

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie

Klinická a toxikologická analýza

---

**FYTOEXTRAKCE A ANALÝZA TONALIDU  
VE VODNÝCH ROZTOCÍCH**

**Diplomová práce**

Praha 2007

Jana Hladká

---

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 26. 4. 2007

.....*Jana Kloučková*.....  
podpis

---

## Předmětová a klíčová slova

Předmětová slova: Organická chemie

HPLC

SPE

Klíčová slova: Mošusové látky

Tonalid

PPCPs

Fytoextrakce

---

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli Doc. Ing. Stanislavovi Smrčkovi, CSc. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad, dále spolupracovníkům z laboratoře za všestrannou pomoc. Také děkuji rodině a přátelům.

---

## Obsah

Předmětová a klíčová slova .....	3
Poděkování.....	4
Obsah .....	5
Seznam zkratek a symbolů.....	7
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2 TEORETICKÝ ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Charakteristika mošusových látek .....</b>	<b>10</b>
2.1.1 PPCPs.....	10
2.1.2 Dělení mošusů.....	11
2.1.2.1 Tonalid .....	13
<b>2.2 Koncentrace mošusových látek v čisticích prostředcích .....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Produkce a použité množství detergentů.....</b>	<b>14</b>
<b>2.4 Měřené koncentrace mošusových látek v životním prostředí.....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Toxikologie.....</b>	<b>15</b>
2.5.1 Zjištěné toxikologické hodnoty pro krysy .....	15
2.5.2 Dráždivost/citlivost.....	16
<b>2.6 Ekologické informace .....</b>	<b>16</b>
<b>2.7 Endokrinní systém .....</b>	<b>16</b>
2.7.1 Endokrinní dysharmonizátory – endocrine disruptors.....	17
<b>2.8 Rozklad mošusových látek v ekosystému .....</b>	<b>17</b>
<b>2.9 Metabolismus.....</b>	<b>18</b>
2.9.1 I. Fáze biotransformace – derivatizace .....	19
2.9.1.1 Cytochromy P-450 .....	20
2.9.1.2 Peroxidasy.....	20
2.9.2 II. Fáze biotransformace - konjugace.....	21
2.9.2.1 Konjugace se sacharidy.....	21
2.9.2.2 Konjugace s malonátem.....	21
2.9.2.3 Konjugace s glutathionem.....	21
2.9.3 III. Fáze – kompartmentace .....	22
<b>2.10 Fytoremediace .....</b>	<b>22</b>
2.10.1 Metody fytoremediace .....	23
2.10.1.1 Fytoextrakce.....	23
2.10.1.2 Rhizofiltrace.....	23
2.10.1.3 Fytodegradace .....	24

---

2.10.1.4	Fytovolatilizace.....	25
2.10.2	Techniky remediace.....	25
2.10.2.1	Fyzikální metody <i>ex-situ</i> .....	25
2.10.2.2	Chemické metody <i>ex-situ</i> .....	26
2.10.2.3	Fyzikální metody <i>in-situ</i> .....	26
2.10.2.4	Chemické metody <i>in-situ</i> .....	26
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>29</b>
4.1	Použité materiály a přístroje.....	29
4.2	Chromatografická analýza komerčních parfémů a tonalidu.....	30
4.3	Extrakce tonalidu z roztoků – kultivačních médií.....	30
4.4	Extrakce tonalidu pomocí SPE.....	31
4.5	Příprava rostlinného materiálu.....	32
4.6	Fytoextrakce tonalidu rostlinami kukuřice.....	33
4.7	Příprava jodtonalidu pro účely získání [ <sup>3</sup> H]tonalidu.....	34
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>43</b>

---

## Seznam zkratk a symbolů

ADBI	celestolid
AETT	versalid
AHMI	phantolid
AHTN	tonalid
AITI	traseolid
ATP	adenosintrifosfát
BPA	bisfenol – A
DEP	diethylftalát
DMSO	dimethylsulfoxid
EC50	efektivní koncentrace, při které reaguje 50 % jedinců ze souboru
FELS test	Fish Early Live Stage test – test raného stadia života ryb
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HHCB	galaxolid
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRIPT	Human Repeat Insult Patch Test – opakovaný test citlivosti lidského těla na testovanou látku
IC50	inhibiční koncentrace, která způsobí 50% inhibici účinnosti sledovaného enzymu
LD50 (LC50)	lethální dávka (koncentrace), při které zahyne 50 % jedinců z testovaného souboru
MFO	Mixed Function Oxidases, monooxygenasy se smíšenou funkcí
MS	označení kultivačního média
NOAEL	No Observable Adverse Effect Level, koncentrace, při které ještě není pozorován žádný nežádoucí účinek
NOEL	No Observable Effect Level, koncentrace, při které ještě není pozorovatelný účinek
PAH	polyaromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované uhlovodíky

---

PPCPs	Pharmaceutical and Personal Care Products, farmaceutické produkty a přípravky pro osobní potřebu
PVC	polyvinylchlorid
SPE	Solid Phase Extraction – extrakce tuhou fází
TCE	trichlorethylen
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TPH	ropné látky
UV	ultrafialový



---

# 1 Úvod

Velmi aktuálním problémem v současné době je znečištění životního prostředí. Koncentrace kontaminantů v prostředí se v důsledku lidské činnosti neustále zvyšuje, neboť chemický průmysl produkuje různé druhy výrobků běžné spotřeby vhodné k praní, k dezinfekci, k ochraně proti škůdcům či produkty vhodné k udržování osobní hygieny. I když jsou tyto látky většinou velmi účinné, jsou také nebezpečné pro vyšší organismy, mnohé z jejich komponent se totiž kumulují v ekosystému a vykazují určitou biologickou aktivitu.

Používání vonných substancí typu mošusových látek, které se hojně přidávají do výrobků spotřební chemie jako parfemační složky, je jedním z vážných problémů. Tyto látky přecházejí především z pracích prášků do odpadních vod a nejsou odstranitelné v současně provozovaných čistírnách odpadních vod a to ani v biologickém stupni. Jejich nebezpečí spočívá především v jejich estrogenní aktivitě a v současné době jsou považovány za jeden z faktorů, který ovlivňuje reprodukci ryb v říčních aquasystémech. Z tohoto důvodu byly tyto látky zařazeny na seznam sledovaných kontaminantů v povrchových vodách jak v ČR tak v EU a celosvětovém měřítku (Environmental Protection Agency). Sledování jejich osudu ve vodách, řasách a rostlinách se stalo důležitým ekologickým úkolem stejně tak jako metody jejich monitorování.

---

## 2 Teoretický úvod

### 2.1 Charakteristika mošusových látek

Vonné látky a extrakty jsou používány v mnoha výrobcích spotřební chemie jako např. v mýdlech, krémech, detergencích, kosmetice a pracích práscích. Parfémové složky jsou užívány za účelem odstranění zápachu či vnesení příjemné vůně na ošetřované povrchy, některé z parfémových substancí, extraktů koření a bylin slouží i jako vůně s antibakteriálním či repelentním účinkem. Do detergentů jsou vonné substance přidávány za účelem získání příjemné vůně oděvů, maskuje se tak nepříjemný pach dalších přísad v produktech a špíny v promývací vodě. Nepřispívá se tak k dosažení vyšší čistící kvality, ale estetického dojmu. Mnoho spotřebitelů spojuje vůni s čistotou, a tak se dá soudit, že výkon praní s vůní úzce souvisí.

Mošusové látky jsou důležitou přísadou vonných látek nejen kvůli typické a jedinečné vůni, která do značné míry určuje vlastní vůni produktu, ale řada z nich má pozitivní účinek i na kvalitu vůně. Mošusy jsou velmi málo rozpustné ve vodě, mají nízkou těkavost a vysokou rozpustnost v organických rozpouštědlech, vysoká lipofilita rovněž umožňuje hladký přestup do biologických tkání [1].

#### 2.1.1 PPCPs

PPCPs (pharmaceutical and personal products) představují různorodou skupinu chemikálií a chemických kompozic, která je široce využívána a produkuje specifické kontaminanty aquasystému, hlavně v hustě obydlených oblastech [2]. Mezi tyto produkty řadíme např. léky volně prodejné i léky na předpis, tenzidy a polycyklické sloučeniny používané často jako vonná substance v parfémích a čistících prostředcích. PPCPs se ve vyspělých zemích široce využívají a jejich vstup do ekosystému se děje prostřednictvím komunálních odpadních vod, kde byly tyto látky jednoznačně detekovány [3]. Vzhledem k nízkým koncentracím a specifickým metabolickým vlastnostem nejsou většinou kompletně odstranitelné ani moderními čistírnami odpadních vod [4].

---

### 2.1.2 Dělení mošusů

Mošusové látky jsou různého typu: nitromošusy, makrocyclické a polycyclické mošusy. Přírodní mošus je získán ze žláz vzácného druhu jelena Kabara pižmového (*Moschus moschiferus*) a ze žláz Ondatry pižmové (*Ondatra zibethicus*). Vonnou substancí přírodního pižma je hlavně muskon (makrocyclický mošus) a muskopyridin (makrocyclický pyridin). Přírodní pižmo je velmi drahé a dostupné jen v omezeném množství. Kabar pižmový patří k ohroženým druhům, proto jsou syntetická pižma často používaná jako levnější náhrada pro vonné složky parfémů, krémů, čistících prostředků, mýdel, detergentů a běžných toaletních přípravků [5]. V Tab. 2.1 jsou znázorněny příklady syntetických mošusových látek [1].

Tab. 2.1: Příklady syntetických mošusových látek.

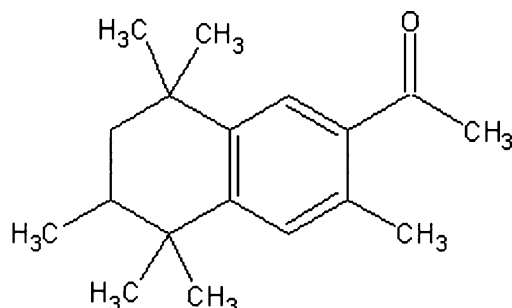
Název	Chemický název	Sumární vzorec
<b>NITROMOŠUSY</b>		
Musk keton	4'-terc-butyl-2',6'-dimethyl-3',5'-dinitroacetofenon	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Musk Xylen	2,4,6-trinitro-1,3-dimethyl-5-terc-butylbenzen	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>
Musk Ambrette	2-terc-butyl-4,6-dinitro-5-methylanisol	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Musk Tibetene	5-terc-butyl-1,2,3-trimethyl-4,6-dinitrobenzen	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
Musk Moskene	4,6-dinitro-1,1,3,3,5-pentamethylindan	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
<b>MAKROCYKLIČKÉ MOŠUSY</b>		
Musk natural	oxacykloheptadec-8-en-2-on	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Musk R1, Thibetolid	11-oxahexadekanolid	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>
Muscon	3-methyl-cyklopentadekanon	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O
<b>POLYCYKLIČKÉ MOŠUSY</b>		
Musk Moskene	4,6-dinitro-1,1,3,3,5-pentamethylindan	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
Phantolid (AHMI)	5-acetyl-1,1,2,3,3,6-hexamethylindan	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O
Galaxolid (HHCB)	1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl- cyklopenta-gama-2-benzopyran	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O
Tonalid (AHTN)	1-(5,6,7,8-tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naftyl)ethan-1-on	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O
Versalid (AETT), Musk 36A	1,1,4,4-tetramethyl-6-ethyl-7-acetyl-1,2,3,4-tetrahydronaftalen	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O
Celestolid (ADBI)	4-acetyl-6-terc-butyl-1,1-dimethylindan	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O
Traseolid (AITI)	5-acetyl-3-isopropyl-1,1,2,6-tetramethylindan	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O
<b>NEZAŘAZENÉ MOŠUSY</b>		
Musk T	1,4-dioxacykloheptadekan-5,17-dion	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>
Cashmeran	1,2,3,5,6,7-hexahydro-1,1,2,3,3-pentamethyl-4.H-inden-4-on	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O

Mošusový keton je součástí květinových vonných kompozic a je velmi málo stabilní v kosmetice, mýdle a detergentech [6]. Galaxolid a tonalid jsou používány jako vonná látka kosmetiky a detergentů [7].

### 2.1.2.1 Tonalid

1-(5,6,7,8-tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naftyl)ethan-1-on

$C_{18}H_{26}O$



**Skupina látek:** Polycyklické mošusové látky.

**Toxicita:** Persistentní, kumuluje se v organismu.

**Použití a vlastnosti:** Voní sladce po květinách a dřevu. Je to polycyklická velmi persistentní látka. Druh vůně je sladce čistý, mírný. Mošusy jsou nejproslulejší ze všech esenciálních kategorií, protože jsou obecně zahrnuty ve vůni exotického původu a to v pižmu některé vysoké zvěře.

**Možné zdroje:** Chemický průmysl (šampony, mýdla), v potravinách s vyšším obsahem tuku.

**Zdroje v ČR:** Setuza a.s. Ústí nad Orlicí, Procter & Gamble – Rakona a.s. Rakovník, Milo Olomouc, Kosmos Čáslav, Styl družstvo Praha. [8]

## 2.2 Koncentrace mošusových látek v čistících prostředcích

Koncentrace vonných látek v toaletním mýdle může být 1,5 %, v šamponech 0,5 % a v detergentech 0,15 %. Množství vonné substance a barviva v pracím prášku a v tekutých čistících prostředcích je asi 1 % z obsahu [9]. Výrobci čistících produktů musí dodržet obsah vonných látek v rozmezí 0,05 – 0,5 %. Určité produkty, jako např. WC bloky, mohou obsahovat vyšší koncentrace těchto látek.

## 2.3 Produkce a použité množství detergentů

Spotřeba domácích detergentů obsahujících vonné substance ve skandinávských zemích je popsána v Tab. 2.2 [10].

Tab. 2.2: Spotřeba jednotlivých čistících produktů v určité zemi v tunách za rok.

Druh produktu	Finsko	Norsko	Švédsko	Rok
Prášek na praní	27 000	23 000	49 000	1993–1994
Prostředek na mytí nádobí	5 500	5 500	11 300	1995
Prostředek do myčky	3 004	3 247	4 930	1995
Čistidla obecně	4 300	10 000	7 900	1997

Mošusový keton, xylen, tonalid a galaxolid představují asi 95 % trhu vonných substancí v Evropě. Nejvíce používaná pižma jsou tonalid a galaxolid. Nitromošus ambrette a polycyklický mošus versalid už užívány nejsou [1]. Odhadované použité množství mošusů v Evropě za určitý rok v tunách je znázorněn v Tab. 2.3 [1].

Tab. 2.3: Odhadované použité množství mošusů v Evropě v tunách za určitý rok.  
( HHCB – galaxolid, AHTN – tonalid)

Rok	HHCB	AHTN	Mošus. xylen	Mošus. keton
1992	2 400	885	174	124
1995	1 482	585	110	61
1998	1 473	385	86	40

## 2.4 Měřené koncentrace mošusových látek v životním prostředí

Syntetické mošusy byly poprvé identifikovány v životním prostředí zhruba před dvaceti lety. Yamagishi [11, 12] provedl první identifikaci mošusového ketonu a xyleny na zlatých rybách (*Carassius auratus langsdorfii*) v japonských řekách, v říční vodě, komunální odpadní vodě, v mořských mušlích (*Mitilus edulis*) a ústřicích (*Crassosterea gigas*). Mošusový xylen byl nalezen ve všech 74 analyzovaných vzorcích a mošusový

---

keton byl objeven v 80% ze všech vzorků. Koncentrace xylenu ve vytékající vodě z čistírny odpadních vod se pohybovala od 25 - 36 ng/l a koncentrace mošusového ketonu od 140 - 410 ng/l. Dále se prokázala přítomnost mošusového xylenu v rybím svalu přibližně v desítkách ppb, zatímco pro mošusový keton byly hodnoty menší než 10 µg/kg.

Winkler [13] zjistil přítomnost mošusů ve 31 vzorcích a ve vzorcích vody z řeky Labe v Německu. Ve všech 31 vzorcích byly nalezeny mošusový keton (4 - 22 ng/g), galaxolid (148 - 736 ng/g) i tonalid (194 - 770 ng/g). Ve vzorcích vody bylo naměřeno 2 - 10 ng mošusového ketonu/l, 36 - 152 ng galaxolidu/l a 24 - 88 ng tonalidu/l.

Draisici [14] zkoumal sladkovodní ryby v Itálii a identifikoval dva z pěti cílových mošusů ve většině vzorcích ryb, galaxolid a tonalid byly identifikovány v hodnotách od 4 ng/g do 105 ng/g ve svalové tkáni ryb.

Eschke [15] identifikoval galaxolid, tonalid a celestolid v tukové tkáni cejna a okouna říčního ve vzorcích řeky Ruhr v Německu v koncentracích 2,5 - 4,6 mg/kg.

Müller [16] zjistil přítomnost galaxolidu, tonalidu a celestolidu ve švýcarské řece Glatt řádově v ng/l.

Geyer [17] publikoval souborný článek o reziduích nitromošusových látek nacházejících se v rybách, škeblích, v mateřském mléce a lidských lipidech a současně i o ekotoxikologických a toxikologických údajích nitromošusů. Rezidua mošusového xylenu a mošusového ketonu našel ve sladkovodních rybách (štika, úhoř a pstruh) v řekách Severního Německa. V lidském mateřském mléce byl identifikován mošusový keton i xylen v hodnotách 10 - 240 mg/kg mléčného tuku [17].

Nedávno se objevila i řada publikací z Evropy, zvláště z Německa a Švýcarska. Rimkus [18] napsal stručný přehled výskytu mošusů v životním prostředí.

## **2.5 Toxikologie**

### **2.5.1 Zjištěné toxikologické hodnoty pro krysy**

LD50 (orální působení)	964 mg/l
LD50 (dermální působení)	7940 mg/l
90 – ti denní test chronické toxicity, NOAEL	15 mg/kg/den [19]

## 2.5.2 Dráždivost/citlivost

V Tab. 2.4 je znázorněna dráždivost a citlivost tonalidu [19].

Tab. 2.4: Dráždivost tonalidu.

<b>Dráždivost/citlivost</b>	<b>Koncentrace v rozpouštědle</b>	<b>Výsledek</b>
Dráždivost lidské kůže	10% ethanol/DEP	Negativní
Dráždivost kůže králíka	50% DEP	Negativní
HRIPT pro člověka	10% ethanol/DEP	Negativní
Fotocitlivost pro morčata	2% ethanol	Negativní
Fototoxicita pro člověka	10% ethanol/DEP	Negativní
Fototoxicita pro králíka	2% ethanol	Pozitivní
Dráždivost očí králíka	100%, bez rozpouštědla	Negativní

## 2.6 Ekologické informace

V Tab. 2.5 je popsána akutní a chronická toxicita tonalidu [19].

Tab. 2.5: Akutní a chronická toxicita tonalidu.

<b>Druh testu</b>	<b>Akutní a chronické výsledky</b>
Prodloužený toxikologický test na rybách	21 dní, LC50: 0,314 mg/l, NOEL: 1,089 mg/l
FELS test toxicity na rybách	NOEL: 0,035 mg/l
Test reprodukční aktivity na dafniích	21 dní, EC50: 0, 244 mg/l, NOEL: 0,196mg/l
Inhibiční test na řasách	72 hodin, IC50: 0,8 mg/l, NOEL: 0,400 mg/l

## 2.7 Endokrinní systém

Endokrinní systém je tvořen ze žláz, hormonů a receptorů, které se nacházejí na četných místech těla. Může být chápán jako spojení mezi nervovou soustavou a reprodukcí, imunitou, metabolismem a chováním. Vnitřní vylučování je přímo propojené do oběhového systému. Endokrinní systém je tvořen hierarchickou kaskádou regulačních dějů s finálním vyloučením cílového hormonu ovlivňujícího řadu základních životních atributů. Z tohoto pohledu patří k endokrinnímu systému např.



---

štítná žláza, vaječníky, varlata, slinivka břišní, ale i hypothalamus či další specializované oblasti mozku. Endokrinní regulace je ve srovnání s řízením nervovými vzruchy podstatně pomalejší a kvantitativně spočívá v odezvě na aktuální koncentraci příslušného hormonu.

**Příklad endokrinních procesů:**

- slinivka břišní produkuje inzulín a glukagon, které regulují hladinu cukru v krvi
- hypothalamus produkuje hormony, které stimulují aktivitu podvěsku mozkového
- pohlavní žlázy vylučují pohlavní steroidní hormony, které regulují vývoj a růst

### **2.7.1 Endokrinní dysharmonizátory – endocrine disruptors**

Mezi tyto látky patří i mošusové látky. Jsou to například syntetické chemikálie nebo i přírodní fytoestrogeny, které ovlivňují endokrinní systém lidí i zvířat. Přerušení endokrinního systému spočívá např. v rozpojení či ovlivnění hierarchického řízení nebo v blokování hormonálních účinků v tkáních, které za normálních podmínek reaguje adekvátním způsobem na hormonální atak. Změny v endokrinní regulaci mohou ovlivnit psychický vývoj, vývoj mozku, chování, regulaci teploty i reprodukci. Tyto látky způsobují vrozené vady, změny v sexuálním a funkčním vývoji, diabetes mellitus, časnou pubertu u mladých dívek, rakovinu prsu a tlustého střeva, redukci motorické dovednosti, dyslexii a jiné choroby.

Významným zdrojem těchto látek jsou například i některé plasty. Hodně používané PVC obsahuje různá změkčovadla a přísady, kdy bisfenol A (BPA) je častá přísada v PVC. BPA se tak snadno dostává do produktů balených v PVC [20].

### **2.8 Rozklad mošusových látek v ekosystému**

Mošusy jsou látky odolávající rozkladu, což vysvětluje, proč při širokém využití jsou tyto látky detekovány ve vodách po celém světě [20]. Navíc jsou velmi lipofilní, a proto se mohou bioakumulovat [17, 18]. V této souvislosti je závažným i fakt, že byla

---

prokázána vývojová toxicita pro organismy žijící ve vodě, přičemž „musk ambrette“ vykazuje i poškození nervové soustavy [22].

Z mošusových látek jsou nejméně odbouratelné nitromošusy a polycyklické mošusy. Bylo provedeno několik biodegradačních testů se čtyřmi nitromošusy (xylen, keton, mosken, tibeten) a ukázalo se, že se tyto látky za standardních podmínek nemineralizují. Makrocyklická pižma, jejichž struktura je podobná přirozeně se vyskytujícímu pižmu, jsou rozložitelná nejsnadněji [23].

V nedávné studii byly nalezeny produkty transformace nitromošusů ze splaškového kalu švýcarských odpadních vod. 4-amino derivát mošusového xylynu byl objeven v šesti ze dvanácti vzorků a 2-amino mošusový keton v jednom ze dvanácti vzorků. Degradací produkty mošusového xylynu byly také nalezeny v sedimentech řeky Labe v Německu [1]. Přítomnost nezměněného galaxolidu a tonalidu byla prokázána v mnoha vzorcích odpadních i povrchových vod, splaškových kalů i usazenin. Všudypřítomnost těchto látek ve vodním prostředí může být vysvětlována kontinuálním vstupem chemikálií přes čistírnu odpadních vod. Detekované koncentrace mošusů v r. 1999 se zdály být bezpečné [1], což kontrastuje o několik let novějším náhledem o jejich přítomnosti, akumulaci a bioaktivitě ve vodním prostředí.

Aminomošusové látky, které vznikají z nitromošusů, jsou více rozpustné ve vodě než původní mošusy, mají stále významný koeficient oktanol/voda (vysoký bio-koncentrační potenciál) a jsou toxičtější než původní nitromošusy.

Syntetické mošusy lze v současné době charakterizovat jako všudypřítomné, jejich používání ve velkém množství kontaminuje ekosystém a hlavním problémem je jejich omezená či nepatrná rozložitelnost. Jsou současně považovány za hlavní kandidáty na monitorování ve vodách i v suchozemských ekosystémech jako indikátory přítomnosti ostatních PPCPs. Jejich analýzy v ekosystému byly diskutovány v literatuře od Gatermanna [21] a Rimkuse [18].

## **2.9 Metabolismus**

Rostliny a živočichové jsou během svého života vystaveni působení cizorodých chemických látek, tzv. xenobiotik. Xenobiotika většinou nemohou být v organismu změněna specifickými enzymy. Tyto látky neslouží jako zdroj energie nebo stavebního materiálu, ale svým vstupem do buněk představují rušivý zásah, který má více či méně

---

toxický účinek [24]. Cizorodé látky se jen zřídka vylučují v nezměněné formě. Většinou podléhají v organismu více nebo méně hlubokým transformacím.

U živočichů dochází k biotransformaci xenobiotik hlavně v játrech, avšak rovněž důležitá je biotransformace v ostatních orgánech (plíce, ledviny, kůže a gastrointestinální mukóza), která se týká např. látek znečišťujících životní prostředí, potravinových aditiv nebo reziduí průmyslových chemikálií.

Metabolismus xenobiotik můžeme rozdělit do tří stupňů [25]. V první fázi (derivatizace) se uplatňují především oxidativní reakce méně redukční a hydrolytické. Zavádí se reaktivnější funkční skupina do skeletu lipofilního xenobiotika. V druhé fázi (konjugace) se uplatňují konjugační nebo syntetické reakce s endogenní molekulou. Konjugát má zvýšenou rozpustnost ve vodě a schopnost ionizace při fyziologickém pH. Ve třetí fázi dochází k vylučování konjugátů z organismu.

U rostlin lze také metabolismus xenobiotik rozdělit do tří stupňů. Derivatizace a konjugace jsou obdobné jako u živočichů. Výrazně odlišná je třetí fáze, při které dochází k ukládání produktů biotransformace do rostlinného pletiva, neboť rostliny nemají vylučovací orgány [26].

Enzymy podílející se na biotransformaci jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu buněk (v cytosolu a mikrosomech). Mikrosomální enzymy katalyzují reakce I. fáze a cytosolové enzymy katalyzují reakce II. fáze.

### **2.9.1 I. Fáze biotransformace – derivatizace**

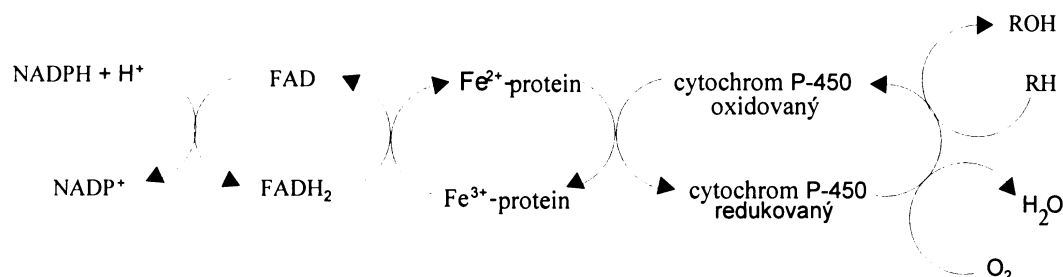
V první fázi biotransformace xenobiotik dochází k zabudování funkčních reaktivních skupin do skeletu lipofilního xenobiotika, či demaskování funkčních skupin již v molekule xenobiotika přítomných. Proto je někdy tato fáze nazývána jako fáze derivatizační nebo funkcionalizační. Tím se zvyšuje polarita sloučeniny a možnost pro následnou konjugaci.

Biotransformačních reakcí v první fázi metabolismu xenobiotika rostlinami se účastní několik enzymových systémů. Mezi nejdůležitější patří monooxygenasy (oxidasy) se smíšenou funkcí (MFO – mixed function oxidases) s cytochromy P-450 jako terminální oxidasou [27] a dále pak peroxidasy.

Většina reakcí první fáze probíhá oxidačně (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, desulfurace a další). Nicméně některé reakce probíhají i redukčním mechanismem (nitro, azoredukce) nebo hydrolyticky.

### 2.9.1.1 Cytochromy P-450

Mikrosomální monooxygenasový systém je systém enzymů vázaných v membráně endoplasmatického retikula. Jako terminální oxidasu obsahuje hemoprotein cytochrom P-450. Cytochrom P-450 odpovídající např. za alifatickou hydroxylaci, aromatickou hydroxylaci, deaminaci, N-hydroxylaci aj., ale i za redukční biotransformaci některých látek, která vede k bioaktivaci. Rostlinné cytochromy P-450 monooxygenasy jsou membránové hemoproteiny, skládající se z protoporfyrinu IX a apoproteinu, který zaručuje substrátovou specifitu [28].



Obr. 2.1: Schéma oxidace xenobiotika RH na ROH za účasti cytochromu P-450.

Cytochrom P-450 spolupůsobí s dalším enzymem NADPH: cytochrom P-450 reduktasou. Tento enzymový systém je klasifikován jako oxygenasa se smíšenou funkcí MFO, protože kyslík přijímá čtyři elektrony ze dvou různých redukčních činidel, ze substrátu a kofaktoru (NADPH) [27].

### 2.9.1.2 Peroxidas

Peroxidas jsou enzymy, které redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny (endogenní i xenobiotika). Funkcí společnou pro všechny peroxidas je schopnost detoxikovat  $H_2O_2$ . Metabolicky aktivní peroxidas katalyzují např. redukci hydroperoxidu (což se týká např. metabolismu aromatických aminů, fenolů, hydrochinonu). Mezi další reakce katalyzované peroxidasami patří např.

---

halogenace a dehalogenace (halogenperoxidasy, thyroid peroxidasa), nebo oxidace halogenidů (myeloperoxidasa). V rostlinných buňkách jsou peroxidasy bohatě zastoupeny. Mohou být buď volné, ve vakuolách či cytoplazmě nebo vázané v buněčných stěnách a membránách. Vazba může být iontová, ale i kovalentní [29].

## **2.9.2 II. Fáze biotransformace - konjugace**

Druhá fáze biotransformace bývá označována jako konjugační, neboť při ní dochází k navázání (konjugaci) endogenních molekul (glukuronátu, sulfátu z aktivního sulfátu, glutathionu, cysteinu, glycinu apod.) na reaktivní funkční skupiny metabolitů zavedených do molekuly xenobiotika v první fázi biotransformace. I když se tyto reakce nazývají reakcemi fáze II, mohou některé cizorodé látky s vhodnou funkční skupinou reagovat přímo bez účasti fáze I.

V případě rostlin se tato konjugační fáze přesněji označuje jako primární konjugace. Polárnější metabolity jsou spojovány kovalentní vazbou s molekulami endogenních hydrofilních sloučenin, jako jsou např. některé sacharidy, aminokyseliny nebo glutathion [30]. V případě toxických sloučenin jejich toxicita reakcemi této fáze výrazně klesá. Konjugáty jsou pak v rostlinách ukládány v některých částech buňky [29].

### **2.9.2.1 Konjugace se sacharidy**

Nejčastějším sacharidem, který podléhá konjugaci, je u rostlin i živočichů glukosa. U živočichů je to oxidovaná forma, aktivní kyselina glukuronová (kyselina uridin-5'-difosfo-D-glukuronová). U rostlin tvoří konjugáty glukosa. Pokud má xenobiotikum ve své molekule alkoholickou nebo fenolickou skupinu, dochází za katalýzy příslušnou O-glukosyltransferasou ke vzniku O-glykosidické vazby. V případě reakce aminové nebo iminové skupiny vznikají za katalýzy N-glukosyltransferas ke vzniku N-glykosidů.

### **2.9.2.2 Konjugace s malonátem**

Konjugace s malonátem navazuje na konjugaci s glukosou. Reakce je katalyzována příslušnou O-malonyltransferasou nebo N-malonyltransferasou. Vzniklé metabolity jsou uloženy do vakuol nebo transportovány vně buňky.

---

### 2.9.2.3 Konjugace s glutathionem

Glutathion je tripeptid skládající se z glycinu, kyseliny glutamové a cysteinu. Kyselina glutamová je vázána anomálně svým  $\gamma$ -karboxylem ( $\gamma$ -glutamylcysteinylglycin). Pro účinek glutathionu je rozhodující velmi reaktivní thiolová skupina cysteinového zbytku. Je katalyzována glutathion-S-transferasami [29], které jsou všude přítomné. Komplexy glutathionu jsou uloženy ve vakuolách, kde mohou podléhat další úpravě. Při ní se uplatňují především hydrolytické enzymy. Jejich produkty se poté většinou ukládají v buněčné stěně.

Transport konjugátů s glutathionem do vakuol byl dokázán např. u buněčných kultur ječmene [30].

### 2.9.3 III. Fáze – kompartmentace

Třetí fáze v rostlinném metabolismu je představována ukládáním metabolitů. Na rozdíl od savců nemají rostliny vylučovací orgány. Úložným místem pro rozpustné konjugáty jsou vakuoly. Některé produkty konjugační fáze procházejí ještě fází další označovanou za sekundární konjugaci, reakcemi s některými složkami buněčné stěny – s ligniny, pektiny, hemicelulosami. Uložení produktů vzniklých v druhé fázi ve vakuole předchází transport konjugátů přes membránu vakuoly. Bylo zjištěno, že podobně jako u živočichů se i v rostlinných buňkách vyskytuje ATP-dependentní membránový přenašeč, který se v rostlinách využívá právě pro transport do vakuol [31, 32].

## 2.10 Fytoremediace

Fytoremediace označuje technologie využívající zelené rostliny k fixaci, akumulaci a rozkladu kontaminantů, tj. k jejich odstranění ze životního prostředí [33]. Fytoremediace zahrnuje využití vegetace pro *in situ* remediace půdy, sedimentů a vody. Vybrané rostliny se využívají k extrakci toxických kovů, včetně radioaktivních izotopů, i k odstranění některých organických látek z uvedených biotických složek. Pro úspěšnou fytoremediaci je nutná biologická přístupnost kontaminantů z vody a půdy do rostliny, která je dána zejména rozpustností látky, typem půdy a stářím kontaminace.

Důvodů pro rozvíjení této technologie je několik. Především lze dosáhnout snížení nákladů při dekontaminačních procesech. Fytoremediace předpokládá využití známých

---

agrotechnických postupů běžně používaných při zemědělském hospodaření. Z toho vyplývá, že finanční vstupy jsou obecně nízké a náklady na průběh remediacce minimální. Další výhodou fytoemediacce je šetrný přístup k prostředí, neboť se vyhýbá odstranění půdy a použití těžké techniky. Z tohoto pohledu je fytoemediacce příznivě přijímána veřejným míněním.

### **2.10.1 Metody fytoemediacce**

Fytoemediacce lze podle metodického postupu závislého na charakteru znečištěného prostředí, kontaminantu a jeho koncentraci rozdělit na fytoedekontaminační a fytoedstabilizační. Mezi fytoedekontaminační technologie patří fytoextrakce, rhizofiltrace, fytoedgradace a fytoedvolatilizace.

#### **2.10.1.1 Fytoextrakce**

Fytoextrakce spočívá ve vysetí či vysázení vybraných rostlin na kontaminovanou plochu. Po akumulaci kontaminantů v rostlině jsou rostliny sklizeny a dále zpracovány tepelně, mikrobiálně nebo chemicky [34]. Metoda je využitelná především pro odstranění toxických kovů [35]. Některé druhy rostlin jsou vysoce tolerantní vůči přítomnosti kovů v půdě a navíc jsou schopné akumulovat tyto kovy do vysoké koncentrace ve svých pletivech bez nepříjemného vlivu na jejich růst a prosperitu. Takové rostliny se nazývají hyperakumulátory.

Při výběru rostlin pro fytoextrakci kovů je vhodné vzít v úvahu rovněž další požadavky, jako je schopnost akumulovat kovy při nízké koncentraci v půdě, akumulovat více druhů kovů, odolávat jejich vysokým koncentracím v půdě a tvořit dostatečné množství biomasy. Za hyperakumulátor těžkých kovů je považován např. *Thalspi caerulescens* z rodu hořčic. Pokud se podaří najít takovou rostlinu, která vyhovuje uvedeným požadavkům, může být i finančně výhodné získávat akumulované kovy z rostlinného materiálu zpět.

#### **2.10.1.2 Rhizofiltrace**

Rhizofiltrace je metoda, která využívá k absorpci, koncentraci a precipitaci xenobiotik z proudící, znečištěné vody kořeny živých rostlin. Metoda je vhodná především pro odstranění nízkých koncentrací kovů, kdy nelze efektivně využít jinou

---

dekontaminační metodu. Rhizofiltrace se ukázala jako zvláště vhodná při záchytu radionuklidů, které byly úspěšně akumulovány kořeny rostlin *Brassica juncea* nebo *Helianthus annuus* [36]. Vhodné rostliny pro akumulaci některých těžkých kovů rhizofiltrací je např. kukuřice, slunečnice a rýže.

### 2.10.1.3 Fytodegradace

Při použití fytodegradace degradují rostliny a s nimi asociovaná mikroflóra kontaminanty přímo v půdě na netoxické látky. Uvažuje se o detoxikaci především organických látek, které jsou rostliny schopny metabolizovat pomocí enzymatického aparátu zapojeného do detoxikační reakce. Podmínkou fytodegradace je, aby produktem metabolických aktivit byla látka netoxická nejen pro rostliny, ale i pro ostatní organismy.

Rostliny vylučují svými kořeny do okolní rhizosféry množství exudátů, ve kterých jsou obsaženy např. sacharidy, aminokyseliny a jiné organické sloučeniny. Tyto látky mohou sloužit jako zdroj energie pro mikroorganismy žijící ve rhizosféře a tak umožňovat růst jejich populací. Naopak mikroorganismy mohou svými metabolickými pochody poskytnout rostlinám takové látky, které rostliny nejsou schopny samy vyprodukovat. Rhizosféra je tedy díky vzájemnému vztahu rostlin a mikroorganismů metabolicky velmi aktivní oblastí, v níž může probíhat mnoho klíčových reakcí důležitých při dekontaminaci.

Fytodegradace byly doposud použity jako remediační metoda při kontaminacích následujícími typy látek:

- TPH (ropné látky)
- PAH (polyaromatické uhlovodíky)
- Chlorované pesticidy
- Jiné chlorované látky – PCB, TCE
- Výbušniny a další nitrolátky
- Organofosfátové pesticidy
- Detergenty [37]



---

#### 2.10.1.4 Fytovolatilizace

Fytovolatilizace je založena na schopnosti některých mikroorganismů, které mohou enzymaticky redukovat rtuťnaté ionty na kovovou rtuť, která se díky svým fyzikálním vlastnostem rozptyluje do okolí ve formě par. Gen kódující reduktázu rtuti se podařilo vnést do genomu rostliny *Arabidopsis thaliana* [38], a také do rostliny *Lyriodendron tulipifera* [39]. Expresí tohoto genu se zvýšila odolnost rostlin vůči koncentraci  $Hg^{2+}$  iontů v jejich tkáních a současně se podařilo přenést větší část rtuti ve formě  $Hg^0$  do ovzduší. V případě použití tohoto způsobu musí však být realizováno opatření, které by zamezilo nekontrolovanému rozptylu plyných zplodin. Vedle výběru rostlin a klasických šlechtitelských metod jsou genové manipulace technikou, která může výrazně přispět k lepšímu využití rostlin pro fytořediční účely.

#### 2.10.2 Techniky remediace

V současnosti používané metody remediace dělíme na *ex-situ* a *in-situ* techniky. Metody *ex-situ* představují odtěžení a transport kontaminované zeminy a její následné ošetření. Tyto metody jsou zpravidla mnohem agresivnější, než metody *in-situ*. Metody *in-situ* využívají dekontaminačních opatření přímo na místě znečištění bez přenosu kontaminované zeminy a jsou více šetrné k vlastnímu předmětu čištění. Vzhledem k tomu, že proces probíhá bez přemístění materiálu, je nutno jej z důvodu ochrany životního prostředí velmi precizně zabezpečit. Oba uvedené způsoby využívají především fyzikálních a chemických principů.

##### 2.10.2.1 Fyzikální metody *ex-situ*

Základními fyzikálními *ex-situ* metodami jsou fyzikální separace, vitrifikace a žíhání půdy. Při separaci se vychází z předpokladu, že těžké kovy jsou v půdě přednostně vázány na částicích o určité velikosti. Po separaci této kontaminované frakce se zbylá část půdy vrací zpět. Při vitrifikaci je půda ošetřena tepelně. Jde o pyrolýzní proces při teplotách okolo 1200 °C. Při těchto teplotách dochází k tavení křemičitanů v půdě a zatavení rizikových prvků do těchto materiálů. Žíhání je obdobný proces. Do půdy jsou navíc přidávány některé typy jílových minerálů (např. kaolinit) a směs je tavena při teplotách 600 – 800 °C. Zatavením kovů dochází k jejich imobilizaci [40].

---

### **2.10.2.2 Chemické metody *ex-situ***

Chemické metody *ex-situ* představuje solidifikace/stabilizace, enkapsulace, iontová výměna a promývání půdy. Solidifikace představuje smísení půdy s materiálem, který zlepší vazebné schopnosti půdy. Tím jsou kovy imobilizovány chemickými vazbami. Mezi typické materiály patří cementy, podzoly, termoplasty a jíly. Enkapsulace je obalení částic, které obsahují těžké kovy, polymery o nízké permeabilitě. Iontová výměna je obdobou solidifikace. Do půdy se přidávají jílové minerály a zeolity, které mají specifický povrch pro iontovou vazbu. Promývání půdy, extrakce půdy nebo mobilizace půdy kovů jsou opačnými procesy. Předchozí chemické metody prvky v půdě imobilizovaly, kdežto tyto se snaží polutanty z půdy odstranit.

### **2.10.2.3 Fyzikální metody *in-situ***

Mezi fyzikální *in-situ* metody jsou řazeny vitrifikace, adsorpce, vytvoření zmrzlé vrstvy, ředění kontaminované zeminy či její překrytí čistou zeminou. Vitrifikace je stejný proces jako při provedení *ex-situ*, ale probíhá přímo na místě kontaminace při teplotách 1600 – 2000 °C. Adsorpce je založena na vazbách látek na povrch aktivního uhlíku po jeho přidání do půdy. Zmrzlé vrstvy, nebo také tzv. kryogenní zóny, představují konzervaci stávajícího stavu nebo regulované promývání půdy v přirozeném prostředí. Zmrazením ploch v půdě se vytvoří ledové bariéry, přes které se při promývání kontaminované oblasti rizikové prvky nedostanou, nebo jsou koncentrovány jen v určité oblasti a odtud bezpečně odstraněny. Ředění je způsob, při kterém se promíchává kontaminovaná zemina s čistou půdou. Používá se jen u půd s nižší koncentrací těžkých kovů. Při překrytí čistou zeminou jsou kovy pouze izolovány vrstvou čisté zeminy před příjmem kořeny rostlin a nedochází tedy k odstranění. Pokud i přesto kořeny prorostou do oblasti s kontaminací, je celkové množství kovů přijaté rostlinami malé.

### **2.10.2.4 Chemické metody *in-situ***

Chemické *in-situ* metody jsou zastoupeny neutralizací, precipitací, iontovou výměnou, elektrokinetikou a promýváním. Neutralizace je prováděna úpravou pH půdy podle pohyblivosti těžkých kovů v daném pH. Tato metoda vede k mobilizaci i k imobilizaci kovů v půdě podle požadovaného výsledku. Precipitace je vysrážení do

---

nerozpustných sloučenin. Iontová výměna a promývání jsou obdobou metod *ex-situ*. Elektrokinetika využívá elektrické pole v půdě, které umožňuje migraci iontů v půdním roztoku. Tato metoda je velmi závislá na půdních charakteristikách, jako jsou sorpční kapacita, pufrační kapacita a stupeň nasycení. Do půdy jsou aplikovány elektrody vytvářející elektrické pole. Kationty kovů se vlivem stejnosměrného elektrického proudu hromadí v těsné blízkosti okolo katody. *In-situ* lze použít i tzv. bioremediace, neboli využití mikroorganismů k degradaci polutantů *in-situ*, a fytoremediace, při kterých jsou využívány rostliny. Tyto způsoby jsou nejvíce šetrné k životnímu prostředí a zpravidla i nejlevnější. Jedním z klíčových faktorů, které omezují bioremediace, je biologická dostupnost kontaminantů [40].

---

### 3 Cíl práce

1. Chromatografická analýza komerčních parfemačních kompozic a tonalidu. HPLC analýza tonalidu v kultivačním médiu, stanovení koncentrace tonalidu přímo z kultivačního média.
2. Stanovení koncentrace tonalidu v médiu - kapalinová extrakce ethyl-acetátem.
3. Stanovení koncentrace tonalidu ve vodných roztocích - SPE.
4. Fytoextrakce tonalidu s analytickou koncovkou s využitím vypracovaných metod.

*Projekt je dotován MŠMT ČR - COST 859 1P05OC044 Interakce mošusových, fenolických a estrogenně aktivních látek s řasami a rostlinami.*

---

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité materiály a přístroje

Anorganické chemikálie pro přípravu média byly čistoty p.a. (Lachema, ČR) a sacharosa byla dodána firmou Kulich, Hradec Králové. *Myo*-inositol byl použit v kvalitě pro tkáňové kultury od firmy Sigma. Voda pro přípravu mobilní fáze pro HPLC a média byla získána přístrojem DEMIVA (Watek, ČR). Methanol a acetonitril od firmy Lab -Scan, UK byl použit v kvalitě pro HPLC. Od firmy Sigma byl dodán dimethylsulfoxid (DMSO) v kvalitě pro tkáňové kultury, který se používá pro rozpuštění tonalidu. Ethyl-acetát byl kvality p.a. od firmy Lachema, ČR a před použitím byl přečištěn rektifikací na koloně. Tonalid byl získán od firmy Sigma-Aldrich a reálné kompozice parfémů do pracích prášků byly poskytnuty firmou SETUZA (White Mountain GE 05-0289 (100758255), Výrobce: Quest International, Velká Británie; Fresca 3100 (100758100), Výrobce: International Flavors and Fragrances Inc., Nizozemí; Cascade fresh 322375 (100758118), Výrobce: Charabot, Francie; Titania 235435 (100758041), Výrobce: DROM fragrances international, SRN).

Jako biologický materiál byla použita semena kukuřice seté *Zea mays L.*, var. Mesnil, KWS Osiva s.r.o., Velké Meziříčí.

HPLC analýzy byly provedeny na chromatografickém zařízení INCOS sestávajícího z vysokotlakého čerpadla INCOS LCP 5020, autosampleru INCOS LCS 5040 a UV detektoru INCOS LCS 5000. Pro měření byla použita kolona o rozměrech 250 x 4,5 mm se sorbentem Reprosil 100 C – 18 (5 µm).

Hmotnostní spektra (ESI) byla měřena na přístroje Bruker ESQUIRE 3000.

SPE extrakce byly provedeny na SPE konzole Supelco za použití vakua membránové vývěvy Vaccubrand MZC a manostatu van der Heijden za použití SPE kolon Bond Elut LRC – C 18 (Varian), 500 mg sorbentu/kolona. Získané eluáty byly odpařeny za vakua na přístroji TCS-Trockentemperier-system.

Kultivace byly prováděny v kultivační místnosti při teplotě 25 °C a světelným režimem světlo/tma, 12h/12h.

---

Manipulace s rostlinným materiálem probíhala v laminárním boxu Labox BHSL. Pro odpařování rozpouštědel byla použita rotační vakuová odparka Heidolph Laborota Digital 4002 vybavená manostatem.

Data byla vyhodnocována chromatografickým programem Clarity (DataApex) včetně přepočtu dle kalibrační závislosti.

## **4.2 Chromatografická analýza komerčních parfémů a tonalidu**

Chromatografické analýzy byly provedeny pro získané komerční parfemační kompozice do pracích prášků a čistou substancí tonalid s následnou konstrukcí kalibrační závislosti pro odečet finálních koncentrací ve studovaných vzorcích. Pro chromatografické analýzy byla zvolena chromatografie na sorbentu C-18, kolona Reprosil 100 C-18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,5 mm.

Komerční směsi byly testovány za použití mobilních fází acetonitril/voda a methanol/voda v izokratickém uspořádání. Testované složení mobilních fází bylo v rozmezí 60 - 80 % acetonitrilu ve vodě a 50 - 100 % methanolu ve vodě při průtoku 0,6 - 1,0 ml/min. Detekce byla prováděna při vlnové délce 254 nm.

Pro komerční směsi byla na uvedené koloně optimální mobilní fáze methanol/voda (6:4, v/v) při průtoku 0,7 ml/min.

Chromatografie čistého tonalidu byly testovány ve stejných mobilních fázích s cílem najít separační podmínky pro uvedenou látku při analýze kultivačního média a pro kvantifikaci tonalidu po SPE z roztoků methanolu.

Nalezené podmínky pro tonalid v kultivačním médiu byly na koloně Reprosil 100 C-18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,5 mm, mobilní fáze methanol + 0,1 % kyseliny octové, průtok 0,6 ml/min, detekce při UV 254 nm. Optimální podmínky pro analýzu SPE předupravených vzorků v methanolu byly v daném chromatografickém systému nalezeny pro mobilní fázi čistý methanol a průtok 0,5 ml/min stejně tak, jako pro extrakty z média do ethyl-acetátu.

## **4.3 Extrakce tonalidu z roztoků – kultivačních médií**

Pro účely praktického provedení fytoextrakčních experimentů byly testovány možnosti extrakce tonalidu z vodných roztoků a kultivačního média do organického rozpouštědla ethyl-acetátu.

---

Byl připraven roztok tonalidu v dimethylsulfoxidu o koncentraci a 25,4 mg/l a do 100 ml odměrné baňky bylo pipetováno odpovídající množství roztoku tonalidu v methanolu, aby výsledná koncentrace po doplnění na konečný objem 100 ml byla 1 mg/l. Extrakce 10 ml vzorku byla provedena 5 ml ethyl-acetátu, vzorek pro stanovení koncentrace byl odebrán přímo injekční stříkačkou z organické fáze a koncentrace byly stanoveny HPLC.

Podmínky extrakce byly dále měněny vzhledem k poměru média/ethyl-acetát a testovány byly poměry 40 ml média / 5 ml ethyl-acetátu a 15 ml média / 5 ml organického rozpouštědla.

Extrakce byly prováděny v uzavíratelných zkumavkách, scintilačních lahvičkách nebo zábrusových baňkách třepáním po dobu 5 minut.

#### **4.4 Extrakce tonalidu pomocí SPE**

Vzhledem k malé rozpustnosti a nízkým reálným koncentracím studované látky ve vodě či kultivačních experimentech byly provedeny pokusy o izolaci a kvantifikaci tonalidu pomocí SPE metody.

SPE kolona byla aktivována promytím 10 ml methanolu, 10 ml acetonu a 20 ml destilované vody při průtoku přibližně 2 ml/min. Průtok byl řízen nastavením vhodné hodnoty vakua manostatem na SPE zařízení. Na takto připravenou kolonu byl aplikován vzorek tonalidu definované koncentrace v destilované vodě za stejného průtoku jako v případě kondicionace. Poté byla kolona sušena prosáváním vzduchu po dobu 15 minut a následně byla sorbovaná substance vymyta 5 ml destilovaného acetonu při průtoku 2 ml/min. Acetonový roztok byl za vakua odpařen ve zkumavce umístěné v temperovaném bloku a odparek rozpuštěn v definovaném množství methanolu a analyzován HPLC. Použité koncentrace tonalidu, objemy vzorků a elučního roztoku jsou uvedeny v následující Tab. 4.1. Experimenty s koncentracemi tonalidu 0,315 a 1,26 mg/l byly provedeny s jinou kondicionací SPE kolony, a to v sekvenci 2x promytí 2 ml methanolu a 2 ml vody, poté byla kolona 5 minut sušena a vzorek tonalidu ve vodě aplikován na suchou kolonu. Po aplikaci vzorku byla kolona promyta 2 ml vody a následovalo 5 minut sušení a eluce 10 ml acetonu. Průtokové rychlosti byly stejné-viz.výše, shodné je i další zpracování - odpaření a naředění pro HPLC měření.

Tab. 4.1: SPE experimenty a jejich parametry (kondicionace viz. text, průtok 2 ml/min, pro každý experiment použita nová SPE kolona, každý experiment byl prováděn třikrát, u experimentů označených v položce faktor zakoncentrování hvězdičkou bylo těsně před vlastní analýzou provedeno naředění vzorku do koncentrace odpovídající výpočtem rozmezí kalibrační závislosti).

Koncentrace tonalidu ve vodě [mg/l]	Objem použitého roztoku [ml]	Objem elučního roztoku – aceton [ml]	Objem methanolu pro rozpuštění odparku [ml]	Faktor zakoncentrování
0,700	5	5	2	25
0,070	50	5	1	50
1,160	5	5	2	2,5*
0,116	50	5	1	50*
1,160	5	10	2	2,5*
0,116	50	10	1	50*
0,315	50	10	1	50*
1,260	25	10	1	25*

Experimenty byly prováděny ve třech paralelních stanoveních a kromě uvedených koncentrací byly ještě testovány další koncentrace 0,8 mg/l, 0,08 mg/l a 0,107 mg/l. Tyto experimenty nebyly prováděny opakovaně a nejsou proto zahrnuty do tabulky.

#### 4.5 Příprava rostlinného materiálu

Semena kukuřice (*Zea mays L.*, var. Mesnil, KWS Osiva s.r.o., Velké Meziříčí) byla povrchově sterilizována 70% ethanolem po dobu 1 minuty a poté roztokem chlornanu sodného (10% SAVO) 20 minut. Poté byla semena třikrát promyta sterilní destilovanou vodou. Takto upravená semena byla za sterilních podmínek vysázena do sterilních kultivačních baněk o objemu 500 ml s 10 ml živného média. Do každé baňky bylo vysazeno 5 semen.

Jako živné médium byl použit roztok anorganických solí MS podle Murashiga a Skooga [41] s *myo*-inositem (100 mg/l), pH bylo upraveno před autoklávováním na 5,8 – 6,0. Sterilizace média probíhala přímo v baňkách po dobu 30 minut. Složení média je uvedeno v Tab. 4.2.



Tab. 4.2: Složení použitého MS média.

<b>Chemikálie</b>	<b>Koncentrace [mg/l]</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	8,6
Komplexon I	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,250
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,3
<i>Myo</i> -inositol	100

Rostliny byly kultivovány v kultivačních boxech při 25 °C se světelným režimem 12h světlo/12 h tma. Růst rostlin a případná kontaminace kultur byly průběžně vyhodnocovány. Při nedostatku média v době růstu bylo za sterilních podmínek doplněno 5 – 10 ml čerstvě připraveného sterilního média injekční stříkačkou. Po třech až pěti týdnech dosáhly rostliny optimální velikosti a byly použity pro fytoextrakční experimenty.

#### **4.6 Fytoextrakce tonalidu rostlinami kukuřice**

Z kultivačních baněk se vzrostlými rostlinami kukuřice bylo odsáto kultivační médium a za sterilních podmínek nahrazeno médiem obohaceným o studované xenobiotikum tonalid o koncentraci 1 mg/l. Objem přidaného média byl 200 ml. Rostliny byly kultivovány za podmínek, při kterých byly kultury připraveny a po 3 a 72 hodinách byly sterilně odebrány vzorky média o objemu 15 ml. Odebrané vzorky byly extrahovány třepáním po dobu 5 minut s 5 ml destilovaného ethyl-acetátu a organická frakce byla analyzována HPLC na přítomnost a koncentraci tonalidu,

---

chromatogramy byly zároveň vyhodnocovány vzhledem k přítomnosti nově vzniklých sloučenin, pravděpodobně metabolitů výchozího xenobiotika. Kultivační experiment byl proveden čtyřikrát.

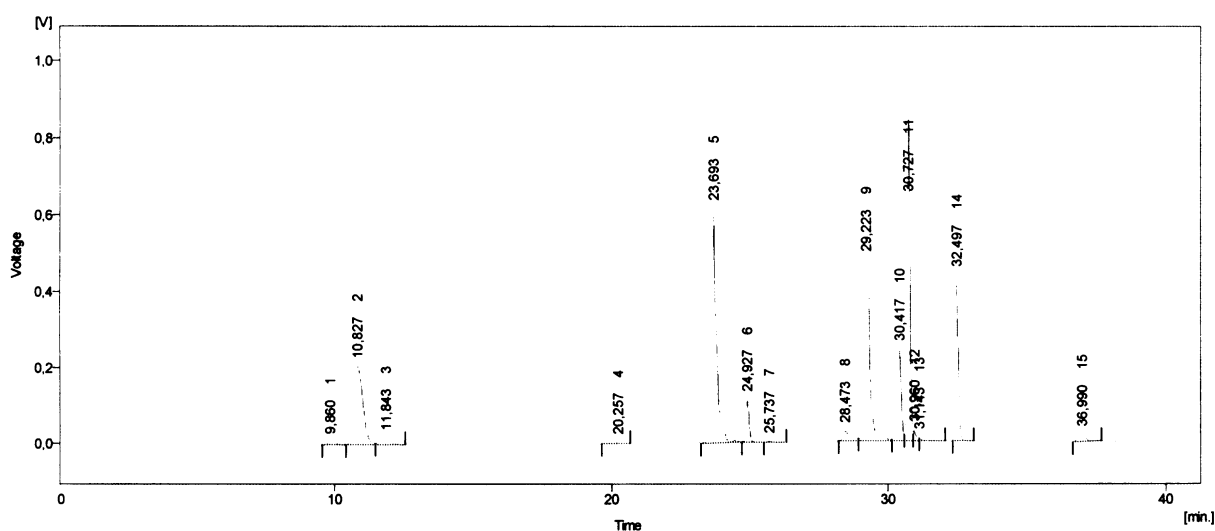
#### 4.7 Příprava jodtonalidu pro účely získání [<sup>3</sup>H]tonalidu

Pokus o přípravu jodtonalidu byl proveden běžnou metodou jodace aromatických sloučenin [42].

Do baňky opatřené zpětným chladičem bylo vneseno 4 g (25 mmol) tonalidu, 8,85 g (35 mmol) jodu, 100 ml kyseliny octové, 4 ml kyseliny dusičné, 10 ml kyseliny sírové a 5 ml tetrachlormethanu. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 4 hodiny (sledováno TLC do vymizení výchozí látky). Po ukončení zahřívání byla směs neutralizována roztokem 20% hydroxidu sodného do slabě kyselé reakce a vytřepána 3 x 100 ml diethyletheru. Organická frakce byla dále vytřepána 2 x 100 ml 10% roztoku siřičitanu sodného k odstranění přebytečného jodu, sušena přes noc síranem hořečnatým a po jeho odstranění byl ether odpařen. Vzniklá hmota byla třikrát krystalována - jedenkrát z ethanolu a dvakrát z toluenu. Bylo izolováno 110 mg krystalické hmoty, dle TLC odlišné substance od výchozí látky a s UV absorpcí. Látka byla analyzována MS a <sup>1</sup>H NMR spektroskopii. Spektra nebyla jednoznačně identifikovatelná a ani pokus o zpětnou dehalogenaci tributylstannanem za katalytických podmínek, která je na aromatických systémech ověřena [43], neprokázal zpětný vznik původní molekuly tonalidu.

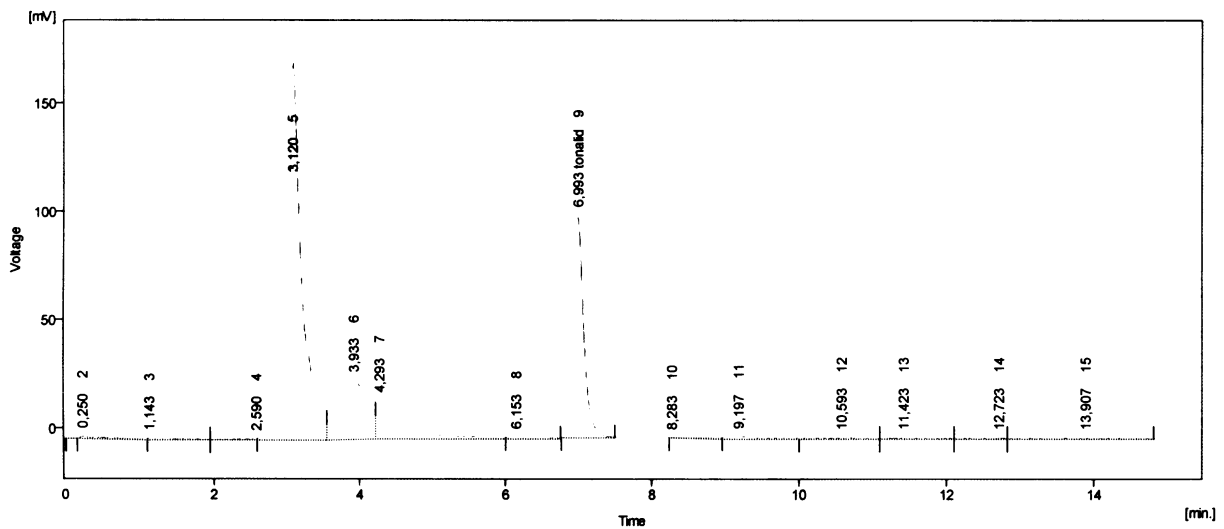
## 5 Výsledky a diskuse

Tonalid je součástí parfemačních kompozic pracích prášků a některých dalších výrobků spotřební chemie. V první fázi proto byly analyzovány čtyři získané kompozice s cílem použít je přímo k fytoextrakčním experimentům. Přestože se podařilo nalézt podmínky pro separaci jednotlivých komponent, ukázalo se, že směsi jsou příliš bohaté na počet chemických individuí a počet detekovaných signálů převyšuje počet látek uvedený v základní receptuře (Obr. 5.1). Interpretace v reálném kultivačním experimentu by tak byla velmi obtížná a navíc by mohlo docházet k interferencím s metabolity komponent. Proto byla v dalších fázích použita k experimentům čistá substance tonalid.

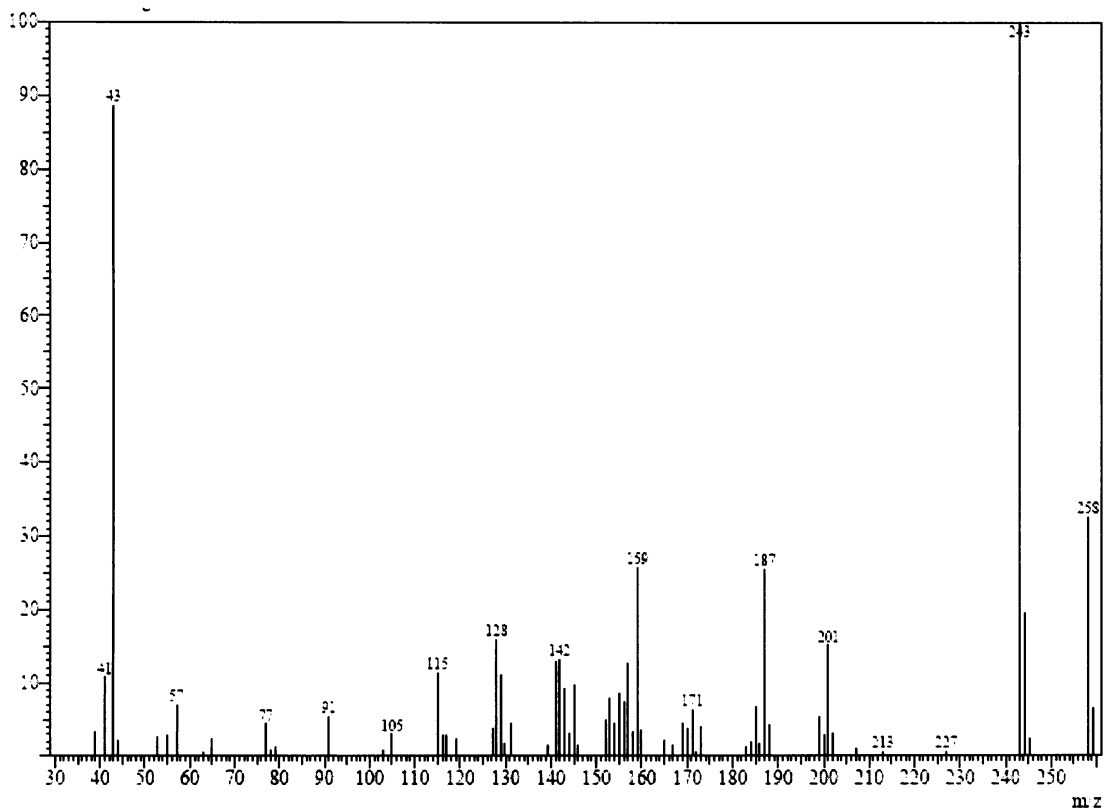


Obr. 5.1: Chromatogram komerčně dodávané směsi kompozita 100758041 (Titania, DROM fragrances international, SRN), (kolona Reprosil 100 C-18, 5  $\mu$ m, 250 x 4,5 mm, methanol/voda (6:4), 0,7 ml/min, UV 254 nm).

HPLC tonalidu bylo testováno nejprve s cílem přímo analyzovat kultivační média, přestože chromatogramy v modelových experimentech vykazovaly dobrou separaci signálu hledané látky (Obr. 5.2), odezva tonalidu byla přijatelná a identifikována GC/MS (Obr. 5.3).



Obr. 5.2: Chromatogram komerčně dodávaného tonalidu v kultivačním médiu MS (kolona Reprisil 100 C-18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,5 mm, methanol + 0,1 % kyseliny octové, 0,6 ml/min, UV 254 nm). Signál s retencí 6,9 min odpovídá tonalidu (GC/MS), signály s nižším retenčním časem jsou odezvou komponent média.

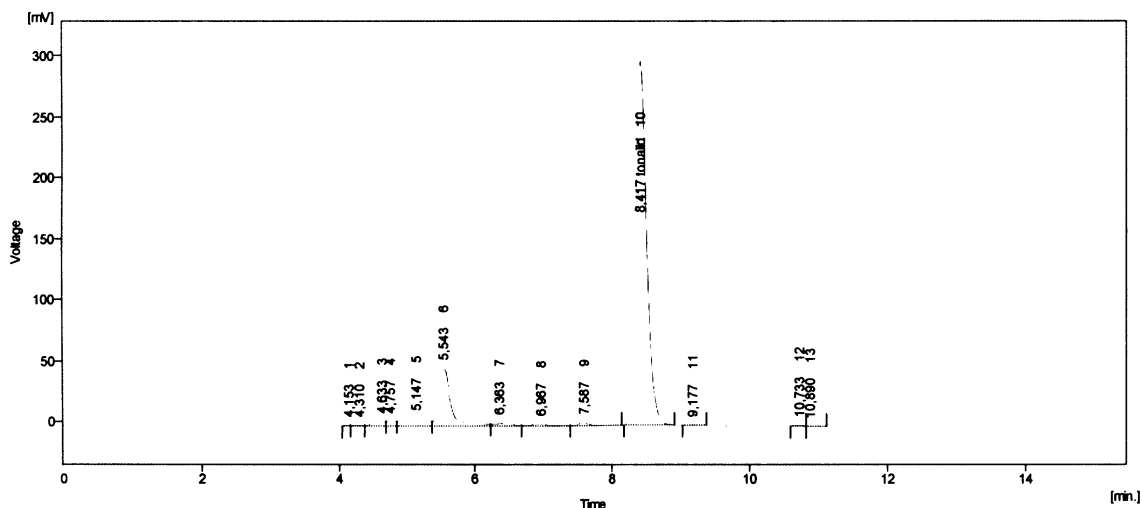


Obr. 5.3: GC/MS spektrum tonalidu, signál m/z 258 odpovídá molekulárnímu píku tonalidu.

Přes tento pozitivní výsledek se objevily mimořádné potíže se stanovením koncentrace tonalidu v reálných kultivačních médiích při přímém nástřiku a současně

byla zřejmá nutnost stanovení nízkých koncentrací za účelem vyvinutí metody pro měření reálných vzorků, byly provedeny a ověřeny kalibrační závislosti analýzou vzorků z ethyl-acetátu a methanolu jako předpokládaných vzorků z extrakce kapalina/kapalina a SPE metody.

Chromatogram při analýze roztoku tonalidu z roztoku methanolu je na Obr. 5.4.



Obr. 5.4: Chromatogram komerčně dodávaného tonalidu z roztoku v methanolu (kolona Reprosil 100 C-18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,5 mm, methanol, 0,5 ml/min, UV 254 nm). Pro uvedený systém byla naměřena kalibrační závislost v oblasti koncentrací 1 - 4 mg/l s korelačním koeficientem 0,9994, která byla použita k vyhodnocení roztoků tonalidu v methanolu po SPE. V případě nástřiku tonalidu v ethyl-acetátu byla získána kalibrační přímka pro stejné koncentrační rozmezí 1 - 4 mg/l s korelačním koeficientem 0,9988.

Extrakce tonalidu ethyl-acetátem z média byla provedena především z důvodů nemožnosti přímé analýzy a potvrdila možnost takového postupu při analýze reálných kultivačních experimentů. Byly testovány tři systémy vzhledem k poměru kultivačního média s obsahem 1 mg/l tonalidu k ethyl-acetátu 2:1, 3:1 a 4:1, přičemž nejlepší výsledky byly získány pro poměr 2:1, kde pro předpokládanou finální koncentraci v ethyl-acetátu 2 mg/l byla jako průměr z devíti experimentů a HPLC stanovení koncentrace získána hodnota 1,971 +/- 0,031 mg/l, což odpovídá účinnosti extrakce 98,6 %. U zbylých poměrů s vyšším poměrem média k ethyl-acetátu je sice výhodnější faktor zakoncentrování, nicméně výsledky jsou podstatně méně přesné a pravděpodobně interference s neseparovanými nečistotami z rozpouštědla produkuje vysoké výsledky analýz. Pro konečnou předpokládanou koncentraci 3 mg/l (15 ml média/5 ml extrakčního činidla) byly získány výsledky 3,426 +/- 0,305 mg/l (114 %,

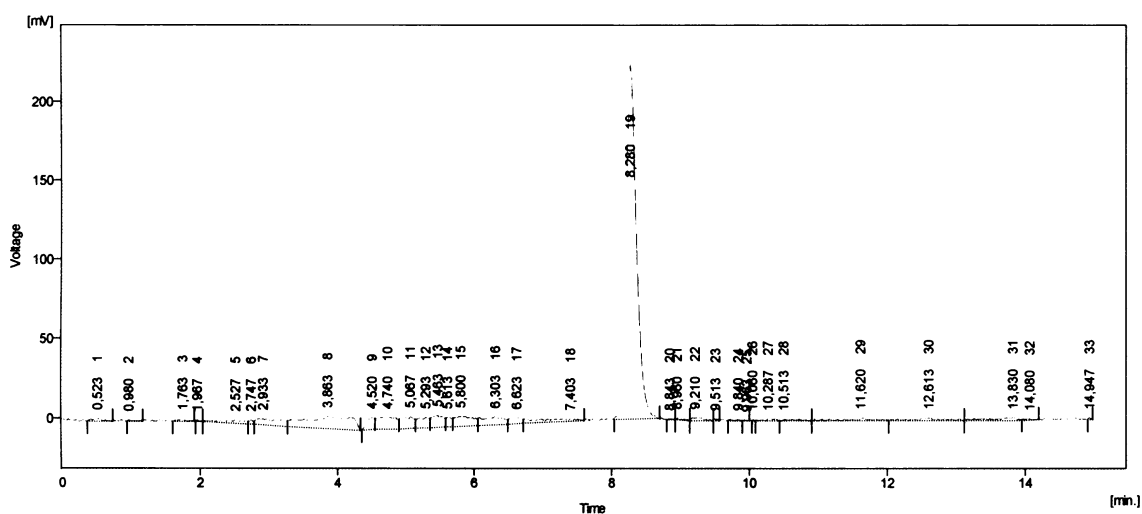
6 experimentů) a pro finální koncentraci 4 mg/l (40 ml média/10 ml extrakčního činidla) 4,886±0,245 mg/l (122 %, 7 experimentů). Přestože určitou roli může hrát i odpaření rozpouštědla během manipulace se vzorkem, jeví se jako nejpravděpodobnější příčinou chyby chromatografické interference s nečistotami extrakčního rozpouštědla a určitou roli může hrát i rozpustnost ethyl-acetátu ve vodě. Přepočtení na rozpustnost je však problematické, protože uváděné údaje se velmi rozcházejí (0,3 - 1 ml na 10 ml vody) a současně použité médium může hrát výraznou roli. Doplnění odebraného roztoku ethyl-acetátu na definovaný objem navíc nepřineslo výrazné zlepšení výsledků, ale pouze přiblížilo stanovované hodnoty k očekávaným. Lze tak usoudit na superpozici všech diskutovaných vlivů. Podstatnějším je však fakt, že při vyšších poměrech média k ethyl-acetátu dochází k vyššímu rozptylu získaných hodnot. Při vlastní práci tak byl použit poměr extrahovaného média k ethyl-acetátu 2:1, který v modelových pokusech dával nejlepší výsledky blízké realitě.

Vzhledem k nutnosti stanovování ještě nižších koncentrací tonalidu byly provedeny orientační pokusy s jeho izolací z vodných roztoků pomocí SPE. Jako materiál byly použity běžné C-18 kolony s 500 mg sorbentu a na nich byla provedena extrakce v rozsahu koncentrací 0,116 - 1,26 mg/l, každá koncentrace byla extrahována 3x, zcela odlehlé výsledky byly eliminovány. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 5.1.

Tab. 5.1: Výsledky testování účinnosti SPE pro roztoky tonalidu ve vodě za různých podmínek (u experimentů označených hvězdičkou bylo provedeno dodatečné ředění vzorku před HPLC analýzou, aby bylo dosaženo koncentrací odpovídajících rozsahu kalibračního vztahu).

Koncentrace tonalidu ve vodě [mg/l]	Objem použitého roztoku [ml]	Objem elučního roztoku – aceton [ml]	Objem methanolu pro rozpuštění odparku [ml]	Faktor zakonzentrování	Očekávaná koncentrace [mg/l]	Nalezená koncentrace [mg/l]	Účinnost extrakce [%]
0,700	5	5	2	25	1,75	1,41	80,6
0,070	50	5	1	50	3,50	3,03	86,6
1,160	5	5	2	2,5*	2,90	2,57	88,6
0,116	50	5	1	50*	5,80	5,97	102,9
1,160	5	10	2	2,5*	2,90	2,73	94,1
0,116	50	10	1	50*	5,80	6,00	103,4
0,315	50	10	1	50*	15,75	15,70	99,7
1,260	25	10	1	25*	31,50	31,50	102,5

Výsledky SPE izolace se pohybují v rozsahu 80,6 - 102,9 %, eliminujeme-li některé neuvedené výsledky, kde došlo ke zřejmé experimentální chybě jako např. nehomogenita modelového roztoku, ztráta části roztoku během odpařování, odpaření rozpouštědla během manipulace apod. Významným problémem je velmi omezená rozpustnost látky ve vodných roztocích, kdy zřejmě vizuální vymizení tonalidu ze suspenze při rozpouštění za pomoci ultrazvuku nedává dostatečnou záruku homogenity vzorku. Tím lze vysvětlit výtěžky separace nad 100 %, roli v těchto případech může hrát i částečné odpaření organického rozpouštědla, či chyba chromatografické analýzy. Na druhé straně však lze konstatovat, že chromatogramy extraktů z SPE ukazují na přítomnost prakticky jediné substance ve finálním roztoku, viz. Obr. 5.5.

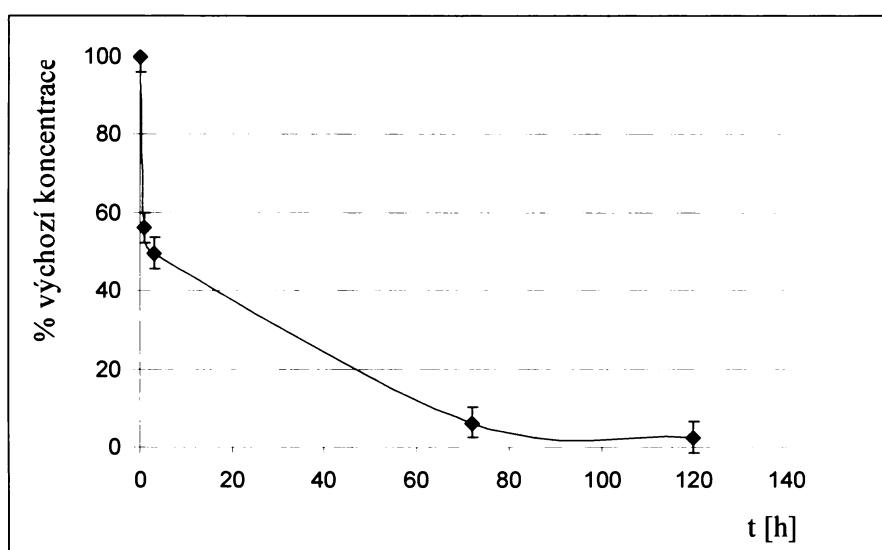


Obr. 5.5: Chromatogram extraktu z SPE kolony, roztok v methanolu po odpaření eluentu – acetonu (kolona Reprisil 100 C-18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,5 mm, methanol , 0,5 ml/min, UV 254 nm).

Na základě získaných výsledků se zdá, že bude možné vypracovat metodu kvantifikace tonalidu metodou SPE, bude však třeba řady optimalizačních kroků s preferencí reprodukovatelnosti před účinností extrakce, tak jak byly experimenty vedeny v této práci.

Dalšími prováděnými experimenty bylo testování možnosti fytoextrakce tonalidu rostlinami kukuřice. Vzhledem k velké lipofilitě studované látky lze předpokládat poměrně rychlou fytoextrakci, a proto byl experiment navržen již s počátečním odběrem po 1 hodině.

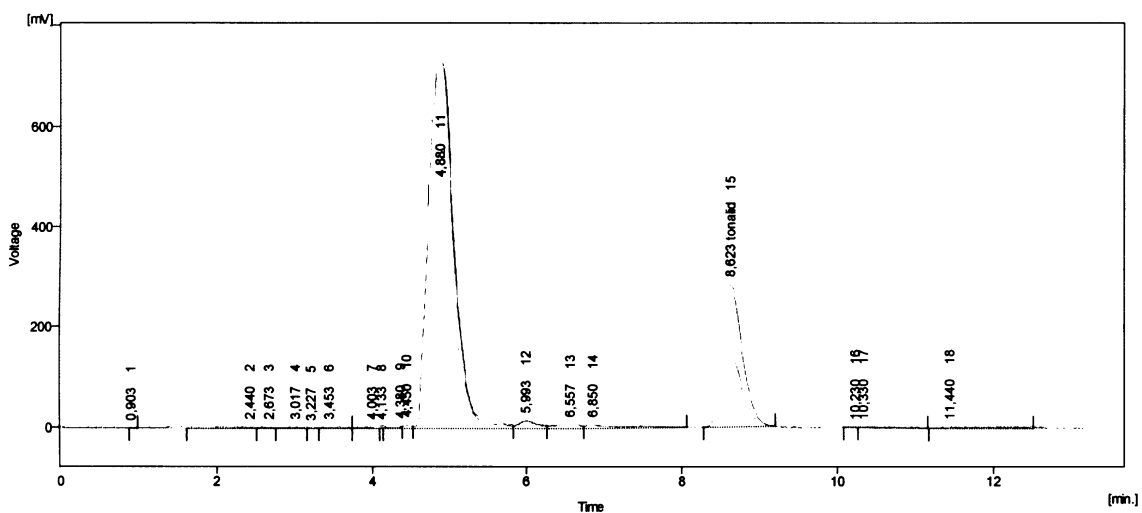
Průběh extrakce je uveden na Obr. 5.6, kde lze usoudit poměrně rychlý průběh fytoextrakčního procesu. První část křivky se vyznačuje rychlým poklesem, který je zřejmě způsoben superpozicí sorpčních a fytoextrakčních pochodů. Podstatnou je však další část křivky, která vyznačuje postupný pokles koncentrace tonalidu v médiu a zjevně odpovídá fytoextrakčnímu pochodu. V oblasti mezi třetí a 72. hodinou za předpokladu lineární aproximace je rychlost fytoextrakce  $0,003 \text{ mg/l} \cdot \text{h} \cdot \text{g}$  (čerstvé hmotnosti). V celkové bilanci bylo po 3 hodinách kultivace nalezeno v médiu 49,7 % výchozí koncentrace, po 72 h 6,4 % výchozí koncentrace a po 120 h klesla koncentrace tonalidu v médiu na 2,4 % výchozí hodnoty. Experiment tedy prokázal schopnost rostlin kukuřice extrahovat studovanou látku z vodných médií.



Obr. 5.6 Časový průběh fytoextrakce tonalidu rostlinami kukuřice (koncentrace stanoveny HPLC po extrakci odebraného vzorku média do ethyl-acetátu).

Ukázka chromatogramu kultivačního média je na Obr. 5.7. Kromě signálů média (4,880 min) a označeného tonalidu se během kultivace objevují dva nové signály (zelená linie) za odezvu média. Větší z nich byl separován HPLC a bylo změřeno hmotnostní spektrum, které poskytlo signál  $m/z$  313,4, u kterého sice nelze přímo určit struktury, ale charakter štěpení napovídá hydroxyderivátu.





Obr. 5.7: HPLC analýza média při kultivaci rostlin kukuřice na médiu obohaceném o tonalid (modrá - odběr po 0 hodinách, červená – po 3 hodinách, zelená – po 72 hodinách), (kolona Reprisil 100 C-18, 5  $\mu$ m, 250 x 4,5 mm, methanol , 0,5 ml/min, UV 254 nm).

Kromě signálů média (4,880 min) a označeného tonalidu se během kultivace objevují dva nové signály (zelená linie) za odezvu média. Větší z nich byl separován HPLC a bylo změřeno hmotnostní spektrum, které poskytlo signál m/z 313. Vzhledem k nepatrnému množství látky nebylo možné naměřit další spektra, která by byla nutná k identifikaci struktury. Na základě analýzy hmotnostního spektra lze pouze usoudit na zvětšení molekuly a fragmentační schéma napovídá přítomnosti hydroxyskupiny. Z charakteru spektra však nelze jednoznačně usoudit, zda se jedná o metabolit tonalidu nebo o stresový metabolit vlastní rostliny indukovaný přítomností tonalidu.

Přesto, že se podařilo realizovat všechny body definované projektem, je nutné konstatovat, že analýza a chování tonalidu ve vodných roztocích je v rámci použitých metod velmi obtížná a mnohdy poskytuje málo reprodukovatelné výsledky. Z tohoto důvodu byla částečně rozpracována metodika, při které by se využívalo radioaktivně značeného tonalidu. Detekce by s použitím izotopicky modifikované molekuly, předpokládá se tritiem, byla zcela specifická a i při pouhém stopovacím experimentu by nenastávaly pochybnosti o identitě či příbuznosti získaných látek se studovaným tonalidem, u kterého sice nelze přímo určit strukturu, ale charakter štěpení napovídá hydroxyderivátu a zvětšení molekuly.

---

## 6 Závěr

V práci byla studována látka tonalid, jako zástupce mošusových látek, používaných ve výrobcích spotřební chemie. Byla provedena jeho identifikace v některých parfemačních kompozicích do práškových prášků. Vlastní práce byly prováděny se samotným tonalidem. Přesto, že byly nalezeny chromatografické podmínky pro separaci tonalidu z kultivačního média, nebyly výsledky kvantifikace získaných měření uspokojivé a byla hledána alternativní cesta. Takovým postupem je kapalinová extrakce do ethyl-acetátu a využití metody SPE. Vypracování takové metody by posléze umožnilo i analýzu reálných vzorků - například na odtoku z čistírny odpadních vod v Praze. U obou testovaných metod byly získány výsledky, které jsou sice povzbudivé, nicméně pro praktické užití k monitoringu tonalidu v odpadních vodách vypracované metody přímo použitelné nejsou. Základní problémy jsou malá reprodukovatelnost a použité koncentrace jsou stále ještě vysoké proti reálným očekávaným hodnotám. Vhodně modifikovaným postupem a změnou analytické koncovky na GC/MS bude zřejmě možné dosáhnout požadovaného cíle.

Jakkoliv problematika analýzy nízkých koncentrací tonalidu ve vodách zůstává otevřená, výsledky fytoextrakční studie s rostlinami kukuřice podávají jasný důkaz o schopnosti použité rostlinné species extrahovat tonalid z vodného prostředí. Navíc se prokázala i přítomnost či tvorba jedné až dvou nových substancí, u nichž je třeba vyhodnotit strukturu a toxicitu, aby případné použití testovaného systému v kořenových či mokřadových technologických uspořádáních bylo bezpečné.

---

## 7 Literatura

1. OSPAR (Oslo and Paris Commission): Agenda Item 3. DIFF 99/3/12-E. OSPAR convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic. Working group on diffuse sources (DIFF). Bern-Ittigen 18-22 October 1999. Draft Background Document concerning the Elaboration of Programmes and Measures on Musk Xylenes and other Musks. Presented by Switzerland, (1999).
2. Daughton, C.G.; Ternes, T.A.: *Environ. Health Persp.*, **107**, 907 (1999).
3. Ternes, T.A.: *Water Res.*, **32**, 3245 (1998).
4. Paxeus, N.: *Water Sci. Technol.*, **50**, 253 (2004).
5. OSPAR (Oslo and Paris Commission): Agenda Item 13. DIFF 97/13/1-E. Oslo and Paris conventions for prevention of marine pollution working group on diffuse sources (DIFF). Oslo 20-24 October 1997. Musk Compounds, (1997).
6. Römpf Lexicon Chemie. Version 1.3, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag (1997).
7. Plassche, E.J. van de; Balk, F. (1997): Environmental risk assessment of the polycyclic musks AHTN and HHCB according to the EU-TGD (Risico evaluatie van de polycyclische musken AHTN en HHCB in het milieu volgens de EU-TGD), RIVM raport 601503008, 121p in English, 1997, price NLG 40; abstract: <http://www.rivm.nl/lib/Reports/601503008.html>.
8. Sledované ukazatele jakosti povrchových vod, ČHMU <http://hydro.chmi.cz/ojv/> (20.2.2007).
9. Modler, R.F.; Fenelon, S.; Yoshida, Y.: Surfactants, household detergents and their raw materials. CEH Marketing Research Report. Surface-Active Agents 583.8000 A. July 1998. 1998 by the Chemical Economics Handbook- SRI International, (1998).
10. Paxeus, N. (1996): *Wat. Res.*, **30**, 1115 (1996).
11. Yamagishi, T.; Miyazaki, T.; Horii, S.; Kaneko, S.: *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 656 (1981).

- 
12. Yamagishi, T.; Miyazaki, T.; Horii, S.; Akiyama, K.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **12**, 83 (1983).
  13. Winkler, M.; Kopf, G.; Hauptvoege, C.; Neu, T.: *Chemosphere* **3**, 1139 (1998).
  14. Draisci, R.; Marchiafava, C.; Ferretti, E.; Palleschi, L.; Catellani, G.; Anastasio, A.: *Chromatogr. A*, **814**, 187 (1998).
  15. Mersch-Sundermann, V.; Kevekordes, S.; Jentero, C.: *Toxicol. in Vitro*, **12**, 389 (1998).
  16. Müller, S.; Schmid, P.; Schlatter, C.: *Chemosphere*, **33**, 17 (1996).
  17. Geyer, H.J.; Rimkus, G.; Wolf, M.; Attar, A.; Steinberg, C.; Kettrup, A.: *Umweltchem Ökotox.*, **6**, 9 (1994).
  18. Rimkus, G.; Butte, W.; Geyer, H.J.: *Chemosphere*, **35**, 1497 (1997).
  19. Kevekordes, S.; Mersch-Sundermann, V.; Diez, M.; Bolten, C.; Dunkelberg, H.: *Anticancer Res.*, **18**, 449 (1998).
  20. Goettlich, P.: Endocrine Disruptors, <http://www.mindfully.org/Pesticide/EDs-PWG-16jun01.htm> (15. 4. 2007).
  21. Gatermann, R.; Hühnerfuss, H.; Rimkus, G.; Attar, A.; Kettrup, A.: *Chemosphere*, **36**, 2535 (1998).
  22. Kirschner, E.M.: *Chem. Eng. News*, **75**, 19 (1997).
  23. Japan Chemical Week: March 5, 1998, page 3; cit. In: F&S Index Plus Text Intl 1/94-5/98 (1998).
  24. Šípal, Z.; Anzenbacher, P.; Peč, P.; Pospíšil, J.; Růžička, I.: *Biochemie*, SPN, Praha, (1992).
  25. Sandermann, H.: *Pharmacogenetics*, **4**, 225 (1991).
  26. Sandermann, H.: *TIBS*, **17**, 82 (1992).
  27. Bollwel, G.P.; Bozak, K.; Zimmerlin, A.: *Phytochemistry*, **37**, 1491 (1994).
  28. Vodrážka, Z.: *Biochemie* (III), Academia, Praha, (1999).
  29. Chromá, L.; Macková, M.; Macek, T.; Martínek, V.; Stiborová, M.: *Chem. Listy*, **95**, 212 (2001).
  30. Dietz, A.C.; Schnoor, J.L.: *Environ. Health Perspectives Supplements*, **109**, 163 (2001).
  31. Lamoreux, G.L.: *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 996 (1981).
  32. Marrs, K.A.: *Plant Mol. Biol.*, **47**, 127 (1996).

- 
33. Cunningham, S.D.; Ow D.W.: *Plant Physiol.*, **110**, 715 (1996).
  34. Cunningham, S.D.; Berti, W.R.; Juany, J.W.: *TIBTECH*, **13**, 393 (1995).
  35. Watanabe, M.E.: *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 182 (1997).
  36. Dushenkov, S.; Vasudev, D.; Kapulnik, Y.; Gleba, D.; Fleisher, D.; Ting, K.C.; Ensley, B.D.: *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 3468 (1997).
  37. Anderson, T.A.; Guthrie, E.A.; Walton, B.T.: *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 2630 (1993).
  38. Rugh, C.L.; Wilde, H.D.; Stach, N.M.; Thompson, D.M.; Summers, A.O.; Meagher, R.B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3182 (1996).
  39. Rugh, C.L.; Senecoff, J.F.; Meagher, R.B.; Merkle, S.A.: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 925 (1998).
  40. [http://www.waste.cz/waste.php?clanek=02-05/Remediace\\_pud.htm](http://www.waste.cz/waste.php?clanek=02-05/Remediace_pud.htm) (21.3.2007)  
Tlustoš, P.; Száková, J.; Fischerová, Z.; Šichorová, K.: Příspěvek ze Sborníku z 10. mezinárodní konference „Racionální využití hnojiv“ zaměřené na problematiku rizikových látek v rostlinné výrobě, (2004).
  41. Murashige, T.; Skoog, F.: *Physiol Plant*, **15**, 473 (1962).
  42. Dains, F.B.; Brewster, R.Q.: *Org. Synth. Coll.*, **1**, 323 (1947).
  43. Komínková, M.: *Diplomová práce*, UK v Praze PŘF, (2006).