
Tabulka 15: Údaje potřebné pro identifikaci deuterovaných standardů

Analyt	Identifikační ionty (m/z)	Kvantifikační ion (m/z)	Retenční čas [min]
MX-D15	293, 294, 312	294	12,64
AHTN-D3	190, 246, 261	246	12,80



Obrázek 16: Chromatogram ukazující rozdělení deuter. standardů MX-D15 a AHTN-D3

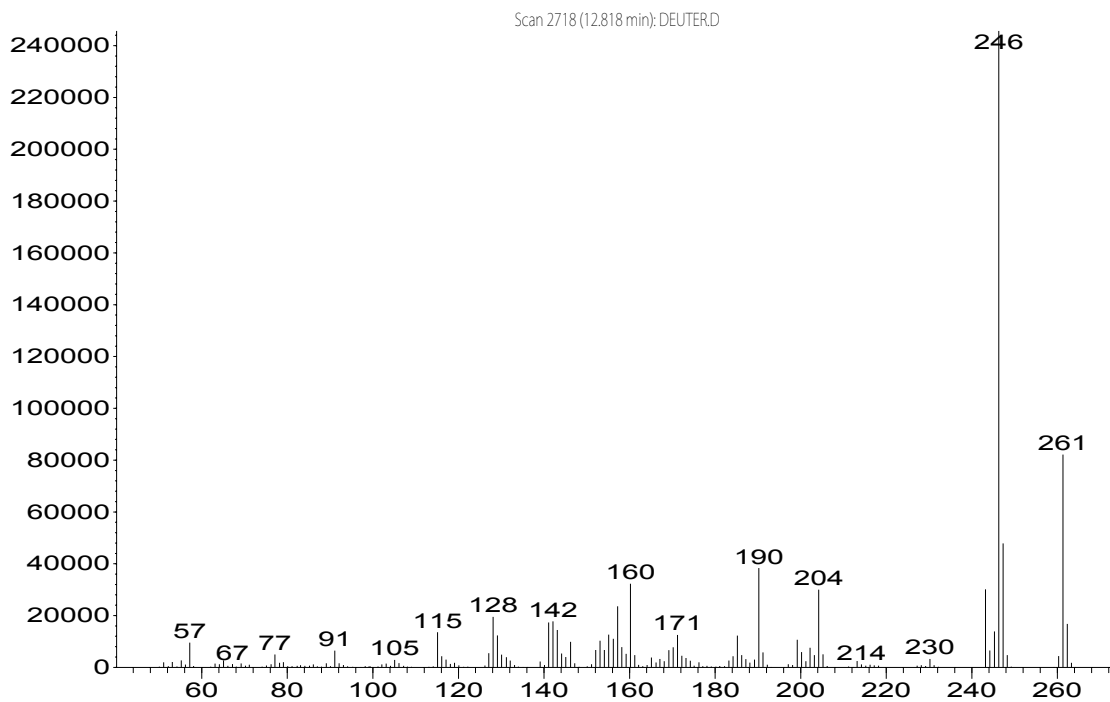
Abundance



m/z-->

Obrázek 17: Hmotnostní spektrum MX-D15

Abundance



m/z-->

Obrázek 18: Hmotnostní spektrum AHTN-D3

4.1.6 Nejistoty analytických výsledků

Nejistota měření vyjadřuje míru spolehlivosti výsledků. Nejistota je definována jako parametr přidružený výsledku měření, který charakterizuje rozptýlení hodnot, které mohou být důvodně přisuzovány k měřené veličině. Proces odhadu nejistot je často složitý. Celý proces lze rozdělit do částí: specifikace měřené veličiny (např. koncentrace), identifikace zdrojů nejistoty, kvantifikace nejistoty a výpočet kombinované nejistoty. Existují 2 základní postupy odhadu nejistot: „zdola-nahoru“ a „shora-dolů“. Postup „zdola-nahoru“ („složka po složce“; „bottom-up“) spočívá v identifikaci a kvantifikaci nejistot pocházejících ze všech individuálních zdrojů. Tento postup lze aplikovat zejména při řešení jednodušších problémů. Pro složitější analytické postupy se jeví jako výhodnější a snadnější použití postupu „shora-dolů“ („top-down“). V rámci tohoto postupu se nevyhodnocují nejistoty pocházející z každého jednotlivého zdroje, ale využívají se výhradně souhrnné údaje vyjadřující celkový vliv jednotlivých zdrojů. Mezi údaje, které lze využít k odhadu nejistoty postupem „shora-dolů“ patří opakovatelnost, výtěžnost a reprodukovatelnost.

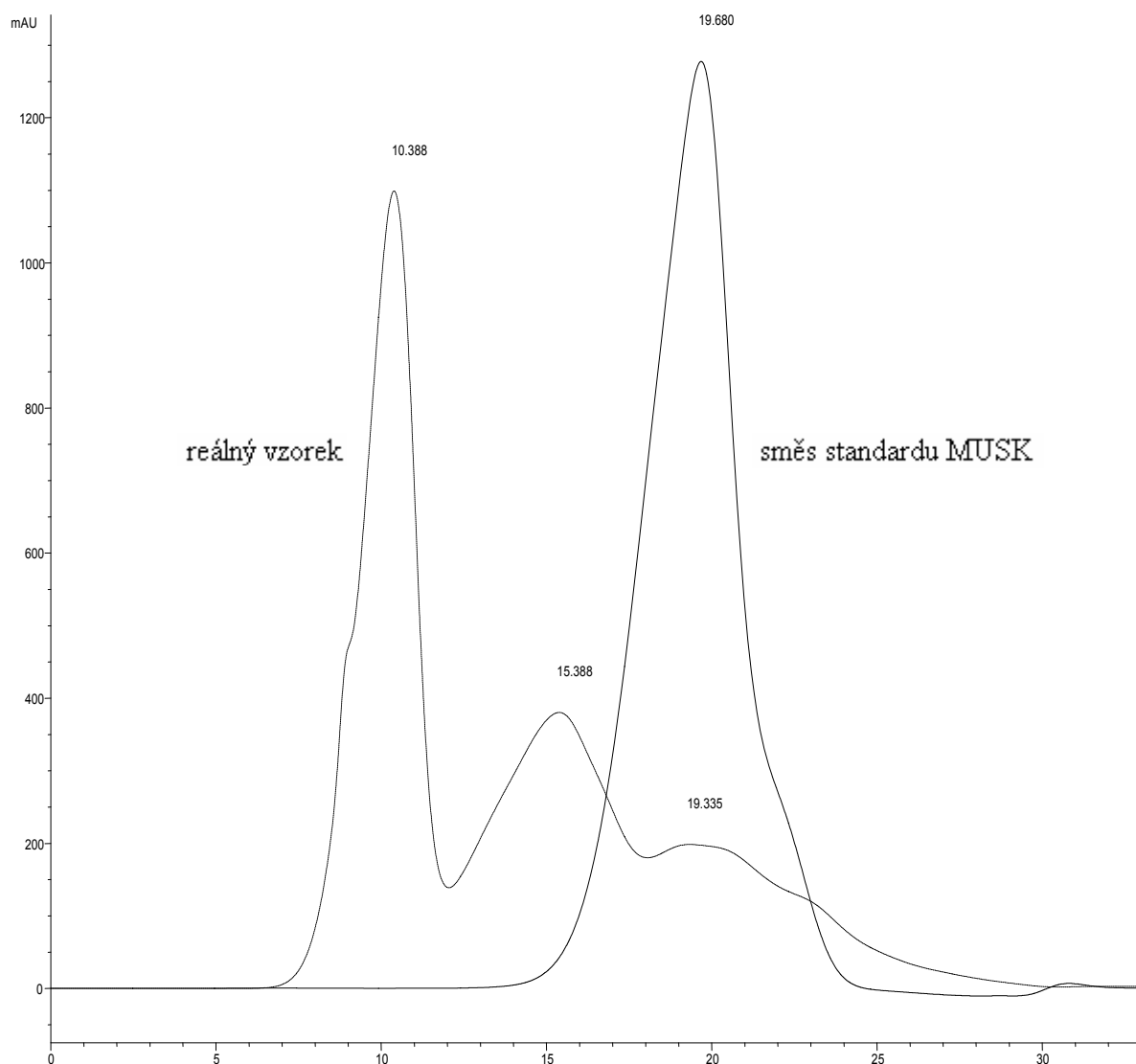
Vyhodnocení nejistot postupem „shora-dolů“ bylo použito i v této práci. Všechny výpočty byly provedeny podle literatury [47]. Opakovatelnost byla stanovena ze série měření reálného vzorku (stejný vzorek proměřen 5×). Výtěžnosti analytů byly stanoveny v kapitole 4.1.5 (kvůli chybějícímu deuterovanému MK nebylo možno určit výtěžnost pro tento analyt; protože však jde o sloučeninu strukturně i vlastnostmi podobnou MX, byla použita pro výpočet nejistot MK výtěžnost MX) [47].

Tabulka 16: Nejistoty analytických výsledků

Analyt	r_t [%]	R_t [%]	$u(R)_t$ [%]	u_{ct} [%]
MX	8,47	53,96	13,29	15,76
AHTN	9,66	78,75	6,13	11,44
MK	7,53	53,96	13,29	15,28

- r_t opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka
- R_t výtěžnost pro daný analyt
- $u(R)_t$ nejistota výtěžnosti
- u_{ct} kombinovaná nejistota celého analytického postupu

4.1.7 Optimalizace gelové permeační chromatografie



Obrázek 19: Optimalizace GPC

Optimalizace GPC byla provedena podle návodu v kap. 3.3.6. Z uvedeného obrázku překrytých chromatogramů je patrné, že musk sloučeniny jsou eluovány z kolony v časovém rozmezí 14-25 min (vrchol píku: 19,680 min). Při zohlednění určité rezervy byl zvolen postup, v rámci kterého budou frakce ze všech reálných vzorků odebírány v časovém rozmezí 13-29 min. Z obrázku je také vidět, že touto volbou dojde k separaci od přítomných lipidů, což bylo hlavním cílem použití GPC. Lipidy eluují z kolony již v čase 7-12 min, vrchol píku je v čase 10,388 min.

Optimalizované podmínky GPC:

- ❖ Nastříkovaný objem: 100 μ l
- ❖ Mobilní fáze: chloroform
- ❖ Průtok mobilní fáze: 0,6 ml/min
- ❖ UV-VIS detektor: 254 nm
- ❖ Sběr frakce s analyty: 13-29 min
- ❖ Doba analýzy: 35 min

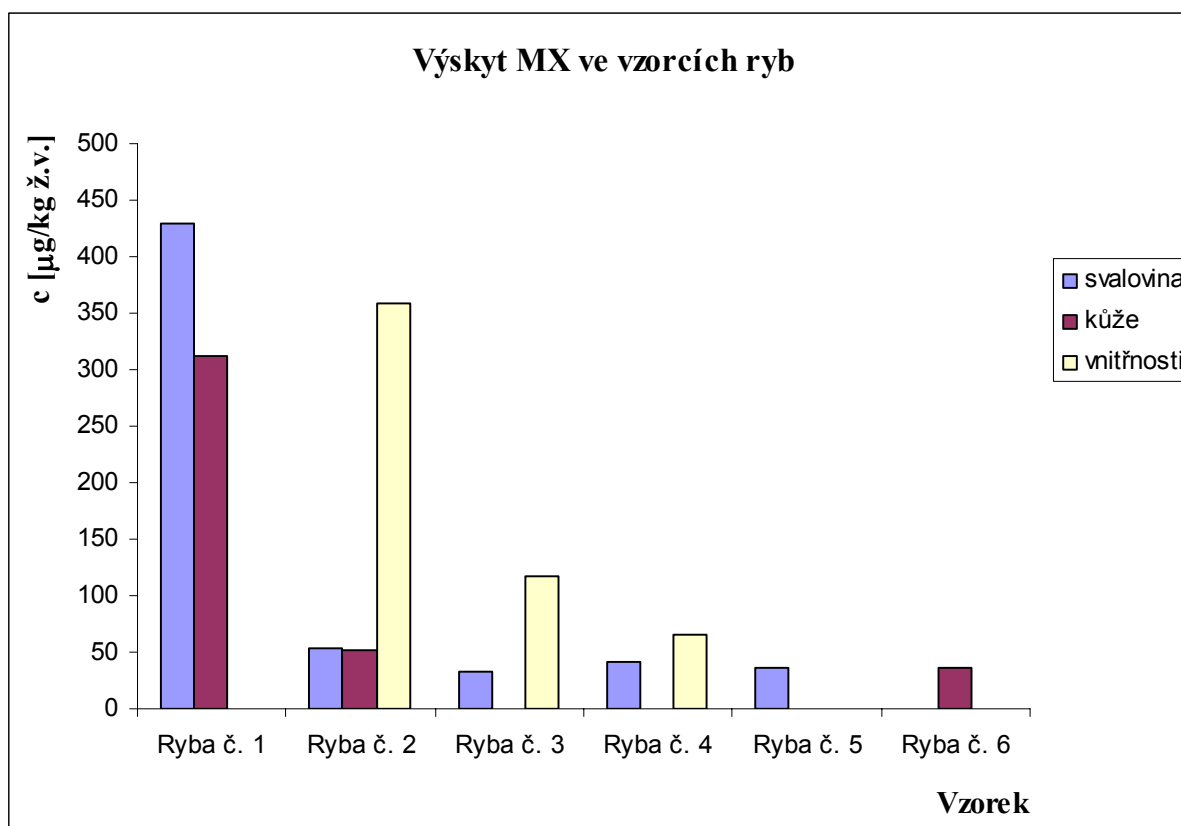
4.1.8 Stanovení analytů v reálných biotických vzorcích

Reálné vzorky tvoří ryby specifikované v kapitole 3.3.3. Tyto vzorky byly podrobeny analytickému postupu (viz kap. 3.3.5) a obsah sledovaných musk sloučenin byl stanoven pomocí GC / MS (používaný program - viz kap. 4.1.2). Dosažené výsledky shrnují kapitoly 4.1.8.1-4.1.8.4. Výpočty byly provedeny pomocí kalibračních křivek (viz kap. 4.1.1) se zohledněním „zředování“ během analytického postupu (viz. kap. 3.3.5).

4.1.8.1 Musk xylen

Tabulka 17: Zastoupení MX v biotických vzorcích

Vzorek	c (MX) [μg/kg ž.v.]					
	svalovina	RSD [%]	kůže	RSD [%]	vnitřnosti	RSD [%]
Ryba č. 1	430,17	43,64	312,17	28,71	////	////
Ryba č. 2	52,80	6,97	51,53	33,41	358,72	16,18
Ryba č. 3	32,69	6,72	nd	////	116,69	7,35
Ryba č. 4	40,56	1,63	nd	////	64,81	9,98
Ryba č. 5	36,17	15,18	nd	////	nd	////
Ryba č. 6	////	////	36,99	2,18	nd	////

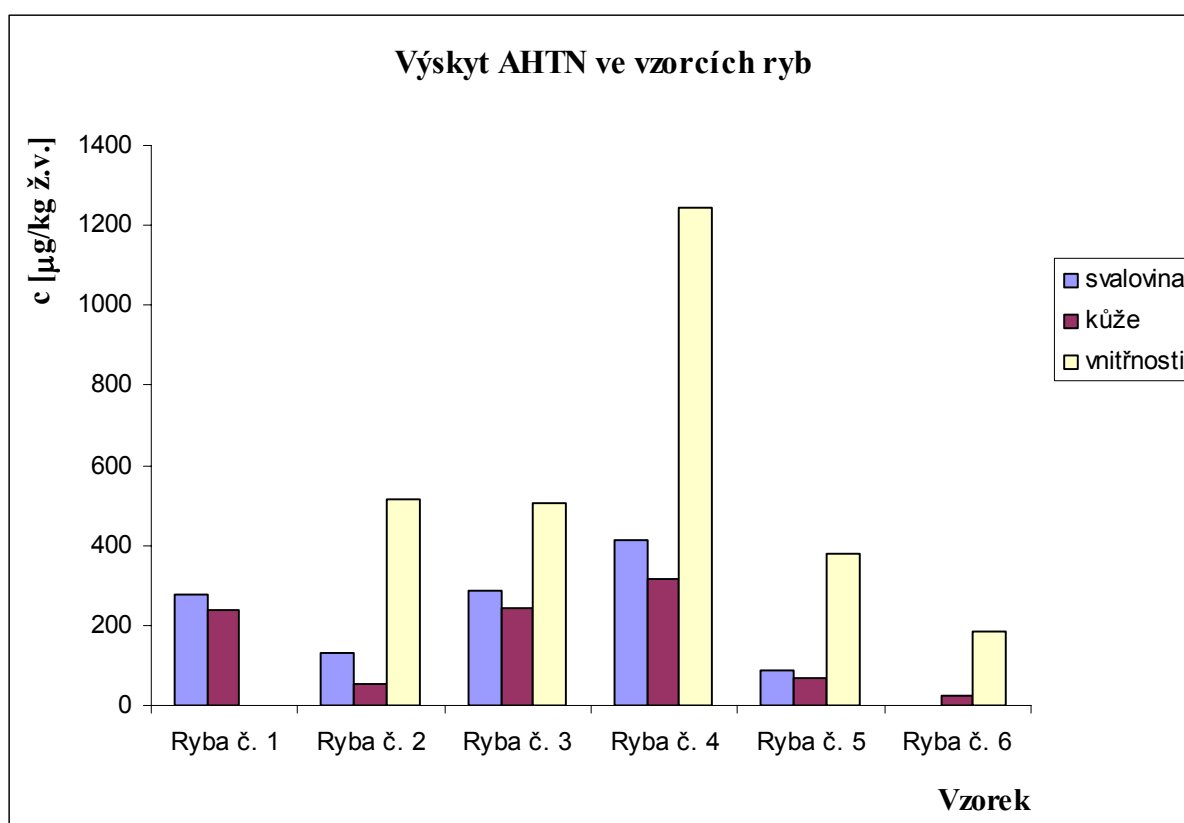


Graf 5: Výskyt musk xylenu ve vzorcích ryb

4.1.8.2 Tonalid

Tabulka 18: Zastoupení AHTN v biotických vzorcích

Vzorek	c (AHTN) [$\mu\text{g}/\text{kg}$ ž.v.]					
	svalovina	RSD [%]	kůže	RSD [%]	vnitřnosti	RSD [%]
Ryba č. 1	277,51	47,86	239,90	39,83	////	////
Ryba č. 2	130,07	26,78	54,98	12,38	513,92	15,50
Ryba č. 3	284,75	14,28	242,61	22,82	505,26	42,41
Ryba č. 4	412,29	0,83	315,02	9,02	1245,11	21,81
Ryba č. 5	89,29	8,52	67,40	0,99	381,45	11,50
Ryba č. 6	////	////	25,07	2,22	185,73	5,61

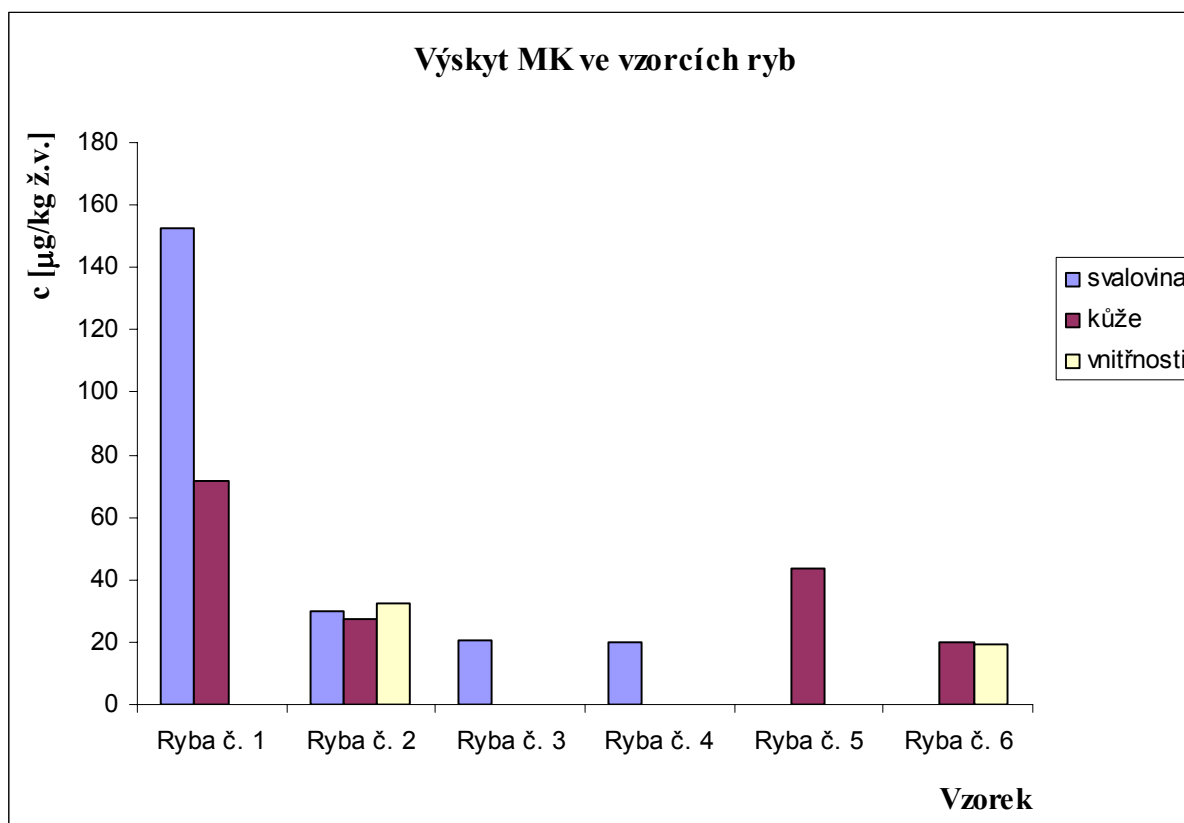


Graf 6: Výskyt tonalidu ve vzorcích ryb

4.1.8.3 Musk keton

Tabulka 19: Zastoupení MK v biotických vzorcích

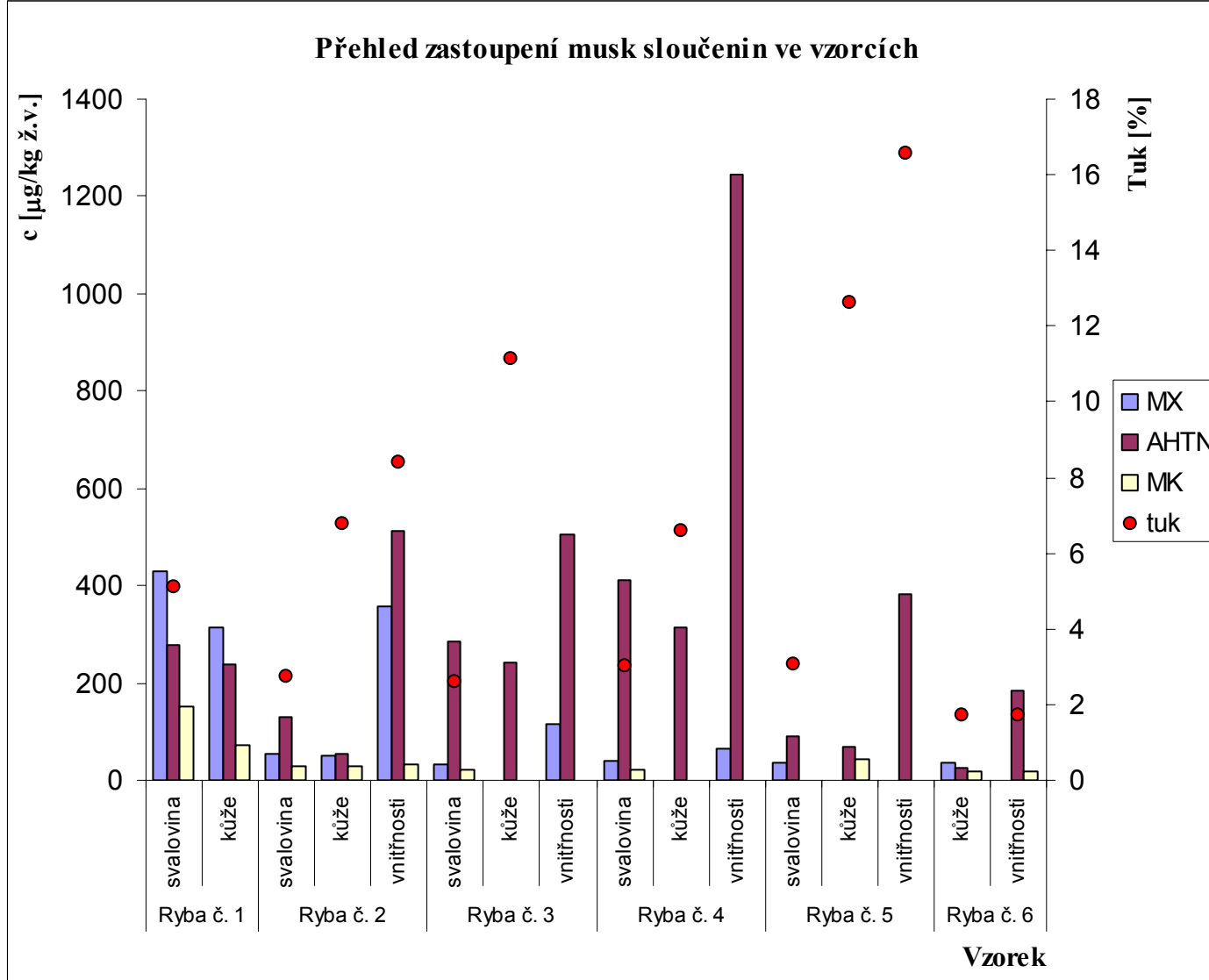
Vzorek	c (MK) [$\mu\text{g}/\text{kg}$ ž.v.]					
	svalovina	RSD [%]	kůže	RSD [%]	vnitřnosti	RSD [%]
Ryba č. 1	152,82	4,55	71,74	15,44	////	////
Ryba č. 2	29,87	26,77	27,14	19,55	32,19	32,43
Ryba č. 3	20,39	7,27	nd	////	nd	////
Ryba č. 4	20,17	0,77	nd	////	nd	////
Ryba č. 5	nd	////	43,37	5,07	nd	////
Ryba č. 6	////	////	19,81	11,97	19,34	9,20



Graf 7: Výskyt musk ketonu ve vzorcích ryb

4.1.8.4 Souhrn výsledků a diskuze

Graf č. 8 shrnuje dosažené výsledky stanovení vybraných musk sloučenin v biotických vzorcích. Do stejného grafu byly přidány hodnoty množství tuku v jednotlivých vzorcích, aby bylo možno lépe porovnat vzájemnou souvislost.



Graf 8: Přehled zastoupení musk sloučenin ve vzorcích

Z dosažených výsledků je patrné, že výskyt sledovaných musk sloučenin v jednotlivých vzorcích ryb je velmi individuální. Je to logické; přestože byly odebrány ryby ze stejné lokality, je množství přítomných kontaminantů (tedy i musk sloučenin) závislé nejen na druhu, pohlaví a stáří ryb, ale zejména na způsobu života daných jedinců a jejich metabolismu (proto jsou i v této práci nacházeny různé koncentrace i u příslušníků stejného druhu – cejna velkého). Vyšší obsahy hodnocených analytů lze tedy očekávat u jedinců, kteří se určitou dobu svého života pohybovali v oblasti s vyšším výskytem musk; rovněž ryby žijící spíše u dna mohou vykazovat vyšší obsahy musk sloučenin, a to z důvodu zvýšeného výskytu musk sloučenin v sedimentech. Hlavní vliv na obsah musk sloučenin v rybách však má složení jejich potravy. Musk sloučeniny se ve vodě snadno sorbují na malé organické částice, kterými se živí plankton. Pokud je ryba všežravá a živí se proto i planktonem (platí i pro vzorky ryb této práce), znamená to zvýšené riziko kontaminace musk sloučeninami. Důvodem je zakoncentrování musk sloučenin v planktonu a následně ve tkáních drobných vodních živočichů (se stoupající trofickou úrovní roste i obsah musk sloučenin, jak je běžné i u jiných typů POPs). To lze vyčíst i ze sledovaných koncentračních úrovní (dosažené i v této práci) – zatímco obsah musk sloučenin ve vodách je v řádech pg/ml-ng/ml (případně analyt nebyl detekovatelný), tak v rybách se již vyskytují koncentrace představující desítky až stovky µg/kg živé hmotnosti. To svědčí o schopnosti bioakumulace těchto sloučenin. Bioakumulace je důvodem, proč nacházíme v biotických vzorcích některé musk sloučeniny (v této práci: MX, MK), které však nebyly detekovány ve vodě, odkud ryby pochází. Z dosažených výsledků lze vyvodit následující obecné závěry:

Nejvyšší obsah nitro-musk sloučenin (MX, MK) byl nalezen u vzorku ryby č. 1 (plotice obecná). **Musk xylen (MX)** se vyskytoval ve svalovině všech vzorků ryb. V kůži byly nalezeny relativně malé obsahy MX, případně zde tento analyt nebyl vůbec detekován. Obsahy MX v kůži a svalovině jsou srovnatelné; vnitřnosti obsahují obecně vyšší množství MX než svalovina s kůží (ovšem velmi závisí na typu vnitřnosti – např. jikry ze vzorku č. 2 obsahují vysoké množství MX). Obsah **musk ketonu (MK)** byl ve vzorcích velmi individuální – MK byl obecně zastoupen ve sledovaných vzorcích v nejnižších koncentracích ze všech 3 sledovaných analytů; v řadě případech nebyl vůbec detekován. Zástupce polycyklických musk sloučenin **tonalid (AHTN)** byl přítomen ve všech analyzovaných tkáních všech vzorků ryb. Zároveň jeho nalezené koncentrace ve tkáních byly nejvyšší, a to při porovnání s ostatními sledovanými analyty (MX, MK). To plně koreluje s dosaženými výsledky z analýzy odebraných vzorků vod (viz. kapitola 4.2.2). Nalezené koncentrace AHTN ve vodě i biotických vzorcích tedy potvrzují ubikvitární a nezanedbatelný výskyt AHTN v životním (zejména akvatickém) prostředí. Zároveň je z výsledků patrné, že koncentrace polycyklické musk sloučeniny tonalidu převyšuje koncentrace nitro-musk sloučenin, což souvisí s historií používání jednotlivých typů musk sloučenin (nitro-musk sloučeniny jsou od 90. let 20. století razantně omezovány a nahrazovány právě polycyklickými musk sloučeninami). Největší kontaminace tonalidem byla prokázána u vzorku ryby č. 4 (zejména u vnitřností). Obecně se nejvíce tonalidu vyskytovalo ve vnitřnostech, méně pak ve svalovině a nejméně v kůži (koncentrace AHTN ve svalovině a kůži jsou srovnatelné).

Přestože jsou musk sloučeniny lipofilní, tak nebyla jednoznačně prokázána souvislost mezi obsahem tuku v tkáni a obsahem musk sloučenin. Určitou souvislost lze pozorovat u vzorku č. 6, jehož kůže i vnitřnosti obsahuje málo tuku a proto i zastoupení musk sloučenin je u tohoto vzorku nízké; ovšem kvůli absenci vzorku svaloviny a odlišnosti druhu ryby nelze ani v tomto případě učinit jednoznačný závěr.

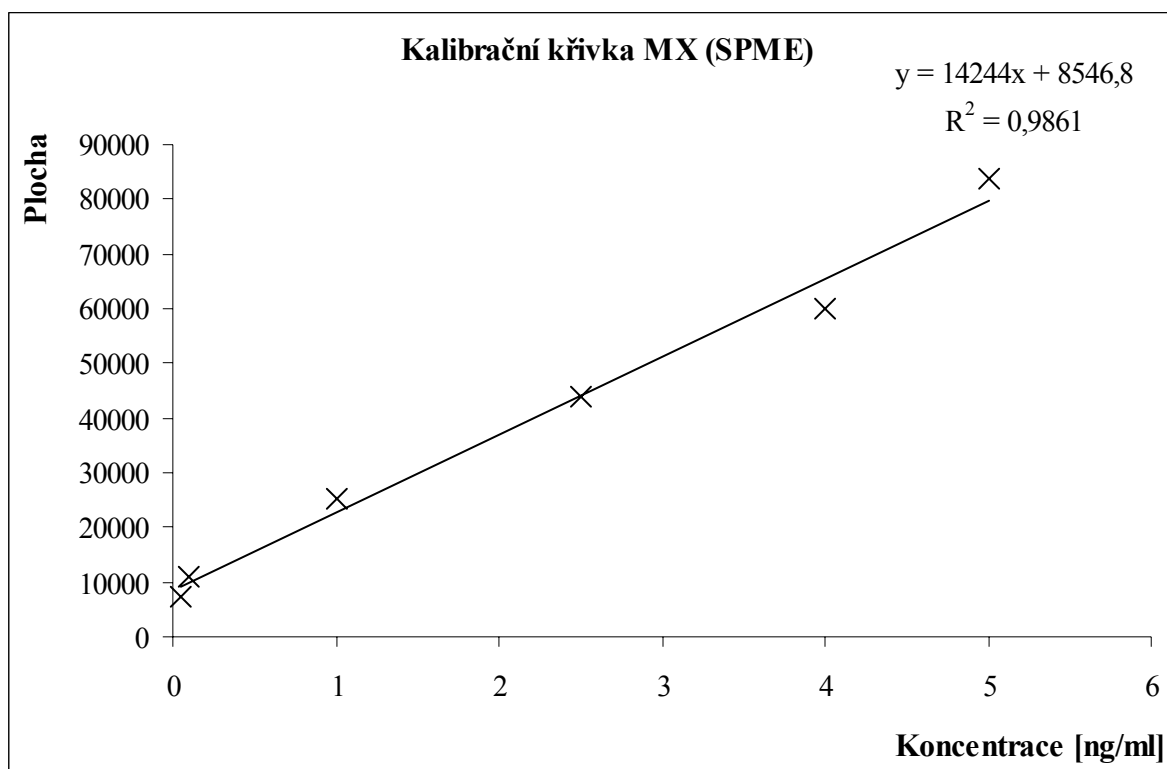
4.2 Voda

4.2.1 Kalibrace pro SPME

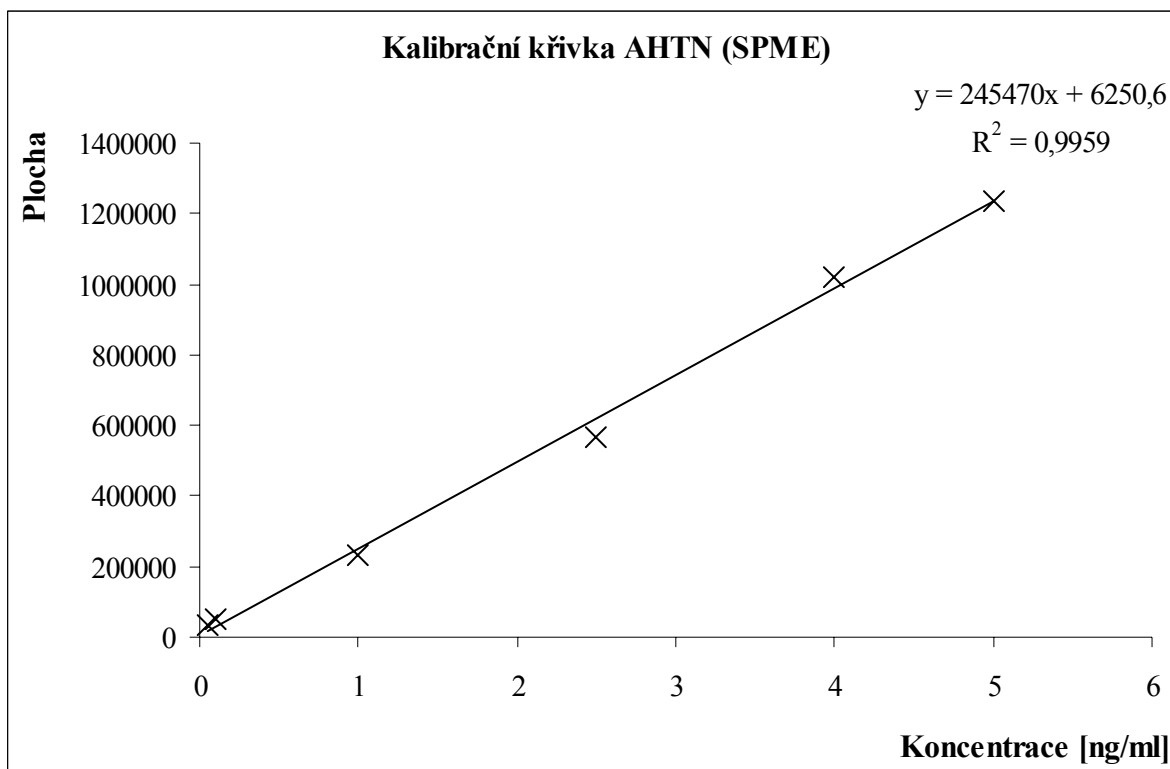
Kalibrace byla provedena postupem uvedeným v kap. 3.4.1. Stanovení výtěžnosti SPME nebylo pro konečné vyhodnocení reálných vzorků zapotřebí, protože kalibrace používané pro vyhodnocení již v sobě zahrnují korekci na výtěžnost.

Tabulka 20: Data potřebná k sestavení kalibračních přímek

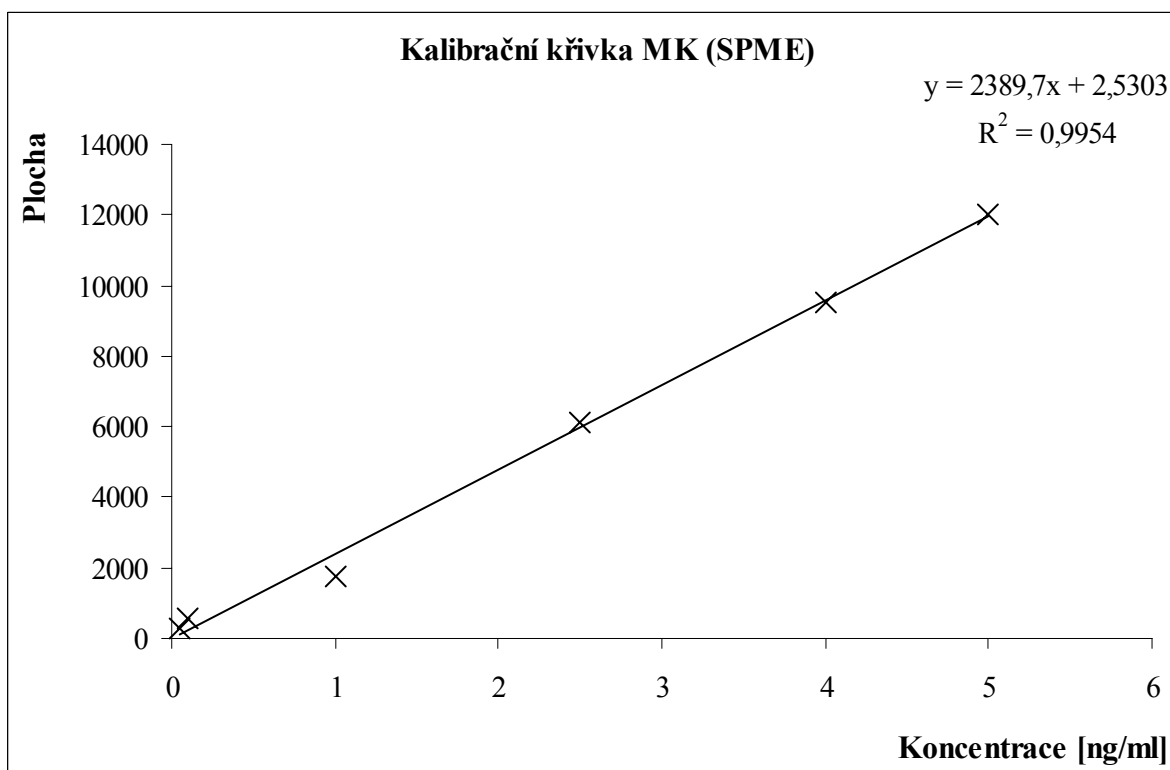
Koncentrace ng/ml	Signál (plocha)		
	MX	AHTN	MK
0,05	7294	34880	258
0,10	11148	52863	557
1,00	25380	230285	1749
2,50	43875	565091	6136
4,00	59833	1021871	9518
5,00	83939	1237704	12027



Graf 9: Kalibrační křivka musk xylenu (SPME)



Graf 10: Kalibrační křivka tonalidu (SPME)



Graf 11: Kalibrační křivka musk ketonu (SPME)

4.2.1.1 Určení LOD a LOQ z kalibračních křivek

Určení LOD a LOQ bylo provedeno dle rovnic v kapitole 4.1.1.4.

Tabulka 21: Meze detekce a meze stanovitelnosti pro analýzu vody (SPME)

Látka	Směrnice KK	Šum z KK	LOD	LOQ
			[ng/ml]	[ng/ml]
MX	14244,12	20	0,0042	0,0140
AHTN	245469,61	200	0,0024	0,0081
MK	2389,69	11	0,0138	0,0460

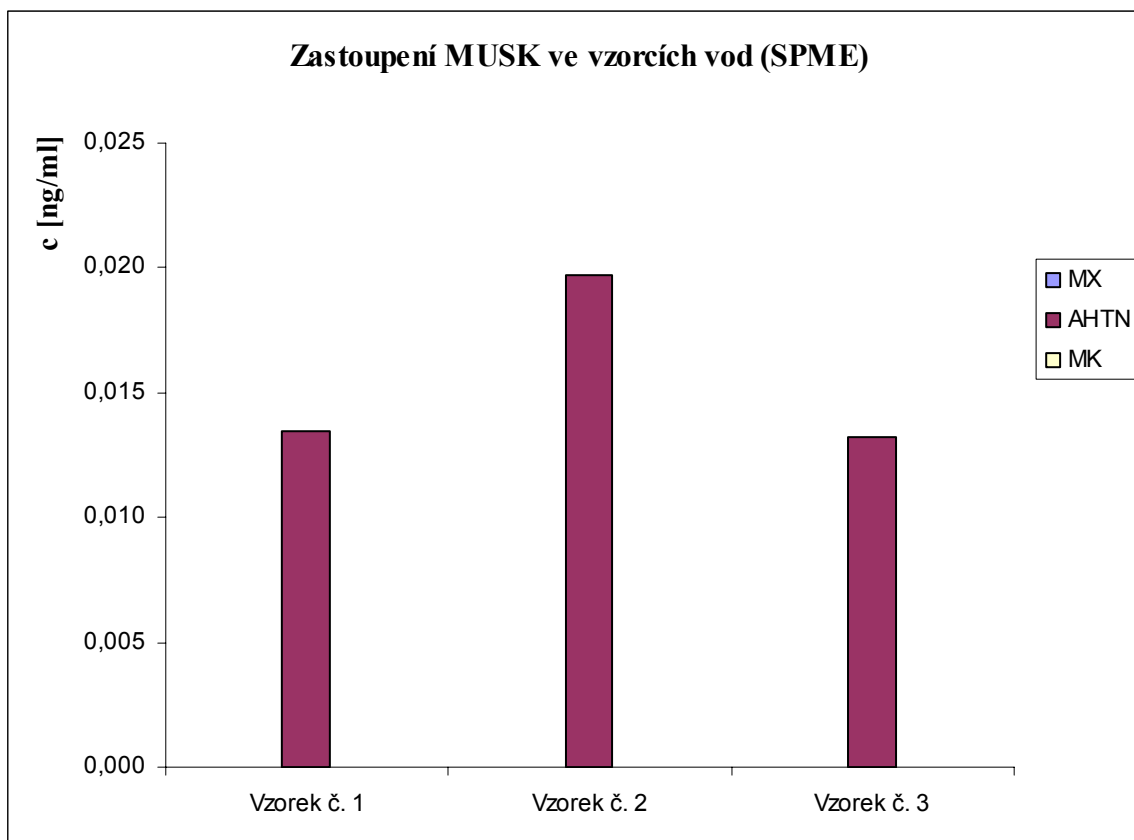
Poznámka: Šum byl odečítán vždy z chromatogramu příslušející nejnižší koncentraci v KK.

4.2.2 Vyhodnocení reálných vzorků vod

V rámci této práce byly zjišťovány musk sloučeniny ve 3 reálných vzorcích vody specifikovaných v kapitole 3.4.4. Tyto vzorky byly zpracovány pomocí optimalizovaného analytického postupu (viz kap. 3.4.5) a obsah sledovaných musk sloučenin byl stanoven pomocí GC / MS (viz kap. 3.4.3). Vyhodnocení probíhalo pomocí kalibračních křivek uvedených v kapitole 4.2.1. Dosažené výsledky shrnuje tabulka č. 22 a graf č. 12.

Tabulka 22: Obsah analytů ve vzorcích vod

Analyt	c (vzorek č. 1)	RSD	c (vzorek č. 2)	RSD	c (vzorek č. 3)	RSD
	[ng/ml]	[%]	[ng/ml]	[%]	[ng/ml]	[%]
MX	nd	////	nd	////	nd	////
AHTN	0,0135	16,42	0,0197	4,27	0,0132	31,46
MK	nd	////	nd	////	nd	////



Graf 12: Zastoupení sledovaných MUSK sloučenin ve vzorcích vod (SPME)

Zdrojem musk sloučenin v Brněnské přehradě mohou být lokální ČOV umístěné na řece Svatce. Z uvedených výsledků je zřejmé, že v daných vzorcích vod byl detekován pouze tonalid (AHTN) v koncentracích 0,0132-0,0135 ng/ml vody. Koncentrace tonalidu je ve všech třech vzorcích vody srovnatelná (místa odběrů byla relativně blízko sebe, takže výsledky potvrzují rovnoměrnou distribuci tonalidu v celé lokalitě); mírně zvýšená je koncentrace ve vzorku č. 2. Musk xylen a musk keton nebyly detekovány ani v jednom vzorku, z čehož lze učinit závěr, že v dané lokalitě v místě odběru vzorků (viz kap. 3.4.4) voda neobsahuje tyto sloučeniny, respektive jejich případný obsah je pod mezí detekce dané metody, která činí pro MX 0,0042 ng/ml a pro MK 0,0138 ng/ml (viz kap. 4.2.1.1). Nedetekovatelný obsah MX a MK souvisí s tím, že používání nitro-musk sloučenin je již od devadesátých let razantně snižováno a v současnosti jsou tyto musk sloučeniny nahrazovány především polycyklickými musk sloučeninami (což dokumentuje výskyt tonalidu ve všech 3 analyzovaných vzorcích). Nedetekovatelný obsah MX a MK v samotné vodě lze vysvětlit také tím, že tyto sloučeniny podléhají anaerobní metabolizaci a rovněž se vážou na jemné částice (organického původu) přítomné ve vodě; popřípadě se kumulují v sedimentu nebo biotické tukové tkáni a podléhají biodegradaci a v určité míře i fotolýze. Z výsledků a uvedených skutečností vyplývá, že obsah samotných MX a MK je v dané lokalitě odběru vzorků nulový nebo bezvýznamný.

5. ZÁVĚR

Syntetické analogy pižma (SAPŽ; musk sloučeniny) jsou široce používány pro aromatizaci nejrůznějších spotřebních produktů, jako jsou např. prací prášky, mýdla a kosmetika. Ubikvitární výskyt těchto lipofilních syntetických látek ve vodních ekosystémech je důsledkem trvalého a relativně masivního uvolňování z domácností do komunálních odpadních vod. V organismu ryb jsou tyto sloučeniny z vody zakoncentrovány a uloženy např. v tukové tkáni. Část sloučenin může být metabolizována na polárnější produkty, které již mohou být v průběhu života z těla vyloučeny [29]. Řada studií však dokazuje nepříznivé účinky SAPŽ na životní prostředí a vše nasvědčuje tomu, že mohou mít i negativní účinky na člověka. Souhrnný dopad syntetických musk sloučenin na životní prostředí a člověka je však dosud neznámý, a proto jsou musk sloučeniny předmětem intenzivního mezinárodního výzkumu [30].

Předkládaná diplomová práce se zabývá stanovením koncentrace tří klasickým musk sloučenin (MX, MK, AHTN) v biotických vzorcích (rybách) a ve vodě, odkud biotické vzorky pochází. Prvním a stěžejním krokem práce však byla optimalizace celého analytického postupu umožňující izolaci, identifikaci a kvantifikaci studovaných analytů. Během optimalizace byl rovněž kladen důraz na minimalizaci doby analýzy, na eliminaci chyb během celého postupu, na zabránění kontaminace z vnějšího prostředí a v rámci možností i na omezení vzniku odpadů. Biotické vzorky tvořily tkáň (kůže, svalovina, vnitřnosti) 6 jedinců ryb, které byly odloveny v listopadu 2007 z Brněnské přehrady. Ze stejné lokality byly odebrány dne 10. 5. 2009 tři vzorky vody. Analýza vzorků vod byla provedena pomocí mikroextrakce tuhou fází (SPME); analytický postup stanovení musk sloučenin v biotických vzorcích zahrnoval tlakovou extrakci (PSE) a přečištění gelovou permeační chromatografií (GPC). U obou typů vzorků tvořila analytickou koncovku plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC/MS). Dosažené výsledky práce lze shrnout do následujících bodů:

- Byl vypracován a ověřen úspěšný čisticí postup pro laboratorní sklo i ostatní používané nástroje, který vyloučil riziko vnější kontaminace vzorků.
- Byla provedena vícebodová kalibrace standardů pro stanovení vybraných musk sloučenin v biotické tkáni. Hodnoty spolehlivosti R^2 kalibračních přímk se pohybují v rozmezí 0,9907-0,9983. Zároveň byly určeny hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé analyty.
- Byla provedena vícebodová kalibrace standardů pro stanovování vybraných musk sloučenin ve vodě pomocí SPME. Bylo nutné vyřešit problém nemísitelnosti standardů (v cyklohexanu) s vodou [pomocí acetonu]. Hodnoty spolehlivosti R^2 kalibračních přímk se pohybují v rozmezí 0,9861-0,9959. Zároveň byly vypočteny hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti pro jednotlivé sledované analyty. Metoda SPME (desorpce z vlákna) poskytuje o 1-2 řády nižší LOD (LOQ) než metoda pro stanovení v biotických vzorcích (přímý nástřik).
- Byl vytvořen program pro analytickou koncovku na GC/MS zaručující spolehlivou identifikaci a kvantifikaci sledovaných analytů pocházející z biotické matrice, respektive

z vody. Pro identifikaci bylo nutné znát kvantifikační ionty sledovaných analytů (z hmotnostních spekter); zároveň bylo nutné zjistit z chromatogramu jejich retenční časy.

- Bylo ověřeno použití podmínek pro SPME podle práce [33] – tyto podmínky byly potom používány pro stanovení analytů ve vodě pomocí SPME.
- Bylo provedeno stanovení sledovaných analytů ve vzorcích vod pomocí metody SPME. Bylo prokázáno, že ve všech 3 vzorcích byl přítomen tonalid (AHTN) v koncentracích 0,0132-0,0197 ng/ml. Musk xylen (MX) ani musk keton (MK) nebyl detekován v žádném vzorku, z čehož lze usuzovat na nulový nebo bezvýznamný výskyt těchto nitro-musk sloučenin v samotné vodě. Příčinou může být razantní omezování použití nitro-musk sloučenin od 90. let 20. století. Za nedetekovatelný obsah v samotné vodě může být zodpovědná i jejich schopnost podléhat anaerobní metabolizaci (degradaci), schopnost se vázat na přítomné organické částice, případně možnost podléhat fotodegradaci (fotolýze).
- Byl optimalizován analytický postup pro stanovení musk sloučenin v biotické tkáni. Pro tlakovou extrakci (PSE) bylo jako rozpouštědlo zvolen cyklohexan; optimalizovaná teplota extrakce byla 110 °C. Při této teplotě je výtěžnost celého postupu stanovení 78,75 % (pro AHTN-D3), respektive 53,96 % (pro MX-D15). Pro zjišťování výtěžnosti musel být upraven program na GC/MS (zahrnutí kvantifikačních iontů 246 a 294 do režimu SIM). Dále byla optimalizována metoda gelové permeační chromatografie (GPC), která byla použita jako čistící technika (zejména pro odstranění lipidů).
- Byly určeny nejistoty analytických výsledků a opakovatelnost (u stanovení biotické tkáně). Opakovatelnost byla vypočtena v rozmezí 7,53-9,66 %, z čehož vyplývá možnost reprodukovatelnosti metody.
- Byl stanoven obsah tuku v jednotlivých biotických vzorcích (pomocí Soxhletovy extrakce s použitím petroletheru jako rozpouštědla). Obsah tuku ve vzorcích se pohyboval v rozmezí 1,70-16,54 %. Obecně lze za tkáň obsahující velké množství tuku považovat kůži, ovšem i vnitřnosti některých ryb obsahují velké množství tuku. Souvislost mezi množstvím tuku ve tkáni a obsahem musk sloučenin nebyla prokázána.
- Bylo provedeno stanovení sledovaných analytů v reálných biotických vzorcích pomocí optimalizovaného analytického postupu. Zjištěné koncentrace sledovaných analytů se v biotických vzorcích (rybách) pohybovaly v těchto mezích:
 - MX (svalovina): 32,69-430,17 µg/kg ž.v.
 - MX (kůže): nd-312,17 µg/kg ž.v. (nejnižší nalezená koncentrace: 36,99 µg/kg ž.v.)
 - MX (vnitřnosti): nd-358,72 µg/kg ž.v. (nejnižší nalezená koncentrace: 64,81 µg/kg ž.v.)
 - AHTN (svalovina): 89,29-412,29 µg/kg ž.v.
 - AHTN (kůže): 25,07-315,02 µg/kg ž.v.
 - AHTN (vnitřnosti): 185,73-1245,11 µg/kg ž.v.
 - MK (svalovina): nd-152,82 µg/kg ž.v. (nejnižší nalezená koncentrace: 20,17 µg/kg ž.v.)
 - MK (kůže): nd-71,74 µg/kg ž.v. (nejnižší nalezená koncentrace: 19,81 µg/kg ž.v.)
 - MK (vnitřnosti): nd-32,19 µg/kg ž.v. (nejnižší nalezená koncentrace: 19,34 µg/kg ž.v.)

Z výsledků je patrné, že zastoupení sledovaných musk sloučenin v biotických vzorcích je velmi individuální. Zastoupení analytů ovlivňuje nejen druh ryby a typ tkáně, ale také například způsob života dané ryby (obývaná lokalita) a složení stravy. Obecně lze říci, že tonalid (jako představitel polycyklických musk sloučenin) byl nalezen ve všech vzorcích i typech tkání, zatímco nitro-musk sloučeniny (MX, MK) nebyly v řadě případů vůbec detekovány a navíc byly většinou prokazovány v nižších koncentracích. Toto zjištění úzce souvisí s výsledky stanovení sledovaných analytů ve vodě (pomocí SPME), kde byl detekován pouze tonalid. Ze srovnání koncentračních rozmezí výskytu sledovaných analytů ve vodě a biotické tkáni jasně vyplývá schopnost bioakumulace sledovaných musk sloučenin.

Tato diplomová práce svými konkrétními výsledky potvrzuje obecně známá fakta o výskytu musk sloučenin ve vodním ekosystému a dává prostor pro další studie týkající se jejich toxicity, osudu v životním prostředí i expozice obyvatelstva, které přispějí ke konečnému posouzení vlivu musk sloučenin na životní prostředí.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Trepková, E., Vonášek, F.: *Vůně a parfémy – tajemství přitažlivosti*. Praha: MAXDORF s.r.o., 1997. 173 s. ISBN 80-85800-48-9.
- [2] Od posvátné vůně k parfému. *Magazín 2000 záhad*, 2004, roč. 11, č. 18, s. 27-29. ISSN 1211-4928.
- [3] Červený, L.: Syntetické vonné a chuťové látky. *Chemické listy*, 1999, roč. 93, č. 7, s. 412-420. ISSN 0009-2770.
- [4] Groom, N.: *Průvodce parfémy*. Praha: Fortuna Print, 2000. 192 s. ISBN 80-86/44-55-0.
- [5] Bräckleová, I.: *Přírodní kosmetika (30 dní pro krásu)*. Praha: Mladá fronta, 1991. 112 s. ISBN 80-204-0301-9.
- [6] Hlava, B., Starý, F., Pospíšil, F.: *Rostliny v kosmetice*. Praha: ARTIA, 1987. 240 s. ISBN 37-004-87.
- [7] Svět vůní. *100+1 zahraniční zajímavost*, 2006, roč. 43, č. 23, s. 12-15. ISSN 0322-9629.
- [8] Dědek, H.: Medicejská renesance. *Reflex*, 2004, roč. 15, č. 8, s. 42. ISSN 0862-6634.
- [9] Pospěchová, P.: Čas převléknout vůni. *Týden*, 2005, roč. 12, č. 36, s. 84-88. ISSN 1214-0201.
- [10] Vodrážka, Z.: *Biochemie pro studenty středních škol a všechny, které láká tajemství živé přírody*. 1. vyd. Praha: Scientia, spol s r.o., 1998. 161 s. ISBN 80-7183-083-6.
- [11] Záhadný čich. *100+1 zahraniční zajímavost*, 2007, roč. 44, č. 25, s. 30-31. ISSN 0322-9629.
- [12] Michalec, L.: Umění vůně. *Koktejl*, 1997, roč. 6, č. 4, s. 326-332. ISSN 1210-4353.
- [13] Frank, S., Rataj, K., Zukal, R.: *333× jak a proč*. Praha: SVÉPOMOC, 1983. 375 s. ISBN 38-013-83.
- [14] Zych, J.: *Želvy*. Praha: Brázda, s. r. o., 1997. 140 s. ISBN 80-209-0272-4.
- [15] Reichholf-Riehmová, H.: *Hmyz a pavoukovci*. Praha: Knižní klub, 1997. 288 s. ISBN 80-7176-583-X
- [16] Žďárek, J.: *Feromony: Příběh profesora Berlinera* [online]. 2001, poslední revize 1. 3. 2001 [cit. 18. 4. 2009]. Dostupné z: <http://www.rozhlas.cz/vedaarchiv/portal/_zprava/5380>.

- [17] Oakes, J.: *Zlatá kniha parfémů*. 1. vyd. Praha: Dita, 1998. 336 s. ISBN 80-85926-22-9.
- [18] Dědek, H.: Flakóny. *Reflex*, 2004, roč. 15, č. 16, s. 50. ISSN 0862-6634.
- [19] Hajšlová, J., Kocourek, V., Volka, K., Suchánek, M., Böhm, S., Skácel, F., Tomaniová, M., Radová, Z., Holadová, K., Poustka, J., Šetková, L., Suchan, P.: Přehled aktivit realizovaných v rámci projektu MŽP "Monitoring cizorodých látek v potravních řetězcích v ČR", výstupy vybraných pilotních studií. In *Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách a ekosystémech: Sborník příspěvků ze XIV. semináře s mezinárodní účastí, Praha 12.-14. září 2001*. Praha: Ústav chemie a analýzy potravin VŠCHT, Česká společnost chemická, 2001, s. 12-33. ISBN 80-7080-472-6.
- [20] Turin, L., Yoshii, F.: *Structure-odor relations: a modern perspective*. London, Niigata: Dept of Physiology, University College (UK); Graduate School of Science and Technology, Niigata University (Japan) [cit. 20. 5. 2009]. Dostupný z: <http://www.flexitral.com/research/review_final.pdf>.
- [21] Wikipedia: *Triolein* [online]. Last revision 23rd of January 2009 [cit. 5. 5. 2009]. Dostupné z: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Triolein>>.
- [22] Wikipedia: *Musk* [online]. Last revision 17th of April 2009 [cit. 16. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Musk>>.
- [23] Wikipedia: *Musk xylene* [online]. Last revision 7th of April 2009 [cit. 15. 4. 2009]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Musk_xylene>.
- [24] Moore, T.: *Synthesis and fragrance properties of macrocyclic musks* [online]. 2005, last revision 14th of April 2005 [cit. 20. 4 2009]. Dostupný z: <http://chemistry.illinois.edu/research/organic/seminar_extracts/2004_2005/12_Moore_Abstract_SP05.pdf>
- [25] Wikipedia: *Androstenol* [online]. Last revision 22nd of April 2009 [cit. 25. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Androstenol>>.
- [26] Suter-Eichenberger, R.: *Musk xylen: Bioaccumulation, enzyme induction and developmental toxicity*. 1999, Zurich, dissertation thesis, Swiss federal institute of technology Zurich. Dostupné z: <<http://e-collection.ethbib.ethz.ch/eserv/eth:23189/eth-23189-01.pdf>>.
- [27] European Chemicals Agency (ECHA): *Substance name: 5-tert-butyl-2,4,6-trinitro-m-xylene (musk xylene)* [online]. 2008, last revision 8th of October 2008 [cit. 1. 5. 2009]. Dostupné z: <http://echa.europa.eu/doc/candidate_list/svhc_supdoc_muskxylene_publication.pdf>.
- [28] Mottaleb, M. A., Brumley, W. C., Pyle, S. M., Sovocool, G. W.: *Determination of a bound musk xylene metabolite in carp hemoglobin as a biomarker of exposure by gas chromatography mass spectrometry using selected ion monitoring* [online]. 2004, last

- revision 10th of January 2007 [cit. 30. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://www.epa.gov/esd/chemistry/org-anal/reports/carp/carphb.htm>>.
- [29] Kocourek, V., Šetková, L., Hajšlová, J.: Sledování lipofilních kontaminantů ve vybraných profilech Labe a Vltavy technikou SPMD. In *Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách a ekosystémech: Sborník příspěvků ze XIV. semináře s mezinárodní účastí, Praha 12.-14. září 2001*. Praha: Ústav chemie a analýzy potravin VŠCHT, Česká společnost chemická, 2001, s. 98-105. ISBN 80-7080-472-6.
- [30] Liz, B., Monosson, E.: Synthetic musks. *Encyclopedia of Earth* [online]. 2008, 7th of April 2008; last updated 15th of December 2008 [cit. 25. 4. 2009]. Dostupný na www: <http://www.eoearth.org/article/Synthetic_musks>.
- [31] European Union Risk Assessment Report: *5-tert-butyl-2,4,6-trinitro-m-xylene (musk xylene)* [online]. 2005, Luxembourg, series 3rd, volume 55 [cit. 1. 5. 2009]. Dostupné z: <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/muskxylenereport322.pdf>.
- [32] Mottaleb, M. A., Brumley, W. C., Curtis, L. R., S. M., Sovocool, G. W.: *Nitro musk adducts of rainbow trout hemoglobin: Dose-response and toxicokinetics determination by GC-NICI-MS for a sentinel species* [online]. 2004, last revision 25th July 2007 [cit. 1. 5. 2009]. Dostupné z: <<http://www.epa.gov/esd/chemistry/org-anal/reports/musktox/musktox.htm>>.
- [33] Blahová, E.: *Stanovení vybraných "Musk" sloučenin v biotických vzorcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 72 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [34] Schuiling, J., Naald, W.: *Dárek do života - nebezpečné chemikálie v pupečnickové krvi*. Greenpeace Nizozemsko, 2005, 36 s. ISBN 90-73361-87-7.
- [35] Slanina, P.: Vnímání dietárních a environmentálních rizik. In *Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách a ekosystémech: Sborník příspěvků ze XIV. semináře s mezinárodní účastí, Praha 12.-14. září 2001*. Praha: Ústav chemie a analýzy potravin VŠCHT, Česká společnost chemická, 2001, s. 42-45. ISBN 80-7080-472-6.
- [36] Marcinková, A.: *Co způsobuje, že buněčná obrana nefunguje?* [online]. 2008; poslední revize 17. října 2008 [cit. 20. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://www.osel.cz/index.php?clanek=4019>>.
- [37] Gangolli, S.: *Dictionary of Substances and Their Effects* (DOSE, 3rd Electronic Edition). Royal Society of Chemistry, 2005 [cit. 2. 5. 2009]. Electronic ISBN 978-1-59124-667-1. Dostupný z: <http://knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=527&VerticalID=0>.

- [38] OSPAR Commission - *Musk xylene and other musks*. 2004, cit. [2. 5. 2009]. 45 p. ISBN 1-904426-36-0. Dostupné z: <http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/p00200_BD%20on%20musk%20xylene.pdf>.
- [39] Popl, M., Fähnrich, J.: *Analytická chemie životního prostředí*. 4. vyd. Praha: VŠCHT, 1999. 218 s. ISBN 80-7080-336-3.
- [40] Zouhar, L. *Polycyklické aromatické uhlovodíky, jejich toxicita a analytické metody stanovení v objektech životního prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 48 s. Vedoucí bakal. práce prof. RNDr. Lumír Sommer, DrSc.
- [41] Ocelka, T., Kočí, V., Kochánková, L.: *Semipermeabilní membrány – popis perspektivní metodiky monitorování persistentních organických polutantů v povrchových vodách a vodárenských zdrojích* [online]. Cit. 4. 5. 2009. Dostupné z: <<http://ekotoxikologie.sweb.cz/toxlab/knihovna/SPMD1.htm>>.
- [42] Kočí, V., Ocelka, T., Kochánková, L.: *Semipermeabilní membrány – moderní přístup pasivního vzorkování* [online]. Cit. 4. 5. 2009. Dostupné z: <<http://ekotoxikologie.sweb.cz/toxlab/knihovna/SPMD2.htm>>.
- [43] Mareš, J.: *Stanovení vybraných „Musk“ sloučenin v kalech z čistíren odpadních vod*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2006. 79 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [44] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [45] EPA 1998: *Method 3545A (SW-846): Pressurized Fluid Extraction (PFE)* [online]. 2007, last revision February 2007 [cit. 15. 4. 2009]. Dostupné z: <<http://www.epa.gov/sam/pdfs/EPA-3545a.pdf>>.
- [46] Sommer, L.: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 348 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [47] Štěpán, R.: *Rezidua moderních pesticidů a jejich degradační produkty / metabolity v potravinářských surovinách a produktech*. Praha, 2005. 170 s., 3 s. příloh. Disertační práce na Fakultě potravinářské a biochemické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze na Ústavu chemie a analýzy potravin. Vedoucí disertační práce Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.
- [48] Mapa: <http://www.amapy.atlas.cz> (2008).
- [49] Přednášky z předmětu: *Environmentální analýza* (VUT, FCH, 2008). Dostupné z: <<https://www.vutbr.cz/elearning/>>.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AED	atomový emisní detektor
AFID	plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem
AHTN	tonalid
AHTN-D3	deuterovaný tonalid
AMX	amino-musk xylen
ASE	technika zrychlené extrakce rozpouštědlem
CAS	identifikační číslo sloučeniny podle „Chemical Abstracts Service“
CI	chemická ionizace
ČOV	čistička odpadních vod
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECD	detektor elektronového záchytu
EI	elektronová ionizace
EPA	americká organizace: Environmental Protection Agency
ESI	elektrosprej
EU	Evropská unie
FAB	ionizace urychlenými atomy
FI	ionizace polem
FID	plamenový ionizační detektor
FMW	fokusovaná extrakce pomocí mikrovln (otevřený systém)
GC	plynová chromatografie
GLC	plynová rozdělovací chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
GSC	plynová adsorpční chromatografie
Hb	hemoglobin
HHCB	galaxolid
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
HRMS	analyzátor s dvojitou fokusací
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IT	iontová past
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
KK	kalibrační křivka
K_{ow}	rozdělovací koeficient n-oktanol / voda
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti (kvantifikace)
MAE	extrakce pomocí mikrovln (uzavřený systém)
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MASE	mikrovlnná extrakce s použitím rozpouštědla
MK	musk keton
MS	hmotnostní spektrometrie
MUSK	syntetické vonné sloučeniny
MX	musk xylen
MX-D15	deuterovaný musk xylen
MXR	multi-xenobiotická rezistence
nd	nedetekováno (pod mezí detekce)

NOEC	nejvyšší koncentrace nezpůsobující pozorovatelný účinek na organismus
LD ₅₀	letální dávka, při které zahyne 50 % testovaných organismů
OCP	organochlorované pesticidy
PCB	polychlorované bifenyly
PCDDs	polychlorované dibenzo-p-dioxiny
PCDFs	polychlorované dibenzofurany
PDMS	polydimethylsiloxan
PFE	technika zrychlené extrakce rozpouštědlem
PID	fotoionizační detektor
PLOT	kolona s vrstvou pevného sorbentu na vnitřní stěně
POPs	perzistentní organické polutanty
PSE	technika zrychlené extrakce rozpouštědlem
pTDI	předběžný tolerovatelný denní příjem
Q	kvadrupól
RP	rozlišovací schopnost
SAPŽ	syntetické analogy pižma
SCAN	režim hmotnostního analyzátoru pro snímání celého spektra
SCOT	kolona s kapalnou stacion. fází zakotvenou na povrchu pevného nosiče
SEC	chromatografie stérické vyluky
SFE	extrakce tekutinou v nadkritickém stavu
SIM	režim hmotnostního analyzátoru pro monitorování vybraných iontů
SPE	extrakce pevnou fází
SPMD	vzorkovač na principu membránové extrakce
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TCD	tepelně vodivostní detektor
TNT	trinitrotoluen
TOF	průletový analyzátor
TSI	thermosprej
UV záření	ultra-fialové záření
WCOT	kolona s kapalnou stacionární fází
ŽP	životní prostředí

8. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I Brněnská přehrada se značenými místy odběru vody pro SPME [48]

9. PŘÍLOHY

Příloha I

