

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za *farmacijo*



Ranka Prerad

# **SINTEZNI MOŠUSI V REKI KRKI**

Magistrska naloga

Magistrski študij Industrijska farmacija

Ljubljana, 2011

## IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorskim vodstvom doc. dr Damjana Janeša, mag. farm. na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo.

Ranka Prerad

## VSEBINA

1	UVOD .....	1
1.1	NARAVNI MOŠUSI.....	3
1.1.1	Živali.....	3
1.1.2	Rastline .....	7
1.2	SINTEZNI MOŠUSI.....	8
1.2.1	Nitro mošusi .....	8
1.2.2	Policiklični mošusi .....	10
1.2.3	Makrociklični mošusi .....	12
1.2.4	Linearni ali aliciklični mošusi .....	15
1.3	METABOLIZEM IN FARMAKOKINETIKA SINTEZNIH MOŠUSOV .....	16
1.3.1	Perkutana absorpcija.....	16
1.3.1.1	<i>Nitro mošusi</i> .....	16
1.3.1.2	<i>Policiklični mošusi</i> .....	17
1.3.2	Biotransformacija .....	17
1.3.2.1	<i>Nitro mošusi</i> .....	17
1.3.2.2	<i>Policiklični mošusi</i> .....	18
1.3.3	Distribucija in eliminacija .....	18
1.3.3.1	<i>Nitro mošusi</i> .....	18
1.3.3.2	<i>Policiklični mošusi</i> .....	19
1.4	TOKSIČNO DELOVANJE SINTEZNIH MOŠUSOV .....	19
1.4.1	Akutna zastrupitev .....	20
1.4.1.1	<i>Nitro mošusi</i> .....	20
1.4.1.2	<i>Policiklični mošusi</i> .....	20
1.4.2	Subkronična zastrupitev .....	21
1.4.2.1	<i>Nitro mošusi</i> .....	21
1.4.2.2	<i>Policiklični mošusi</i> .....	21
1.4.3	Indukcija metabolnih encimov .....	22
1.4.3.1	<i>Nitro mošusi</i> .....	22
1.4.3.2	<i>Policiklični mošusi</i> .....	23
1.4.4	Mutagenost in genotoksičnost .....	24
1.4.4.1	<i>Nitro mošusi</i> .....	24

1.4.4.2	<i>Policiklični mošusi</i> .....	24
1.4.4.3	<i>Makrociklični mošusi</i> .....	24
1.4.5	Kancerogenost .....	25
1.4.6	Fotoalergija.....	25
1.4.7	Teratogenost/Embriotoksičnost.....	25
1.5	VPLIV SINTEZNIH MOŠUSOV NA OKOLJE .....	25
1.5.1	Prisotnost sinteznih mošusov v odpadnih vodah.....	26
1.5.2	Prisotnost sinteznih mošusov v površinskih vodah (reke, jezera).....	26
1.5.3	Prisotnost sinteznih mošusov v pitni vodi .....	27
1.6	PRISOTNOST SINTEZNIH MOŠUSOV V SLOVENSKEM VODNEM OKOLJU.....	28
2	NAMEN DELA .....	29
3	MATERIALI IN METODE .....	30
3.1	VZORCI VODE .....	30
3.2	KEMIKALIJE .....	30
3.3	APARATURE IN OPREMA .....	30
3.4	PLINSKA KROMATOGRFIJA.....	31
3.4.1	Splošni pomen GC.....	31
3.4.2	Plinski kromatograf .....	31
4	EKSPERIMENTALNO DELO .....	37
4.1	PRIPRAVA VZORCEV VODE .....	37
4.2	GC-MS ANALIZA.....	37
5	REZULTATI.....	38
5.1	DOLOČITEV MEJE DETEKCIJE .....	38
5.2	ANALIZA STANDARDOV POLICIKLIČNIH MOŠUSOV .....	38
5.3	ANALIZA VZORCEV VODE .....	41
6	RAZPRAVA .....	49
7	ZAKLJUČEK.....	52
8	LITERATURA.....	53
	PRILOGE .....	55

## POVZETEK

Mošus je prvotni izraz za snov z ostrim vonjem iz žleze samca mošusovega jelena (*Moschus moschiferus*), ki jo najdemo med trebuhom in genitalijami. Ime izvira iz sanskrske besede *muska*, ki pomeni modo (testis). Nobena naravna snov nima tako kompleksnega vonja, povezanega s tako veliko nasprotujočih si opisov. Ponavadi ga opisujejo abstraktno kot animaličen, zemeljski, lesni vonj ali vonj, podoben dojenčkovi koži. Odkritje sinteznih mošusov je omogočilo zamenjavo naravnih mošusov, ki jih zaradi ogroženosti živali in visoke cene danes ne uporabljamo več. Prvi sintezni mošusi so bile aromatske nitro spojine, sledili so jim policiklični mošusi. Slaba lastnost obeh skupin je velika lipofilnost in počasna biološka razgradljivost, zato se kopičijo v okolju, vstopajo v prehransko verigo in tako ogrožajo tudi zdravje človeka. Leta 1981 npr. so odkrili prisotnost nitro mošusov v ribah ter školjkah, ki živijo v reki Tam na Japonskem. Ker je uporaba sinteznih mošusov zelo razširjena, predvsem v izdelkih, ki se uporabljajo v velikih količinah (npr. detergenti in kozmetika), to lahko dolgoročno vodi do hudega onesnaževanja okolja. Na celotnem toku reke Krke smo izvedli vzorčenje vode. Vzorčenje je potekalo na osmih lokacijah in sicer: Velike Malence, Kostanjevica, Dobrava pri Škocjanu, Mačkovec, Srebrniče, Soteska, Žužemberk ter izviri reke Krke. Zaradi hlapnosti spojin smo za analizo uporabili plinsko kromatografijo (GC). Rezultati naših analiz so pokazali, da v reki Krki sintezni nitro in policiklični mošusi niso prisotni v koncentracijah nad 32,8 ng/L. V prihodnje bo potrebno optimizirati analizno metodo GC-MS in spremeniti način priprave vzorcev tako, da bo možno zaznavanje nižjih koncentracij in tudi kvantitativno vrednotenje.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ADBI	4-acetil-1,1-dimetil-6-terc-butildihidroindan (Celestolide <sup>®</sup> )
AHDI	6-acetil-1,1,2,3,3,5-heksametildihidroindan (Phantolide <sup>®</sup> )
AHTN	7-acetil-1,1,3,4,4,6-heksametiltetrahidronaftalen (Tonalide <sup>®</sup> )
ATTN	7-acetil-1,1,4,4-tetrametil-6etiltetrahidro-naftalen (Versalide <sup>®</sup> )
ATII	5-acetil-1,1,2,6-tetrametil-3-izopropil-dihidroindan (Thraseolide <sup>®</sup> )
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka
CITES	Konvencija mednarodnega trgovanja z ogroženimi vrstami flore in favne
CYP	encim citokrom P oksidaza
DPMI	6,7-dihidro-1,1,2,3,3-penta-metil-4(5 <i>H</i> )-indanon (Cashmeran <sup>®</sup> )
EC	Evropska komisija
EU	Evropska Unija
EUR	Evro
GC	plinska kromatografija
GST	glutation- <i>S</i> -transferaza
HHCB	1,2,3,4,6,7,8,-heksahidro-4,6,6,7,8,8,heksametilciklopenta-[g]-2 benzopiran (Galaxolide <sup>®</sup> )
IKW	Nemško združenje za kozmetiko, parfumerijo in detergente
LD <sub>50</sub>	srednji letalni odmerek
3-MC	3-metilkolantren
MK	mošus keton
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina
MX	mošus ksilen
NADPH	reducirana oblika nikotinamidadenindinukleotidfosfata
NOAEL	največji odmerek pri katerem ni opaženih učinkov
PAH	policiklični aromatski ogljikovodiki
PCB	poliklorirani bifenili
PROD	7-pentoksiresorufin- <i>O</i> -demetilaza
RIMF	Research Institute for Fragrance Materials
RS	Republika Slovenija
UDP	uridindifosfat

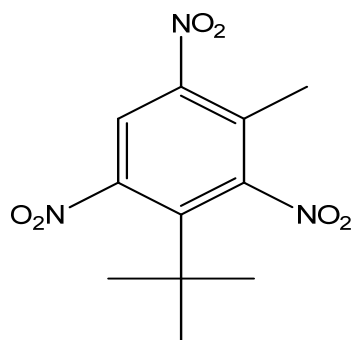
# 1 UVOD

Naravni mošus uvrščamo med najstarejše dišave, ki jih uporabljamo tako za odišavljanje prostorov pri verskih obredih kakor tudi za izdelavo različnih dišav za osebno nego. Zgodovina naravnega mošusa sega v staro Kitajsko in Indijo, kjer je bil pomemben del kulture takratne družbe.

Mošus je prvotni izraz za snov z ostrim vonjem iz žleze samca mošusovega jelena (*Moschus moschiferus*), ki jo najdemo med trebuhom in genitalijami. Ime izvira iz sanskrske besede muska, ki pomeni modo (testis). Mošus vsebuje veliko spojin s podobnimi vonji, kljub temu da so si mnoge zelo različne glede kemijske strukture. Mošusni jelen je bil neznan v klasičnem starem veku in se ga spoznali šele po 6. stoletju, ko so Grki odkrili Cosmas Indicopleustes, proizvod dobljen iz Indije. Kmalu, ko so ga arabski in bizanstinski izdelovalci parfumov začeli uporabljati, so dosegli, da je postal znan kot afrodisiak. V času vladavine Abasidov, je bil mošus zelo cenjen in islamski poglavarji Bagdada so ga uporabljali za dragocena darila. V zgodnjem 9. stoletju ga je Al-Kindi vključil v veliko število svojih receptov za parfume in tako je postal eden od pomembnih razkošnih predmetov, prinesenih z arabskimi ladjami iz vzhoda. Perzijsko ime za mošus je *mušk*, grško μόσχος (moskos), latinsko *moschus*, francosko *musc*, angleško *musk* (1).

Ne glede na njegovo visoko ceno, so mošusove tinkture uporabljali v parfumeriji do 1979, ko je mošusni jelen postal zaščiten kot ogrožena vrsta pri Konvenciji mednarodnega trgovanja z ogroženimi vrstami flore in favne (CITES), ki danes nadzoruje promet z mošusom, kljub temu pa se nadaljuje ilegalno trgovanje. Na Japonskem so leta 1987 zasegli ilegalno pošiljko 700 kg kitajskega mošusa iz mošusnega jelena, kar pomeni da so zanj ubili 100.000 živali (2, 3).

Konec 19. stoletja predstavlja začetek proizvodnje sinteznih mošusov z odkritjem prvega umetnega mošusa, ki ga je sintetiziral nemški kemik Albert Baur. ki je imela značilen vonj po mošusu. Mošus »Baur« je bil zaščiten in registriran kot prva umetno narejena spojina, ki je imela značilen vonj po mošusu (4).



**Slika 1:** Mošus Baur (tonkinol) (4).

Ne dolgo za tem sledi sinteza mošusa ketona, mošusa ksilena, mošusa tibetena in mošusa ambreta. Ti mošusi so imeli vodilno vlogo v proizvodnji dišav naslednjih 50 let. Leta 1932 je bil sintetiziran mošus mosken, ki so ga kasneje v 50. letih 20. stoletja identificirali kot enega od intermediatov za sintezo policikličnih mošusov (5). Odkritje sinteze novih tako imenovanih nitro mošusov je nadomestilo uporabo naravnih mošusov ter omogočilo široko uporabo v parfumeriji, kozmetiki, proizvodnji izdelkov za osebno nego in v različnih gospodinjskih čistilih.

Razvoj makrocikličnih mošusov se je začel, ko so Ružička in drugi kemiki odkrili strukturne lastnosti muskona in civetona, ki sta ketona in sta živalskega izvora ter eksaltolida, ki je lakton in je rastlinskega izvora. Makrocelični ketonski mošusi niso bili na voljo v večjih količinah do leta 1990 zaradi težavne sinteze. Zaradi tega dejstva ter visokih stroškov proizvodnje je danes njihov delež manj kot 5 % celotne proizvodnje sinteznih mošusov.

Policiklične mošuse so odkriti v 50. letih 20. stoletja. To je druga velika skupina sinteznih mošusov, ki ne vsebujejo nitro skupin. Uspešnim sintezam je sledila njihova uporaba ne samo zaradi izrednega vonja ampak tudi zaradi cenejših stroškov proizvodnje kot makrocikličnih mošusov. Tržni delež policikličnih mošusov, ki je leta 1987 znašal 61 %, je naraščal tako, da je leta 1996 znašal več kot 70 % (6).

V splošnem mošuse lahko delimo na dve skupini: tiste pridobljene iz naravnih virov in sintezno pridobljene mošuse.



## 1.1 NARAVNI MOŠUSI

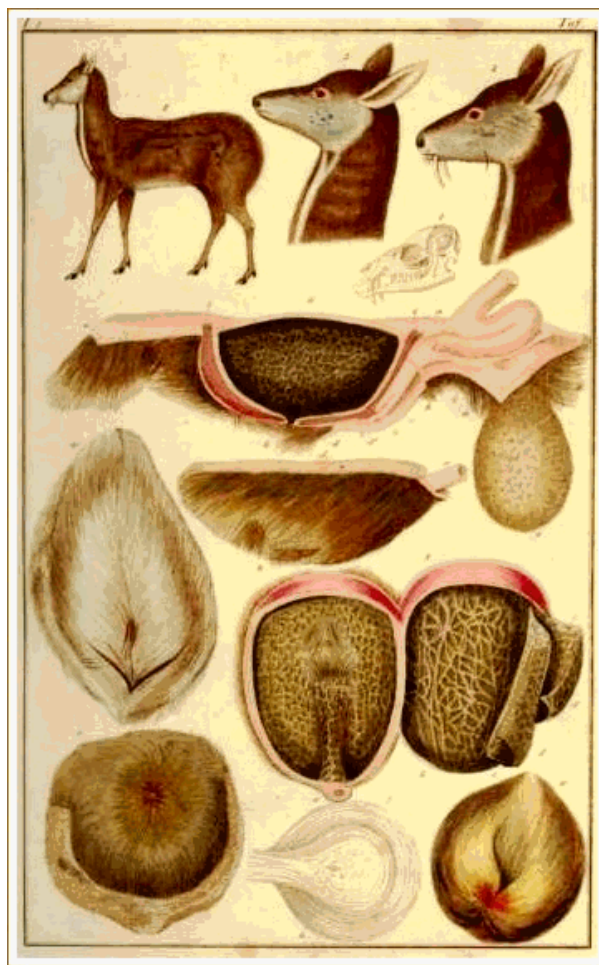
### 1.1.1 Živali

Mošusni jelen (*Moschus moschiferus*) sodi v družino pižmarjev (Moschidae). Živi v Pakistanu, Indiji, Tibetu, Kitajski, Sibiriji in Mongoliji. Naravni mošus, feromon, ki ga jelen v času parjenja izloča v okolje, nastaja v mošusni žlezi. V tem času žleza naraste do velikosti kokošnjega jajca. Z izločanjem feromona v okolico jelen označuje svoj teritorij. Predstavlja vabo za samice ter je istočasno tudi opozorilo drugim samcem, ki prečkajo njegov teritorij. Feromoni so po definiciji kemijske spojine, ki s svojimi sporočili vplivajo na obnašanje tako znotraj iste vrste kakor tudi med vrstami. Ločimo različne tipe feromonov kot so npr. opozorilni, teritorialni, spolni (1, 6, 22).



**Slika 2:** Mošusni jelen (*Moschus moschiferus*) (7).

Za pridobivanje mošusa, jelena ubijejo in odvzamejo žlezo (ang. musk pod). To posušijo na soncu ali na vročem kamnu ali pa s potopitvijo v vroče olje. Po sušenju rdečkastorjava zmes postane črn zrnast material, imenovan mošusna zrna, ki jih uporabljamo za alkoholne ekstrakte (tinkture). Aroma tinkture postane bolj intenzivna med shranjevanjem in daje prijeten vonj, šele potem ko je precej razredčena.



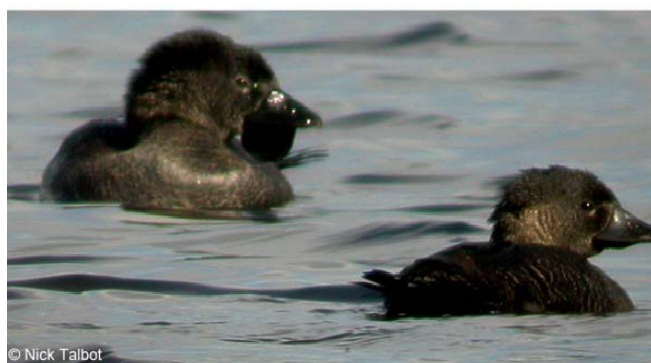
**Slika 3:** Žleza mošusnega jelena ki, izloča mošus (8).

Nobena naravna snov nima tako kompleksnega vonja, povezanega s tako veliko nasprotujočih si opisov. Ponavadi ga opisujejo abstraktno kot animaličen, zemeljski, lesni ali vonj, podoben dojenčkovi koži. Dober mošus je temno vijolične barve, suh, gladek in oljnat na otip in grenkega okusa. Spojina, odgovorna za značilen vonj mošusa, je muskon. Poleg tega mošus vsebuje še amoniak in muskopiridin, ki mu dajeta urinski vonj, holesterol, lipide, smole in ostale sestavine. Najboljše kakovosti je tonkin mošus iz Tibeta in Kitajske, ki mu sledi asamski in nepalski mošus ter karbadinski mošus iz Rusije in kitajsko-himalajske regije. En kilogram mošusnih zrn zahteva med trideset in petdeset ubitih jelenov, kar vpliva na zelo visoko ceno mošusne tinkture (1, 6).



**Slika 4:** Posušena žleza in zrnca mošusa (9).

*Ondatra zibethicus* – pižmovka, je glodavec iz družine hrčkov (Cricetidae) in izvira iz Severne Amerike. Ima žleze, ki izločajo snov z mošusnim vonjem. Poznana je od 17. stoletja dalje, vendar komercialno nikoli ni bila zanimiva. Zrnaste snovi po vonju podobne mošusu, pridobivamo tudi iz mošusne rance (*Biziura lobata*), ki jo uvrščamo v družino plovcev (Anatidae) iz južne Avstralije, rdečesivega mošusnega hrčka (*Crocidura cyanea*), mošusnega hrošča (*Aromia moschata*) iz družine kozličkov (Cerambycidae), mošusne želve (*Sternotherus odoratus*) iz družine zaklepnic (Kinosternidae), aligatorja (*Alligator mississippiensis*) iz družine aligatorjev in kajmanov iz centralne Amerike, ki ima en par žlez v kotu čeljusti in drugi par v kloaki, afriške cibetovke (*Civettictis civetta*), velike indijske cibetovke (*Viverra zibetha* L.), obe iz družine cibetovk (Viverridae) ter drugih živali, kot so npr. kače in moškatno govedo (*Ovibos moschatus*) iz družine votlorogov (Bovidae) (10, 11).



**Slika 5:** Mošusna račka (*Biziura lobata*) (10).



**Slika 6:** Pižmovka (*Ondatra zibethicus*) (11).



**Slika 7:** Moškatno govedo (*Ovibos moschatus*) (12).

Afriška cibetovka (*Civettictis civetta*) je največji predstavnik cibetovk. V dolžino zraste do 110 cm. Razširjena je v subsaharski Afriki od Senegala do Somalije in na jugu Afrike. Naseljuje področja, ki so delno zaraščena z grmovjem. Je predvsem nočna žival, podnevi pa se skriva med rastlinjem ali v votlinah.

Afriške cibetovke imajo značilno barvo krzna, izmenjujejo se bele ter črne lise, oči okrog katerih so črne lise, ki spominjajo na rakunove oči. Samci in samice, tako kot vse cibetovke, predvsem v času parjenja, označujejo svoje območje s posebnim izločkom zadnjičnih žlez, cibetom (13).

Cibet je eden najpomembnejših živalskih surovin za izdelavo parfumov. Cibet ima zelo močan vonj, zato se uporablja razredčen in v minimalni količini. Vonj je podoben mošusu, vendar ima bolj dimen, vroč in fekalen ton. Danes se uporablja v mnogih najkvalitetnejših parfumih.



**Slika 8:** Afriška cibetovka (*Civettictis civetta*) (13).

Velika indijska cibetovka (*Viverra zibetha*) živi v geografskem področju od južne Indije, Tajske, Burme, Laosa, Vietnama do Kitajske. Tako kot afriška cibetovka je nočna žival, ki večinoma čez dan počiva, ponoči pa je aktivna. Njeno krzno je sivo rjave barve z značilnimi črno belimi progami okrog vratu in na repu. Velika indijska cibetovka tako kot vse cibetovke, v času parjenja izloča iz zadnjične žleze feromon cibet s katerim označuje svoj teritorij (13).



**Slika 9:** Velika indijska cibetovka (*Viverra zibetha*) (14).

### 1.1.2 Rastline

Nekatere rastline kot angelika (*Angelica archangelica*) ali muškadni oslez (*Abelmoschus moschatus*) proizvajajo po mošusu dišeče spojine, ki so kemijsko makrociklične laktoni. Njihova eterična olja ali ekstrakte uporabljamo v parfumeriji kot nadomestilo za živalski mošus ali da spremenijo vonj zmesi ostalih mošusov. Med rastline z mošusu podobnim vonjem sodijo tudi muškadni krinkar (*Mimulus moschatus*), mošusni les (*Olearia argophylla*) iz Gvajane in Zahodne Indije.(1, 6).



**Slika 10:** Angelika (*Angelica archangelica*) (15).

## 1.2 SINTEZNI MOŠUSI

Sintezne mošuse delimo na:

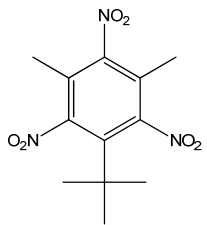
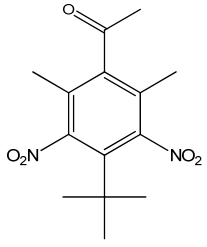
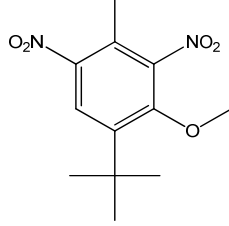
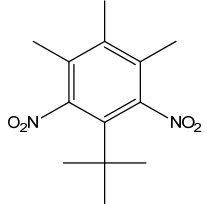
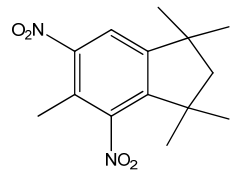
- nitro mošuse,
- policiklične mošuse,
- makrociklične mošuse,
- linearne (aliciklične) mošuse.

### 1.2.1 Nitro mošusi

Umetni mošus je bil pridobljen leta 1888 (Albert Baur) s postopkom kondenzacije toluena z izobutilbromidom v prisotnosti aluminijevega klorida in sledečim nitriranjem. Bil je odkrit ponesreči kot rezultat Baurovega poskusa sinteze bolj učinkovite oblike trinitrotoluena. Pokazalo se je, da je vonj odvisen od simetrije treh nitro skupin.

Po odkritju mošusa »Baur« (tonkinol), prvega nitro mošusa, je bilo narejenih veliko podobnih spojin. Najbolj znani nitro mošusi so: mošus keton, mošus ksilen, mošus ambret, mošus tibeten in mošus mosken (Tabela I). Čeprav so si po kemijski strukturi zelo različni, jim je skupen značilen vonj po mošusu. Sintezni mošusi so nitro derivati benzena, ki imajo dodano alkil, keto ali metoksi skupino. Odkritje sinteznih mošusov je omogočilo da zamenjajo naravne mošuse. Mošus mosken, ki je bil odkrit leta 1932 in je derivat dinitroindana je bil spojina vodnica za sintezo policikličnih mošusov, ki so jih odkrili leta 1955 (6, 21).

**Tabela I:** Tržno pomembni nitro mošusi (6).

TRŽNO IME	KEMIJSKO IME	MOLEKULSKA FORMULA	STRUKTURA
mošus ksilen, mošus ksilol	1-(1,1-dimetiletil)-3,5-dimetil-2,4,6-trinitrobenzen	$C_{12}H_{15} N_3O_6$	
mošus keton	1-(4-(1,1-dimetiletil)-2,6-dimetil-3,5-dinitrofenil)-etanon	$C_{14}H_{18} N_2O_5$	
mošus ambret	1-(1,1-dimetiletil)-2-metoksi-4-metil-3,5-dinitrobenzen	$C_{12}H_{16} N_2O_5$	
mošus tibeten	1-(1,1-dimetiletil)-3,4,5-trimetil-2,6-dinitrobenzen	$C_{13}H_{18} N_2O_4$	
mošus mosken	2,3-dihidro-1,1,3,3,5-pentametil-4,6-dinitro-1H-indan	$C_{14}H_{20} N_2O_4$	

**Tabela II:** Prikaz industrijske uporabe nitro mošusov v Evropi izražena v tonah (6).

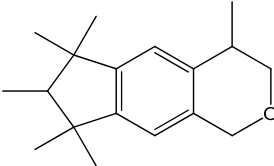
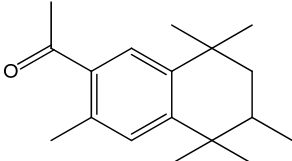
leto	mošus ksilen	mošus keton	mošus mosken	mošus tibeten
1992	174	124	-	-
1995	110	61	5	0,8
1998	86	40	-	-

## 1.2.2 Policiklični mošusi

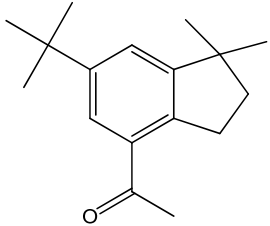
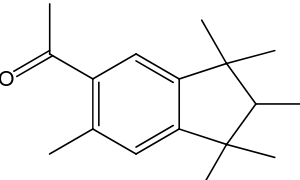
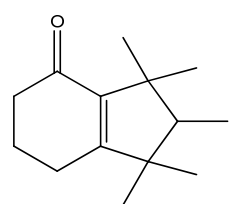
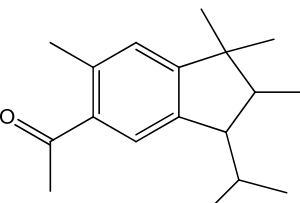
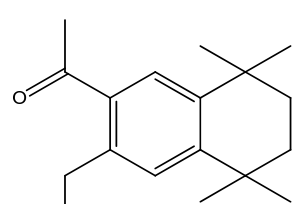
Policiklične mošuse so odkrili po letu 1950. To so spojine, ki ne vsebujejo nitro skupin in so bile razvite kot derivati indana, tetralina in kumarina. Predstavljajo umetne analoge nitro mošusov, ki manj obremenjujejo okolje in nimajo nobenih kemijskih podobnosti z naravnimi mošusnimi komponentami. Uporaba se je začela po sintezi 6-acetil-1,1,2,3,3,5-heksametil dihidroindana ali AHDI (Phantolide<sup>®</sup>). Njihova uporabnost ni samo zaradi atraktivnega vonja, ampak tudi zaradi cenejše sinteze kot je sinteza makrocikličnih mošusov, druge skupine sintetičnih mošusov, ki ne vsebujejo nitro skupin. Če naredimo primerjavo policikličnih mošusov z nitro mošusi ugotavljamo, da so policiklični mošusi bolj odporni na vpliv svetlobe ter alkalij. Zaradi tega je tudi razširjena njihova uporaba v kozmetični in industriji detergentov. Najbolj pomembni predstavniki te skupine mošusov so predstavljeni v tabeli III.

V zgodnjih 70. letih prejšnjega stoletja je bil zaradi nižjih stroškov proizvodnje HHCB (Galaxolide<sup>®</sup>) bolj v uporabi kot AHTN (Tonalide<sup>®</sup>). 1980 leta so porabili 1500 ton AHTN in 3800 ton HHCB v Evropi in Združenih Državah Amerike, kar je predstavljalo 95 % proizvodnje vseh policikličnih mošusov. Potrebno je omeniti tudi 7-acetil-1,1,4,4-tetrametil-6-etiltetrahidronaftalen ali ATTN (Versalide<sup>®</sup>), ki ima bolj zgodovinski pomen. Zaradi nevrotoksičnega delovanja je bila njegova proizvodnja ter uporaba prekinjena leta 1980.

**Tabela III:** Tržno pomembni policiklični mošusi (6).

TRŽNO IME	KEMIJSKO IME	MOLEKULSKA FORMULA	STRUKTURA
galaksolid, abalid, perlid	1,1,3,4,6,7,8-heksahidro- 4,6,6,7,8,8- heksametilciklopenta[g]-2- benzopiran (HHCB)	$C_{18}H_{26}O$	
tonalid, fiksolid	7-acetil-1,1,3,4,4,5- heksametiltetrahidronaftalen (AHTN)	$C_{18}H_{26}O$	



<b>celestolid, krizolid</b>	4-acetil-1,1-dimetil-6-terc-butildihidroinden (ADBE)	$C_{17}H_{24}O$	
<b>fantolid</b>	6-acetil-1,1,2,3,3,5-heksametildihidroinden (AHDI)	$C_{17}H_{24}O$	
<b>kašmeran</b>	6,7-dihidro-1,1,2,3,3-pentametil-4(5H)indanon (DPMI)	$C_{14}H_{22}O$	
<b>traseolid</b>	5-acetil-1,1,2,6-tetrametil-3-izopropildihidroinden (ATII)	$C_{18}H_{26}O$	
<b>versalid</b>	7-acetil-1,1,4,4-tetrametil-6-etiltetrahidronaftalen (ATTN)	$C_{18}H_{26}O$	

Če primerjamo proizvodnjo nitro ter policikličnih mošusov, ugotavljamo, da se je zmanjševala proizvodnja nitro na račun porasta proizvodnje policikličnih mošusov. Tržni delež policikličnih mošusov, ki je 1987 leta znašal 61 % ali 4300 ton in je naraščal do 70 % leta 1996 kar je znašalo 5600 ton. Poglavitni vzrok je uporaba HHCB ter AHTN, ki sta izpodrinila uporabo nitro mošusov. Raziskave, v katere je bila zajeta kozmetika ter detergenti v letih 1994 in 1995, so pokazale, da sta najbolj uporabljana policiklična mošusa HHCB in AHTN (Tabela IV).

**Tabela IV:** Prikaz uporabe policikličnih mošusov v Evropi izražena v tonah (6).

leto	HHCB	AHTN	ADBI	AHDI	ATH
1992	2400	885			
1995	1482	585	34	50	40
1998	1473	385	18	19	2

Prva poročila o prisotnosti policikličnih mošusov v vodi in ribah so se pojavila leta 1994. Leto kasneje so sledila poročila o prisotnosti policikličnih mošusov v vodi ter človeških vzorcih (mleko, adipociti). Dobljeni podatki o koncentracijah policikličnih mošusov so bili večji kot je določeno za vrednosti nitro mošusov. Zaradi rezultatov, ki so jih pokazale analize vzorcev na prisotnost policikličnih mošusov mnogi proizvajalci so opustili njihovo uporabo. Status policikličnih mošusov je tudi predmet obravnave Evropske komisije. Pričakuje se mnenje predvsem o statusu HHCB ter AHTN (6).

### 1.2.3 Makrociklični mošusi

Začetki makrocikličnih mošusov segajo v leto 1906. Walbaum je izoliral keton iz žleze mošusnega jelena in ga je imenoval muskon. Ta spojina je glavni vir vonja. Leta 1915 je Sack iz cibeta izoliral keton civeton. Ružicka je leta 1926 s sintezo muskona potrdil njegovo kemijsko strukturo. Leto kasneje je Kerschbaum v koreninah angelike ter v olju pridobljenem iz semen muškarnega osleza odkril makrociklične laktone. Odkritje teh dišavnih komponent je omogočilo razvoj sinteze nove skupine mošusov imenovano makrociklični mošusi (6, 21).

Dolga leta so bili vsi nitro mošusi zaradi dokaj enostavne sinteze ter nizkih stroškov proizvodnje močno zastopani v industriji parfumov, sredstev za osebno higieno ter detergentov. Leta 1981 so mošus keton in mošus ksilen odkrili v ribah ter vodi na Japonskem. Razlaga tega pojava je temeljila na tem, da prihaja do bioakumulacije nitro mošusov v vodnem sistemu. Čez dve leti so se pojavljati prva poročila o fotoalergijah, ki so nastale zaradi uporabe mošusa ambreta. Raziskave v Nemčiji so leta 1992 pokazale, da več kot 55 % poceni kozmetike in detergentov vsebuje nitro mošuse. V kozmetiki je prevladoval mošus keton, v detergentih pa mošus ksilen (6, 21).

Zaradi vseh zbranih podatkov ter novih odkritij v zvezi z bioakumulacijo in potencialno kancerogenostjo, je Nemško združenje za kozmetiko, parfumerijo in

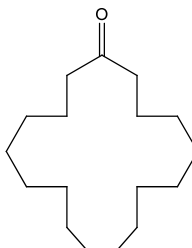
detergente (IKW) izdalo priporočilo, da se opusti uporaba le-teh v proizvodnji kozmetike in podobnih proizvodov. Zaradi močne fotoalergije, ki jo povzroča mošus ambret je prepovedana njegova uporaba v kozmetiki v Evropski Uniji od leta 1995 dalje. Seznam prepovedanih nitro mošusov je dopolnjen leta 1998 z direktivo 76/768/ EEC s katero se prepoveduje uporaba mošus tibetena ter mošus moskena (6, 20).

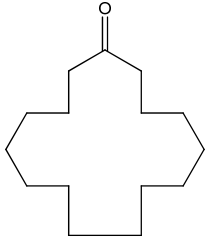
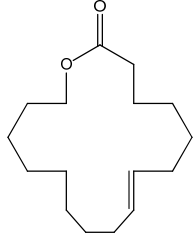
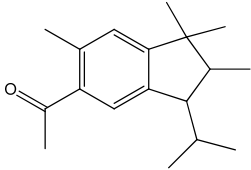
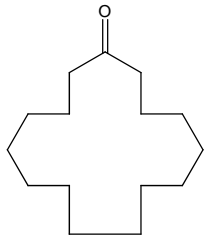
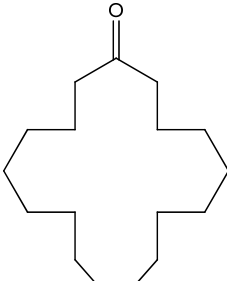
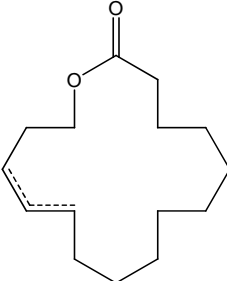
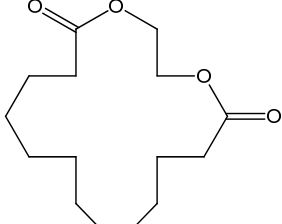
Makrociklične mošuse uvršamo v skupino mošusov, ki ne vsebujejo nitro skupino. Značilno za to skupino mošusov je, da imajo obroč, ki vsebuje od 15 do 17 ogljikovih atomov. Vonj kot tudi njegova intenziteta je odvisna od števila ogljikovih atomov, ki sestavljajo obroč. Mošusna spojina, ki vsebuje 14 ogljikovih atomov v obroču ima šibek vonj za razliko od spojine, ki ima obroč iz 15-17 ogljikovih atomov (6, 21).

Makrociklični mošusi so zaradi svoje odpornosti na delovanje svetloba ali alkalij in močnega ter prijetnega vonja pomemben člen v industriji dišav. Eden od najbolj pomembnih je dilakton etilenbrazilat in to zaradi enostavne sinteze ter nizkih stroškov surovin. Na letni ravni znaša njegova proizvodnja okrog 300 ton. Drugi predstavnik, ki ima ravno tako nizke stroške proizvodnje je habanolid. Habanolid je nenasičena različica eksaltolida (glej tabelo V) (6, 21).

Sinteza makrocikličnih mošusov je težka in v večini primerov poteka v več stopnjah. Zaradi visokih stroškov proizvodnje je omejena njihova ekonomska upravičenost. V letu 1996 je njihov delež znašal vsega 5 % od celotne proizvodnje mošusov. Če primerjamo cene nitro ter policikličnih mošusov, ki so od 5 do 15 EUR/kg oziroma od 10 do 30 EUR/kg, so cene makrocikličnih mošusov bistveno višje in znašajo od 25 do 2500 EUR/kg (6, 21).

**Tabela V:** Tržno pomembni makrociklični mošusi (6).

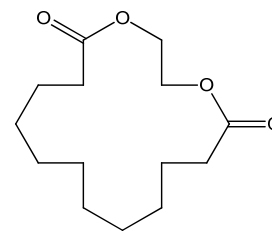
TRŽNO IME	KEMIJSKO IME	MOLEKULSKA FORMULA	STRUKTURA
civeton	cis-9-cikloheptadecenon	$C_{17}H_{30}O$	

<b>muskon</b>	3-metilciklopentadekanon	$C_{16}H_{30}O$	
<b>ambretolid</b>	7-heksadecen-16-olid	$C_{16}H_{28}O_2$	
<b>eksaltolid, pentalid, tibetolid</b>	15-pentadekanolid	$C_{15}H_{28}O_2$	
<b>eksalton, normuskon</b>	ciklopentadekanon	$C_{15}H_{28}O$	
<b>dihidrociveton</b>	cikloheptadekanon	$C_{17}H_{32}O$	
<b>habanolid, globalid</b>	oksacikloheksadecen-2-on	$C_{15}H_{26}O_2$	
<b>astraton, mošus T, mošus NN, mošus MC-5</b>	etilenbrazilat	$C_{15}H_{26}O_4$	

**mošus MC-4,  
mošus C14**

etilendodekandioat

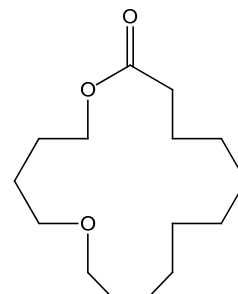
$C_{14}H_{24}O_4$



**cervolid,  
mošus 781**

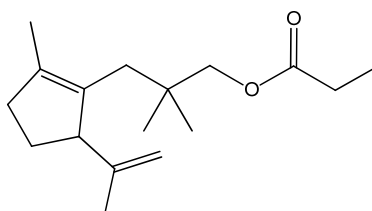
12-oksaheksadekanolid

$C_{15}H_{28}O_3$

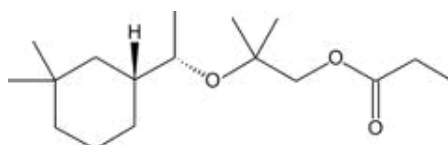


#### 1.2.4 Linearni ali aliciklični mošusi

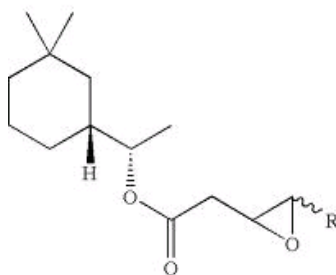
1975 leta se je pojavila nova generacija makrocikličnih mošusov, linearni (aliciklični) mošusi. Njihova struktura se bistveno razlikuje od ostalih znanih mošusov. Prvi se je na tržišču pojavil Cyclomusk<sup>®</sup>, ki so ga odkrili leta 1975 (Slika 11). Njegov vonj opisujejo kot topel, pudrast s pridihom sadne predvsem jagodne note. 15 let kasneje so predstavili Helvetolide<sup>®</sup>, ki je postal dosti bolj uspešen (Slika 12). Helvetolid so razvili v švicarskem podjetju Firmenich leta 1990 pod vodstvom kemika Philipa KRAFTA. Zanimivo je to, da so pri helvetolidu eno geminalno metilno skupino nadomestili s karbonilno skupino ne da bi se pri tem izgubil značilen vonj po mošusu, medtem ko se je sadni spremenil v bolj kafrastega in ambrastega. Ta oksohelvetolid imenovan Romandolide<sup>®</sup> se je pojavil na tržišču leta 2002 (6, 21, 23, 25).



**Slika 11:** Cyclomusk<sup>®</sup>.

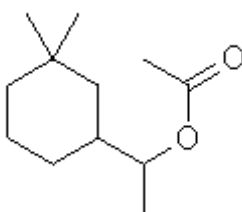


**Slika 12:** Helvetolide<sup>®</sup>.



**Slika 13:** Romandolide<sup>®</sup> (23).

Rosamusk<sup>®</sup> sodi med najnovejše aliciklične mošuse. Njegov vonj predstavlja nenavadno mešanico vonja vrtnice (pelargonije), sadja in mošusa. Rosamusk<sup>®</sup> je trgu kot racemna zmes. (+) stereoizomer ima globljo, bolj značilno noto (22, 23).



**Slika 14:** Rosamusk<sup>®</sup> (23).

Čas bo pokazal, če se bo nova generacija lineranih mošusov nadomestila uporabo tradicionalnih do sedaj uporabljanih sintetičnih mošusov.

### 1.3 METABOLIZEM IN FARMAKOKINETIKA SINTEZNIH MOŠUSOV

#### 1.3.1 Perkutana absorpcija

##### 1.3.1.1 Nitro mošusi

Pri perkutani absorpciji mošus ksilena *in vitro* so ugotovili zelo veliko absorpcijo pri prašičji koži in nizko pri človeški koži. Po 24 urah je bila celotna absorpcija pri prašičji koži 55 % ter pri človeški 22 %. Pri človeški koži so našli mošus ksilen večinoma in plasti *stratum corneum*. Po 7 dneh počasne absorpcije je samo 6 % apliciranega mošus ksilena ostalo na koži. Pri dveh prostovoljcih, pri katerih so izvedli dermalno aplikacijo radioaktivno označenega mošus ksilena v brezalkoholni raztopini v odmerku 0,02 mg/cm<sup>2</sup> kože, so po 6 urah ugotovili, da 90 % odmerka ni več prisotnega na mestu aplikacije in da je manj kot 0,26 % izločenega z urinom ter 0,1 % izločenega z blatom. V 120 urah po aplikaciji 10 % apliciranega odmerka ni bilo možno določiti (6, 17, 18).

Po dermalni aplikaciji mošus ketona na kožo podgan, ki je znašala 0,5 mg/kg, se je po 6 urah absorbiralo 31 % spojine. Pri dveh prostovoljcih po enkratni dermalni aplikaciji s radioaktivno označenim mošus ketonom v odmerku od 0,02 mg/cm<sup>2</sup> so ugotovili, da 86 % apliciranega odmerka ni več prisotnega na mestu aplikacije ter da se je 0,42 % in 0,05 % odmerka izločilo z urinom ter blatom 14 % apliciranega odmerka niso mogli določiti (6, 17, 18).

### **1.3.1.2 Policiklični mošusi**

Preliminarne študije *in vitro*, izvedene na koži podgan, so pokazale da je absorpcija AHTN, ki je znašala  $0,28 \pm 0,14$  % ter HHCB  $0,07 \pm 0,03$  %, zelo nizka. Po 24 urah opazovanja so ugotovili, da je prisotnega 50-60 % apliciranega odmerka. Pri perkutani aplikaciji z radioaktivno označenim <sup>14</sup>C AHTN ter HHCB raztopljenega v etanolu (voda po britju) na kožo podgan v odmerku 4,5 mg/kg telesne mase, so ugotovili, da je po 6 urah ostalo približno 19 % AHTN odmerka ter po 120 urah približno 14 % HHCB. Po 6 urah je bila absorpcija 9,3 % odmerka za AHTN ter 3,9 % za HHCB.

Pri izpostavljenosti človeških prostovoljcev z radioaktivno označenimi vzorci so preko izločanja z urinom in blatom ugotovili, da se pri uporabi 70 % alkoholne raztopine AHTN in HHCB absorbiralo manj kot 2 % spojin (17).

## **1.3.2 Biotransformacija**

### **1.3.2.1 Nitro mošusi**

Po peroralni aplikaciji nitro mošusa pri podganah je glavni del metabolizma redukcija nitro (-NO<sub>2</sub>) skupine v amino (-NH<sub>2</sub>) skupino. V naslednji stopnji poteče hidroksilacija metilne skupine *p*-amino metabolita in se s tem poveča hidrofilnost molekule. Mošus ksilen, 4-amino-mošus ksilen, 4-acetilamino-mošus ksilen, 4-amino-3-hidroksimetil-mošus ksilen ter 4-amino-1-tert-BuOH-mošus ksilen so našli v urinu, blatu in slini. 2-Amino-mošus ksilen ter neidentificirane metabolite so odkrili v blatu ter urinu, 4-amino-3-hidroksimetil-mošus ksilen so odkrili v urinu ter hidroksi-mošus ksilen samo v slini. Večina študij, ki so jih izvedli na podganah, je pokazala, da se dermalno aplicirana mošus ksilen ter mošus keton po absorpciji izločata preko sline v obliki polarnih konjugatov. Hidroksilirani analogi mošus ketona ter mošus ksilena nastajajo z oksidacijo metilne skupine. V slini se metaboliti pojavljajo v obliki glukoronidov. Sestava metabolitov, ki se pojavljajo v urinu je bolj kompleksna. V urinu je prisotna mešanica polarnih,

neidentificiranih spojin in glukoronidov. Večina metabolitov mošus ketona niso bili enostavni glukonoridi ter sulfatni konjugati (6, 18).

Podatki o študijah metabolizma nitro mošusov pri človeku so redke. 4-Amino-mošus ksilen so odkrili v urinu po dermalni aplikaciji. Količina, izločena z urinom očiščenje urina je bila 0,12 - 0,53 % od vrednosti peroralnega odmerka. Glavnih metabolitov niso identificirali. Acetil derivatov 4-amino metabolita, ki so jih odkrili v urinu podgan, pri človeku niso našli (6, 18).

### ***1.3.2.2 Policiklični mošusi***

O metabolizmu policikličnih mošusov pri človeku nimamo podatkov.

## **1.3.3 Distribucija in eliminacija**

### ***1.3.3.1 Nitro mošusi***

Pri človeških prostovoljcih po peroralni ter dermalni aplikaciji 0,3 mg mošus ksilena na kilogram telesne mase je bila koncentracija v plazmi po 6 urah od 40 do 270 ng/mL po peroralni aplikaciji ter od 1,6 do 5,5 ng/mL po dermalni aplikaciji. Farmakokinetiko mošus ksilena v plazmi spremljata dva kinetična modela. Začetna hitra distribucija po krvi, ter počasna eliminacija iz adipocitov. Poprečna razpolovna doba je 70 dni. Eliminacija mošus ksilena pri človeku večinoma poteka preko urina. Maksimalna koncentracija 4-amino metabolita v urinu je dosežena v 18 do 24 urah po aplikaciji. Eliminacija poteka po kinetiki prvega reda s povprečno razpolovno dobo 12 ur. Iz literarnih podatkov indeksa telesne mase in rezultatov razpolovne dobe poprečnega dnevnega odmerka lahko izračunano, da je eliminacija približno 11  $\mu\text{g}$  na osebo ali 160 ng na kilogram telesne mase. Mošus ksilen ter mošus keton so odkrili v človeškem maščobnem tkivu v 15 vzorcih v koncentracijah od 6,7 do 288  $\mu\text{g}$  mošus ksilena na kilogram telesne mase in manj kot 1 do 173  $\mu\text{g}$  mošus ketona na kilogram telesne mase. Mošus ksilen ter mošus keton so odkrili tudi v človeškem mleku. Zgodnje študije so poročale o visokih koncentracijah okrog 100  $\mu\text{g}$  za mošus ksilen na kilogram telesne mase ter 40  $\mu\text{g}$  za mošus keton na kilogram telesne mase. Kasnejše študije so pokazale nižje vrednosti in sicer za mošus ksilen od 8 do 20  $\mu\text{g}$  kilogram telesne mase ter približno 8 do 10  $\mu\text{g}$  kilogram telesne mase za mošus keton (18).



### **1.3.3.2 Policiklični mošusi**

Pri podganah so po dermalni aplikaciji radioaktivno označenih AHTN in HHCB ugotovili, da izločanje večinoma poteka preko blata. 2,6 % radioaktivno označenega AHTN se izloči z urinom ter 14,5 % z blatom v 120 urah. 1,3 % HHCB se izločilo z urinom ter 11,6 % z blatom (6).

Relativno visoke koncentracije policikličnih mošusov v primerjavi s koncentracijami nitro mošusov so našli v človeškem maščobnem tkivu ter človeškemu mleku. V 15 vzorcih desetih žensk, starih od 3 do 100 let in 5 moških, starih od 49 do 77 let so bile vrednosti odkritih HHCB, AHTN ter ADBI naslednje (na kilogram telesne mase): od 12 do 171 µg HHCB, od 1 do 23 µg AHTN in od 0,12 do 3,5 µg ADBI. Vse tri spojine so našli v vseh vzorcih. Veliko različnih raziskav je tudi potrdilo, da so v maščobnem človeškem tkivu našli različne koncentracije policikličnih mošusov. Poročali so, da dva vzorca človeškega mleka vsebujeta 310 µg in 360 µg HHCB na kilogram telesne mase, ter 290 µg in 250 µg ATN na kilogram telesne mase. DPMI niso zaznali. Za primerjavo: pri aplikaciji od 2 do 20 mg radioaktivno označenega HHCB ter AHTN brejim podganam s ponavljajočimi peroralnimi odmerki od tretjega tedna nosečnosti, so odkrili najvišje koncentracije v mleku 3 ter 7 dan po kotitvi in sicer 1350 µg HHCB L<sup>-1</sup> ter 940 µg AHTN L<sup>-1</sup> pri najvišjih odmerkih in 23,590 µg HHCB L<sup>-1</sup> ter 12,140 µg AHTN L<sup>-1</sup> pri najnižjih odmerkih (6).

## **1.4 TOKSIČNO DELOVANJE SINTEZNIH MOŠUSOV**

Ko so leta 1981 nitro mošuse odkrili na Japonskem v vzorcih vode ter ribah, so se začele raziskave glede njihove toksičnosti. Sintezni mošusi so klasični onesnaževalci okolja in ksenobiotiki. Po perkutani aplikaciji zaradi svoje lipofilno naravo zlahka prehajajo skozi kožo. Zaradi prisotnosti sinteznih mošusov v različnih proizvodih za osebno higieno, detergentih ter parfumi, ki jih večinoma uporabljamo vsak dan, so sintezne mošuse odkrili v človeškem mleku ter adipocitih (6). Po peroralni aplikaciji pa je možno mošuse dokazati v krvi. Največja akumulacija sinteznih mošusov je v maščobnem tkivu, jetrih ter tkivih, ki vsebujejo visok odstotek maščobe. Ker prehajajo placentno, so sintezne mošuse so odkrili v telesu novorojenčkov (6).

## **1.4.1 Akutna zastrupitev**

### **1.4.1.1 Nitro mošusi**

Akutna toksičnost nitro mošusov po peroralni ter dermalni poti pri laboratorijskih živalih je relativno nizka,  $LD_{50} > 5000$  mg/kg (6).

Miši, ki so bile izpostavljene ponavljajočim dnevnimi odmerki 500 mg mošus ksilena na kilogram telesne mase sedem dni, so pokazale znake hude zastrupitve in so poginile v dveh dneh. Različne raziskave na miših teh podganah so pokazale, da ima izpostavljenost le-teh večjim odmerkom od 200 do 500 mg na kilogram telesne mase z mošus ksilenom ter mošus ketonom tekom 5 do 7 dni signifikantne učinke na jetra: povečanje mase jeter, povečanje mikrosomskih proteinov ter hipertrofijo jetrnih celic (6).

Dokazano je, da mošus ambret pri podganah povzroča akutno zastrupitev pri peroralnih odmerkih 399 mg na kilogram telesne mase. Pri človeku mošus ambret povzroča fotoalergijske reakcije. Mošus ksilen, mošus keton, mošus mosken ter mošus tibeten ne povzročajo fotosenzibilizacije pri človeku (6).

### **1.4.1.2 Policiklični mošusi**

Raziskave so pokazale, da je do akutne zastrupitve podgan z HHCB prišlo pri peroralni aplikaciji količin večjih od 3,25 g na kilogram telesne mase. Pri drugih študijah so poročali, da je bila  $LD_{50}$  več kot 3 g na kilogram telesne mase podgane pri peroralni aplikaciji, pri dermalni aplikaciji je ta vrednost 5 g na kilogram telesne mase. Ugotovili so tudi, da akutno zastrupitev zajcev dosežemo pri odmerkih večjih od 3,25 g na kilogram telesne mase pri dermalni aplikaciji (6). Pri akutni zastrupitvi podgan s peroralno apliciranim AHTN je vrednost  $LD_{50}$  0,57 g na kilogram telesne mase. Pri dermalni aplikaciji AHTN je bila  $LD_{50}$  večja od 5 g na kilogram telesne mase. Iz znanih podatkov o akutnih zastrupitvah z policikličnimi mošusi je možno sklepati, da so le-te redke, vendar pa že enkratni velik odmerek AHTN 100 mg na kilogram telesne mase pri podganah povzroča akutne poškodbe jeter. Morfološke spremembe vključujejo lokalno nekrozo jetrnih celic, vnetje, zatekanje parenhimskih jetrnih celic, zgoščevanje citoplazme, poškodbe endoplazemskega retikuluma ter mitohondrijev, kar ima za posledico povečanje velikosti jeter (6).

## **1.4.2 Subkronična zastrupitev**

### **1.4.2.1 Nitro mošusi**

Pri samcih in samicah podgan, ki so bili izpostavljeni mošus ambretu v peroralnih odmerkih od 10 do 240 mg na kilogram telesne mase ter od 80 do 240 mg na kilogram telesne mase vsak dan v obdobju od 90 dni, so ugotovili nevrotoksične učinke pri obeh spolih miši ter atrofijo testisov pri samcih. Nadaljnje 90-dnevne študije, ki so jih naredili z dermalno apliciranimi mošus ksilenom, mošus ketonom, mošus tibetenom ter mošus moskenom v dnevnikih odmerkih 240 mg na kilogram telesne mase za mošus keton in mošus ksilen ter 75, 24 ter 7,5 mg na kilogram telesne mase za ostale mošuse, so ugotovili nevrotoksične učinke pri mošus ambretu ter signifikantno povečanje velikosti jeter pri skupini podgan, ki je bila izpostavljena mošus moskenu.

Na podlagi teh študij je postavljen največji dermalni odmerek pri katerem ni opaženih učinkov - dermalni NOAEL »(No Adverse Effect Level)«, ki je 75 mg na kilogram kg telesne mase na dan za mošus keton in mošus tibeten ter 24 mg na kilogram telesne mase na dan za mošus ksilen in mosken. NOAEL vrednosti so bile potrjene s študijami, ki so proučevale vpliv nitro mošusov na indukcijo jetrnih encimov kot najbolj občutljiv parameter (6).

### **1.4.2.2 Policiklični mošusi**

AHTN ter HHCB sta bila predmet številnih študij proučevanja akutne zastrupitve podgan zaradi peroralne ter dermalne aplikacije. Ugotovili so, da so učinki na jetra odvisni od višine odmerka. Pri samicah podgan (skupina 15 podgan), ki so bile izpostavljene dermalno apliciranim dnevnim odmerkom AHTN ter HHCB od 1,1 ali 100 mg na kilogram telesne mase tekom 13 tednov, so ugotovili, da s povečanjem odmerka obeh mošusov narašča tudi velikost jeter. Povečanje odmerka HHCB ni spremljala spremenjena histopatološka slika jeter, za razliko od AHTN, pri katerem so s povečanjem odmerka ugotovili tudi spremenjeno histopatološko sliko jeter ter razbarvanje celic s povečanjem aktivnosti alkalne fosfataze v plazmi. Pri nižjih odmerkih obeh mošusov niso odkrili sprememb (6).

HHCB so peroralno aplicirali podganam, ki so bile na dieti (15 samic in 15 samcev), v dnevnikih odmerkih od 5, 15, 50 ter 150 mg na kilogram telesne mase v času od 13 tednov. Ugotovili so, da je pri samcih minimalno reverzibilno povečanje jeter za razliko od samic, pri katerih ne glede na odmerek ni prišlo do spremembe velikosti jeter. Niso opazili

nobeni histopatoloških sprememb jetrnih celic. HHCB so peroralno aplicirali v odmerku 341 mg na kilogram telesne mase v času dveh tednov in spremljali relativno ter absolutno povečanje velikosti jeter. Na podlagi teh raziskav so predlagali NOAEL za peroralno apliciran HHCB, ki je 150 mg na kilogram telesne mase na dan (6).

AHTN so peroralno aplicirali v enakih odmerkih 1, 5, 15, 50 ter 150 mg na kilogram telesne mase kot HHCB. Pri odmerku 15 mg so pri samicah ugotovili povečanje velikosti jeter in pri samcih pri odmerku 50 mg. Pri nobenem spolu podgan niso opazili spremenjeno histopatološko sliko ali motnje v delovanju jeter. Pri nekaterih živalih so opazili zeleno razbarvanje jetrnega tkiva, limfnih ter mlečnih žlezah, ki je odvisno od odmerka. Na podlagi dobljenih rezultatov so predlagali NOAEL za peroralno apliciran AHTN 15 mg na kilogram telesne mase na dan (6).

Na osnovi rezultatov, ki so jih dobili z raziskavo AHTN, so ugotovili da pri izpostavljenosti v odmerku do 300 µg na kg telesne mase (90 dni) to ne vpliva na strukturo ali biokemijske parametre jeter (6).

Raziskave, ki so jih izvajali tako, da so podgane inhalirale različne dišave, ki vsebujejo HHCB ter mošus keton, so pokazale, da ni bilo nobenih signifikantnih sprememb, ki bi kazale na zastrupitev (6).

### **1.4.3 Indukcija metabolnih encimov**

#### **1.4.3.1 Nitro mošusi**

Mošus ksilen ter mošus keton pri miših in podganah inducirata encime citokrom P450 oksidaze. Nastalo indukcijo je možno primerjati z indukcijo encima pri miših, ki jo sproži fenobarbiton. Mošus ksilen v mišjih jetrih v fazi I metabolizma inducira encime citokrom P450 oksidazo (CYP1A, CYP2B), v fazi II metabolizma pa inducira encima glutation-S-transferazo (GST) in UDP-glukurunil transferazo (6).

Indukcijo mikrosomskih jetrnih encimov z nitro mošusi so proučevali v številnih študijah, ki so jih izvajali na miših ter podganah. Preizkusi na miših s peroralno apliciranim mošus ksilenom v odmerku 200 mg na kilogram telesne mase tekom 7 dni so pokazali šibek učinek na CYP1A1 in 1A2 encimsko aktivnost ter naraščajoči nivo obeh encimov CYP1A in 1A2. Indukcija encimov je bila dosti nižja kot z znanim encimskim induktorjem 3-metilkolantrenom (3-MC), ki ne povzroča povečanja encimske aktivnosti encima CYP2B. Za razliko od tretiranja s mošus ksilenom, kjer je prišlo do povečanja encimske aktivnosti, kakor tudi do povečanja nivoja samih encimov v jetrih. Predmet raziskav je bilo

tudi absolutno ter relativno povečanje velikosti jeter, vpliv *p*-amino in *o*-amino metabolitov mošus ksilena na aktivnost jetrnih encimov. Po indukciji jetrnih encimov ob dodatku fenobarbitona pri miših so raziskovali inhibicijo le-teh zaradi delovanja amino metabolitov mošusoveg ksilena. Oba amino metabolita sta inhibirala aktivnost PROD (7-pentoksiresorufin-*O*-demetilaze) v odsotnosti NADPH (reducirana oblika nikotinamidadenindinukleotidfosfata) v preinkubacijskem času. Testi so pokazali, da *o*-amino-mošus ksilen, ob prisotnosti NADPH v preinkubacijskem času ni zmanjšal aktivnosti PROD. To pomeni, da ta metabolit ni inhibiral delovanja encima CYP2B. *p*-Amino metabolit pa, nasprotno ob prisotnosti NADPH v odvisnosti od časa, zmanjšuje aktivnost PROD. Pri peroralni aplikaciji *in vivo* *p*-amino mošus ksilena v odmerku 180 mg na kilogram telesne mase so ugotovili inhibicijo CYP2B10. 2 uri po peroralni aplikaciji so opazili popolno prenehanje aktivnosti PROD (6).

Preiskovali so tudi potencialni vpliv na indukcijo CYP2B10 ter CYP1A2 mRNA (Informacijska RNA). Po enkratnem odmerku 180 mg obeh aminov na kilogram telesne mase je prišlo do indukcije CYP2B10 mRNA, ki je ponavadi udeležena pri metabolizmu aromatskih aminov. Čas vpliva na encime je bil bistveno daljši po aplikaciji *p*-amino-mošus ksilena, kot po aplikaciji *o*-amino-mošus ksilena. Zaradi indukcije CYP2B10 mRNA so sklepali, da imajo amino metaboliti enak vpliv na encime, kot če bi aplicirali mošus ksilen. Za mošus keton so dokazali da v manjših odmerkih povzroča povečanje jeter za približno 20 % in poveča tudi koncentracije mikrosomskih jetrnih proteinov. V večjih odmerkih mošus keton povzroča indukcijo encima CYP2B ter manjšo indukcijo encimov CYP1A in CYP3A. Raziskave so izvedli na podganah in prišli do podobnih rezultatov in sicer da prihaja do indukcije CYP1A, 2B ter 3A encimov. Potrjeni so tudi učinki na CYP2B na nivoju mRNA. Sam mehanizem indukcije na molekulskem nivoju mošus ketona je neznan (6).

#### **1.4.3.2 Policiklični mošusi**

Vpliva policikličnih in nitro mošusov na indukcijo encimov niso raziskovali obsežno. AHTN nima indukcijskega delovanja na jetra podgan kot fenobarbiton ali 3-MC. AHTN ter ADBI sta se izkazala kot substrata CYP3A4 in se metabolizirata v citotoksične spojine v fibroblastih, ki stabilno izražajo humani CYP3A4 (6).

#### **1.4.4 Mutagenost in genotoksičnost**

##### **1.4.4.1 Nitro mošusi**

Potencialno genotoksičnost mošus ksilena, mošus ketona, mošus, mošus ambreta ter mošus tibetena so raziskovali v številnih *in vitro* ter *in vivo* študijah. kot vodilo so uporabljali mednarodne smernice za preizkušanje mutagenov. Teste so naredili na bakteriji *Salmonella typhimurium* (Ames test), na sesalskih celicah (mišji limfom test) ter na kultiviranih človeških limfocitih. Pri vseh treh testih se pokazalo, da mošus ksilen, mošus keton, mosken ter mošus tibeten ne izkazujejo genotoksičnih lastnosti. Negativne rezultate genotoksičnosti so dobili tudi s pospeševanjem metabolizma. Mošus ambret je v Amesovem testu ob dodatku pospeševalca metabolizma izkazal močno genotoksično delovanje. Poškodbe DNA niso nastale zaradi delovanja bakterijskega encima nitroreduktaze, temveč zaradi verjetne biotransformacije mošus ambreta v arilhidroksilamin pod vplivom sesalskih encimov (6). S testom, ki so ga izvajali na ovarijskih celicah kitajskih hrčkov (CHO) niso potrdili genotoksičnosti mošus ksilena ter mošus ketona, ravno tako niso potrdili genotoksičnosti za mošus ksilen, mošus keton, mošus ambret ter mošus tibeten s SOS krom testom na celicah *Escherichia coli* PQ 37 (6).

##### **1.4.4.2 Policiklični mošusi**

AHTN ter HHCB sta bila predmet raziskav z namenom, da bi ugotovili njuno genotoksičnost. Na testih, ki so jih izvajali na bakterijskih celicah *Salmonella typhimurium* ter celicah *Escherichia coli*, ob ali brez dodanih pospeševalcev metabolizma, niso potrdili genotoksičnega delovanja. Ravno tako niso ugotovili nobenih sprememb v strukturi ali številu kromosomov z aktivacijo ali brez aktivacije metabolizma. Študije, ki so jih izvajali *in vitro* na človeških limfocitih ter hepatocitih so pokazale, da ADBI, AHDMI ter ATII ne izkazujejo nobenega genotoksičnega delovanja. Za AHTN, HHCB, ADBI, AHDI ter ATII študije so potrdile odsotnost zloma ali izgube kromosomov (6).

##### **1.4.4.3 Makrociklični mošusi**

Študije, ki so izvedene *in vitro* z Amesovim testom so pokazale, da pri ciklopentadekanonu, etilendodekandioatu ter etilenbrazilatu ni prisotno genotoksično delovanje kot tudi, da ne povzročajo kromosomskih sprememb (6).

#### **1.4.5 Kancerogenost**

Rezultati študij kancerogenosti, ki so jih izvedli z apliciranjem mošus ksilena, so pokazale signifikantno nastajanje benignih kot tudi malignih tumorjev v jetrih pri obeh spolih miši in nastanek Harderjevega žleznega tumorja pri samcih. Točen vzrok nastajanja tumorjev ni znan (6).

#### **1.4.6 Fotoalergija**

Od leta 1995 je Evropski uniji prepovedana uporaba mošus ambreta, ker povzroča močne fotoalergije. Za mošus ksilen, mošus keton, mošus mosken, mošus tibeten ter za policiklične mošuse AHTN in HHCB niso dokazali, da povzročajo fotoobčutljivost (6).

#### **1.4.7 Teratogenost/Embriotoksičnost**

Raziskave, ki so jih izvajali na brejih samicah podgan z apliciranjem mošus ksilena, so pokazale, da mošus ksilen prehaja skozi placento ter da je prisoten tudi v materinem mleku. Samicah podgan so peroralno aplicirali HHCB (od 50 do 500 mg na kilogram telesne mase dnevno), AHTN (od 5 do 50 na kilogram telesne mase dnevno), mošus keton (od 15 do 150 mg na kilogram telesne mase dnevno) ter mošus ksilen (od 20 do 200 mg na kilogram telesne mase dnevno) v obdobju od 7 do 17 dni (6).

Na 20 dni starem zarodku niso zasledili nobene embriotoksičnosti. Za AHTN ter mošus ksilen niso zabeležili nobenega vpliva na rast, razvoj ali morfologijo zarodka. Pri visokih odmerkih mošus ketona so ugotovili izgubo ali zmanjšanje porodne teže novorojenih podgan (6).

### **1.5 VPLIV SINTEZNIH MOŠUSOV NA OKOLJE**

Razvoj kemične industrije je omogočil zamenjavo naravnega mošusa s sinteznim oziroma tako imenovanimi belimi mošusi. Zaradi relativno enostavne sinteze ter nizkih stroškov proizvodnje se je njihova uporaba zelo razširila. Kot dišavo jih uporabljamo v proizvodnji gospodinjskih sredstev za čiščenje, pralnih praškov, sredstev za osebno higieno ter seveda v parfumeriji. Leta 1981 so odkrili prisotnost MK in MX v ribah ter školjkah, ki živijo v reki Tam (Japonska). To je bil neposreden povod za začetek bolj obsežnih raziskav o prisotnosti sinteznih mošusov kot klasičnih onesnaževalcev v odpadnih vodah, pitni vodi, hišnem prahu ter v ribah (6).

### **1.5.1 Prisotnost sinteznih mošusov v odpadnih vodah**

Po uporabi sredstev, ki vsebujejo sintezne mošuse, velika večina le-teh konča v odpadnih vodah. Prisotnost sinteznih mošusov v odpadnih vodah je način kontaminacije vodnega okolja. Posebej policiklična mošusa HHCB ter AHTN sta prisotna v večini vrst voda z izjemo vode za pitje. Če naredimo primerjavo z drugimi lipofilnimi snovmi, predstavljajo policiklični mošusi ene od dominantnih polutantov. Študije, ki se nanašajo na onesnaževanje s policikličnimi mošusi ugotavljajo, da se s porastom proizvodnje in prodaje HHCB ter AHTN istočasno povečuje tudi onesnaženost površinskih voda (6).

Rezultati raziskave, ki so jo izvedli v Nemčiji od leta 1994 do 1997, so pokazali, da sta vrednosti za HHCB ter AHTN nekaj  $\mu\text{g/L}$ , medtem ko so za druge mošuse iz skupine policikličnih mošusov dosti nižje (okrog  $0,1 \mu\text{g/L}$ ). Vrednosti za najbolj uporabljana predstavnika nitro mošusov, za MK ter MX, sta bili znašali približno  $1 \mu\text{g/L}$ . V nobenem od vzorcev niso našli mošus ambreta, moskena ali mošus tibetena (6).

Po postopku čiščenja odpadnih vod v čistilnih napravah, so ugotovili, da pride do zmanjšanja koncentracij sinteznih mošusov. Do zmanjšanja vrednosti mošusnih komponent v odpadni vodi prihaja zaradi adsorpcije na trdne delce ter zaradi razgradnje na polarne metabolite. Vrednosti zmanjšanja prisotnosti mošusnih komponent se razlikujejo od ene do druge študije. Do razlik prihaja zaradi različnih koncentracij mošusnih komponent, ki so prisotne v odpadnih vodah, kot tudi od uporabe različnih čistilnih naprav, ki so uporabljene za čiščenje odpadnih vod. Zaskrbljujoče je dejstvo, da se mošusne komponente le delno razgradijo, delno nalagajo na trdne delce in na ta način trajno kontaminirajo okolje. HHCB ter AHTN so odkrili v večini vzorcev vode z izjemo vode za pitje, zato se je HHCB izkazal kot primeren organski indikator onesnaženosti vod s mošusnimi komponentami (6).

### **1.5.2 Prisotnost sinteznih mošusov v površinskih vodah (reke, jezera)**

Glavni vir onesnaževanja vodnega okolja s sintezni mošusi predstavljajo odpadne vode, ki zapustijo čistilne naprave. Testi so pokazali, da so najvišje koncentracije mošusnih komponent v neposredni bližini izpusta vode iz čistilne naprave in padajo s povečanjem razdalje od izpusta predelane odpadne vode iz čistilne naprave. Prisotnost mošusov v površinskih vodah je odvisna od deleža oziroma prisotnosti odpadnih vod. Med sintezni mošusi sta se HHCB in AHTN pokazala kot najbolj primerna organska indikatorja s



katerimi se ugotavlja onesnaženost površinskih vod kot tudi vodnega sistema. Koncentracija sinteznih mošusov je odvisna tudi od hitrosti toka reke, kar pogojuje hitrost raztapljanja, kot tudi hitrost očiščenja reke. Zadnja leta so naredili več raziskav o prisotnosti sinteznih mošusov v rekah, jezerih, kanalih in Severnem morju. Na ta način so dobili boljši vpogled v onesnaženost. Ponovno se je izkazalo, da sta v površinskih vodah najbolj prisotni spojini HHCB in AHTN. Najvišje koncentracije za HHCB so bile okrog 12 µg/L in 6,8 µg/L za AHTN. To podatki raziskave različnih rek, kanalov in jezer v Berlinu leta 1996. Vode, ki so imele nizek delež prisotnosti odpadnih vod so imele tudi nizke koncentracije policikličnih mošusov in sicer za HHCB od 100 do 400 ng/L ter za AHTN od 50 do 240 ng/L. Koncentracije ADBI, MK ter MX so bile nizke, blizu ali pod mejo detekcije. Vrednosti o prisotnosti HHCB ter AHTN v reki Elbi so bile večje kot za druge lipofilne organske polutante kot sta poliklorirani bifenili (PCB) ter policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) (6).

### **1.5.3 Prisotnost sinteznih mošusov v pitni vodi**

Regulativa in direktive EU narekujejo visoke standarde glede kakovosti, kemijskih, mikrobioloških ter organoleptičnih zahtev za pitno vodo. Enako visoke zahteve za pitno vodo veljajo na nacionalnem nivoju posameznih članic EU. Študije, ki zajemajo mejne koncentracije ostankov dišav v pitni vodi, vključujejo tudi HHCB in AHTN. Za površinske vode, ki jih uporabljamo za pridobivanje pitne vode, so postavljene relativno nizke mejne koncentracije določanja ostankov sinteznih mošusov in sicer 80 ng/L za HHCB in 40 ng/L za AHTN. Te vrednosti so bile takoj prekoračene. Izvedene analize vzorcev, ki so dobili iz reke Elbe so potrdile to hipotezo. Ker nobeden ni pričakoval, da se določen delež teh nepolarnih in lipofilnih spojin raztopi v vodi, je to narekovalo potrebo po postavljanju večjih mejnih vrednosti za ostanke HHCB ter AHTN. V urbanih okoljih je eden od pomembnih procesov tudi obnavljanje podtalnice. To je počasen proces prehajanja vode skozi peščene filtre, pri katerem pride do eliminacije določenega dela sinteznih mošusov, tako da npr. pri ponovni analizi vzorcev vode iz obrežja reke Elbe HHCB ter AHTN niso zaznali (6).

V splošnem vse raziskave o prisotnosti policikličnih mošusov v vodah, ki so jih naredili, potrjujejo hipotezo, da se s povečanjem uporabe policikličnih mošusov povečuje delež le-teh v vodnem okolju. Prisotnost policikličnih mošusov v vodnem okolju je odvisna tudi od več različnih dejavnikov, kot so delež odpadne vode v vodnem okolju,

kakovosti delovanja čistilnih naprav na koncu tudi od naravnega procesa filtracije vode skozi podtalnico.

## **1.6 PRISOTNOST SINTEZNIH MOŠUSOV V SLOVENSKEM VODNEM OKOLJU**

Slovenija je vodnata dežela. Z več kot 26 tisoč kilometrov rek in hudournikov se ponaša z eno gostejših hidrografskih mrež na svetu. V povprečju je na vsakem kvadratnem kilometru slovenskega ozemlja 1,3 kilometra površinskih vodnih tokov. Ima približno 1300 naravnih in umetnih jezer, morje, izvire, slapove in obširna območja talne vode (18). Vode so eno največjih slovenskih bogastev, zato moramo z njimi ravnati premišljeno. Voda vpliva na naše življenje in naše delovanje. Voda je skupno dobro in naravna vrednota najvišjega pomena. Kakovost našega življenja in zdravje sta neločljivo povezana z njo, zato je vodo in vodne ekosisteme potrebno varovati pred takšnim človekovim delovanjem, ki lahko negativno vpliva nanjo. Voda ima okoljski, ekonomski, socialni in kulturni pomen. Vodno načrtovanje kot tudi zaščita pred onesnaževanjem je sodobna, družbeno koristna ter okoljsko premišljena dejavnost (19).

Z vstopom Republike Slovenije v EU leta 2004 se je RS obvezala spoštovati legislativo ter regulativo EU. Leta 1998 je Evropska komisija (EC) izdala direktivo »Zahteve o kakovosti vode namenjene za prehrano ljudi«, ki so bile podane v Direktivi Sveta Evrope 98/83 ES. Istega leta je direktivo Evropske komisije RS uskladila s svojim pravnim redom glede zahtev za pitno vodo, ki narekujejo mikrobiološke, kemijske ter indikatorske parametre (20).

## 2 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je vrednotenje prisotnosti sinteznih mošusov, tako nitro kakor tudi policikličnih v slovenskem vodnem okolju, ker lahko dolgoročno predstavljajo resno nevarnost za ekosisteme RS. Tovrstnih raziskav v Sloveniji ni naredil še nihče, čeprav v ostalih državah EU potekajo že približno 20 let. Glede na dejstvo, da v RS zaenkrat nimamo podatkov o porabi sinteznih mošusov, bo možno samo opredeliti (kvantitativno ter kvalitativno) njihovo prisotnost v vodnem okolju, v katero posredno pridejo po izpustu predelane odpadne vode iz čistilnih naprav. Za analizo vode bomo izbrali reko Krko, ker je njen tok v celoti na področju RS in teče tudi skozi kraje s številčno populacijo in razvito industrijo. Vzorce bomo odvzeli na osmih lokacijah razporejenih po celotnem toku reke, tako da bomo lahko spremljali morebiten porast koncentracij. Točne lokacije bomo izbrali strateško glede na pričakovane obremenitve vode s sinteznimi mošusi, to je v bližini večjih naselij. Za analizo bomo uporabili v literaturi priporočeno analizo metodo. Ta vključuje plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo. Metoda je primerna zato, ker bomo analizirali hlapne in termostabilne snovi, poleg tega pa ima tudi veliko občutljivost, kar je izredno pomembno, saj v vzorcih vode pričakujemo zelo nizke koncentracije sinteznih mošusov. Priprava vzorcev za analizo bo potekala z ekstrakcijo. Kot topilo bomo uporabili pentan, ker njegova visoka hlapnost omogoča enostavno in hitro koncentriranje raztopine brez izgub analita.

Delovne hipoteze:

- V reki Krki bodo prisotni sintezni mošusi v zaznavnih koncentracijah.
- Koncentracije sinteznih mošusov v reki Krki bodo naraščale v smeri od izvira do sotočja.
- Najvišje izmerjene koncentracije sinteznih mošusov pričakujemo za Novim mestom, ker predstavlja največje industrijsko mesto v celotni regiji odvzema vzorcev.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 VZORCI VODE

Na celotnem toku reke Krke smo izvedli vzorčenje vode. Za odvzem vode smo uporabili 2 L steklenice. Vzorčenje je potekalo 24. 06. 2011 na osmih lokacijah:

Vzorec št. 1: Velike Malence

Vzorec št. 2: Kostanjevica

Vzorec št. 3: Dobrava pri Škocjanu

Vzorec št. 4: Mačkovec

Vzorec št. 5: Srebrniče

Vzorec št. 6: Soteska

Vzorec št. 7: Žužemberk

Vzorec št. 8: Izvir reke Krke.

Zemljevid reke Krke in fotografije lokacij vzorčenja vode so v prilogah 1 in 2.

#### 3.2 KEMIKALIJE

celestolid (Celestolide®)	IPC 33412	IFF (International Flavors & Fragrances Inc.), New York, NY, ZDA
<i>n</i> -heptan (GC)	51745	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija
galaksolid (Galaxolide® 50 IPM)	IPC 70302	IFF (International Flavors & Fragrances Inc.), New York, NY, ZDA
<i>n</i> -pentan (p.a.)	468151000	Carlo Erba, Milano, Italija
tonalid (Tonalide®)	263406	PFW Aroma Chemicals B.V., Barneveld, Nizozemska

#### 3.3 APARATURE IN OPREMA

analizna tehtnica	XS205	Mettler Toledo, Greifensee, Švica
avtomatske pipete	Proline	Biohit, Helsinki, Finska
kromatografska kolona Rtx®-1 F&F (30 m × 0,25 mm, 0,25 μm)	18023	Restek Corporation, Bellefonte, PA, ZDA
nastavki za pipete		Saerstedt, Numbrecht, Nemčija

plinski kromatograf z masno selektivnim detektorjem (GC-MS)	QP2010	Shimadzu, Kyoto, Japonska
vakuumski rotacijski uparjalnik Rotavapor	R-200	Büchi, Flawil, Švica

### 3.4 PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Policiklični ter nitro možusi so spojine z relativno molekularno maso med 200 in 300. Zaradi njihove hlapnosti je metoda izbora pri kvantitativnem določanju nitro ter policikličnih možusov plinska kromatografija (GC) (6, 26, 27). Plinska kromatografija je kromatografska tehnika, pri kateri uparjen vzorec s pomočjo inertnega plina (mobilna faza – MF) potuje skozi kolono. Zaradi selektivnega zadrževanja komponent vzorca na stacionarni fazi (SF) pride do njihove separacije.

Glede na stacionarno fazo ločimo:

- Plinsko (MF) – trdno (SF) kromatografijo (Gas Solid Chromatography-GSC): retencija vzorca je posledica fizikalne adsorpcije
- Plinsko (MF) – tekočo (SF) kromatografijo (Gas Liquid Chromatography – GLC): retencija vzorca je posledica njegovega porazdeljevanja med mobilno in stacionarno fazo (28).

#### 3.4.1 Splošni pomen GC

Prednosti:

- zelo dobra separacija,
- kratek čas analize,
- potrebna je majhna količina vzorca ( $\mu\text{L}$ ),
- kvantitativna analiza.

Pomanjkljivosti:

- degradacija vzorca,
- spojina mora biti termično stabilna ter dovolj hlapna (28).

#### 3.4.2 Plinski kromatograf

Sistem za plinsko kromatografijo sestavljajo:

1. izvor nosilnega plina, jeklenka

2. regulatorji pritiska in pretoka plina detektor
3. injektor za vnos vzorca
4. kolona
5. detektor
6. termostati za injektor, kolono in detektor
7. integrator
8. rekorder (28).

### **Nosilni plin**

Nosilni plin mora biti kemijsko inerten. Najpogosteje se uporabljajo dušik-N<sub>2</sub> (dolgi časi analize, lahko dostopen, poceni), helij- He (inerten, kratki časi analize dražji kot dušik), vodik- H<sub>2</sub> (eksploziven potrebni varnostni ukrepi, kratki časi analize). Izbira nosilnega plina je tudi pogosto odvisna od vrste detektorja.

Zahteva za nosilni plin je ustrezna čistost, ki jo zagotovimo tako, da med jeklenko in aparatom namestimo trap (nosilec nečistot). Glavni onesnaževalci so ogljikovodiki, kisik in vlaga (28).

### **Injektorski del**

Vzorci za analizo s plinsko kromatografijo so lahko plinasti, tekoči ali trdni. Pline vnašamo direktno, trdne in tekoče vzorce pa raztopimo v primernem topilu, tako da je koncentracija posamezne komponente največ 1 % (28).

Načini injiciranja:

- direktno – on column (za polnjene kolone): Z injekcijsko iglo prebodemo gumijasto tesnilo – septum ter vbrizgamo vzorec (1-20 µL)
- split injiciranje (za kapilarne kolone): Običajno injiciramo 1 µL vzorca. Vzorec se razcepi, pri tem na kolono potuje le manjši del. S tem preprečimo preobremenjenost kolone.
- splitless injiciranje (za kapilarne kolone): Pri zelo nizkih koncentracijah moramo celoten uparjen vzorec voditi na kolono (28).

Uparjalna komora je posebna steklena cevka, ki mora zagotoviti učinkovito uparjanje vzorca. Glede na način injiciranja izberemo liner z manjšim ali večjim notranjim premerom. Nekateri linerji vsebujejo tudi polnilo (steklena volna), ki zadrži trdne nehlapne

delce in s tem ščiti kolono. Za vzdrževanje čistosti lahko uporabimo organsko topilo (npr. aceton), ali pa ga zamenjamo z novim (28).

V zgornjem delu injektorja je nameščeno tesnilo – septum. Narejeno je iz posebne silikonske gume, ki je primerna tudi za visoke temperature. Pri pogostem prebadanju tesnjenje ni več zadovoljivo, zato ga je potrebno pogosto menjavati. Na ta način se lahko izognemo izgubi vzorca, uhajanju plina, degradaciji kolone, nastajanju dodatnih vrhov na kromatogramu. Vzorec je potrebno vbrizgati in uvesti v kolono v čim krajšem času, da preprečimo širjenje signalov (28).

### **Kolona**

Kolona je nameščena v termostatisirani peči, zato je njeno temperaturo mogoče časovno natančno uravnavati - izotermno in gradientno. Zgornja temperatura je omejena s termično obstojnostjo stacionarne faze. V koloni se komponente vzorca ločijo med seboj in vstopajo v detektor, ki je posebej termostatisiran (28).

Polnjene kolone:

- Steklene ali kovinske

Napolnjene s trdnim inertnim polnilom (običajno diatomejska zemlja), ki je prevlečeno s tekočo stacionarno fazo; velikost delcev polnila je od 150 do 125  $\mu\text{m}$  (28).

Kapilarne kolone:

Narejene so iz nerjavečega jekla ali staljenega  $\text{SiO}_2$  (fused silica)

- WCOT ( Wall-Coated-Open-Tubular) kolone: notranja površina je prevlečena s tekočo SF.
- SCOT (Support-Coated-Open-Tubular) kolone: na notranji površini se nahaja tanek sloj nosilnega materiala na katerega je adsorbirana SF. Ta tip kolon ima mnogo boljše učinkovitost, manjšo kapaciteto, krajši čas analize, boljše ponovljivost ter univerzalnost kolone je večja (28).

### **Stacionarne faze**

Zahteve za dobro stacionarno fazo so nizka hlapnost, toplotna stabilnost, kemična nereaktivnost in ustrezne lastnosti faze, ki zagotavljajo primeren retencijski ter selektivnostni faktor (28).

Za uspešno ločevanje komponent je izbira stacionarne faze zelo pomembna. V splošnem velja, da naj bi se njena polarnost ujemala s polarnostjo vzorca. V kolikor nam to ne uspe, je vrstni red izločanja komponent iz kolone odvisen le od temperature vrelišča (28).

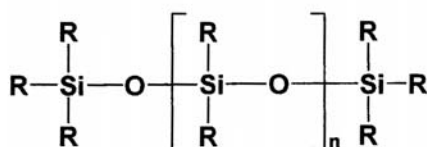
Stacionarna faza je na kapilarno kolono lahko le navadno vezana ali pa premrežena (prečno vezana), s čimer se zmanjša njeno odpuščanje. V prvem primeru gre za kemijsko vez med filmom SF in steno kolone. Pri prečnem vezanju pa se SF doda peroksid, s pomočjo katerega pride ob segrevanju kolone do prečnega vezanja metilnih skupin (28).

Vrste stacionarnih faz:

• **polisiloksani:**

nepolarna SF: za ogljikovodike, steroide

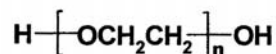
polarne SF:



R CH<sub>3</sub> - nepolarna  
C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>CN, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>CF<sub>3</sub> - polarne

• **polietilenglikoli:**

polarna SF: uporablja se za kisline, alkohole, estre...



## Detektor

Komponento, ki doseže konec kolone, zazna detektor. Njegova prostornina mora biti čim manjša, da preprečimo ponovno manjšanje komponent po separaciji. Detektor daje analizni signal (spremembo upora zaradi prevodnosti, ionski tok, emisijo svetlobe...), ki ga ustrezen senzor pretvori v električni signal. Po okrepitvi ga kot izhodni signal pošljemo na registrirni instrument- rekorder, ki nam pokaže analogni zapis, tj. kromatogram. Lahko pa ga pretvorimo v digitalni signal in ga vodimo na integrator oz. računalnik (28).

Detektor za GC je lahko: neselektiven (odziven na vse spojine, razen na nosilni plin), selektiven (odziven za spojine s podobnimi fizikalnimi ali kemijskimi lastnostmi) ali pa specifičen (za določeno spojino) (28).

Lastnosti idealnega detektorja:

- čim večja občutljivost,



- stabilnost in ponovljivost,
- linearnost,
- delovanje v širokem temperaturnem intervalu (sobna T – 400°C),
- kratek odzivni čas (28).

### ***Plamensko - ionizacijski detektor FID***

FID je osnovan na merjenju toka, ki izvira iz ionov in elektronov, nastalih pri gorenju organskih spojin v čistem plamenu vodik/ zrak. Če pride v detektor organska spojina iz kolone, tok močno naraste in je sorazmeren z množino snovi v eluatu. Nastali tok povzroči padec napetosti; ta napetostni signal ojačamo in peljemo na izhodno enoto (rekorder ali integrator) (28).

Lastnosti:

- odziv je odvisen od števila C atomov (masna odvisnost),
- visoka občutljivost (meja detekcije  $10^{-13}$  g),
- linearen v širokem intervalu ( $10^6$ ),
- ima majhen šum,
- robusten in enostaven za rokovanje,
- slaba lastnost je degradacija vzorca (28).

### ***Ostali GC detektorji***

- ECD detektor (detektor na zajetje elektronov):

Eluent iz kolone vodimo preko dveh elektrod, od katerih ena vsebuje radioaktiven izotop, ki emitira elektrone ( $\beta$  sevalec, npr.  $\text{Ni}^{63}$ ). Ti visokoenergijski elektroni povzročajo po trkih z nosilnim plinom nastanek plazme (ioni, elektroni, radikali). S primernim potencialom dobimo nek konstanten tok, ki predstavlja bazno linijo. Ko pride iz kolone elektrofilna spojina, pride do zajetja elektronov, kar povzroči negativen signal, ki je sorazmeren množini eluirane komponente. Je visoko občutljiv, ima pa ozko linearno območje. Uporablja se za spojine z elektronegativnimi skupinami (halogeni, peroksidi, nitroskupine, kinoni...)

- TCD detektor (toplotno prevodnostni detektor):

Glavni del je električno segreti žica, katere temperatura je pri konstantni električni moči odvisna od toplotne prevodnosti plina. Nosilni plin in organske spojine imajo različne

toplotne prevodnosti. Detektor beleži spremembo toka, ki nastane zato, da je temperatura konstantna. Je edini univerzalni za vse spojine, ki jih lahko ločimo z GC ter ima široko linearno območje. Ker je nedestruktiven, ga lahko uporabljamo tudi v preparativni kromatografiji. Zaradi nizke občutljivosti pa ni primeren za analizo sledov.

- NDP detektor (dušik – fosforjev detektor),
- FPD detektor (plamensko fotometrični detektor),
- TED detektor (detektor na osnovi emisije) (28).

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

Eksperimentalno delo je potekalo v laboratoriju Katedre za farmakognozijo na Fakulteti za farmacijo in je obsegalo pripravo vzorcev vode in analize, izvedene na plinskem kromatografu z masno selektivnim detektorjem.

### 4.1 PRIPRAVA VZORCEV VODE

1 L vode smo ekstrahirali s 50 mL pentana. Postopek smo ponovili trikrat in pentanske frakcije združili. Pentan smo uporabili ker je bolj hlapen, lažje ga odparimo, s tem zmanjšamo izguba vzorca, posledično prihaja do manjše napake.

Združene pentanske frakcije smo prenesli v 250 mL bučko in koncentrirali vzorec pri  $T = 40^{\circ}\text{C}$  in tlaku  $P = 750$  mbar do približno 10 mL. Ta vzorec smo prenesli v 25 mL bučko s koničastim dnom ter oddestilirali ves pentan pri enakih razmerah. Ostanek smo raztopili v 1 mL heptana in uporabili za GC-MS analizo. Heptan smo uporabili, ker ima višje vrelišče in s tem dobimo bolj stabilne vzorce.

### 4.2 GC-MS ANALIZA

Razmere analiz:

T injektorja =  $250^{\circ}\text{C}$

T ionskega izvora =  $200^{\circ}\text{C}$

T vmesnika =  $330^{\circ}\text{C}$

pretok plina (He) = 1 mL/min

“splitless” način

volumen inj. = 1  $\mu\text{L}$

temperaturni program:  $60^{\circ}\text{C}$  (5 min), do  $300^{\circ}\text{C}$  ( $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ),  $300^{\circ}\text{C}$  (5min)

čas analize: 34 minut

razpon zaznavanja relativnih molekulskih mas: 35 – 500

hitrost odjemanja podatkov (skeniranja): 2500

Metodo smo povzeli po referenčni literaturi (27), vendar smo jo nekoliko prilagodili, ker nismo imeli na voljo načina programirane termične desorpcije vzorcev velikih volumnov, zato smo uporabili klasičen način injiciranja.

## 5 REZULTATI

### 5.1 DOLOČITEV MEJE DETEKCIJE

Za izračun meje detekcije smo uporabili standard celestolida, ker eden izmed najbolj pogosto industrijsko uporabljenih sinteznih mošusov.

Izračun razmerja signal/šum na primeru celestolida:

$c(\text{celestolid}) = 100 \mu\text{g/mL}$ , raztopljen v heptanu

Tarča  $m/z = 244$

	Začetek	Konec	Signal
signal	19.120	19.220	2765283
šum	19.250	19.350	302

razmerje  $S/N = 9157$

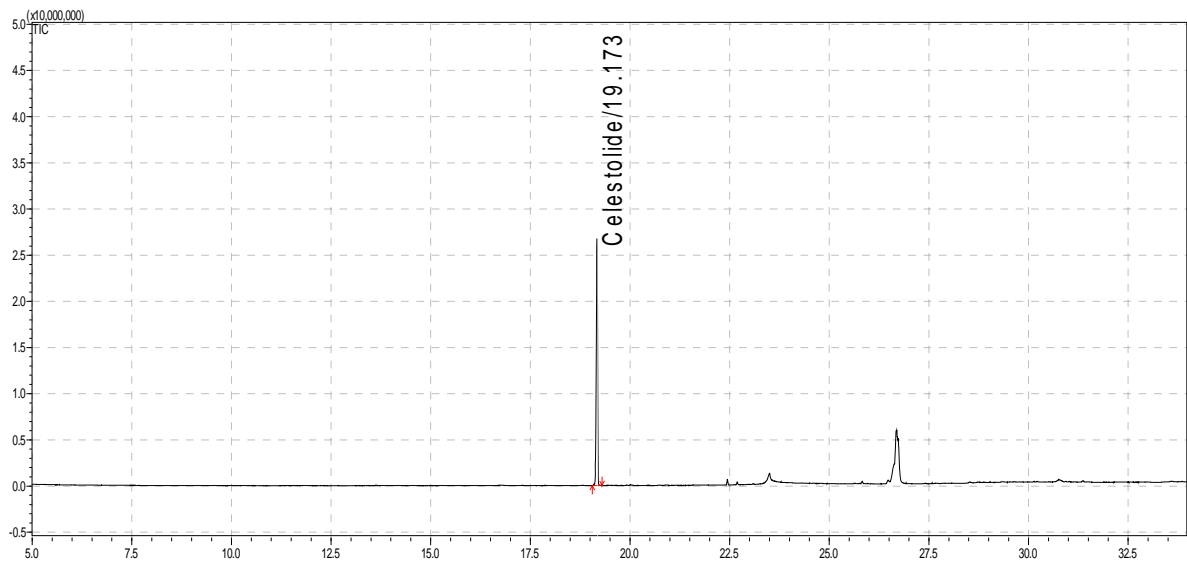
Pri izračunu upoštevamo teoretično koncentracijo v vzorcu vode, to je  $100 \mu\text{g/L}$ .

Meja detekcije =  $3 \cdot 1/SN \cdot c(\text{celestolid}) = 3 \cdot 1/9157 \cdot 100 \mu\text{g/L} = 0,0328 \mu\text{g/L} = 32,8 \text{ ng/L}$

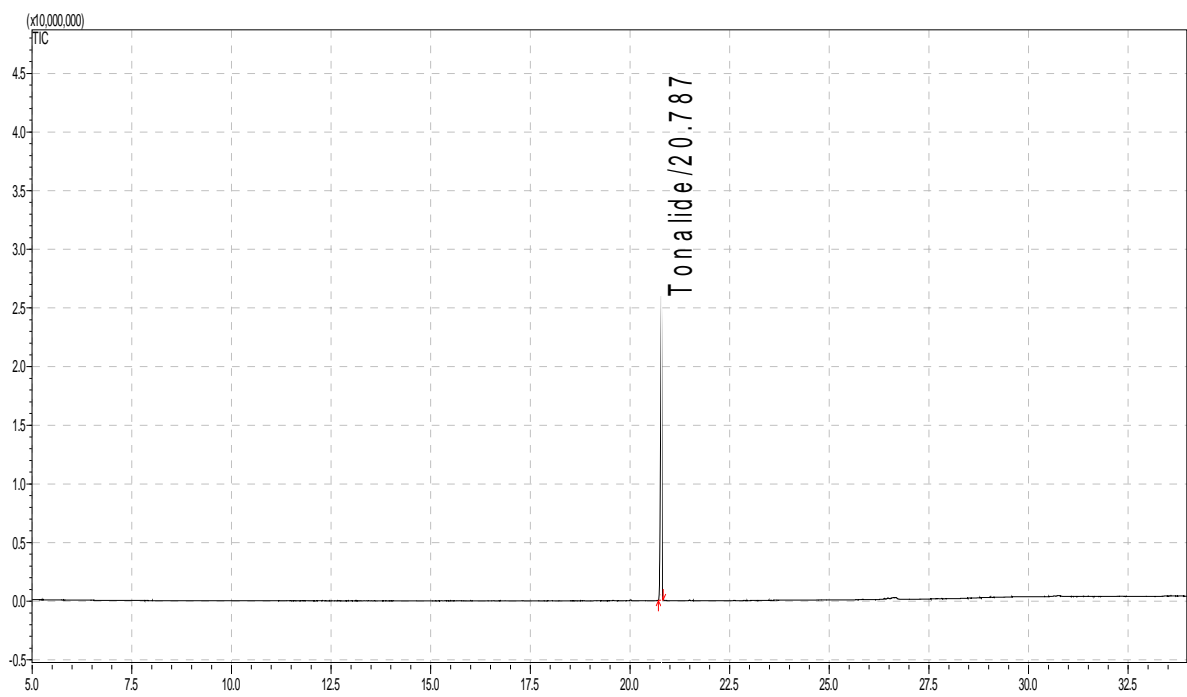
Meja detekcije, ki smo jo določili je višja glede na dostopne literaturne podatke. Pri podobni študiji, ki so jo izvajali na področju Berlina je bila določena meja detekcije  $10 \text{ ng/L}$  (6).

### 5.2 ANALIZA STANDARDOV POLICIKLIČNIH MOŠUSOV

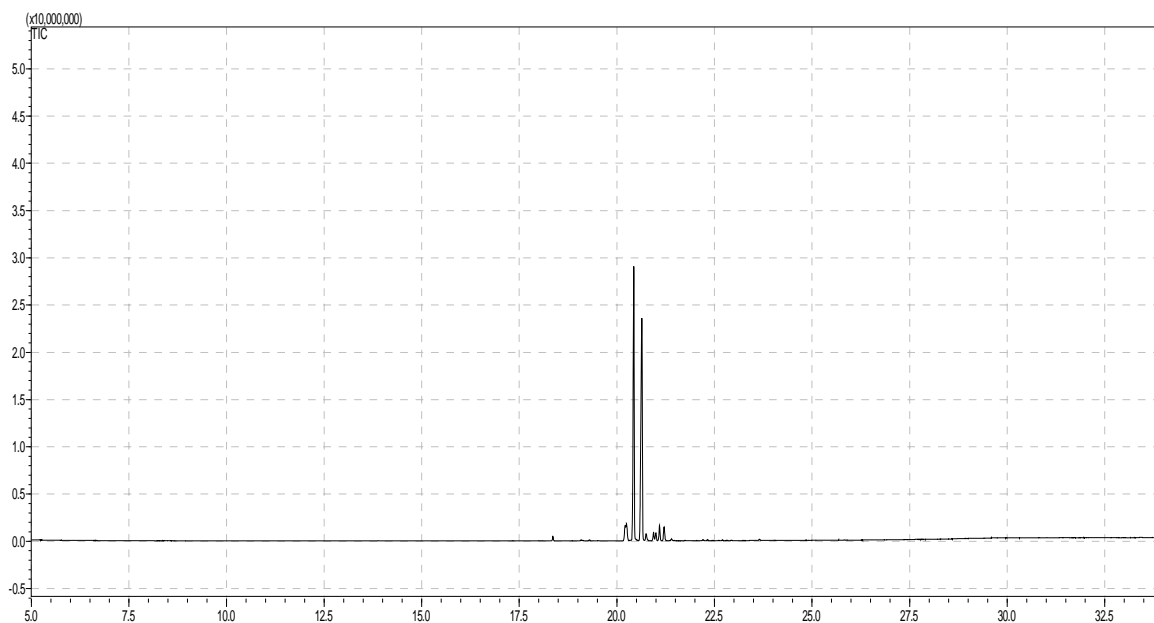
Standarde celestolida, tonalida in galaksolida smo pripravili z raztapljanjem referenčnih spojin v heptanu tako, da je bila koncentracija  $1,00 \text{ mg/mL}$ .



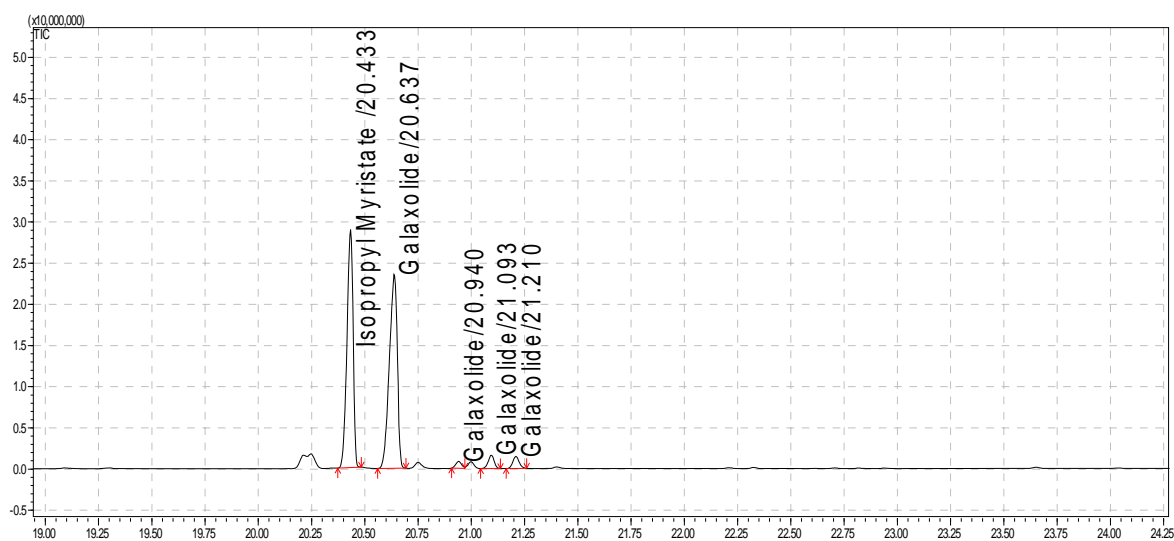
**Kromatogram št.1: Standard celestolida.**



**Kromatogram št. 2: Standard tonalida.**



**Kromatogram št.3: Standard galaksolida.**



**Kromatogram št. 4: Izomeri galaksolida.**

Iz kromatogramov celestolida (št. 1) in tonalida (št. 2) je razvidno, da imamo čiste spojine, medtem ko nam kromatogram galaksolida (št. 3) kaže, da je spojina zmes izomerov. V vzorcu je prisoten tudi izopropilmiristat, ki ga proizvajalec doda kot topilo za zmanjšanje viskoznosti čistega galaksolida. Za nadaljnje primerjalne analize smo kot referenčno spojino uporabili celestolid.

Za ugotavljanje učinkovitosti ekstrakcije smo 1,00 mg celestolida raztopili v 1 L vode in trikrat zapored ekstrahirali s 50 mL pentana. Nadalje smo vzorec pripravili za GC-MS analizo tako, kot je opisano v podpoglavju 4.1.

Izračun učinkovitosti ekstrakcije:

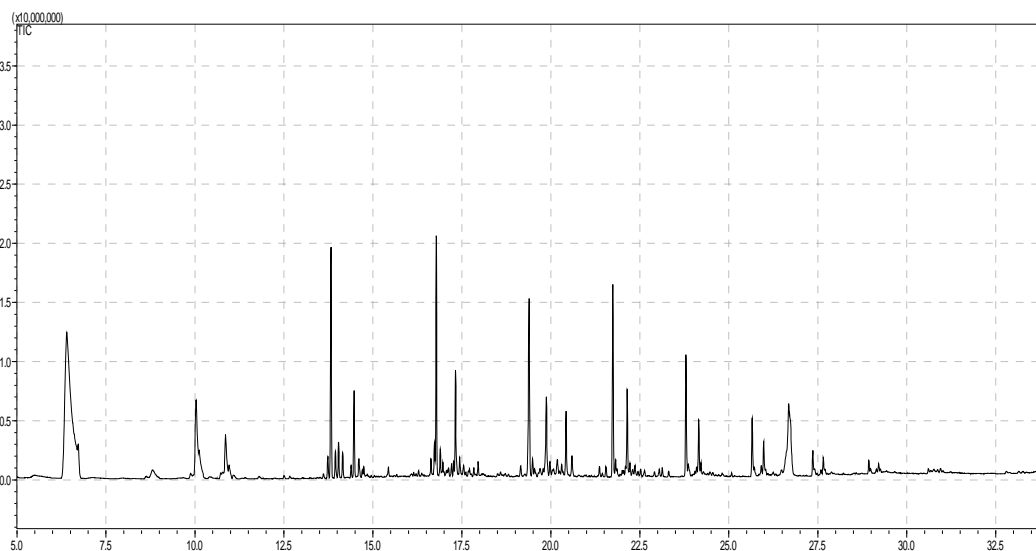
$S(\text{ekstrahiran celestolid}) = 58436959$

$S(\text{standard celestolid}) = 60881083$

$EE = S(\text{ec})/S(\text{sc}) \cdot 100 \% = 58436959/60881083 \cdot 100 \% = 95,99 \%$

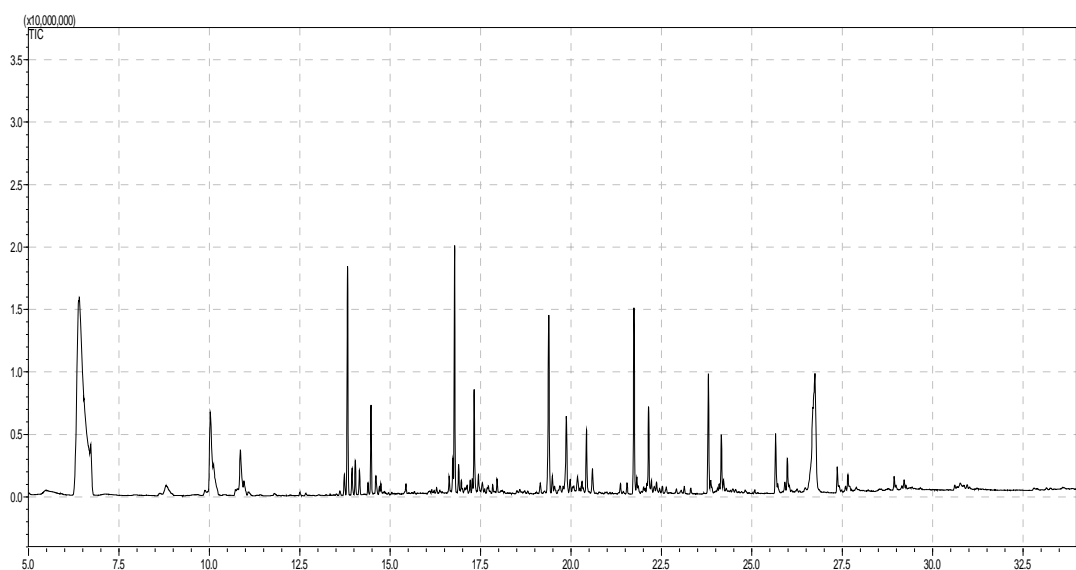
### 5.3 ANALIZA VZORCEV VODE

Kromatogrami, ki smo jih dobili s plinsko analizo analizo osmih vzorcev vode:



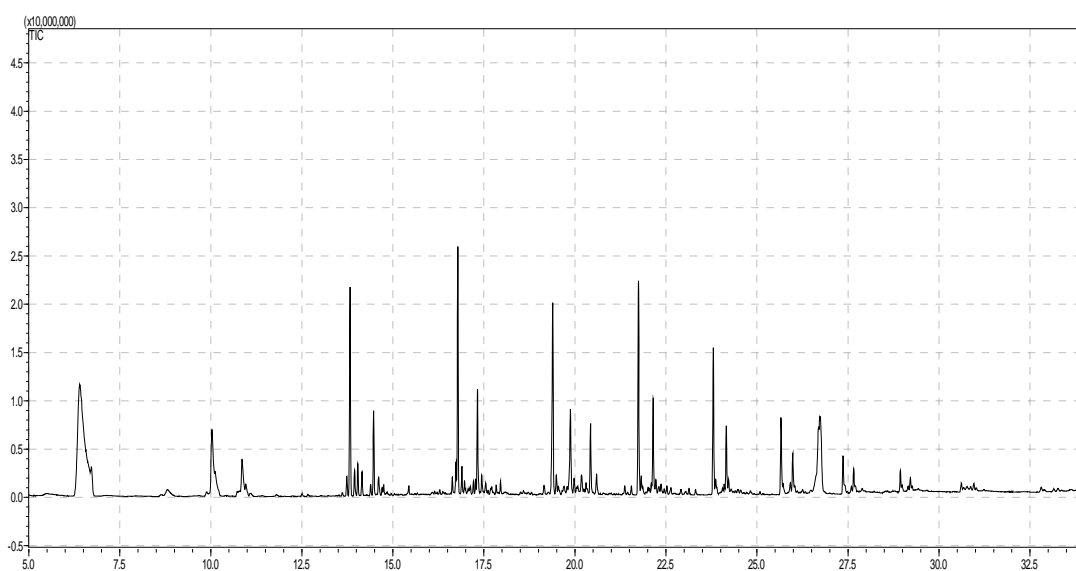
**Kromatogram št. 5:** Vzorec 1 (Velike Malence).

Velike Malence je lokacija na sotočju reke Krke in Save. Predstavlja končni del reke, v katerem bi pričakovali največjo obremenjenost vode s sinteznimi mošusi. Iz kromatograma št. 5 je razvidna odsotnost sinteznih mošusov. Prisotni vrhovi predstavljajo signale za višje alkane, prisotne kot nečistote v pentanu, ki so postale vidne zaradi koncentriranja vzorca.



**Kromatogram št. 6: Vzorec 2 (Kostanjevica).**

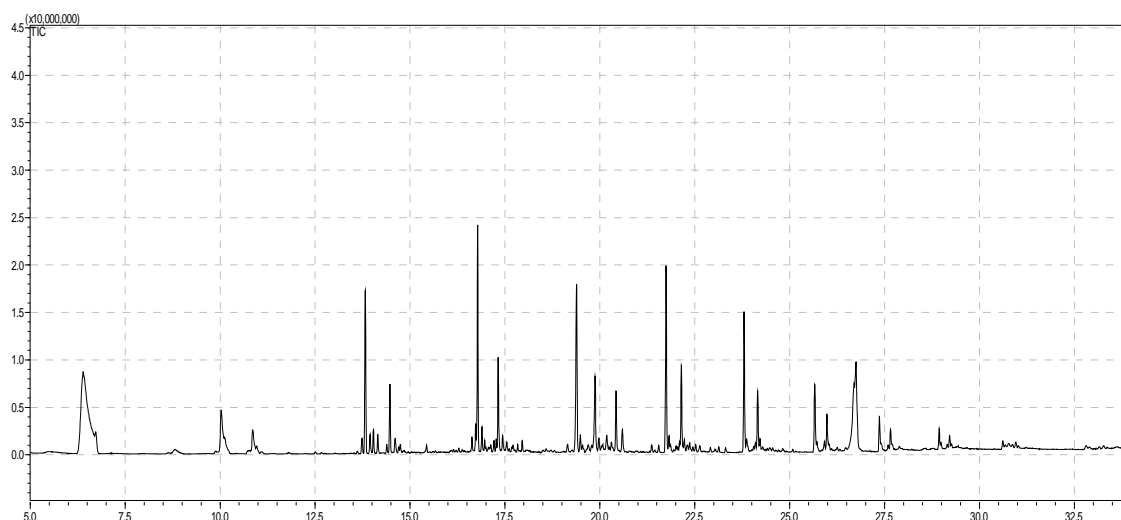
Kostanjevica je bila naslednja lokacija vzorčenja. Je v bližini manjšega naselja z maloštevilno populacijo in brez industrije, zato tu nismo pričakovali porasta koncentracij sinteznih mošusov. Da je to res, lahko vidimo iz kromatograma št. 6, kjer imamo samo signale za nečistote, ki izvirajo iz pentana.



**Kromatogram št. 7: Vzorec 3 (Dobrava pri Škocjanu).**

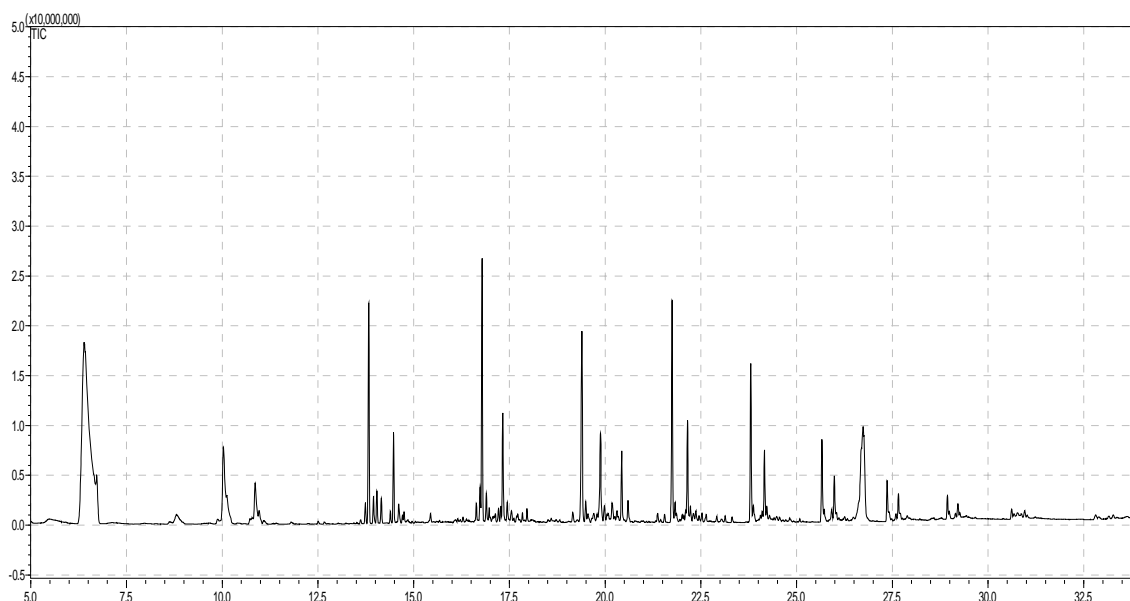
Dobrava pri Škocjanu je še manjše naselje od Kostanjevice, zato tudi tu ne moremo pričakovati povišanih koncentracij sinteznih mošusov. To kaže kromatogram št. 7.





**Kromatogram št. 8: Vzorec 4 (Mačkovec).**

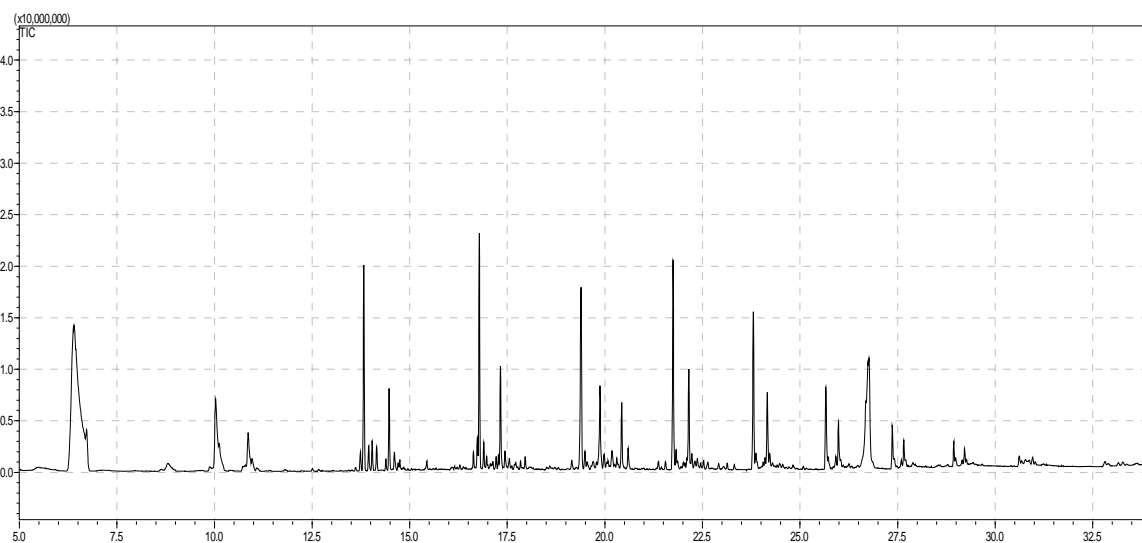
Mačkovec je lokacija na koncu Novega mesta za katero smo pričakovali najvišje koncentracije sinteznih mošusov v vodi zaradi prisotnosti industrije in velikega števila prebivalcev. S pomočjo kromatograma št. 8. lahko v nasprotju z našimi pričakovanji ugotovimo odsotnost sinteznih mošusov na tej lokaciji.



**Kromatogram št. 9: Vzorec 5 (Srebrniče).**

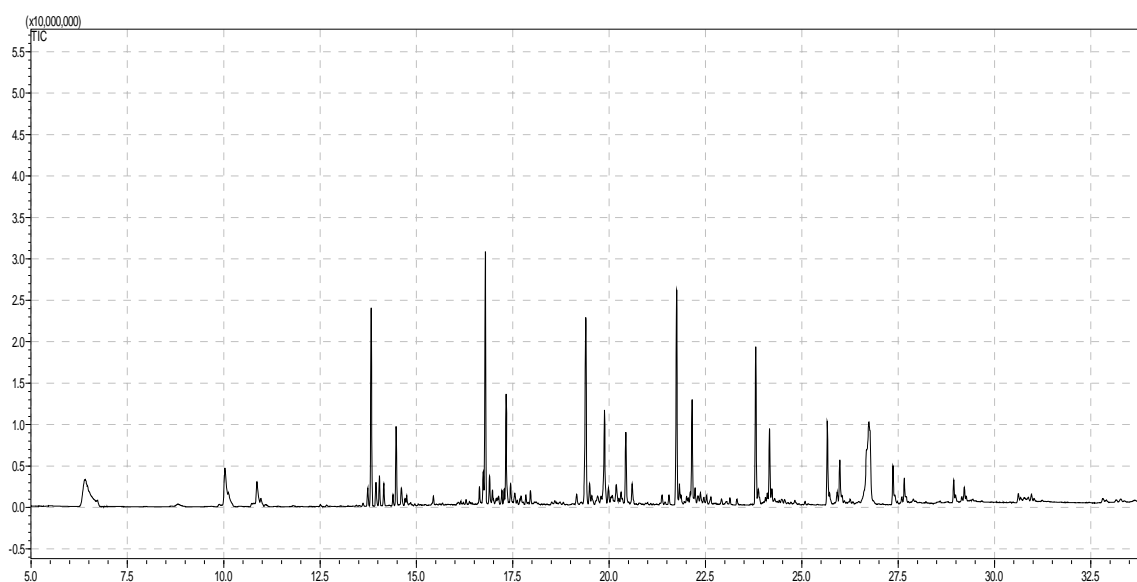
Srebrniče je naselje pred Novim mestom, ki smo ga izbrali, da bi lahko pokazali razliko v koncentracijah sinteznih mošusov v vodi pred in za velikim industrijskim

mestom. Tudi tukaj tega nismo mogli potrditi, ker kromatogram št. 9 kaže na odsotnost sinteznih mošusov.



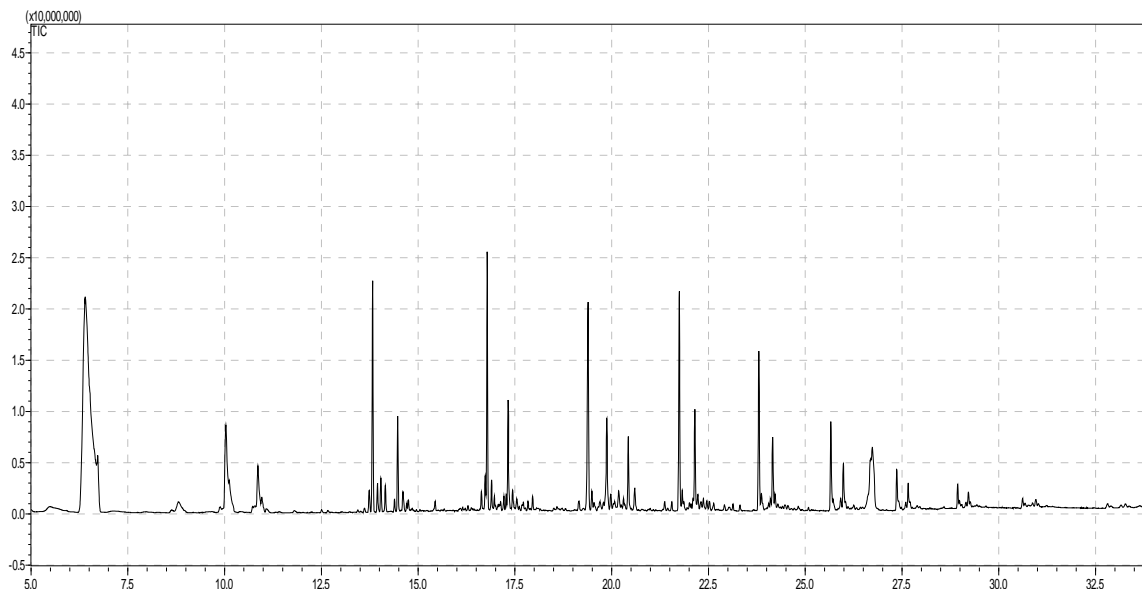
**Kromatogram št. 10: Vzorec 6 (Soteska).**

Soteska je lokacija na približni polovici toka reke Krke. Je praktično neobljuden kraj, zato tu nismo pričakovali pojavljanja sinteznih mošusov v vodi, kar potrjuje tudi kromatogram št. 10.



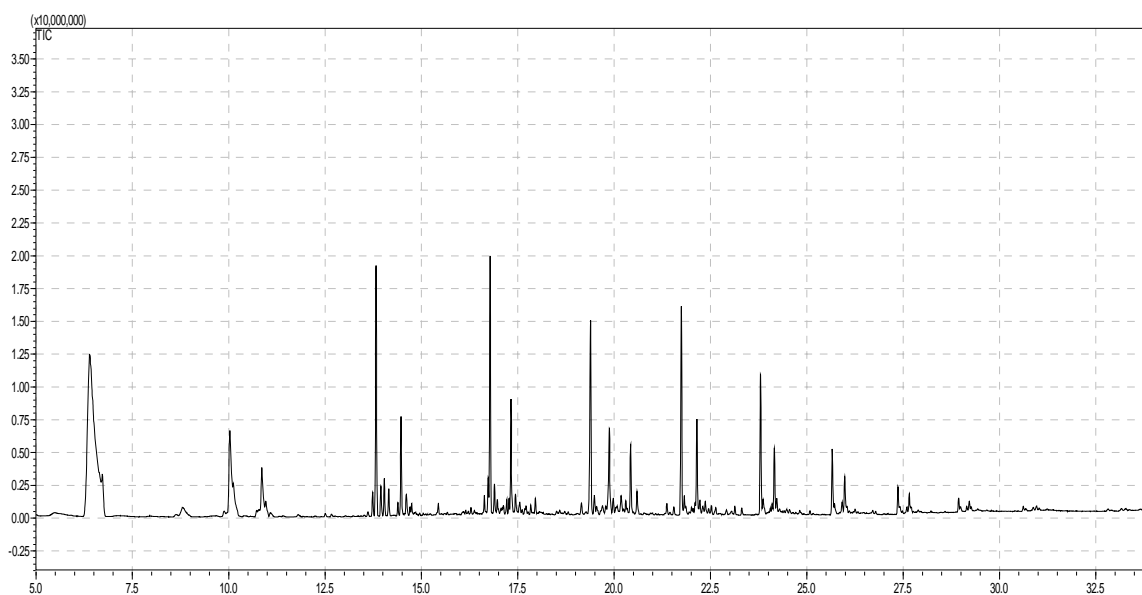
**Kromatogram št. 11: Vzorec 7 (Žužemberk).**

Žužemberk sodi v območje zgornjega toka reke Krke, ki je redko poseljen in popolnoma brez industrije, zato tu težko pričakujemo prisotnost sinteznih mošusov v vodi. Ta pričakovanja so se izkala za utemeljena, kar je razvidno iz kromatograma št 11.



**Kromatogram št. 12: Vzorec 8 (Izvir reke Krke).**

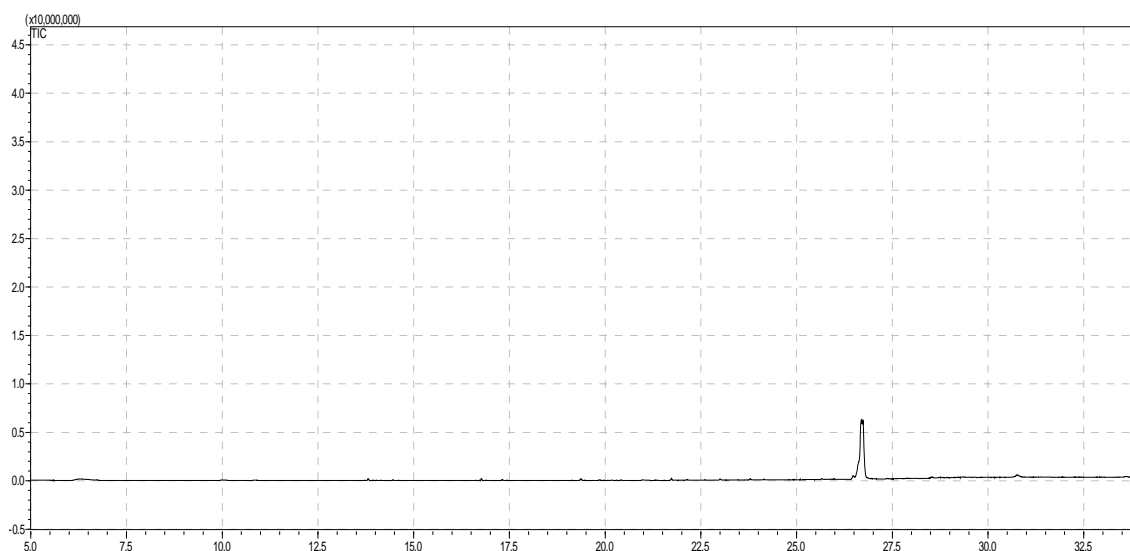
Izvir reke navadno predstavlja njen najmanj onesnažen del, saj praviloma še ni izpostavljena površinskim dejavnikom. Reka Krka izvira v področju brez industrije, goste poseljenosti in intenzivnega kmetijstva, zato lahko upravičeno pričakujemo, da ne tej lokacije ne vsebuje sinteznih mošusov, kar potrjujejo rezultati analize vode s tega področja, predstavljeni na kromatogramu št. 12.



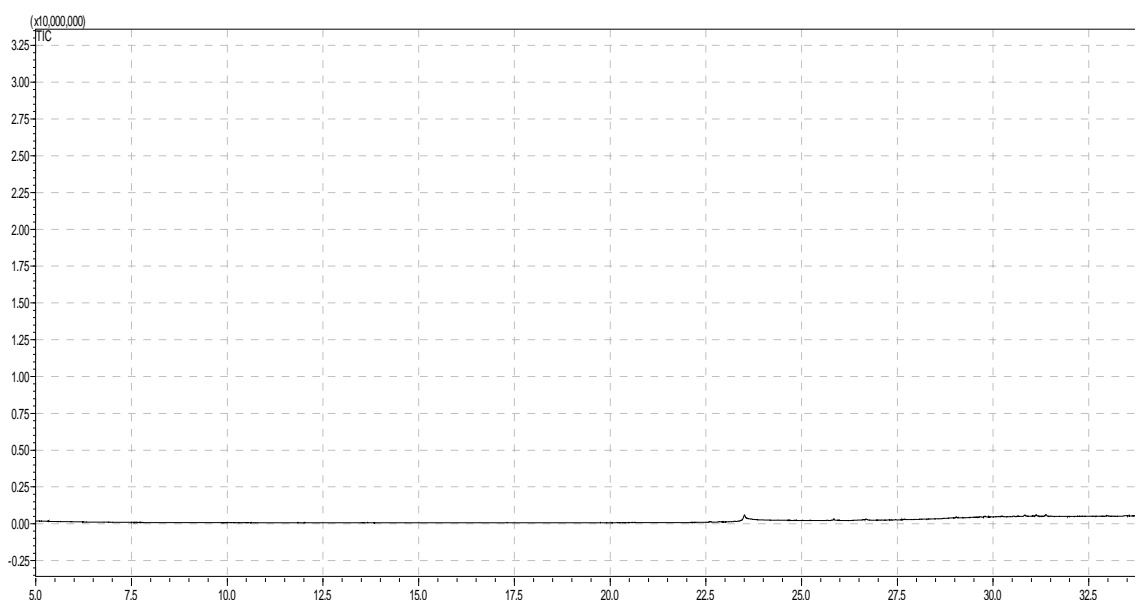
**Kromatogram št. 13:** Slepí vzorec (koncentrirani pentan).

Vseh osem kromatogramov vzorcev (št. 12-15) in kromatogram slepega vzorca (št. 13), ki ga predstavlja koncentriran pentan, je zelo podobnih. Vrhovi, ki so prisotni na kromatogramih predstavljajo nečistote, ki jih zaznamo zaradi koncentriranja pentana in so pravzaprav odziv topila. Po primerjavi z bazo podatkov masnih spektrov, smo ugotovili, da so to manj hlapni alkani z dolžino verige do trideset ogljikovih atomov, ki so v sledovih normalno prisotni v pentanu in pridejo do izraza zaradi koncentriranja vzorca. Da ti vrhovi izvirajo iz topila, lepo vidimo na slepem vzorcu, kjer so bile izključene spojine iz vzorcev vode.

S plinsko kromatografijo smo preverili čistoto uporabljenih topil pred koncentriranjem. Rezultate predstavljata kromatograma št. 14 in 15.



**Kromatogram št. 14: Pentan.**



**Kromatogram št. 15: Heptan.**

Kromatograma topil, ki smo jih uporabili, kažeta na ustrezno čistoto, saj ni prisotnih vrhov nečistot v območju retencijskih časov, v katerih se pojavljajo sintezni mošusi.

Iskanje po fragmentih na podlagi MS:

celestolid: 244, 229, 187, 173, 131

galaksolid: 258, 243, 213, 185, 171

tonalid: 258, 243, 201, 187, 159

mošus keton: 295, 294, 279, 191, 174  
mošus tibeten: 266, 251, 174, 160, 143  
mošus ambret: 268, 253, 223, 176, 160  
mošus ksilen: 297, 282, 265, 160, 143  
mošus mosken: 278, 263, 221, 216, 200  
fantolid: 245, 244, 229, 213, 199  
kašmeran: 206, 191, 173, 163, 149  
trazeolid: 258, 215, 201, 185, 173  
versalid: 258, 244, 243, 227, 214 m/z.

Na podlagi primerjave kromatogramov vzorcev vode ter kromatogramov standardov smo sklepali o odsotnosti sinteznih mošusov v vzorcih v koncentraciji nad mejo detekcije. Zaradi večje zanesljivosti smo naredili še iskanje po značilnih fragmentih iz masnih spektrov za vse pogosto uporabljane nitro in policiklične mošuse. Nismo našli nobenega značilnega fragmenta.

## 6 RAZPRAVA

Vzorke vode za analizo smo dobili z vzorčenjem na terenu. Točke vzorčenja smo enakomerno razporedili po celotnem toku reke Krke. Natančne lokacije smo določili strateško glede na to, kje smo pričakovali potencialno obremenitev vode s sintezniimi mošusi. Praviloma so bile to lokacije za večjimi naselji oziroma mesti. Vseh osem lokacij je natančno označenih na zemljevidu v prilogi 1. Vzorčili smo tako, da nismo kontaminirali posameznih vzorcev. Posebej pozorni smo bili, da smo izbrali mesto, kje ni bilo lebdečih delcev blata ali mulja, pred odvzemom smo steklenice tudi trikrat sprali z vodo, zaprli, ustrezno označili in takoj naslednji dan pripravili vzorce za plinsko kromatografijo.

Za analizo smo uporabili priporočeno metodo, opisano v literaturi (27), ki vključuje plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo. Metoda je primerna zaradi visoke občutljivosti in fizikalno-kemijskih lastnosti naših analitov, ki so hlapne in termostabilne spojine. Žal smo bili metodo prisiljeni nekoliko prilagoditi, ker nismo imeli možnosti injiciranja vzorcev večjih volumnov s programirano termično desorpcijo. Zaradi tega tudi nismo naredili ekstrakcije mošusov na trdno fazo. Posledica tega je bil večji vpliv nečistot, prisotnih v uporabljenih topilih, s tem večji šum in posledično višja meja detekcije. Vzorce vode smo namreč ekstrahirali s pentanom, ki smo ga izbrali zaradi njegove lahke hlapnosti, saj omogoča hitro koncentriranje raztopine pri nizki temperaturi, kar bistveno zmanjša eksperimentalno napako zaradi zanemarljive izgube analita. Žal pa se pri koncentriranju pentana povečuje koncentracija nečistot, ki so že prisotne v topilu iz procesa proizvodnje. To so večinoma težko hlapni višji alkani z dolžino verige do trideset ogljikovih atomov. Da ti res izvirajo iz pentana, smo dokazali z analizo slepega vzorca, ki smo ga pripravili s koncentriranjem pentana po enakem postopku kot smo koncentrirali vzorce, pripravljene z ekstrakcijo vode.

Za injiciranje vzorcev smo izbrali »splitless« način. S tem smo povečali količino vnešenega vzorca na kolono, ker so bile predvidene koncentracije analitov zelo nizke. Uporabljen temperaturni gradient, ki se je končal pri 300°C ni vplival na stabilnost analitov.

Za določitev meje detekcije smo uporabili standard celestolid, ki je zelo pogosta sestavina kozmetičnih izdelkov in detergentov, zato se velikokrat pojavlja kot onesnaževalec površinskih voda. Mejo detekcije smo določili v skladu z mednarodnimi smernicami in je bila 32,8 ng/L, izražena kot koncentracija celestolida. Za to smo uporabili

raztopino standarda celestolida. Mejo smo izračunali kot ekvivalent koncentracije celestolida, ki je ustrezal vrednosti trikratnega odziva šuma. Pri teh izračunih smo upoštevali površine pod krivuljami. Ugotovljena meja detekcije je pričakovano višja glede na dostopne podatke iz literature zaradi prej omenjenih razlogov. Pri podobni študiji, ki so jo naredili v Berlinu, je bila meja detekcije 10 ng/L (6).

Ker smo metodo ekstrakcije modificirali, smo preverili tudi njeno učinkovitost. Za to smo ponovno uporabili standard celestolida. Simulirali smo vzorec rečne vode, tako da smo v čisti vodi raztopili 1,00 mg celestolida. To raztopino smo nato ekstrahirali s pentanom na enak način kot vzorce vode s terena. Po ekstrakciji smo združene pentanske frakcije koncentrirali po enakem postopku kot za vzorce s terena, da smo dobili raztopine analita, pripravljene za plinsko kromatografijo. Ugotovili smo, da je učinkovitost ekstrakcije ustrezna, bila je 95,99 %. Izračunali smo jo s primerjavo površin pod krivuljo za celestolid iz ekstrahiranega vzorca in za celestolid standard. Visoka učinkovitost ekstrakcije potrjuje uspešno ekstrakcijo in odsotnost procesov, ki bi vodili v poškodbo analita.

Primerjava kromatogramov vzorcev vode in kromatogramov referenčnih raztopin policikličnih mošusov kaže na odsotnost teh spojin v vzorcih vode v koncentraciji nad ugotovljeno mejo detekcije. Identiteto vrhov smo ugotovili s primerjanjem masnih spektrov s podatki iz spektralnih knjižnic. Zaradi večje zanesljivosti smo naredili še pregled vseh kromatogramov z iskanjem značilnih fragmentov iz masnih spektrov za vse najbolj pogosto uporabljane nitro in policiklične mošuse. To je bilo smiselno tudi zaradi tega, ker nismo imeli standardov za vse iskane sintezne mošuse. Pregled ni dal nobenega pozitivnega signala za nabor iskanih značilnih fragmentov iz masnih spektrov za katerokoli iskano spojino, kar pomeni, da smo pravilno interpretirali kromatograme vzorcev vode glede odsotnosti sinteznih mošusov, zato lahko z zagotovostjo trdimo, da sintezni mošusi v reki Krki niso prisotni v koncentraciji višji od 32,8 ng/L, izraženo kot koncentracija celestolida.

Postavljenih delovnih hipotez ne moremo sprejeti:

- V reki Krki nismo dokazali prisotnosti sinteznih mošusov v koncentracijah nad 32,8 ng/L.
- Naraščanja koncentracij sinteznih mošusov v reki Krki v smeri od izvira do sotočja nismo potrdili.
- Za Novim mestom, kjer smo pričakovali najvišje koncentracije sinteznih mošusov v vodi, prisotnosti teh spojin nismo dokazali.



Na osnovi rezultatov, pridobljenih v tej študiji, lahko s primerjavo podatkov iz ostalih evropskih držav sklepamo, da reka Krka ni obremenjena s sintezniimi mošusi v takem obsegu, da lahko govorimo o onesnaženosti.

## 7 ZAKLJUČEK

Naša raziskava je pokazala odsotnost sinteznih mošusov v reki Krki v koncentraciji, višji od 32,8 ng/L, ki predstavlja mejo detekcije, izraženo kot koncentracija celestolida. Meja detekcije je višja v primerjavi s podobno raziskavo izvedeno v Berlinu, kjer je bila 10 ng/L. Primerjava naših, slovenskih rezultatov s literaturnimi podatki je vprašljiva, saj je Berlin visoko razvito industrijsko mesto s štirimi milijoni prebivalcev. Vsekakor pa bo potrebno v prihodnosti optimizirati analizno metodo, med drugim tudi s spremenjeno pripravo vzorca, s katero se bomo izognili uporabi velikih količin topil, koncentriranju in s tem povečevanju signalov nečistot. To nam bo omogočilo detekcijo in kar je še bolj pomembno, kvantifikacijo posameznih spojin.

Ne glede na to ali govorimo o naravnih ali sinteznih mošusih, so ti postali del našega vsakdanjega življenja. Najdemo jih v pralnih praških, detergentih za gospodinjstvo, kremah, toaletnih vodah, deodorantih, parfumih ter v številnih drugih izdelkih za osebno nego. Zaradi poceni sinteznih mošusov iz Kitajske z vprašljivo kakovostjo bodo tako v Evropi kakor tudi v Sloveniji postali eden od večjih onesnaževalcev okolja, zato bo v naslednjih letih zelo pomembno spremljanje njihovega pojavljanja v okolju.

## 8 LITERATURA

1. Tschirtsch A. Handbuch der Pharmakognosie. Verlag von Chr. Herm. Tauchnitz, Leipzig, Deutschland, 1917: 1156-1161.
2. Homes V. On the scent: conserving musk deer- the users of musk and Europ's role in its trade, Traffic Europe, Brussels, Belgium, 1999.
3. Commission Regulation (EC) No 1968/ 1999;1999, Off J Europ Comm: 244; 22.
4. Slika 1: <http://perfumemaking.blogspot.com/2006/08/musk.html> (20.12.2010).
5. Winkler M, Headly JV, Peru KM, 2000. Optimization of solid-phase microextraction for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of synthetic musk fragrances in water samples. J Chrom A 903: 203-210.
6. Rimkus GG. Metabolism and Pharmacokinetics. In: Synthetic Musk Fragerances in the Envionment. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg, Germany, 2004: 261-277.
7. Slika 2: <http://www.parfum.si/mosus/> (10.12.2010).
8. Slika 3: <http://abuaishgate.com/country-blog.php?cid=12> (10.12.2010).
9. Slika 4: <http://archiveoftime.blogspot.com/2009/09/scent-from-heaven.html> (10.12.2010)
10. Slika 5:  
<http://www.ozanimals.com/Bird/Musk-Duck/Biziura/lobata.html> (10.12.2010).
11. Slika 6: <http://en.wikipedia.org/wiki/Musk> (13.12.2010).
12. Slika 7:  
[http://www.alaska.com/2008/10/16/v-gallery/2086/musk-oxen-in-alaska.html?/2008/10/16/v-enlarge/2086\\_a1166/musk-oxen](http://www.alaska.com/2008/10/16/v-gallery/2086/musk-oxen-in-alaska.html?/2008/10/16/v-enlarge/2086_a1166/musk-oxen) (13.12.2010).
13. Slika 8: [http://en.wikipedia.org/wiki/African\\_Civet](http://en.wikipedia.org/wiki/African_Civet); <http://gomestic.com/consumer-information/animals-that-produce-the-most-expensive-perfumes/> (10.2.2011)
14. Slika 9: <http://programs.wcs.org/laoswildlifephotosexhibition/en/04Civets.html> (10.2.2011)
15. Slika 10: [http://en.wikipedia.org/wiki/Angelica\\_archangelica](http://en.wikipedia.org/wiki/Angelica_archangelica) (13.12.2010).
16. Hawkins DR, Ford RA, 1999. Dermal absorption and disposition of musk ambrette, musk ketone and musk xylene in rats. Toxicol Lett 111: 95-103.
17. Howkins DR at al. 1984: Unpublished results cited in SCCNFP concerning musk ketone, 8 december 1999
18. Riedel J, Dekant W 1999. Biotransformation and Toxicokinetics of Musk Xylene in Humans. Toxicol Appl Pharmacol 157: 145-155.

19. Inštitut za vode RS: <http://www.izvrs.si> (5.2.2011).
20. Uradni list EU:  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=DD:15:04:31998L0083:SL:PDF>  
(15.2.2011)
21. Rowe DJ. Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2005: 147, 152-155, 156, 163-165.
22. Sell C. The Chemistry of Fragrances From Perfumer to Consumer, 2nd Edition. RSC Publishing, Cambridge, UK, 2006: 25.
23. [http://en.wikipedia.org/wiki/Synthetic\\_musk](http://en.wikipedia.org/wiki/Synthetic_musk) (14.2.2011).
24. <http://www.iff.com/Ingredients.nsf/0/83B92B4F43E7C05480256993004187B4>  
(14.2.2011).
25. <http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2009/February/TheSweetScentOfSuccess.asp> (15.2.2011)
26. Cserhati T. Chromatography of aroma Compounds and Fragrances. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg, Germany, 2010: 346-372.
27. Hübschmann H-J. Polycyclic Musks in Waste Water. In: Handbook of GC/MS. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, 2009: 616-621.
28. Skoog DA, Leary JJ. Principles of Instrumental Analysis. 4<sup>th</sup> Ed. Saunders College Publishing, Fort Worth, TX, USA, 1992: 605-628.

## **PRILOGE**

**Priloga 1:** Zemljevid reke Krke z označenimi mesti vzorčenja.

**Priloga 2:** Fotografije lokacij odvzema vzorcev.

VELIKE MALENCE (1)



KOSTANJEVICA (2)



DOBRAVA PRI ŠKOCJANU (3)





NOVO MESTO - MAČKOVEC (4)



SREBRNIČE (5)



SOTESKA (6)



ŽUŽEMBERK (7)



IZVIR KRKE (8)

