

VYUŽITÍ MIKROEXTRAKCE NA TUHOU FÁZI PRO STANOVENÍ LINEÁRNÍCH MUSK SLOUČENIN

PETRA KOMÁRKOVÁ^a, MILADA VÁVROVÁ^b,
ZUZANA KRÁLOVÁ^a, ALICE JÍROVÁ^a
a KATEŘINA JÁROVÁ^a

^a Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, ^b Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno
komarkovap@seznam.cz

Došlo 21.11.13, přepracováno 24.4.14, přijato 20.11.14.

Klíčová slova: mikroextrakce na tuhou fázi, GC-MS, musk sloučeniny, odpadní voda

Úvod

Syntetické musk sloučeniny začaly být používány jako alternativa drahého přírodního pižma a zahrnují širokou škálu strukturně heterogenních sloučenin¹. Ve značné míře jsou používány jako vonné přísady do různých produktů osobní péče a do čistících prostředků. V současnosti je zaznamenáván hojný výskyt těchto látek v životním prostředí², především ve vodním ekosystému. Kontaminace všech složek vodního ekosystému, tj. vody, sedimentu i bioty, se již stala závažným problémem i z hlediska ekotoxicity³.

Musk sloučeniny jsou považovány za nové mikropolutanty⁴. Některé z nich jsou díky svým vlastnostem, tj. především perzistenci v prostředí, významnému bioakumulačnímu potenciálu a toxickým účinkům na vodní organismy, často zařazovány mezi perzistentní organické polutanty^{5,6}. Toxicita byla hodnocena především u nitro- a polycyklických musk sloučenin. Akutní toxicita posuzovaných musk sloučenin je nízká, hodnoty LD₅₀ se u hlodavců pohybují v jednotkách g kg⁻¹. Musk ambrette vykazuje fototoxické a neurotoxické účinky, musk xylen indukuje tvorbu jaterních nádorů u myši^{7,8}. U musk xyleny, musk ketonu, galaxolidu a tonalidu byla potvrzena toxicita pro vodní organismy⁹. Estrogenní efekt polycyklických musk sloučenin byl prokázán v *in vitro* testech s drápatkou vodní (*Xenopus laevis*) a pstruhem duhovým (*Onchorynchus mykiss*). Galaxolid a tonalid se řadí mezi potencionální endokrinní disruptory^{10,11}.

Musk sloučeniny jsou pravidelně detegovány v odpadních vodách, které tak znamenají konstantní expoziční zdroj těchto látek. V nízkých koncentracích se nacházejí

v ovzduší a prachu. Popsány byly rovněž v tukové tkáni, krvi a mateřském mléce¹².

Na základě fyzikálně-chemických vlastností se syntetické vonné látky rozdělují do čtyř skupin: nitro, polycyklické, makrocyclické a alicyklické musk sloučeniny¹³. Skupina nitromusk sloučenin se skládá ze substituovaných dinitro- a trinitro- benzenových derivátů s alkyl-, keto- nebo methoxyskupinou. K hlavním zástupcům této skupiny syntetických vonných látek patří musk xylen a musk keton^{14,15}. Vzhledem k jejich toxicitě a molekulární nestabilitě se začalo od jejich produkce ustupovat a postupně byly tyto sloučeniny nahrazovány polycyklickými musk sloučeninami¹⁶.

Strukturním prvkem všech polycyklických musk sloučenin je indanový nebo tetralinový skelet, který je substituovaný především methylovými skupinami¹⁷. Nejčastěji detegovanými sloučeninami z této skupiny jsou galaxolid a tonalid¹⁸. Přírodním pižmovým sloučeninám jsou svoji strukturou nejbližší makrocyclické mošusové látky, které jsou tvořeny velkými kruhy ketonů nebo laktonů¹⁹. Alicyklické musk sloučeniny, známé také jako lineární musk sloučeniny nebo cykloalkylestery, jsou relativně novou skupinou syntetických mošusových látek. Hlavním důvodem jejich syntézy byla snaha zamezit vysoké produkci nedegradabilních a bioakumulativních látek, jakými jsou nitro- a polycyklické musk sloučeniny²⁰.

SPME (solid-phase microextraction, mikroextrakce na tuhou fázi) je extrakční technika navržená J. Pawliszynem v roce 1989. Jedná se o techniku, která má mnoho výhod; je jednoduchá, praktická, bez použití rozpouštědel, přesto však je dostatečně citlivá pro stanovení stopových množství kontaminantů, které jsou v životním prostředí přítomny na úrovni nižší než ng kg⁻¹ (ng l⁻¹). SPME v podstatě představuje spojení extrakce, zakonzentrování a čištění do jednoho kroku. Z tohoto důvodu se snižuje riziko ztrát analytů, které je jinak běžné u tradičních extrakčních metod, jako je např. extrakce z kapaliny do kapaliny. Navíc byla metoda SPME již plně automatizována, takže je vhodná i pro rutinní analýzy²¹.

Pečlivý výběr a optimalizace všech extrakčních podmínek, jako je typ vlákna, teplota a doba extrakce, míchání vzorku, objem vzorku, objem head-space prostoru, přidávek soli nebo úprava pH, vedou ke zvýšení citlivosti a reprodukovatelnosti této metody. Obecně platí, že optimální teplota závisí na složení matrice a použité stacionární fázi. Čas a teplota jsou parametry spolu úzce související, např. zvýšení teploty umožní kratší expoziční čas, čímž se urychlí celkový čas analýzy. Přídavek soli zvýší účinnost extrakce snížením rozpustnosti analytů ve vzorku, což má za následek zvyšující se množství analytů sorbovaných na vlákno²².

HS-SPME (head-space SPME) je komplexní multifázový rozdělovací systém, ve kterém je dosahováno rovnováhy ve dvou systémech, a to mezi matricí vzorku a plynným prostorem nad vzorkem a mezi prostorem nad vzorkem a stacionární fází. HS-SPME metoda je ve velké míře používána pro stanovení těkavých a polotěkavých organických sloučenin přítomných v různých maticích.

Ve spojení s GC a HPLC byla tato metoda použita pro analýzu látek ve vnitřním ovzduší, ve spodních vrstvách troposféry, průmyslových exhalacích a lidském dechu, dále také ve vodě a biologických vzorcích (rostlinných a živočišných tkáních a organech, mikroorganismech a v krvi)²³.

Cílem předložené studie bylo stanovení vybraných zástupců lineárních musk sloučenin ve vzorcích odpadní vody pocházející z čistírny odpadních vod (ČOV) Veterinární a farmaceutické univerzity Brno a posouzení účinnosti čistícího procesu používaného na této ČOV.

Experimentální část

Používané přístroje a zařízení

SPME držák pro manuální vzorkování (Supelco, Bellefonte, USA), SPME vlákna (Supelco, Bellefonte, USA): 65 μm Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen (PDMS/DVB), 100 μm Polydimethylsiloxan (PDMS), 50/30 μm Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS), 85 μm Polyakrylát, 7 μm Polydimethylsiloxan (PDMS); plynový chromatograf GC Agilent 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), hmotnostní detektor MSD 5973N (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Chemikálie a standardy

Cyklohexan a aceton v čistotě pro plynovou chromatografii (Merck, Darmstadt, Německo), chlorid sodný p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), standardy lineárních musk sloučenin (AROMA Praha, a.s., ČR): dihydromyrcenol (100 %), cyklohexylethylacetát (100 %), arofir (100 %), cyclacet/jasmocyclen (100 %).

Vzorky

Vzorky odpadní vody byly odebírány na ČOV situované v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno v období od 4. 2. do 13. 2. 2013. Odběr probíhal v pravidelných časových intervalech a představoval 24hodinové slévané vzorky odebrané na přítoku i na odtoku. Vzorky byly odebírány do speciálně vyčištěných vzorkovníků z hnědého skla o objemu 0,5 l. Po odběru z ČOV byly vzorky neprodleně analyzovány v laboratoři. V případě, že nebylo možné provádět analýzu ihned, byly vzorky uchovávány při teplotě 4 °C, nejdéle však po dobu 24 hodin.

Pracovní postupy

Příprava roztoků

Z jednotlivých standardů lineárních musk sloučenin byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ rozpuštěním v cyklohexanu. Z uvedených roztoků byl následně připraven směsný zásobní roztok rozpuštěním

v acetonu, ze kterého byla postupným ředěním připravena 6bodová kalibrační přímka. Koncentrace jednotlivých standardů byly voleny tak, aby jejich odezvy odpovídaly předpokládané koncentraci v reálných vzorcích.

Mikroextrakce na tuhou fázi

Metoda SPME byla prováděna tak, že do skleněných extrakčních patron o objemu 22 ml byly předem naváženy 3 g chloridu sodného a poté bylo přidáno 14 ml neředěného a nefiltrovaného vzorku odpadní vody. Extrakční patrony byly uzavřeny PTFE septem a ponořeny do vodní lázně o teplotě 50 °C. Vzorky byly předmíchávány po dobu 5 min, přičemž SPME jehla se již nacházela v head-space prostoru; poté bylo SPME vlákno (65 μm PDMS/DVB) vysunuto a následně probíhala po dobu 30 min extrakce. Po uplynutí této doby bylo vlákno vsunuto do dávkovače plynového chromatografu a proběhla vlastní analýza. Pro kvantifikaci analytů byla použita metoda standardního přídatku. Objem standardního přídatku byl 100 μl pro vzorek odpadní vody na přítoku a 50 μl pro vzorek odpadní vody na odtoku. Koncentrace jednotlivých standardů byla následující: dihydromyrcenol 60 ng ml^{-1} , cyklohexylethylacetát 5 ng ml^{-1} , arofir 0,2 ng ml^{-1} , cyclacet/jasmocyclen 1 ng ml^{-1} .

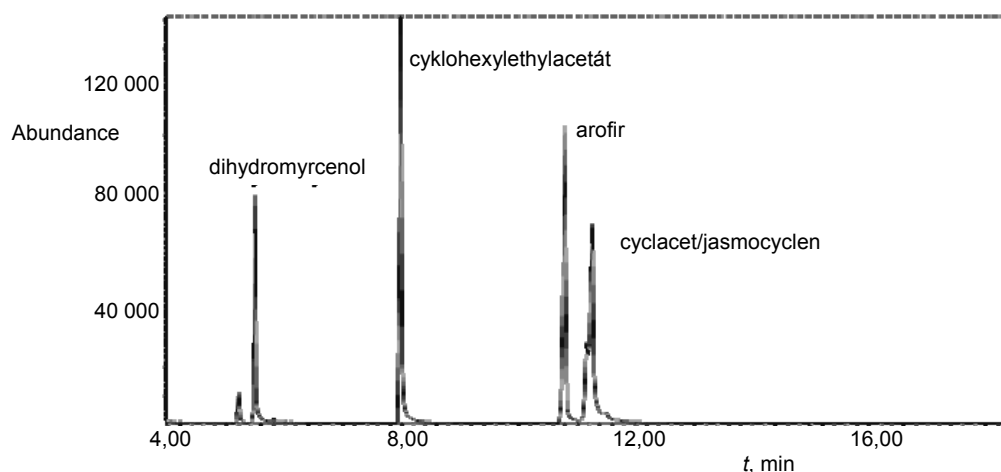
Plynově-chromatografická analýza

Identifikace a kvantifikace analytů byla prováděna na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem. Pro separaci byla použita kapilární kolona DB-5MS (20 m \times 0,18 mm \times 0,18 μm , J. & W. Scientific, Folsom, CA, USA). Podmínky GS-MS byly optimalizovány na pracovišti, kde se prováděly analýzy a následně byly publikovány²⁴; v rámci této studie byl optimalizován pouze teplotní program. Použité parametry GC-MS analýzy byly následující: teplota dávkovače 250 °C, splitless mód; konstantní průtok nosného plynu He (0,8 ml min^{-1}); teplotní program 50 °C (3 min), 15 °C min^{-1} do 80 °C (0 min), 5 °C min^{-1} do 120 °C (5 min), 20 °C min^{-1} do 280 °C (1 min); celkový čas analýzy 27 min. Analyty byly kvantifikovány za následujících podmínek: elektronová ionizace při 70 eV, teplota iontového zdroje 230 °C, teplota kvadrupolu 150 °C, režim SIM (m/z 59 pro dihydromyrcenol, 81 pro cyklohexylethylacetát, 71 pro arofir a 66 pro cyclacet/jasmocyclen).

Výsledky a diskuse

Optimalizace mikroextrakce na tuhou fázi

Výběr vlákna je jedním z nejdůležitějších parametrů metody SPME. Při výběru bylo k dispozici pět typů vláken s rozdílnými stacionárními fázemi: 65 μm Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen (PDMS/DVB), 100 μm Polydimethylsiloxan (PDMS), 50/30 μm Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS), 85 μm Polyakrylát, 7 μm Polydimethylsiloxan (PDMS). Pro každé



Obr. 1. Chromatogram směšného standardu

vlákno bylo porovnáváno provedení head-space (HS) a přímé ponoření (DI). Postup byl podrobně popsán v metodické části. Bylo prokázáno, že u všech použitých typů vláken byly získány mnohem lepší výsledky při HS. Pro následné analýzy bylo vybráno vlákno PDMS/DVB, které poskytlo nejvyšší odezvy. Při porovnání vhodnosti SPME vláken byly podmínky sorpce i desorpce pro všechny typy vláken shodné.

Rovněž byl sledován vliv vysolování. Byla porovnávána účinnost extrakce při HS provedení pro všechna vlákna s přidavkem a bez přidavku soli. Téměř u všech analytů měl přidavek soli ke vzorku významný vliv a docházelo ke zvýšení odezev. Přidavek soli pravděpodobně zvyšuje iontovou sílu roztoku, čímž se snižuje rozpustnost analytů a zvyšuje se jejich rovnovážná koncentrace v plynné fázi.

Pro určení nejvhodnější teploty sorpce byla sledována teplotní řada 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 °C. Se zvyšující se teplotou docházelo k nárůstu odezev, které se zvyšovaly až do 50 °C. Při 100 °C už bylo průkazné výrazné snížení odezev u všech analytů. Po porovnání všech ukazatelů souvisejících se zvyšováním teploty byla jako nejvhodnější zvolena teplota sorpce 50 °C.

Doba vhodná k dosažení rovnováhy mezi matricí vzorku a vláknem je posledním parametrem, který bylo třeba optimalizovat. Testovaná řada byla následující: 10, 20, 25, 30, 40, 50 a 60 minut. Odezvy stoupaly s rostoucím časem sorpce u všech analytů do 30 min. Jako optimální čas sorpce byla proto zvolena doba 30 min (obr. 1).

Stanovení musk sloučenin v odpadní vodě

Vyhodnocením výsledků analýz reálných vzorků bylo zjištěno, že během desetidenního vzorkování byly detegovány a kvantifikovány všechny lineární musk sloučeniny na přítoku na ČOV, zatímco na odtoku z ČOV už nebyly prokázány všechny posuzované analyty. Nejvyšších koncentrací na přítoku dosahoval po celou dobu vzorkování dihydromyrcenol, maximální zjištěná hodnota byla cca 3 $\mu\text{g l}^{-1}$. U ostatních analytů byly hodnoty výrazně nižší, pohybovaly se v rozmezí desetin až tisícín $\mu\text{g l}^{-1}$. Na odtoku byl ze všech vzorků odpadní vody kvantifikován pouze ve dvou případech cyclacet/jasmocyclen, žádný jiný analyt nebyl v průběhu celého sledování na odtoku kvantifiko-

Tabulka I

Průměrné koncentrace sledovaných musk sloučenin na přítoku a na odtoku z ČOV

Analyt	Přítok [$\mu\text{g l}^{-1}$]			Odtok [$\mu\text{g l}^{-1}$] ^a		
	minimum	maximum	průměr	minimum	maximum	průměr
Dihydromyrcenol	0,346	3,008	1,208	<LOD	<LOQ	<LOQ
Cyklohexylethylacetát	0,001	0,117	0,026	<LOD	<LOD	<LOD
Arofir	0,001	0,034	0,008	<LOD	<LOQ	<LOQ
Cyclacet/jasmocyclen	0,002	0,319	0,075	<LOD	0,002	0,188

^a<LOD – pod mezí detekce, <LOQ – pod mezí kvantifikace

Tabulka II
Charakteristiky metody SPME ve spojení s GC-MS

Analyt	LOD ^a [ng l ⁻¹]	LOQ ^b [ng l ⁻¹]	R ² ^c	Opakovatelnost RSD [%]
Dihydromyrcenol	0,49	1,64	0,9926	5,64
Cyklohexylethylacetát	0,26	0,85	0,9923	5,70
Arofir	0,29	0,97	0,9904	7,26
Cyclacet/jasmocyclen	0,38	1,27	0,9928	6,28

^a LOD – limit detekce, ^b LOQ – limit kvantifikace, ^c R² – koeficient determinace

ván. Cyklohexylethylacetát nebyl na odtoku detegován žádný den. Dihydromyrcenol a arofir byly v některých případech na odtoku detegovány, nebyly ale kvantifikovány, protože se nacházely pod mezí kvantifikace. Minimální, maximální a průměrné koncentrace sledovaných analytů na přítoku a na odtoku jsou uvedeny v tab. I.

Na podkladě získaných dat byla vyhodnocena účinnost čistícího procesu příslušné ČOV. U všech analytů, s výjimkou cyclacet/jasmocyclenu, bylo dosaženo účinností odstranění nad 99 %. U cyclacet/jasmocyclenu se účinnost odstranění pohybovala v rozmezí 49,20–99,50 %. Rozmezí účinnosti je sice vysoké, ale zjištěná množství jsou v souladu s používanými komerčními přípravky obsahujícími sledované musk sloučeniny. Opakovatelnost použité analytické metody byla hodnocena pomocí relativní směrodatné odchylky. Její hodnoty, spolu s hodnotami LOD, LOQ a koeficientu determinace, jsou uvedeny v tab. II.

Závěr

V předložené studii byl hodnocen výskyt vybraných zástupců lineárních musk sloučenin v odpadních vodách. Současně byl posuzován také vliv čistírny odpadních vod na vodní ekosystém, který byl hodnocen na základě účinnosti odstranění sledovaných analytů z odpadní vody. Lineární musk sloučeniny jsou chemické sloučeniny, které v posledních letech nahrazují dříve používané nitro- a polycyklické syntetické vonné látky. Hlavním důvodem jejich aplikace je jejich snazší odstranění ze složek životního prostředí. Bylo prokázáno, že čistírna odpadních vod Veterinární a farmaceutické univerzity Brno je schopná tyto látky z odpadní vody odstranit, v důsledku čehož se dále nedostávají do životního prostředí a nemohou tak následně negativně působit na živé organismy. Výsledky rovněž prokázaly, že syntetické vonné látky se vyskytují téměř ve všech složkách životního prostředí, a proto je nutné tuto skupinu látek neustále sledovat.

Tato práce byla podpořena projektem IGA VFU Brno č. 21/2013/FVHE.

LITERATURA

- Roosens L., Covaci A., Neels H.: *Chemosphere* 69, 1540 (2007).
- Yin J., Wang H., Zhang J., Zhou N., Gao F., Wu Y., Xiang J., Shao B.: *Chemosphere* 87, 1018 (2012).
- Villa S., Assi L., Ippolito A., Bonfanti P., Finizio A.: *Sci. Total Environ.* 416, 137 (2012).
- Chase D. A., Karnjanapiboonwong A., Fang Y., Cobb G. P., Morse A. N., Anderson T. A.: *Sci. Total Environ.* 416, 253 (2012).
- Duedahl-Olesen L., Cederberg T., Pedersen K. H., Højgård A.: *Chemosphere* 61, 422 (2005).
- Regueiro J., Garcia-Jares C., Llompert M., Lamas J. P., Cela R.: *J. Chromatogr. A* 1216, 2805 (2009).
- Christian M. S., Parker R. M., Hoberman A. M., Diener R. M., Api A. M.: *Toxicol. Lett.* 111, 169 (1999).
- Steinberg P., Fischer T., Arand M., Park E., Elmadfa I., Rimkus G., Brunn H., Dienes H. P.: *Toxicol. Lett.* 111, 151 (1999).
- Doležalová Weissmannová H., Štěpánková I., Vávrová M., Lapčíková A.: *Chem. Listy* 107, 172 (2013).
- Shek W. M., Murphy M. B., Lam J. C. W., Lam P. K. S.: *Mar. Pollut. Bull.* 57, 373 (2008).
- Bitsch N., Dudas C., Körner W., Failing K., Biselli S., Rimkus G., Brunn H.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 257 (2002).
- Hutter H. P., Wallner P., Moshhammer H., Hartl W., Sattelberger R., Lorbeer G., Kundi M.: *Sci. Total Environ.* 407, 4821 (2009).
- Arbulu M., Sampedro M. C., Unceta N., Gómez-Caballero A., Goicolea M. A., Barrio R. J.: *J. Chromatogr. A* 1218, 3048 (2011).
- Schmeiser H. H., Gminski R., Mersch-Sundermann V.: *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 293 (2001).
- Sommer C.: *Handb. Environ. Chem.* 3, 1 (2004).
- Rimkus G. G.: *Toxicol. Lett.* 111, 37 (1999).
- Ricking M., Schwarzbauer J., Hellou J., Svenson A., Zitko V.: *Mar. Pollut. Bull.* 46, 410 (2003).
- Bester K.: *J. Chromatogr. A* 1216, 470 (2009).
- Sumner N. R., Guitart C., Fuentes G., Readman J. W.: *Environ. Pollut.* 158, 215 (2010).

20. Eh M.: Chem. Biodiversity. 12, 1975 (2004).
21. Rianawati E., Balasubramanian R.: Phys. Chem. Earth 34, 857 (2009).
22. Balasubramanian S., Panigrahi S.: Food Bioprocess Technol. 4, 1 (2011).
23. Kotowska U., Zalikowski M., Isidorov V. A.: Environ. Monit. Assess. 184, 2893 (2012).
24. Zouhar L., Vávrová M., Mravcová L., Kubičková K., Večerek V.: Fresenius Environ. Bull. 21, 3352 (2012).

P. Komárková^a, M. Vávrová^b, Z. Králová^a, A. Jírová^a, and K. Járová^a (^a Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno; ^b Department of Chemistry and Technology of Environmental Protection, University of Technology Brno): **Utilization of Solid-Phase Microextraction in Determination of Linear Musk Compounds**

This study is focused on the determination of four linear musk compounds in wastewater. Solid phase microextraction was used for isolation of the analytes and GC-MS for the detection and quantification of analytes.



VŠCHT PRAHA

**pátek 25. 9. 2015
od 17:00 do 22:00 hod.
Technická 3, Praha 6**



Noc vědců 2015 opět na VŠCHT Praha

Letos stejně jako v předchozích letech se i VŠCHT Praha připojuje k celoevropské Noci vědců, která se tematicky váže k Mezinárodnímu roku světla a světelných technologií vyhlášenému OSN.

Na VŠCHT Praha se můžete těšit na ukázky zajímavých experimentů, celý večer přednášek a diskuzí, při nichž se nejen dozvíte něco zajímavého a nového, ale zároveň se i pobavíte.

Letošní přehlídka se na VŠCHT Praha nese v duchu názvu

„Budiž noc a budiž světlo!“

Na populárně naučných přednáškách, které začínají každou celou hodinu od 17 do 21 hodin, se návštěvníci dozvědí, kde všude v běžném životě se mohou potkat s chemo- či fotoluminiscencí (a co to vlastně je) a další zajímavosti ze světa chemie. Ti nejmladší si u stánku našeho dětského koutku „Zkumavka“ budou moci vlastnoručně vyrobit lampičku. Pro všechny věkové kategorie jsou připraveny drobné dárky, ti starší budou moci ochutnat naše vlastní pivo Lachout, protože uvařit dobré pivo je také věda!

Noc vědců je tradiční celoevropskou akcí, při níže se čtvrtý zářijový pátek otevírají pracoviště různých vědeckých institucí, laboratoří i vysokých škol. Studenti i vědci přibližují návštěvníkům vědu z populárnější stránky, ukazují, kde její výsledky pomáhají a dávají lidem „z ulice“ možnost popovídat si s vědci samotnými.

Akce je určena všem bez rozdílu věku a vstup na akci je zdarma.

Věříme, že Vás pro vědu nadchneme stejně, jako v předchozích letech!

Program a další informace na
<http://www.noc-vedcu.cz/>.

Kontakt VŠCHT Praha: Ing. Hana Bartková, PhD.,
hana.bartkova@vscht.cz

