

STANOVENÍ TOXICITY „MUSK“ SLOUČENIN S VYUŽITÍM ALTERNATIVNÍCH TESTŮ EKOTOXICITY

HELENA DOLEŽALOVÁ WEISSMANNOVÁ,
IVA ŠTĚPÁNKOVÁ, MILADA VÁVROVÁ
a ALENA LAPČÍKOVÁ

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí,
Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purky-
ňova 118, 612 00 Brno
dolezalova@fch.vutbr.cz

Došlo 17.5.11, přepracováno 23.11.11, přijato 8.12.11.

Klíčová slova: akutní toxicita, ekotoxicita, alternativní
testy ekotoxicity, syntetické analogy pižma, „musk“
sloučeniny, polycyklické sloučeniny, nitroaromatické
sloučeniny

Úvod

Samotné působení chemických škodlivin na člověka a samo životní prostředí je zcela běžné. Chemické látky vstupují do našeho prostředí z mnoha oblastí lidské činnosti, jako je zemědělství, průmyslová výroba a činnost, farmacie, zdravotnictví, doprava, také je to důsledek jejich poměrně vysokého průmyslového využití a mnoha dalších. V posledních letech se zájem analytiků soustředil na identifikaci a kvantifikaci syntetických analogů pižma, tzv. „musk“ sloučenin, které patří mezi „nové environmentální polutanty“ a také perzistentní organické polutanty (POP). Tyto sloučeniny jsou dlouhodobě intenzivně používány jako vonné složky celé řady kosmetických prostředků a detergentů. Po jejich aplikaci se prostřednictvím komunálních a průmyslových odpadních vod dostávají do ČOV, které však v současnosti nedisponují technologiemi, které by tyto látky zcela eliminovaly a stávají se tak běžnou složkou efluentů znečišťujících vodní ekosystém^{1–3}.

Z komerčního hlediska jsou důležité nitroaromatické, polycyklické a makrocyclické „musk“ sloučeniny. Mnoho let dominovaly na trhu nitrované „musk“ sloučeniny a od roku 1983 jejich podíl postupně klesal konstantně o 5 % ročně. V roce 1987 celkové množství „musk“ sloučenin tvořilo 67 % polycyklických, 35 % nitrovaných a 3–4 % makrocyclických „musk“ sloučenin. Sloučeniny jako jsou galaxolid (HHCB), musk keton (MK), musk xylen (MX), tonalid (AHTN), traseolid (ATII), phantolid (AHD1), a celestolid (ADBI) jsou široce používány pro aromatizaci nejrůznějších spotřebních produktů¹.

Nejznámějšími polycyklickými „musk“ sloučeninami jsou AHTN (7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1, 2,3,4-tetra-

hydronaftalen), znám pod komerčním názvem Tonalid nebo Fixolid, a HHCB (1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta-[γ]-2-benzopyran) s komerčním názvem Galaxolid nebo Abbalid), které zaujmají nejvyšší objem produkce, což představuje asi 95 % EU a 90 % US trhu pro všechny tyto látky. Mezi neznámější nitroaromatické „musk“ sloučeniny a také nejčastěji se vyskytující patří musk xylen (1-*terc*-butyl-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzen) a musk keton (1-*terc*-butyl-3,5-dimethyl-2,6-dinitro-4-acetylbenzen). Celková produkce polycyklických „musk“ sloučenin byla odhadnuta na 6000 t/rok a nitroaromatických „musk“ sloučenin kolem 1000 t/rok (cit.^{4,5}).

Nedávné studie poskytly údaje o přítomnosti „musk“ sloučenin zejména polycyklických a nitroaromatických sloučenin v biotických a abiotických matricích^{6–8}. V čistírnách odpadních vod (na přítoku a odtoku), povrchových vodách, sedimentech v Evropě se jejich koncentrace liší a ve vodních ekosystémech je vysoce závislá na vzdálenosti od čistíren odpadních vod^{9–11}. Všechny „musk“ sloučeniny se vyznačují vysokým stupněm bioakumulace a také vysokou perzistencí, a protože jsou tyto látky velmi stabilní, nerozkládají se a jejich koncentrace v životním prostředí narůstá. Tyto tzv. „musk“ sloučeniny byly indetifikovány ve vodní biotě, zejména v rybách různého stáří a druhu v mnoha regionech světa^{12–16}. V povrchových vodách byly naměřeny koncentrace galaxolidu 282–12470 ng l⁻¹, tonalidu 52–6780 ng l⁻¹, musk ketonu 4,8–390 ng l⁻¹, musk xylen 1,1–180 ng l⁻¹, což jsou velmi nízké hodnoty^{16,17}, avšak přibližně stejné hodnoty byly také naměřeny v tocích České republiky^{18–20}.

Stanovení akutní toxicity je jedním z nejdůležitějších faktorů při identifikaci nebezpečnosti chemických látek. Akutní a subchronická toxicita galaxolidu, tonalidu, musk ketonu a musk xyleny byly stanoveny v řadě studií podle standardních testů toxicity^{21–23}. V testech byla použita celá řada testovacích vodních a terestrických organismů. V testech toxicity byl testován vodní bezobratlý korýš hrotnatka velká (*Daphnia magna*). Toxický účinek látek byl také studován s využitím testů na rybách, za tímto účelem byl test proveden s testovacím organismem se pstruhem duhovým (*Oncorhynchus mykiss*), daniem pruhovaným (*Danio rerio*), střevle potoční (*Pimephales promelas*), slunečnice obecná (*Lepomis macrochirus*). Akutní toxicita „musk“ sloučenin byla také stanovena pomocí dalších organismů, jako byla např. drápatka vodní (*Xenopus laevis*), chvostokoci (*Folsomia candida*), háďátka obecné (*Caenorhabditis elegans*), žížala hnojní (*Eisenia fetida*) (cit.^{24–26}).

V současnosti dochází k výrazné aplikaci alternativních testů ekotoxicity (mikrobiotesty), které jsou dostupné a poměrně levné a rychlé na realizaci. Tyto testy lze úspěšně používat k hodnocení akutní toxicity a také k odhadu environmentálního rizika sloučenin^{27–29}.

Cílem této práce bylo stanovení akutní toxicity nejčastěji se vyskytující „musk“ sloučenin ve vodním ekosystému s využitím alternativních testů ekotoxicity Daphtoxkit FTM, Thamnotoxkit FTM, Rhotoxkit FTM a s vodním

korýšem žábřonožkou slaništní (*Artemia salina*). Pro studované látky byly stanoveny efektivní koncentrace EC50 v testu Daphtoxkit FTM pro testovaný organismus *Daphnia magna* a letální koncentrace LC50 Thamnotoxkit FTM (*Thamnocephalus platyurus*), Rhotoxkit FTM (*Brachionus calyciflorus*) a žábřonožku slaništní (*Artemia salina*). Současně bylo provedeno porovnání EC50 a LC50, které byly zjištěny s využitím různých komerčních testů za rozdílných podmínek a s různými testovacími organismy.

Experimentální část

Chemikálie

Testované látky

AHTN (Tonalid, Fixolid), IUPAC chemický název 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1, 2,3,4-tetrahydronaftalen (CAS 21145-77-7). HHCB (Galaxolid, Abbalid) IUPAC chemický název 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyklopenta-[γ]-2-benzopyran (CAS 1222-05-5). Musk keton (MK), IUPAC název 1-*terc*-butyl-3,5-dimethyl-2,6-dinitro-4-acetylbenzen (CAS 81-14-1). Musk xylen (MX), IUPAC 1-*terc*-butyl-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzen (CAS 81-15-2). Všechny sloučeniny byly dodány Sigma-Aldrich (Praha) analytické čistoty $\geq 97\%$. Testované látky byly připraveny v $\geq 5\%$ roztoku DMSO (dimethyl sulfoxid), který byl analytické čistoty 99 % (Merci s.r.o.).

Kultivační média

Kultivační média byly připraveny ze solí p.a. čistoty (Vitrum) a roztoků solí dodaných v setu alternativních testů MicroBioTest Inc (Gent, Belgie). V těchto setech již byly připraveny základní roztoky, které se pak již ředily do objemu 1 dm³ dle operačního manuálu dodávaného v komerčním testu.

Standardní sladká voda byla připravena ze solí v příslušných koncentracích CaCl₂ · 2 H₂O (11,76 g l⁻¹), MgSO₄ · 7 H₂O (4,93 g l⁻¹), NaHCO₃ (2,59 g l⁻¹), KCl (0,23 g l⁻¹).

Standardní slaná voda byla připravena ze solí v koncentracích NaCl (23,96 g l⁻¹) a MgSO₄ · 7 H₂O (10,35 g l⁻¹) v destilované vodě (1 dm³) a přidávkem 20 ml l⁻¹ roztoku připraveného z MgCl₂ · 6 H₂O (325 g l⁻¹), NaBr (51,45 g l⁻¹), KCl (29,80 g l⁻¹) a 20 ml l⁻¹ roztoku připraveného z CaCl₂ (29,98 g l⁻¹), NaHCO₃ (20,10 g l⁻¹), SrCl₂ · 6 H₂O (2,70 g l⁻¹), H₃BO₃ (0,60 g l⁻¹) a NaF (0,42 g l⁻¹). Standardní slaná voda byla připravena dle metodiky Test akutní toxicity na žábřonožkách *Artemia salina*²⁸.

Kultivační médium pro Daphtoxkit FTM, Thamnotoxkit FTM, Rhotoxkit FTM bylo připraveno přidáním 25 ml každého roztoku v setu (CaCl₂, MgSO₄, NaHCO₃, KCl) do 1000 ml destilované vody. Roztoky byly provzdušňovány 15–30 minut, poté bylo změřeno pH, které bylo v rozsahu 7,6–8,0. Kultivačním médiem pro test s *Artemia salina* byla připravená slaná voda.

Metodika

Příprava roztoků a provedení testů

Rozsah koncentrací testovaných látek byl v rozsahu 1,0–8,0 mg l⁻¹ pro AHTN, koncentrace HHCB v rozsahu 1,0–6,0 mg l⁻¹, rozsah koncentrace MK 2,0–10,0 mg l⁻¹ a 1,0–15,0 mg l⁻¹ v testu Daphtoxkit FTM, Thamnotoxkit FTM a v testu s *Artemia salina*. V případě testu Rhotoxkit FTM byl rozsah pro AHTN, HHCB v rozsahu 1,0–10,0 mg l⁻¹, pro MK 2,0–8,0 mg l⁻¹ a MX 2,0–10,0 mg l⁻¹. Z důvodu špatné rozpustnosti „musk“ sloučenin byl používán 5% roztok dimethyl sulfoxidu, který byl také v 1. kontrole a v 2. kontrole byly pouze kultivační média (sladká nebo slaná voda), z důvodu zjištění vlivu rozpouštědla dimethyl sulfoxidu (DMSO) na organismy. Sledované koncentrace byly připraveny ze standardů metodou ředění.

Po přípravě kultivačních médií byla provedena inkubace cyst, která trvala za definovaných podmínek testu (viz tab. I) a byla součástí komerčního testu. Po inkubaci byly organismy přeneseny do testovacích destiček s přidávkem testovaných roztoků. Test byl prováděn za příslušných podmínek daného testu uvedených v tab. I. Po ukončení testu bylo provedeno vyhodnocení testů. Všechny alternativní testy byly prováděny dle standardního ope-

Tabulka I

Podmínky testů Daphtoxkit FTM, Thamnotoxkit FTM, Rhotoxkit FTM a testu s *Artemia salina*

Test	Daphtoxkit F TM	Thamnotoxkit F TM	Rhotoxkit F TM	<i>Artemia salina</i>
<i>Podmínky inkubace</i>				
Teplota, °C	20–22	25	25	27–29
Doba inkubace, h	72	20–22	28–30	18–22
Světelný režim, lx	6000	3000–4000	3000–4000	3000–4000
<i>Podmínky testu</i>				
Odezva	imobilita	mortalita	mortalita	mortalita
Teplota, °C	20–22	25	25	22–25
Doba expozice, h	24, 48	24	24	24
Světelný režim	tma	tma	tma	světlo

račního manuálu, který je součástí každého komerčního testu a provedení každého kroku dle manuálu zabezpečuje správné provedení testu. Test byl označen za platný, když u kontroly nepřesáhla mortalita 10 %, jak je pravidlem u akvatických testů toxicity. Principy realizace testů dle operačního manuálu vychází z požadavků standardních testů toxicity OECD. Alternativní testy využívají dormantní (klidová) stadia testovacích organismů a jsou metodicky identické s evropskými ISO a OECD normami²⁹. Kontrola správnosti provedení testu byla provedena pomocí referenční látky dichromanu draselného, u kterého jsou známy hodnoty EC50 a LC50 pro testy Daphtoxkit FTM, Thamnotoxkit FTM, Rhotoxkit FTM.

Vyhodnocení výsledků

Ze zaznamenané imobility/mortality organismů se sestrojila grafická závislost procentuální imobility/mortality na logaritmu koncentrace testované látky. Výsledky testů byly zpracovány regresní analýzou a byly stanoveny efektivní koncentrace (EC) a letální koncentrace (LC). Výsledky testů byly statisticky zpracovány s využitím statistického software Statistika 6.0 (StatSoft, Ltd). Významné rozdíly ($P < 0,05$) v měřených parametrech v každém z testů (imobilizace, mortalita) byly hodnoceny testem ANOVA. Stanoveny byly také 95% konfidenční intervaly. Zjištěné hodnoty EC50 a LC50 z experimentálně určené závislosti mobilita/mortalita na koncentraci byly zhodnoceny s využitím Probitové analýzy³⁰.

Výsledky a diskuse

Testy s referenční látkou

Kontrola správnosti provedení alternativních testů Daphtoxkit FTM, Thamnotoxkit FTM, Rhotoxkit FTM

a s testovacím organismem *Artemia salina* s referenční látkou K₂Cr₂O₇ potvrdily na základě stanovení EC50 a IC50 shodnost s deklarovanými hodnotami EC50 LC50 pro dichroman draselný. Deklarované hodnoty EC50/24h a EC50/48 h pro dichroman draselný v případě testu Daphtoxkit FTM je 1,30 mg l⁻¹ (24 h) a 0,75 mg l⁻¹ (48 h) zjištěná hodnota EC50/24 h byla 0,99 mg l⁻¹ a EC50/48 h byla stanovena 0,78 mg l⁻¹. Deklarovaná hodnota LC50/24 h v testu Thamnotoxkit FTM je 0,10 mg l⁻¹, stanovená LC50/24 h pro dichroman byla 0,09 mg l⁻¹. Zjištěná hodnota LC50/24 h pro dichroman draselný byla 9,75 mg l⁻¹ s použitím testu Rhotoxkit FTM, přičemž deklarovaná hodnota je 9,60 mg l⁻¹. Získané experimentální hodnoty byly ve velmi dobrém souladu s deklarovanými hodnotami v testech a vypočtená směrodatná odchylka (SD) byla v rozmezí 0,02 až 0,10. Současně u testů nebyla překročena mobilita/mortalita v negativní kontrole 10 %, což potvrdilo platnost testů. Také nebyl potvrzen vliv rozpouštědla DMSO na stanovení EC50 (24 h, 48 h) a LC50 (24 h, 48 h).

Stanovení toxicity tonalidu a galaxolidu

Hodnoty akutní toxicity pro tonalid (AHTN) a galaxolid (HHCB) jsou shrnuty v tab. II. Pro tonalid (AHTN) a galaxolid (HHCB) byly hodnoty EC50 a LC50 při 24 hodinové expozici pro organismy *Daphnia magna* a *Brachionus calyciflorus* vyšší než hodnoty EC50 a LC50 při 48 hodinové expozici, avšak zjištěné hodnoty EC50 a LC50 pro 24 hodinovou a 48 hodinovou expozici byly nižší pro testovanou látku galaxolid (HHCB).

Nejvyšší hodnoty LC50/24 h byly zjištěny pro tonalid v testu Rhotoxkit FTM, v kterém je testovací organismus sladkovodní vířník *Brachionus calyciflorus*. Tento vířník patří mezi halinní organismy zooplanktonu, tudíž lze předpokládat jeho vyšší odolnost ve vodním prostředí. Vyšší

Tabulka II

Akutní toxicita tonalidu (AHTN) a galaxolidu (HHCB), mg l⁻¹

	Daphtoxkit F TM [mg l ⁻¹]		Thamnotoxkit F TM [mg l ⁻¹]	Rhotoxkit F TM [mg l ⁻¹]	<i>Artemia salina</i> [mg l ⁻¹]	
	EC50/24 h	EC50/48 h	LC50/24 h	LC50/24 h	LC50/24 h	LC50/48 h
<i>AHTN</i>						
RM ^a	1,52±0,04	1,35±0,08	1,58±0,02	4,12±0,26	2,23±0,04	1,53±0,08
PM ^b	1,50±0,01	1,37±0,19	1,53±0,01	4,20±0,08	2,29±0,14	1,57±0,19
95% I ^c	1,48–1,53	1,31–1,42	1,45–1,61	3,98–4,28	2,17–2,33	1,48–1,62
<i>HHCB</i>						
RM ^a	1,25±0,01	1,11±0,12	1,25±0,08	2,06±0,04	2,26±0,04	1,89±0,12
PM ^b	1,22±0,01	1,18±0,13	1,23±0,11	1,99±0,09	2,34±0,07	1,88±0,13
95% I ^c	1,18–1,27	1,11–1,17	1,21–1,29	1,96–2,15	2,23–2,41	1,78–1,96

^a RM – regresní model, ^b PM – probitová analýza, ^c 95% I – 95% konfidenční interval

hodnoty LC50/24 h a LC50/48 h byly zjištěny také u testovacího organismu *Artemia salina*, která patří také mezi halofilní organismy.

Srovnáním citlivosti organismů k testovaným látkám AHTN a HHCB byl zjištěn pokles citlivosti organismů v testech při 24 hodinové expozici v následujícím pořadí: *Brachionus calyciflorus* > *Artemia salina* > *Thamnocephalus platyurus* ~ *Daphnia magna*, což koresponduje zjištěným hodnotám EC50 a LC50. Stanovené hodnoty EC50 a LC50 pro tonalid (AHTN) při 24 hodinové expozici byly pro *Daphnia magna* 1,52 mg l⁻¹, pro *Thamnocephalus platyurus* 1,58 mg l⁻¹, pro *Artemia salina* 2,23 mg l⁻¹ a pro *Brachionus calyciflorus* 4,12 mg l⁻¹.

Stanovené hodnoty EC50 a LC50 pro galaxolid (HHCB) při 24 hodinové expozici byly pro *Daphnia magna* 1,25 mg l⁻¹, pro *Thamnocephalus platyurus* 1,25 mg l⁻¹, pro *Artemia salina* 2,26 mg l⁻¹ a pro *Brachionus calyciflorus* 2,06 mg l⁻¹. Zde byla stanovena 2× nižší hodnota LC50/24 h u HHCB (2,06 mg l⁻¹) pro testovací organismus *Brachionus calyciflorus* vůči tonalidu, u kterého byla zjištěná hodnota LC50/24 h 4,12 mg l⁻¹. Stanovené LC50/24 h v případě organismu *Artemia salina* byly přibližně stejné.

Z provedených testů vyplývá, že zjištěné hodnoty EC50/24 h a LC50/24 h byly nižší v případě testované látky galaxolidu oproti tonalidu. Současně z testu vyplývá, že nejcitlivějšími organismy vůči testovaným látkám byly *Daphnia magna* a *Thamnocephalus platyurus*.

Stanovení toxicity musk xylenu a musk ketonu

V tab. III jsou uvedeny hodnoty EC50/24(48) h a LC50/24(48) h pro studované nitroaromatické „musk“ sloučeniny – musk keton (MK) a musk xylen (MX). Nejnižší hodnota pro nitroaromatické „musk“ sloučeniny při 24 hodinové expozici byly zjištěny pro musk keton (MK) v testu Daphtoxkit FTM (EC50/24 h 2,13 mg l⁻¹), který

vykazoval také vyšší toxicitu při 48 hodinové expozici (EC50/48 h 2,33 mg l⁻¹). Pro ostatní organismy byl však toxicitější musk xylen (MX), pro který byl zjištěn klesající trend pro testovací organismy v pořadí při 24 hodinové expozici *Thamnocephalus platyurus* > *Artemia salina* > *Brachionus calyciflorus* > *Daphnia magna*. Stejný klesající trend byl potvrzen i pro musk keton (MK).

Srovnání citlivosti organismů od nejcitlivějšího organismu k nejméně citlivému bylo následující *Daphnia magna* < *Brachionus calyciflorus* < *Artemia salina* < *Thamnocephalus platyurus*.

Stanovené hodnoty EC50 a LC50 pro musk keton (MK) při 24 hodinové expozici byly následující pro testovací organismy *Daphnia magna* 2,39 mg l⁻¹, pro *Brachionus calyciflorus* pro 2,95 mg l⁻¹, pro *Artemia salina* 2,26 mg l⁻¹ a pro *Thamnocephalus platyurus* 6,16 mg l⁻¹. Pro MK byly zjištěny přibližně stejné hodnoty. Z toho vyplývá, že studované nitroaromatické „musk“ sloučeniny mají přibližně stejnou toxicitu a není mezi nimi výrazný rozdíl v toxicitě.

Stanovení poměru 24 h/48 h EC50 (LC50)

Poměr 24 h/48 h EC50 nebo 24 h/48 h LC50 lze použít k posouzení vlivu doby expozice na daný organismus. Tento poměr bylo možné stanovit u testů Daphtoxkit FTM a u testu s použitím *Artemia salina*. Test Daphtoxkit FTM byl vybrán z důvodu nejvyšší citlivosti sladkovodního organismu *Daphnia magna* a test s organismem *Artemia salina* jako zástupce halinních organismů.

U všech 4 studovaných sloučenin došlo ke snížení hodnot EC50 a LC50 v závislosti na zvyšující se době expozice (48 hodin). Nejvýraznější rozdíl v hodnotách EC50 a LC50 byl zaznamenán u tonalidu pro testovací organismus *Artemia salina*, zde byl pokles téměř o 31 % v případě tonalitu a 16 % v případě galaxolidu. V případě

Tabulka III

Akutní toxicita musk ketonu (MK) a musk xylenu (MX), mg l⁻¹

	Daphtoxkit F TM [mg l ⁻¹]		Thamnotoxkit F TM [mg l ⁻¹]		Rhotoxkit F TM [mg l ⁻¹]		<i>Artemia salina</i> [mg l ⁻¹]	
	EC50/24 h	EC50/48 h	LC50/24 h	LC50/24 h	LC50/24 h	LC50/24 h	LC50/48 h	
<i>MK</i>								
RM ^a	2,33±0,06	2,13±0,02	6,18±0,01	3,86±0,05	4,93±0,02	4,74±0,02		
PM ^b	2,31±0,06	2,15±0,01	6,19±0,01	3,82±0,06	4,89±0,01	4,78±0,01		
95% I ^c	2,26–2,36	2,08–2,18	6,10–6,26	3,74–3,91	4,98–5,10	4,67–4,91		
<i>MX</i>								
RM ^a	2,39±0,01	2,22±0,06	6,16±0,07	2,95±0,01	4,21±0,04	4,06±0,05		
PM ^b	2,40±0,01	2,21±0,05	6,21±0,06	2,88±0,03	4,16±0,05	4,04±0,04		
95% I ^c	2,29–2,47	2,18–2,31	6,09–6,32	2,78–3,03	4,10–4,29	3,96–4,12		

^a RM – regresní model, ^b PM – probitová analýza, ^c 95% I – 95% konfidenční interval

Tabulka IV

Poměr 24 h/48 h EC50 a 24 h/48 h LC50 pro galaxolid (HHCB), tonalid (AHTN), musk keton (MK) a musk xylen (MX)

Látka	24 h/48 h EC50	
	<i>Daphnia magna</i>	<i>Artemia salina</i>
AHTN	1,11	1,45
HHCB	1,07	1,21
MK	1,08	1,03
MX	1,03	1,04

testu s korýšem *Daphnia magna* byl pokles o 11 % u obou polycyklických „musk“ sloučenin. Pro musk keton (MK) byl zjištěn pokles LC50/24 h vůči LC50/48 h u obou testovacích organismů o 7–8 %, pro musk xylen o 3–4 %.

V tab. IV jsou uvedeny poměry 24 h/48 h EC50 a 24 h/48 h LC50 pro „musk“ sloučeniny a testovací organismy. Nejvyšší zjištěný poměr byl vypočítán pro tonalid (1,45) pro organismus *Artemia salina*. Poměry 24 h/48 h EC50 klesaly AHTN > HHCB ~ MK > MX a 24 h/48 h LC50 AHTN > HHCB > MK ~ MX. Ze zjištěných poměrů vyplývá zvýšení toxicity vlivem expozice zejména pro tonalid. Pro nitroaromatické „musk“ sloučeniny nebyl prokázán výrazný vliv mezi 24 a 48 hodinovou expozicí.

Poměr 24 h/48 h EC(LC)50 lze použít jako vhodný parametr pro srovnání toxicity látek v závislosti na expozici. Na základě výsledků, lze konstatovat, že vybrané nitroaromatické „musk“ sloučeniny představují nebezpečí pro vodní bezobratlé organismy, a to nejen s ohledem na poměr 24 h/48 h EC(LC)50, který se blíží jedné, ale také na hodnoty EC50 a LC50, které byly stanoveny pro vodní bezobratlé v rozsahu 2,13–6,18 mg l⁻¹. Polycyklické „musk“ sloučeniny představují vyšší riziko pro vodní organismy, jejich toxicita je vyšší 1,25–4,12 mg l⁻¹ a současně jsou hodnoty poměru 24 h/48 h EC(LC)50 nad 1, zejména pro tonalid. Podle Směrnice EU93/67/EHS (Komise Evropských společenství), která na základě stanovených hodnot EC50 klasifikuje látky do několika tříd toxicity^{30,31}, lze zařadit tonalid (AHTN), galaxolidu (HHCB), musk keton (MK) a musk xylen (MX) do kategorie látek toxických pro vodní organismy, protože jejich stanovené hodnoty efektivních koncentrací se nachází v rozsahu 1–10 mg l⁻¹.

Závěr

Alternativní testy ekotoxicity Daphtoxkit FTM, Thamnotoxkit FTM, Rhotoxkit FTM a test akutní toxicity s *Artemia salina* byly použity pro stanovení toxicity polycyklických „musk“ sloučenin – tonalid, galaxolid a nitroaromatických „musk“ sloučenin – musk keton, musk xylen. Použité alternativní testy ekotoxicity obsahovaly zástupce sladkovodních a halinních organismů. Tonalid a galaxolid vykazovaly vyšší toxicitu k vodním bezobratlým, přičemž nejcitlivější byl sladkovodní korýš *Daphnia*

magna a nejméně citlivým organismem byl *Brachionus calyciflorus*, který patří mezi halinní organismy. Nižší toxicitu vykazovaly musk keton a musk xylen, u kterých byla pozorována nejnižší citlivost u sladkovodního korýše *Thamnocephalus platyurus* a nejvyšší opět u *Daphnia magna*. Porovnáním poměru 24 h/48 h LC50 a 24 h/48 h EC50 byl zjištěn výrazný vliv expozice zejména u tonalidu. Podle stanovených hodnot toxicity patří galaxolid, tonalid, musk keton, musk xylen mezi látky toxické pro vodní organismy.

Tato práce byla podpořena VUT v Brně, Fakultou chemickou, projektem OC 183 a FCH-S-11-3.

LITERATURA

- Hajšlová J., Kocourek V., Volka K., Suchánek M., Böhms S., Skácel F., Tomaniová M., Radová Z., Holadová K., Poustka J., Šetková L., Suchan P. a kol.: Kontaminanty a další rizikové látky v potravinách a ekosystémech 2001. http://www.vscht.cz/zkp/ustav/Sbornik_kontaminanty.pdf
- Valdersnes S., Kallenborn R., Sydney L. K.: Int. J. Env. Anal. Chem. 86, 461 (2006).
- Wombacher W. D., Hornbuckle K. C.: J. Environ. Eng. 135, 1192 (2009).
- Gatermann R., Biselli S., Hühnerfuss H., Rimkus G. G., Hecker M., Karbe L.: Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42, 437 (2002).
- Valdersnes S., Kallenborn R., Sydney L. K.: Int. J. Env. Anal. Chem. 86, 461 (2006).
- Fromme H., Otto T., Pilz K.: Water Res. 35, 121 (2001).
- Heim S., Schwarzbauer J., Kronimus J. A., Littke R., Woda C., Mangini A.: Org. Geochem. 35, 1409 (2004).
- Bester K.: J. Chromatogr., A 1216, 470 (2009).
- Peck A. M., Hornbuckle K. C.: Environ. Sci. Technol. 38, 367 (2004).
- Kannan K., Reiner J. L., Yun S. H., Perrotta E. E., Tao L., Johnson-Restrepo B., Rodan B. D.: Chemosphere 61, 693 (2005).
- Nakata H.: Environ. Sci. Technol. 39, 3430 (2005).
- Nakata H., Sasaki H., Takemura A., Yoshioka M., Tanabe S., Kajman K.: Environ. Sci. Technol. 41, 2216 (2007).
- Matamoros V., Jover E., Bayona J. M.: Anal. Bioanal. Chem. 393, 847 (2009).
- Lee I. S., Lee S. H., Oh J. E.: Water Res. 44, 214 (2010).
- Sumner N. R., Guitart C., Fuentes G., Reagan J. W.: Environ. Pollut. 158, 215 (2010).
- Brausch J. M., Rand G. M.: Chemosphere 82, 1518 (2011).
- Li Z., Zlabek V., Turek J., Velisek J., Pulkrabova J., Kolarova J., Sudova E., Berankova P., Hradkova P., Hajšlová J., Randak T.: Water Res. 45, 1403 (2011).
- Hajšlová J., Šetková L., v: (G.G. Rimkus, ed.) *The*

- Handbook of Environmental Chemistry*. Sv. 3, díl X, str. 151. Springer-Verlag, Berlin 2004.
19. Hájková K., Pulkrabová J., Hajšlová J., Randák T., Žlábek V.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 390 (2007).
 20. Mori T., Morita F., Inokuchi A., Takao Y., Kohra S., Tominaga N., Takemasa T., Arizono K.: *J. Health Sci.* 52, 276 (2006).
 21. Dietrich D. R., Hitzfeld B. C., v: (G.G. Rimkus, ed.) *Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, str. 233. Springer-Verlag, Berlin 2006.
 22. Carlsson G., Norrgren L.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 102 (2004).
 23. Boleas S., Fernandez C., Tarazona J. V.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57, 217 (1996).
 24. Giddings J. M., Salvito D., Putt A. E.: *Water Res.* 34, 3686 (2000).
 25. Behechti A., Schramm K. W., Attar A., Niederfellner J., Kettrup A.: *Water Res.* 32, 1704 (1998).
 26. Doležalová Weissmannová H, Zlámalová Gargošová H, Vávrová M.: *Chem. Listy* 99, 1234 (2008).
 27. Pretti C., Chiappe C., Baldetti I., Brunini S., Monni G., Intorre L: *Ecotox. Environ. Safe* 72, 1170 (2009).
 28. Kočí V, Rakovický T., Švagr A: Test akutní toxicity na žábřonozkách *Artemia salina*, (2011) <http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/Artemia.htm>
 29. Kočí V., Maršálek B., Tlustá P., v: *Ekotoxikologické biotesty 1-4. Vodní zdroje EKOMONITOR (ed.)*, 2002, 2003, 2004.
 30. ISO International Organisation of Standardization, 2006, ISO/TS 20281 (2006).
 31. Cleuvers M.: *Ecotoxicol. Environ. Safety* 59, 309 (2004).

H. Doležalová Weissmannová, I. Štěpánková, M. Vávrová, and A. Lapčíková (*Faculty of Chemistry, University of Technology, Brno*): **Determination of Toxicity of Musk Compounds Using Alternative Tests of Ecotoxicity**

Alternative ecotoxicity tests Daphtoxkit FTM, Thamnotoxkit FTM, Rhotoxkit FTM and *Artemia salina* were used for determination of ecotoxicity of the musk compounds – galaxolide, tonalide, musk ketone, musk xylene. The results confirmed a higher toxicity of polycyclic musk compounds than that of nitromusk compounds. The highest toxicity was observed for galaxolide. Polycyclic musk compounds showed high toxicity for aquatic invertebrates. The freshwater crustacean *Daphnia magna* was confirmed as the most sensitive whereas *Brachionus calyciflorus* the least sensitive organism. As to the toxicity of nitromusk compounds, the freshwater crustaceans *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna* were the most sensitive organisms. By comparing the ratio of 24 h/48 h LC50 and 24 h/48 h EC50, a significant effect of exposure was found especially in the case of tonalide. All the musk compounds pose risk for aquatic ecosystems and can be considered toxic for aquatic invertebrates.