

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ

AGRONOMICKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2015

VENDULA SMOLÍKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav chemie a biochemie



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



**Stanovení rtuti v Pangasu spodnookém a vyhodnocení
případných rizik z konzumace ryb**

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

doc. Mgr. Pavlína Pelcová, Ph.D.

Vypracovala:

Vendula Smolíková

Brno 2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci na téma Stanovení rtuti v Pangasu spodnookém a vyhodnocení případných rizik z konzumace ryb vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. Mgr. Pavlíně Pelcové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce. Děkuji také Ing. Petře Vičarové za ochotu a pomoc při zpracování mého experimentu a poskytnuté rady.

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit celkový obsah rtuti a jejích chemických forem v deseti vzorcích svaloviny Pangase spodnookého, který je volně k dispozici v obchodní síti České republiky. Teoretická část práce je zaměřena na charakteristiku pangase, rtuti a jejích sloučenin vyskytujících se v rybách a v životním prostředí. Celkový obsah rtuti v čerstvé hmotě svaloviny se pohyboval v rozmezí 0,0099 – 0,0493 mg.kg⁻¹, obsah methylrtuti se ve svalovině Pangase spodnookého pohyboval v rozmezí 59 – 87 %. U žádného ze stanovovaných vzorků nebyl překročen maximální limit rtuti 0,50 mg.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti ryb, stanovený podle Nařízení Komise (EU) č. 420/2011.

KLÍČOVÁ SLOVA

Pangasius spodnooký, rtuť, specie rtuti, atomová absorpční spektrometrie, kapalinová chromatografie ve spojení s atomovou fluorescenční detekcí.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to define the amount of total mercury and its species in ten samples of Pangasius hypophthalmus muscle that is freely available in supermarkets in the Czech Republic. The theoretical part of the work is focused on mercury and its compounds in fish and in environment and also describes pangasius. The total mercury content in the fresh mass of muscle ranged from 0,0099 to 0,0493 mg.kg⁻¹, the content of methylmercury in Pangasius muscle varied in the range 59 – 87%. None of the analyzed samples exceeded the maximum limit of mercury 0.50 mg.kg⁻¹ in fresh weight of fish, determined in accordance with Commission Regulation (EU) č. 420/2011.

KEYWORDS

Pangasius hypophthalmus, mercury, mercury species, atomic absorption spectrometry, liquid chromatography in conjunction with atomic fluorescence detection.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	CÍL PRÁCE	11
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1	Historie rtuti	12
3.2	Vlastnosti rtuti	12
3.3	Využití rtuti	12
3.4	Chemické formy rtuti a jejich toxicita	13
3.4.1	Elementární rtuť	13
3.4.2	Anorganické sloučeniny rtuti	13
3.4.3	Organické sloučeniny rtuti	14
3.5	Rtuť v životním prostředí a její koloběh v přírodě	14
3.5.1	Rtuť v atmosféře	15
3.5.2	Rtuť ve vodním ekosystému	16
3.6	Rtuť v potravinách	17
3.6.1	Hygienické limity rtuti pro potraviny	18
3.7	Metody pro hodnocení zdravotního rizika z konzumace ryb	18
3.8	Stanovení rtuti v biologickém materiálu	20
3.8.1	Odběr vzorků, skladování a předpříprava	20
3.8.2	Metody stanovení celkového obsahu rtuti v potravinách	20
3.8.3	Metody stanovení chemických forem rtuti v potravinách	22
3.9	Charakteristika pangase spodnookého	24

3.9.1	Chov a zpracování	25
3.9.2	Nutriční parametry	26
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1	Vzorky.....	27
4.2	Uchování vzorků	30
4.3	Stanovení sušiny.....	30
4.4	Použité chemikálie	30
4.5	Stanovení celkového obsahu rtuti na přístroji AMA-254	31
4.6	Stanovení obsahu methylrtuti a anorganické rtuti (Hg ²⁺) pomocí HPLC	32
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
5.1	Stanovení sušiny.....	35
5.2	Stanovení celkového obsahu rtuti na AMA 254	35
5.2.1	Validace atomové absorpční spektrometrie (AMA 254).....	35
5.2.2	Celkový obsah rtuti ve vzorcích pangase	36
5.3	Stanovení chemických forem rtuti LC-CV-AFS.....	38
5.3.1	Validace CV-AFS	38
5.3.2	Obsah chemických forem rtuti ve vzorcích pangase	39
5.4	Hodnocení zdravotního rizika z konzumace pangasů dle Kannana a WHO ...	40
5.4.1	Metoda dle Kannana	40
5.4.2	Metoda dle WHO.....	41
6	ZÁVĚR	43
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	44

8	SEZNAM TABULEK	47
9	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	48
10	SEZNAM ZKRATEK	50

1 ÚVOD

Na českém trhu se před několika lety objevila novinka v podobě Pangase spodnookého. Ryba dovážená z Vietnamu se velice rychle stala oblíbenou u českých spotřebitelů, a to především díky naprosté absenci kostí a typického rybího pachu. Kvůli původu této sladkovodní ryby se však objevily spekulace ohledně její zdravotní nezávadnosti a bezpečnosti konzumace.

Kromě sádek v USA, z nichž se k nám však ryby nedovážejí, pochází veškerá produkce pangase z jihovýchodní Asie, zejména Vietnamu. Pangasius je chován především v deltě řeky Mekong a v líhních. V důsledku znečištění této řeky odpadními vodami průmyslových firem, bylo vyjádřeno podezření na zdravotní nezávadnost masa pangase z hlediska obsahu kontaminantů. Mezi nejnebezpečnější kontaminanty, dostávající se do životního prostředí vlivem antropogenní činnosti, patří také rtuť. Její toxicita je dána především její formou výskytu. Nebezpečí spočívá především ve výskytu methylrtuti ve vodních ekosystémech. Tato sloučenina vzniká z elementární rtuti a jejích anorganických sloučenin působením methanogenních bakterií v anaerobním prostředí, např. v sedimentech sladkých a slaných vod. Vzhledem k lipofilní povaze a vysoké bioakumulační schopnosti, dochází k jejímu snadnému přechodu do potravinového řetězce člověka.

2 CÍL PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše k tématu
2. Odběr vzorků
3. Zpracování odebraných vzorků.
4. Stanovení obsahu rtuti metodou atomové absorpční spektrometrie na přístroji AMA-254.
5. Stanovení specií rtuti metodou kapalinové chromatografie na přístroji HPLC-CV-AFS
6. Vyhodnocení výsledků a případných rizik z konzumace ryb.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Historie rtuti

Rtuť znali již starověcí Féničané, Řekové, Kartaginci i Římané. Řeckým filosofem Theophrastosem byla nazývána "tekuté stříbro" a řeckým lékařem Dioskoridesem "stříbrná voda". Z těchto názvů pochází latinské pojmenování hydrargyrum. Alchymisté rtuť považovali za součást kovů a měli pro ni název mercurius, podle latinského jména posla bohů Merkura. Rtuť byla izolována z rumělky (HgS) již před 2500 lety a používala se k extrakci kovů amalgamací. (REMY, 1962; PAVELKA & SCHÜTZ, 1979).

3.2 Vlastnosti rtuti

Rtuť patří do skupiny II. B periodického systému prvků, má atomové číslo 80, relativní atomovou hmotnost 200,6, specifickou hmotnost $13,6 \text{ g.cm}^{-3}$, bod tání $38,9 \text{ °C}$, bod varu $356,6 \text{ °C}$. Při laboratorní teplotě je rtuť stříbřitá kapalina s kovovým leskem, nabývá oxidačních stavů 0, I, II. Na vzduchu se čistá rtuť neoxiduje, při zahřátí k teplotě varu se pokrývá vrstvičkou oxidu rtuťnatého.

V přírodě se vyskytuje především ve formě sulfidů v horninách. V rudách bohatých na rtuť tvoří až 70 % jejího obsahu tzv. rumělka (též cinabarit) HgS. Celosvětové zásoby se odhadují na 200 000 tun, přičemž polovina těchto zásob se nachází ve Španělsku (BENCKO et al., 1995; PAVELKA & SCHÜTZ, 1979). V roce 1973 dosáhla celosvětová produkce rtuti 10 000 tun, v roce 1980 pak zhruba 6500 tun a v roce 2000 pouhých 1800 tun (CHEM.UNEP.CH, 2015).

3.3 Využití rtuti

Z celkové roční produkce rtuti se asi 25 % zpracuje na výrobu elektrod pro průmyslovou elektrochemii, 20 % na výrobu elektrických zařízení, 15 % na výrobu

barviv, 10 % na výrobu měřicích a kontrolních zařízení, 5 % v zemědělství, 3 % v zubním lékařství a 2 % v laboratořích. Zbývajících 20 % tvoří využití v papírenském průmyslu, pro vojenské účely, ve farmaceutickém průmyslu apod. (BENCKO et al., 1995). S mnohými kovy tvoří rtuť slitiny, obecně nazývané amalgámy. Jsou to buď roztoky kovů (např. se zinkem a kadmíem), nebo sloučeniny. Amalgámy mají rozsáhlé využití, např. plombování zubů v zubním lékařství, k redukcím, v minulosti také k pozlacování a postříbřování v ohni (dnes je však tento postup kvůli zdravotnímu riziku zakázán). Amalgamovaný zinek se používá do galvanických článků (PAVELKA & SCHÜTZ, 1979).

3.4 Chemické formy rtuti a jejich toxicita

Rtuť se v životním prostředí vyskytuje v řadě forem, které se od sebe výrazně liší svými fyzikálně-chemickými i toxikologickými vlastnostmi. Rtuť se vyskytuje ve své elementární podobě jako rtuť kovová (Hg^0), ve formě anorganických a organických sloučenin (MARŠÁLEK, 2006).

3.4.1 Elementární rtuť

Elementární rtuť je po požití často vyloučena bez dopadu na organismus. Jedná se o nejméně toxickou formu rtuti. Vysoce toxické jsou páry elementární rtuti, které jsou jedovaté a po vdechnutí jsou rychle adsorbovány do krevního oběhu, kterým jsou dopraveny do mozku. Mírné expozice způsobují poškození centrálního nervového systému, což je doprovázeno nespavostí, podrážděností a poruchami jemné motoriky. Silné expozice mohou mít smrtící účinek z důvodu vážného poškození plic (KAFKA & PUNČOCHÁŘOVÁ, 2002).

3.4.2 Anorganické sloučeniny rtuti

Z toxikologického hlediska patří mezi nejvýznamnější chlorid rtuťnatý HgCl_2 , dusičnan rtuťnatý $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, kyanid rtuťnatý $\text{Hg}(\text{CN})_2$ a oxykyanid rtuťnatý $\text{Hg}(\text{CN})_2 \cdot \text{HgO}$. Anorganické sloučeniny rtuti se liší svou rozpustností ve vodě. Právě s ní souvisí i rozdíly v gastrointestinálním vstřebávání těchto sloučenin (BENCKO et al., 1995).

Anorganické sloučeniny rtuti jsou mírně toxické, přičemž sloučeniny jednomocné rtuti (rtuťné) jsou obecně méně škodlivé než sloučeniny dvojmocné (rtuťnaté). Důvodem je právě nižší rozpustnost jednomocných sloučenin ve vodě. Zvláště vnímavé vůči účinkům rtuti jsou malé děti, u kterých může dojít ke vzniku tzv. růžové nemoci. Ta je provázána mimo jiné hypersekrecí potních žláz, světloplachostí, horečkou a charakteristicky zbarvenou vyrážkou (odtud název nemoci). Anorganické sloučeniny rtuti mohou rovněž poškozovat ledviny (KAFKA & PUNČOCHÁŘOVÁ, 2002).

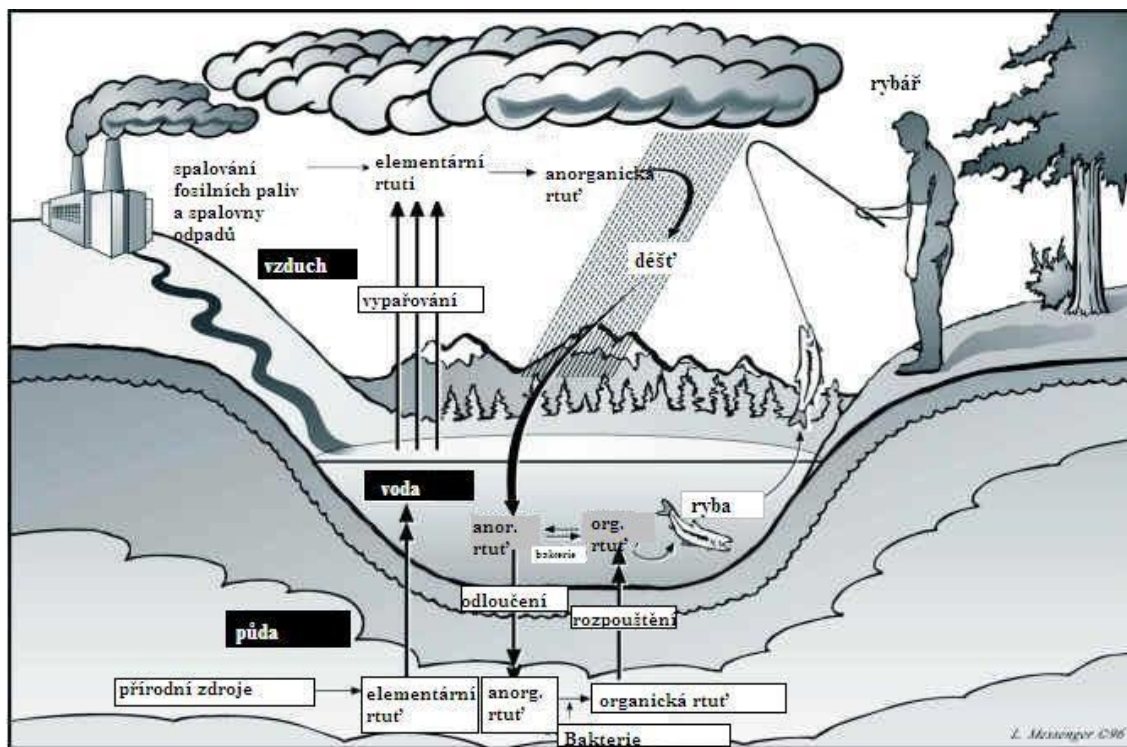
3.4.3 Organické sloučeniny rtuti

Mezi organické sloučeniny rtuti patří především methylrtuť (CH_3Hg^+), dimethylrtuť ($\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, ethylrtuť ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$) a dále pak arylsloučeniny rtuti. Sloučeniny methylrtuť a dimethylrtuť vznikají z elementární rtuti a jejích anorganických sloučenin působením methanogenních bakterií v anaerobním prostředí, např. v sedimentech sladkých a slaných vod. Vzhledem k lipofilní povaze a vysoké bioakumulační schopnosti organických sloučenin rtuti dochází k jejich snadnému přechodu do potravinového řetězce člověka. Toxicita methylrtuti vyplývá především z její schopnosti přestupovat dvě z nejpřísnějších ochranných bariér lidského organismu – plodovou placentu a hematoencefalickou bariéru mezi krví a mozkiem. Z tohoto důvodu patří methylrtuť mezi látky zvláště nebezpečné pro těhotné ženy, jelikož jejím působením může docházet k poškození plodu nebo spontánním potratům. Methylrtuť se ukládá v mozkové tkáni což vede k mentální a tělesné retardaci. U malých dětí způsobuje methylrtuť smyslové poruchy až úplné selhání některých funkcí (hluchota, slepota, ztráta chuti). U dospělých jedinců může vyvolat třes těla, ataxii (porucha sladění pohybu), dysartrii (špatná výslovnost slov), snížení zorného pole a zhoršení paměti (KAFKA & PUNČOCHÁŘOVÁ, 2002; RUSEK, 2001).

3.5 Rtuť v životním prostředí a její koloběh v přírodě

Rtuť a její minerály jsou přirozenou součástí zemské kůry. Lze proto předpokládat určitou rovnováhu jejího obsahu mezi složkami životního prostředí. Tato rovnováha byla ale narušena intenzivní antropogenní činností. V ekosystémech je rtuť přítomna

ve všech složkách životního prostředí. Biogeochemický cyklus zahrnuje veškeré vstupy a výstupy sloučenin rtuti v daném ekosystému (KAFKA & PUNČOCHÁŘOVÁ, 2002).



Obr. 1: Biogeochemický cyklus rtuti (VIČAROVÁ, 2012)

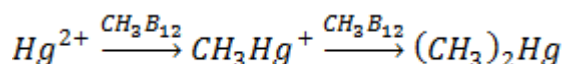
3.5.1 Rtuť v atmosféře

V atmosféře je přes 95 % rtuti přítomno ve formě elementární (kovové) rtuti (Hg^0). V tomto prostředí dochází nejčastěji k oxidaci elementární rtuti ozonem, kdy za spolupůsobení hydroxylových radikálů vzniká oxid rtuťnatý. Oxidované formy rtuti (např. Hg^{2+}) jsou z atmosféry odstraněny dešťovými srážkami. Touto takzvanou mokrou depozicí se na zemi vrací přibližně 66 % atmosférické rtuti.

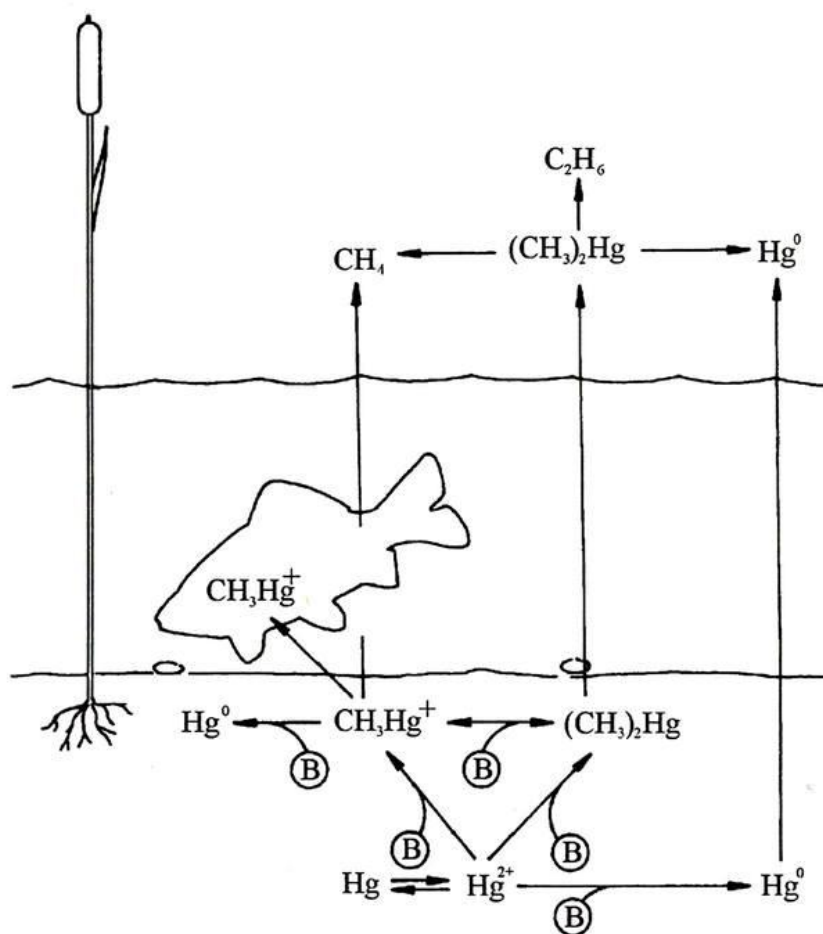
Sloučeniny rtuti mohou být dále oxidovány nebo redukovány peroxidem vodíku, chlornanem a organickými peroxy-sloučeninami nebo radikály vyskytujícími se v atmosféře. Organokovové sloučeniny rtuti podléhají v atmosféře fotolýze. Rtuť přítomná v atmosféře působením větrných proudů cykluje na příslušné polokouli a může se dostávat daleko od původního zdroje. Na koncentraci rtuti v atmosféře má vliv průmyslové znečištění v dané oblasti (HOUSEROVÁ et al., 2006a).

3.5.2 Rtut' ve vodním ekosystému

Nejdůležitějším transformačním procesem rtuti ve vodách je biomethylace. Anorganická rtuť je ve vodních ekosystémech methylována na monomethylrtuť a dimethylrtuť. Methylace probíhá jak biotickou cestou (mikroorganismy v sedimentech, ale i v trávicím ústrojí ryb), tak i abiotickou cestou. Abiotická methylace Hg^{2+} je méně častá a je zapříčiněna působením methyl derivátů olova nebo cínu a také přítomností vysoké koncentrace huminových látek. Na převládajícím biotickém procesu methylace rtuti se podílejí především anaerobní bakterie z rodů *Bifidobacterium*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Methanobacterium*, *Pseudomonas*. Tato reakce zahrnuje neenzymatickou methylaci rtuťnatých iontů methylkobalaminovými sloučeninami (CH_3B_{12}) v přítomnosti těchto bakterií. Nejrychleji dochází k methylaci rtuti na povrchu sedimentu, který je v kontaktu s vodou a tato rychlost klesá směrem do hloubky. (HOUSEROVÁ et al., 2006a; MARŠÁLEK, 2006).



Vodní živočichové mají schopnost značně kumulovat rtuť ve svých tkáních. Koncentrace rtuti $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ neovlivňuje negativně růst ryb a lze ji považovat za bezpečnou koncentraci pro ryby (RYBARSTVI.EU, 2014). Vyšší koncentrace je pak pro ryby toxická, přičemž sladkovodní organismy jsou vůči jejím účinkům odolné méně než organismy mořské. Příčinou je obsah určitého množství selenu v mořské vodě, který je antagonistou rtuti – je látkou působící protichůdně (KAFKA & PUNČOCHÁŘOVÁ, 2002). Methylrtuť představuje v tkáních ryb více jak 95 % celkové rtuti. Z toho důvodu je konverze anorganické rtuti na methylrtuť nejdůležitějším článkem v procesu bioakumulace rtuti v rybách a má největší význam z hlediska toxicity pro člověka (MARŠÁLEK, 2006).



Obr. 2: Schematické znázornění alkylace a biotransformace rtuti v důsledku metabolické činnosti bakterií B (BENCKO et al., 1995)

3.6 Rtut' v potravinách

Rostlinné potraviny jsou rtutí kontaminovány jen nepatrně, výjimkou jsou volně rostoucí houby (především žampiony a hříby). Hlavním potravinovým zdrojem rtuti jsou především ryby, které jsou konečným článkem potravního řetězce ve vodním prostředí. Rtut' se do organismu ryb dostává s potravou přes trávicí ústrojí, žábry a kůži. Stupeň hromadění rtuti v tkáních ryb je závislý na koncentraci tohoto prvku v daném prostředí, a to především v sedimentech, na fyzikálně chemických vlastnostech vody, dále na druhu, věku a hmotnosti ryb a na dalších faktorech. Z fyzikálně chemických vlastností vody působí na stupeň kumulace zejména teplota vody a koncentrace kyslíku rozpuštěného ve vodě, v menší míře pak další ukazatele,

např. pH. Obsah rtuti u jednotlivých druhů ryb ve stejném prostředí je odlišný. Je to způsobeno jednak odlišným charakterem přijímané potravy a také metabolickými pochody vlastními pro každý druh. Nejvyšší hodnoty obsahu celkové rtuti jsou zjišťovány u dravých ryb (štika obecná, bolen dravý, candát obecný, okoun říční), které představují konečný článek potravního řetězce (CIBULKA et al., 1991).

3.6.1 Hygienické limity rtuti pro potraviny

Limit rtuti obsažené v potravinách je uveden v Nařízení Komise (EU) č. 420/2011 ze dne 29. dubna 2011, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006. Podle tohoto nařízení společného pro všechny státy Evropské unie mohou produkty rybolovu a svalovina ryb obsahovat maximálně 0,50 mg rtuti/kg čerstvé hmotnosti ryb. Výjimku tvoří druhy konkrétně uvedené v doprovodné tabulce, u nichž je limit vyšší – 1,0 mg rtuti/kg čerstvé hmotnosti ryb. Na základě odborného hodnocení byl přijat prozatímní tolerovaný týdenní příjem (PTWI) pro methylrtuť na 1,6 µg methylrtuti/kg živé hmotnosti a tolerovaný týdenní příjem (TWI) pro anorganickou rtuť na 4 µg rtuti/kg živé hmotnosti.

V ostatních potravinách se rtuť vyskytuje převážně v anorganických formách, které jsou méně rizikové. (NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 420/2011, NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006).

3.7 Metody pro hodnocení zdravotního rizika z konzumace ryb

Potenciální zdravotní riziko způsobené rtutí v rybách se hodnotí metodou podle Kannana a kol. (1998), který popsal výpočet indexu nebezpečí spojeného s konzumací ryb. Indexy nebezpečnosti vypočtené pro celkovou rtuť, které jsou pod hodnotou 1, nesvědčí o nebezpečí pro spotřebitele.

Pro výpočet zdravotního rizika (hazard index – H) se používá vzorec:

$$D = c \cdot I / W \cdot 1000$$

$$H = D / RfD$$

Kde:

D...maximální denní tolerovatelné množství Hg v mg/kg konzumenta

c...obsah rtuti ve vzorku ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

I...průměrná spotřeba ryb (g/den) – normální konzument: $5300\text{g/os/rok} \rightarrow 16,43$
g/os/den

W...průměrná hmotnost konzumenta – 70 kg

RfD...referenční dávka pro rtuť – $0,0003 \text{ mg/kg/den}$

H = index rizika

Při určení hodnoty I byl použit údaj z českého statistického úřadu pro rok 2013 (ČSÚ, 2013).

Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovila prozatímní tolerovatelný týdenní příjem (PTWI) na $1,6 \mu\text{g MeHg/kg}$ tělesné hmotnosti/týden. Tato hodnota může být použita k výpočtu množství rybí svaloviny, které může konzument spotřebovat pro naplnění toxikologického limitu.

$$D = EL \cdot W$$

$$\text{NTL} = D / c$$

$$\text{PP} = \text{NTL} / P$$

Kde:

D...maximální denní tolerovatelné množství Hg v mg/kg konzumenta

EL...expoziční limit (PTWI, RfD,...) $\text{PTWI} = 1,6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

W...průměrná hmotnost konzumenta – 70 kg

c...obsah polutantu ve svalovině ryb z dané lokality (mg/kg č. hm.)

NTL...hmotnost rybí svaloviny pro naplnění toxikologického limitu

PP...počet porcí za týden

P...hmotnost jedné porce – 170 g (KRUŽÍKOVÁ et al., 2008; DVOŘÁČEK, 2011).

3.8 Stanovení rtuti v biologickém materiálu

3.8.1 Odběr vzorků, skladování a předpříprava

Samotnému měření stopových prvků kontaminantů v potravinách předchází odběr a příprava vzorků a také jejich skladování. Jakákoli chyba vzniklá v těchto fázích znehodnocuje další analytické stanovení, protože nemůže být dosaženo spolehlivých výsledků. Proto je nutno dodržovat hygienické podmínky laboratoře, nádob a chemikálií a úschovy vzorků. Čerstvé vzorky ryb se uskladňují hluboce zmrazené nebo lyofilizované v temnu (CIBULKA et al., 1991).

3.8.1.1 Lyofilizace

Lyofilizace je sušicí metodou, která využívá nízkého tlaku. Proti ostatním metodám sušení, které spočívají v odstraňování vlhkosti odpařením, tj. přechodem vody z fáze kapalně do plynné, je lyofilizace charakteristická odstraněním vody sublimací. Voda se odpařuje ze zmrazeného vzorku ve vakuu a namrazuje se na kondenzační spirálu. Zbývá pevná část si zachovává speciální pórovitou strukturu, která je tvořena kanálky vzniklými po odpařené vodě. Technologie lyofilizace je velmi zdlouhavá a energeticky náročná (OKÁČOVÁ et al., 2010).

3.8.2 Metody stanovení celkového obsahu rtuti v potravinách

Ke stanovení celkového obsahu rtuti v potravinách se nejčastěji používá atomová absorpční spektrometrie AAS, atomová fluorescenční spektrometrie AFS, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP-MS a optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP-OES. Velmi dobré výsledky poskytuje také atomová absorpční spektrometrie s technikou generace studených par CV-AAS

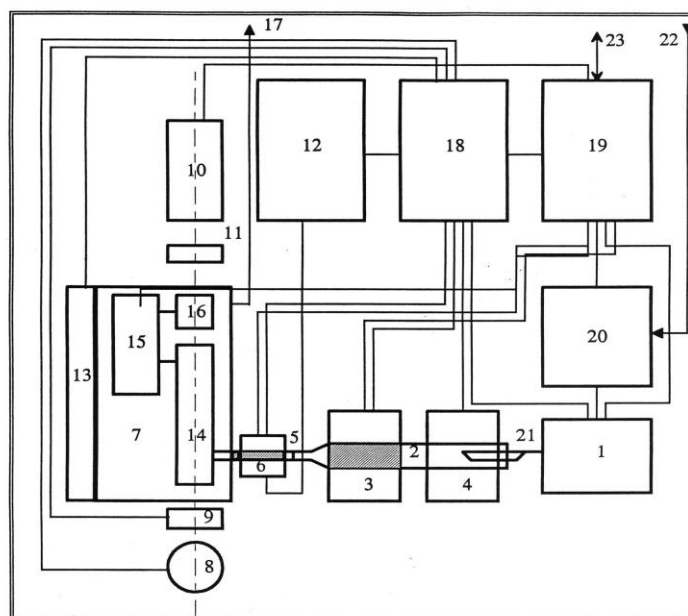
a atomová fluorescenční spektrometrie s technikou generace studených par CV-AFS (HOUSEROVÁ et al., 2006a).

Problémem při analýze rtuti v biologických materiálech je možnost ztráty a kontaminace analytu během předpřípravy vzorku (tj. např. rozkladné fáze). Pro přímé stanovení koncentrace celkové rtuti bez potřeby chemické úpravy vzorku před vlastním stanovením, se proto v praxi využívá nejčastěji analyzátor Advanced Mercury Analyser AMA 254 (SPĚVÁČKOVÁ & KNOTKOVÁ, 1998).

3.8.2.1 Princip přístroje AMA 254

Analyzátor AMA 254 (Altec, ČR) je jednoúčelový atomový absorpční spektrometr, využívaný pro stanovení celkového obsahu rtuti v pevných i kapalných vzorcích bez potřeby předchozí úpravy vzorku (rozkladu, separace). Spektrometr využívá principu generování par kovové rtuti tepelným rozkladem vzorku ve spalovací trubici s následným zachycením a zakoncentrováním na zlatém amalgamátoru, opětovným tepelným vypuzením a detekcí. Tímto je dosaženo vysoké citlivosti bez závislosti na matici. Nosným plynem je kyslík.

Při vlastním stanovení je vzorek o známé navážce vložen do spalovací lodičky a je zaveden do spalovací trubice, kde je vysušen a spálen v proudu kyslíku. Rozkladné produkty pak postupují přes katalyzátor, kde se dokončí oxidace a zachytí se některé produkty spalování, a dále přes amalgamátor, kde se selektivně zachytí rtuť. Rtuť z amalgamátoru je uvolněna krátkodobým ohřevem a je nosným plynem vedena nejprve do delší měřicí kyvety a poté přes zpoždovací nádobku do kratší měřicí kyvety. Stejně množství rtuti se tedy měří dvakrát s odlišnou citlivostí (ALTEC, 2002).



Obr. 3: Schéma přístroje AMA 254 (ALTEC, 2002)

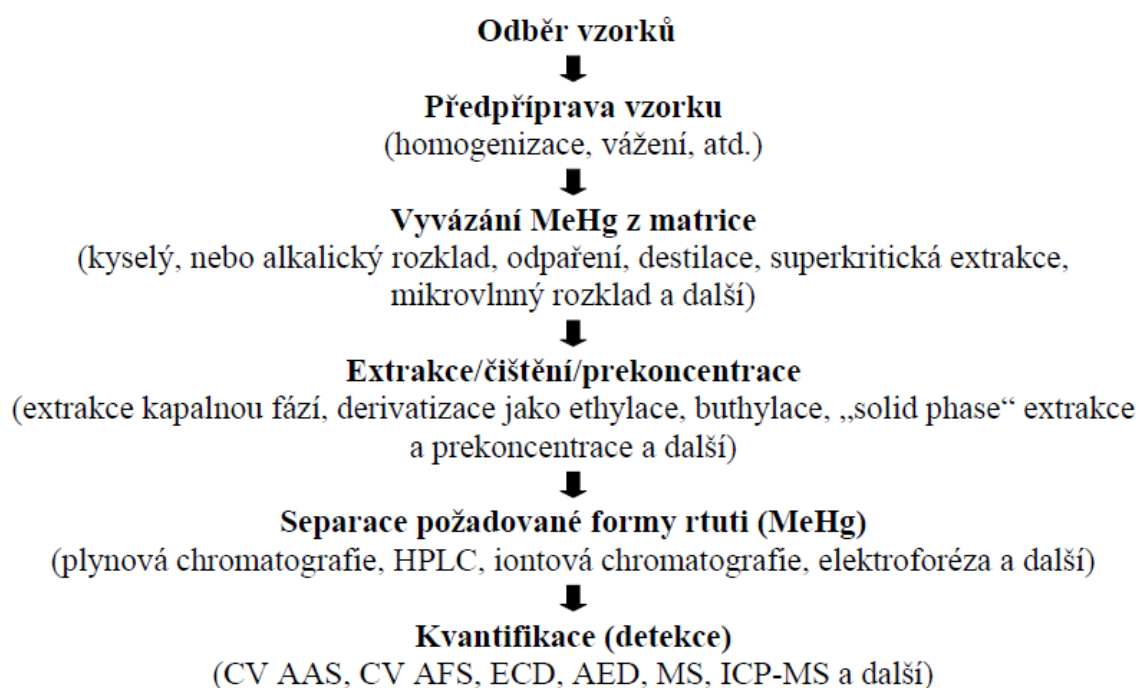
1 dávkovací zařízení	9 clonka	17 výstup kyslíku
2 spalovací trubice	10 detektor	18 analogová elektronika
3 katalytická pec	11 interferenční filtr	19 mikropočítač
4 spalovací pec	12 chladicí čerpadlo	20 regulátor průtoku kyslíku
5 amalgamátor	13 topení bloku měř. kyvet	21 dávkovací lodička
6 vypuzovací pec	14 delší měřicí kyveta	22 vstup kyslíku
7 blok měřících kyvet	15 zpožďovací nádobka	23 komunikace s PC
8 rtuťová výbojka	16 kratší měřicí kyveta	(ALTEC, 2002)

3.8.3 Metody stanovení chemických forem rtuti v potravinách

Metody stanovení methylrtuti spadají do oblasti tzv. speciální analýzy, která se zabývá stanovením jednotlivých forem daných prvků. Speciální analýza má ve srovnání se stanovením celkových obsahů kovů zvýšené nároky jak na přípravu vzorku, tak i na samotnou analýzu včetně nároků na sestavu analytické instrumentace (MARŠÁLEK, 2006). Při přípravě vzorku pro stanovení chemických forem rtuti se používají mírnější extrakční podmínky, tak aby nedocházelo k transformaci

jednotlivých chemických forem, ale zároveň aby jejich výtěžky byly kvantitativní. Izolace specií rtuti z biologických materiálů se provádí kyselou nebo alkalickou hydrolyzou, destilací nebo superkritickou fluidní extrakcí nebo některou z moderních technik (mikrovlnná extrakce – MWE aj.).

V současné době se pro stanovení různých forem rtuti využívají tzv. tandemové techniky. Ty jsou kombinací separačních metod s prvkově, v některých případech i izotopově, selektivní detekcí a umožňují tak velmi přesně stanovit všechny přítomné chemické formy. Nejčastěji se jedná o kombinaci výše uvedených metod (kapitola 3.8.2) s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), plynovou chromatografií (GC) nebo kapilární elektroforézou (CE) (HOUSEROVÁ et al., 2006a).



Obr. 4: Základní kroky speciální analýzy (MARŠÁLEK, 2006)

3.8.3.1 Separace vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

Kapalinová chromatografie je založena na rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Při dělení dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi oběma fázemi (DOUŠA, 2002). Hlavní výhodou kapalinové chromatografie je jednodušší příprava vzorku před vlastním

HPLC stanovením, jelikož umožňuje stanovení netěkavých sloučenin, a proto nevyžaduje derivatizaci (ta je využívána při stanovení plynovou chromatografií, kdy se analyty převádí na těkavé sloučeniny chemickou modifikací). Při kapalinové chromatografii se chemické formy rtuti separují při laboratorní teplotě, což snižuje riziko jejich vzájemné konverze (HOUSEROVÁ et al., 2006a).

Separace specií rtuti se provádí nejčastěji chromatografií s reverzním systémem fází. K překonání rozdílů v chemických i fyzikálních vlastnostech jednotlivých chemických forem rtuti se využívají modifikátory, které vytváří stabilní komplexy s chemickými formami rtuti. K vytváření komplexů se využívá chelatačních, případně ion-párových interakcí mezi modifikátorem mobilní fáze a analyty na jedné straně a hydrofobních interakcí mezi modifikátorem mobilní fáze a stacionární fáze na straně druhé. Díky využití těchto modifikátorů lze stanovit značně odlišné sloučeniny v jednom separačním kroku.

Nejpoužívanější chelatační činidla jsou:

- L-cystein
- 2-merkptoethanol
- směs 2-merkptoethanolu s L-cysteinem
- 1,5-difenyl-3 thiokarbazon (dithizon)
- sodná sůl diethyldithiokarbamátu DDTC
- amonná sůl pyrrolidin-1-yl-dithiokarbamátu APDC

Nejpoužívanější ion-párová činidla jsou směsi tetrabutylamoniun-bromidu (TBA) s NaCl (DVOŘÁČEK, 2011).

3.9 Charakteristika pangase spodnookého

Pangasius spodnooký (*Pangasius hypophthalmus*) je sladkovodní sumcovitou rybou přirozeně žijící v řekách jihovýchodní Asie jako je například Mekong a Chao Phraya. V posledních letech byl odchován i v dalších asijských řekách a rybnících. Chov sladkovodních ryb ve Vietnamu, především pak v deltě řeky Mekong, se změnil

z venkovského rázu živícího místní obyvatele v rybářské podnikání (ORBAN et al., 2008).

Pangasius bývá často označován jako sumeček žraločí (díky hřbetní ploutvi nacházející se blízko za hlavou, což vzdáleně připomíná žraloka). Zbarvení na hřbetní straně a po bocích přechází z tmavomodré v tmavě šedou, břišní strana je stříbřitě šedá. Kolem ústního otvoru jsou dva páry vousů, typických pro sumcovité ryby. Jedná se o všežravý druh, živící se potravou složenou z drobných ryb, bezobratlých živočichů a rostlin.



Obr. 5: *Pangasius hypophthalmus* (WIKIPEDIA.ORG, 2014)

3.9.1 Chov a zpracování

V posledních letech došlo k významnému nárůstu produkce pangasia ve Vietnamu a to z 87 tis. tun (1999) na 1,2 mil. tun (2008). Mezi další významné producenty pangasia patří Indonésie (kolem 100 tis. tun) a Thajsko (kolem 20 tis. tun). Rychlost vzrůstající produkce ovlivňuje především způsob chovu těchto ryb. Ty jsou nejčastěji chovány v menších zemních rybníčcích nebo v plovoucích klecích a síťových ohradách v tekoucích vodách. Tržní hmotnosti 1 – 1,5 kg v podmínkách akvakultury dosahuje přibližně za 8 až 10 měsíců. Pro srovnání, kapr dosahuje své tržní hmotnosti (zpravidla 2 – 2,5 kg) za tři až čtyři roky.

Po dosažení tržní hmotnosti jsou ryby ručně zpracovány do podoby filet bez kůže. Výťažnost závisí na způsobu chovu, kdy u ryb chovaných v klecích je výtěžnost okolo

33 % a u ryb z rybníků kolem 31 %. Zbarvení masa odráží jeho kvalitu, přičemž žlutá je považována za nejméně a růžová za nejvíce kvalitní. Svalovina obsahuje poměrně velké množství vody (kolem 83 %), což je navíc podpořeno také její úpravou bránicí vysychání – tzv. glazováním, případně použitím polyfosfátů, které zadržují vodu přidávanou během zpracování přímo do svaloviny. Na český trh je pangasius dovážen převážně ve formě zmražených filetů (MAREŠ, GRMELA & BRABEC, 2011).

3.9.2 Nutriční parametry

Filety pangase se vyznačují vysokou úrovní vlhkosti (80 – 85 %) a nízkým obsahem proteinů (12,5 – 15,6 %) a lipidů (1,1 – 3,0 %). Celková hladina lipidů se vyznačuje nízkým podílem cholesterolu (21 až 39 mg/100 g), s vysokým zastoupením nasycených mastných kyselin (41,1 – 47,8 % z celkového množství mastných kyselin) a nízkým zastoupením polynenasycených mastných kyselin (12,5 – 18,8 % z celkového množství mastných kyselin), které jsou zastoupeny především kyselinou linolovou (44 – 55 % z celkového množství PUFA - polynenasycené mastné kyseliny). Minerální složení se vyznačuje vysokým obsahem sodíku (222 až 594 mg/100 g), pravděpodobně částečně v důsledku obsahu tripolyfosfátu sodného (E 451), používaného k udržení vlhkosti (ORBAN et al., 2008). Svalovina pangase může být zdrojem polutantů, zejména reziduí antibiotik nebo malachitové zeleně. Pangasius často trpí kožním (žaberním) parazitem, k jehož léčbě je tato látka využívána. Jedná se však o látku karcinogenní, a proto se nesmí používat při chovu ryb určených pro lidskou spotřebu. V minulosti došlo k výskytu a zachycení dodávek kontaminovaných ryb. Od roku 2006 bylo evropským systémem RASFF (Rapid alert system for food and feed) evidováno 79 případů, kdy filety pangasia obsahovaly závadné látky. Tyto dodávky ryb byly vráceny dodavateli nebo zlikvidovány. V současnosti se s rozvojem chovu a zpracování pangasia situace výrazně zlepšila. Svědčí o tom i záznamy evropské databáze RASFF – v roce 2010 bylo zaznamenáno 26 hlášení závadných dodávek a z toho se pouze dvě týkala České republiky (MAREŠ, GRMELA & BRABEC, 2011).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Vzorky

K analýze byly použity zmražené ryby, běžně dostupné v obchodní síti České republiky. Celkem bylo zakoupeno 10 vzorků pangasů původem z Vietnamu. Před vlastním stanovením rtuti bylo provedeno stanovení obsahu vody v jednotlivých vzorcích. Z každé ryby poté byly odebrány 3 vzorky pro stanovení celkového obsahu rtuti na přístroji AMA 254 a 3 vzorky pro stanovení obsahu methylrtuti pomocí LC-CV-AFS.



Obr. 6: Vzorek 1 - Nowaco



Obr. 7: Vzorek 2 - Iglo



Obr. 8: Vzorek 3 - *Animalco*



Obr. 10: Vzorek 4 - *Nautica*



Obr. 9: Vzorek 5 - *Euro Frigo*



Obr. 11: Vzorek 6 - *Ice cap*



Obr. 12: Vzorek 7 - *S-budget*



Obr. 13: Vzorek 8 - *Pangasius filet*



Obr. 14: Vzorek 9 - *Kimbex*



Obr. 15: Vzorek 10 - *Mamka*

4.2 Uchování vzorků

Zakoupené vzorky byly hluboce zmrazeny v mrazničce na -18 °C. Před analýzou byla provedena lyofilizace vzorků rozřezaných na plátky a takto upravené vzorky byly opět skladovány v mrazničce v plastových nádobkách.

4.3 Stanovení sušiny

Zmražená rybí svalovina byla rozřezána pomocí keramického nože na tenké plátky, které byly vkládány do Petriho misek vhodných pro použití v lyofilizátoru. Vzorky byly lyofilizovány v lyofilizátoru Christ (B. Braun Biotech International, Švýcarsko). Lyofilizace probíhala při teplotě -52 °C po dobu 48 hodin do konstantní hmotnosti. Po lyofilizaci vzorků byla z rozdílu hmotností vypočítána hodnota sušiny a obsahu vody v jednotlivých vzorcích.

4.4 Použité chemikálie

- Základní kalibrační standard o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1} \text{ Hg}$ v 2% (v/v) HNO_3 (Český Metrologický Institut Praha, ČR)
- Chlorid methylrtuti p.a.- CH_3HgCl (Sigma-Aldrich Chem. Comp., USA)
- 2-merkapt ethanol p.a. (Sigma-Aldrich Chem. Comp., USA)
- Methanol pro HPLC (Merck, Darmstadt, Německo)
- Octan amonný, SnCl_2 , KBr , KBrO_3 , NaCl , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, HCl , HNO_3 – všechny p.a. (Pliva-Lachema, Brno, ČR)
- Standardní referenční materiál DORM-4 (Institut pro mezinárodní standardy, Kanada): T-Hg = $0,410 \pm 0,055 \text{ mg.kg}^{-1}$, MeHg (jako Hg) = $0,354 \pm 0,031 \text{ mg.kg}^{-1}$

Standardní roztok Hg^{2+} ($c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$) pro speciální analýzu byl připraven v 2 % (v/v) HCl . Kalibrační roztoky pro stanovení T-Hg byly připraveny v 0,1 % (m/v) $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a 0,6 % HNO_3 . Standardní roztoky MeHg ($c = 1 \text{ mg.l}^{-1}$) byly připraveny

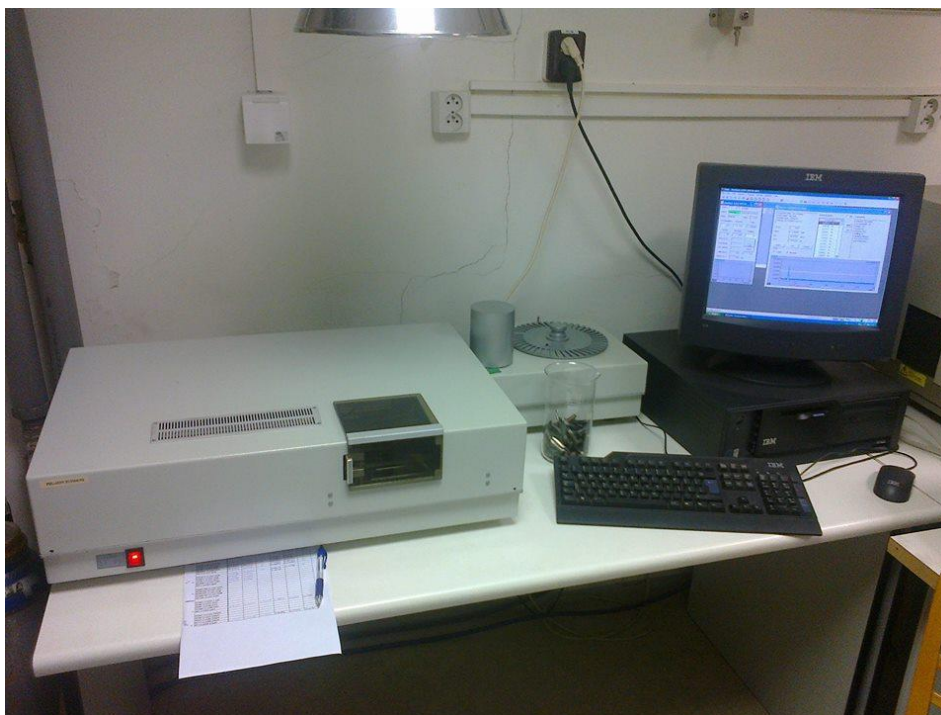
v methanolu. Všechny pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou (Millipore, Bedford, USA).

4.5 Stanovení celkového obsahu rtuti na přístroji AMA-254

Pro stanovení celkového obsahu rtuti byl použit jednoúčelový atomový absorpční spektrofotometr AMA 254 (Altec s.r.o., Praha) řízený WinAMA softwarem. Homogenizované lyofilizované vzorky byly navažovány na digitálních vahách přímo do předčištěných, vypálených niklových lodiček a manuálně vkládány do AMA 254 analyzátoru. V analyzátoru byly vzorky vysušeny při 120 °C a spáleny při 550 °C v proudu kyslíku (200 ml.min⁻¹). Navážka vzorku se pohybovala mezi 80 – 110 mg s přesností na 0,1 mg. Selektivně zachycená rtuť byla uvolněna krátkodobým ohřevem amalgamátoru. Absorpce Hg⁰ byla měřena při 253,65 nm (doba měření 60 s). Doba sušení a rozkladu patřily mezi optimalizované parametry stanovení. Každý vzorek byl měřen třikrát.

Tab. 1: *Optimalizované parametry AMA 254*

Krok	Teplota [°C]	Doba [s] (organická matrice)
Sušení	120	90
Rozklad	550	180
Měření	120	60



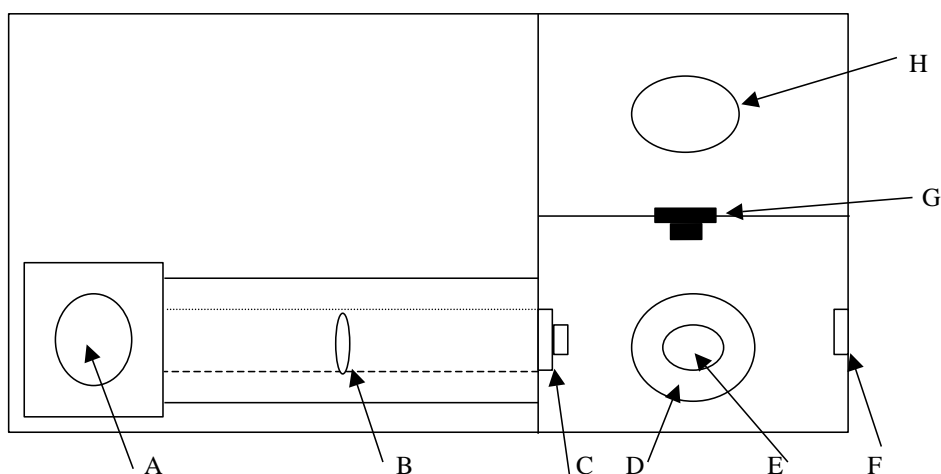
Obr. 16: *Přístroj AMA 254*

4.6 Stanovení obsahu methylrtuti a anorganické rtuti (Hg^{2+}) pomocí HPLC

Pro extrakci specií rtuti ze vzorků pangase byl použit vysokotlaký mikrovlnný extraktor Ethos SEL (Milestone, Itálie). Mikrovlnný extraktor obsahoval 10 teflonových reakčních nádobek, takže umožňoval současnou extrakci až 10 vzorků. Kontrola extrakční teploty byla prováděna termočlánkem umístěným v první reakční nádobě. Navážka vzorku byla přibližně 1000 mg s přesností na 0,1 mg. Extrakce byla prováděna podle zoptimalizovaného postupu (HOUSEROVÁ et al., 2006b), tedy při 55 °C, po dobu 10 minut, při výkonu 400 W, za použití 10 ml extrakčního činidla ($6 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HCl} + 0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaCl}$). Po extrakci byly vzorky zfiltrány nejprve přes filtrační papír (No. 389, průměr 12,5 cm) a následně přes stříkačkový teflonový mikrofiltr o velikosti pórů 0,45 μm . Supernatant byl ředěn acetátovým pufrům na objem 25 ml.

Pro stanovení specií rtuti byl použit kapalinový chromatograf LC-200 (tzv. bioverze, Perkin Elmer, Norwalk, USA) vybavený vysokotlakou pumpou Series 200 LC, autosamplérem Series 200, UV/VIS detektorem 785 A (Perkin Elmer,

Norwalk, USA) a atomovým fluorescenčním detektorem PSA Millenium Merlin (P S Analytical Ltd., Orpington, GB). Optické uspořádání atomové fluorescenční spektrometrie je znázorněno na obr. 17. Isokratická eluce specií rtuti byla prováděna na chromatografické koloně s reverzní fází Zorbax SB-C18 (4,6 x 150 mm, velikost částic 5 μm , Agilent Technologies, USA) při průtokové rychlosti 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ s mobilní fází obsahující 6,2% methanol + 0,05% 2-sulfanylethanol + 0,02 M octan amonný. Před začátkem a na konci měření byl chromatografický systém promyt methanolem a mobilní fází. Automatickým dávkovačem bylo do toku mobilní fáze dávkováno 100 μl vzorku. Automatický dávkovač byl před každým dalším dávkováním vzorku automaticky promyt směsí H_2O a methanolu (1:1) a mobilní fází.

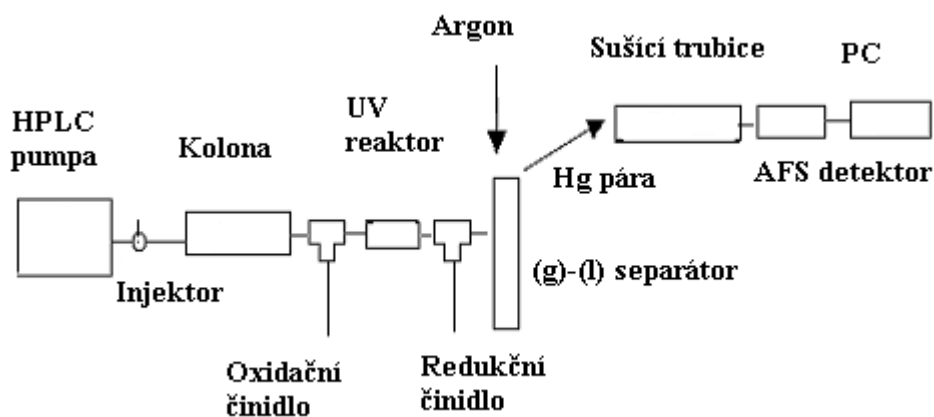


A – zdroj záření – Hg lampa B- čočky E- studená pára Hg G - filtr
 C- kolimátor D – argon F- referenční cela H – fotonásobič

Obr. 17: Optické uspořádání AFS (HOUSEROVÁ, 2005)

Eluent z chromatografické kolony po smísení s oxidačním činidlem (0,002 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KBr + 0,0004 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KBrO_3 v 5% HCl) přecházel přes UV reaktor (PTFE kapilární trubička 0,5 mm x 10 m, výkon UV lampy 12 W, vlnová délka 253,7 nm), který zajišťoval převedení všech chemických forem rtuti fotooxidací na Hg^{2+} . Přebytečný Br_2 byl z oxidačního činidla odstraňován hydroxylamin hydrochloridem (0,004% (m/v))

hydroxylamin hydrochlorid). Rtuťnaté sloučeniny byly dále redukovány reakcí s redukčním činidlem (2% (m/v) SnCl₂ v 10% HCl) na elementární rtuť. Z roztoku byla elementární rtuť uvolněna proudem argonu (0,25 l.min⁻¹) ve fázovém (g)/(l) separátoru, vysušena v PermaPure[®] membránové jednotce a detekována AFS v křemenné cele při vlnové délce 253,65 nm. Výsledná data byla zpracována chromatografickým softwarem Clarity (verze 2.1, Data Apex, Praha, ČR). Schématické uspořádání HPLC-CV-AFS systému pro stanovení specií rtuti je znázorněno na obr. 18. Požadovaná excitační a emisní vlnová délka byla dosažena použitím Hg lampy (Cathodeon Ltd.) a filtru záření nastaveného na vlnovou délku 254 nm.



Obr. 18: Schématické uspořádání HPLC-CV-AFS systému pro stanovení specií rtuti (HOUSEROVÁ, 2005)

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení sušiny

Na základě rozdílu hmotností vzorků před a po lyofilizaci byl vypočítán obsah vody a podíl sušiny v jednotlivých vzorcích. Výsledky uvádí tabulka č.2.

Tab. 2: Sušina a obsah vody ve vzorcích

	Značka	Sušina [%]	Obsah vody ve vzorku [%]
1	NOWACO, 400g	25,27	74,73
2	IGLO, 250g	30,19	69,81
3	ANIMALCO, 1000g	22,62	77,38
4	NAUTICA, 500g	27,83	72,17
5	EURO FRIGO, 400g	23,90	76,10
6	ICE CAP, 500g	24,45	75,55
7	S-BUDGET, 1000g	24,28	75,72
8	PANGASIUS FILET, 300g	25,69	74,31
9	KIMBEX, 600g	25,39	74,61
10	MAMKA, 1000g	46,17	53,83

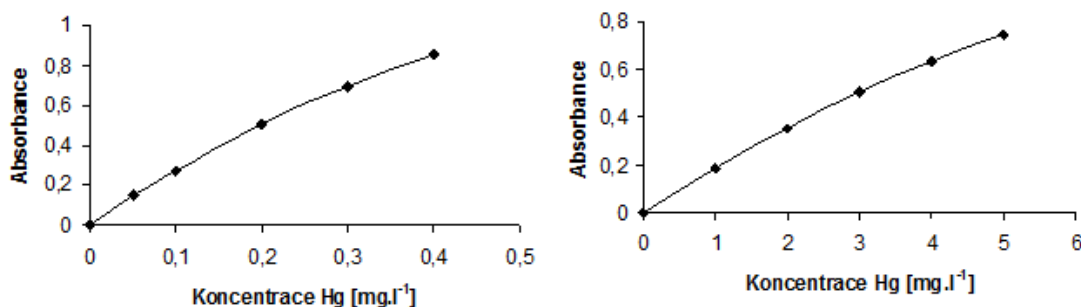
Z výsledků stanovení vyplývá, že s výjimkou dvou vzorků značky MAMKA a IGLO obsahují veškeré zakoupené vzorky pangase více než 70 % vody. Jak již bylo zmíněno v teoretické části (kapitola 3.9.1), vyšší obsah vody je dán úpravou masa – zejména glazováním a použitím polyfosfátů, či jiných aditiv vážících vodu ve svalovině.

5.2 Stanovení celkového obsahu rtuti na AMA 254

5.2.1 Validace atomové absorpční spektrometrie (AMA 254)

Pro stanovení celkového obsahu rtuti pomocí AMA 254 byla použita již zoptimalizovaná metoda. Analyzátor AMA 254 byl pravidelně kalibrován na dvě sady standardních roztoků o koncentraci 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 mg.l⁻¹ a 1, 2, 3, 4 a 5

$\text{mg.l}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$. Kalibrační roztoky byly připraveny v prostředí 0,1 % $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a 0,6 % HNO_3 . Výsledné kalibrační křivky nebyly lineární (obr. 19).



Obr. 19: Kalibrační křivky AMA 254

Správnost stanovení byla kontrolována analýzou standardního referenčního materiálu rybího proteinového homogenátu DORM-4 s certifikovaným obsahem celkové rtuti T-Hg = $0,410 \pm 0,055 \text{ mg.kg}^{-1}$. V referenčním materiálu bylo analýzou stanoveno $0,408 \pm 0,014 \text{ mg.kg}^{-1}$ T-Hg. Stanovená hodnota byla shodná s hodnotou certifikovanou a metoda tedy poskytovala správné výsledky.

Přesnost stanovení byla stanovena na základě RSD a odpovídala 3,06 % (při $0,408 \text{ mg.kg}^{-1}$, $n = 10$). Mez detekce stanovení ($3s_{bl}$) celkové rtuti bez zakoncentrování byla $0,1 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ (pro navážku $100 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$)

5.2.2 Celkový obsah rtuti ve vzorcích pangase

Celkový obsah rtuti ve vzorcích svaloviny pangase je uveden v tabulce č. 3. V tabulce je uveden průměrný obsah celkové rtuti v čerstvé hmotě i v sušině, který byl stanoven na základě tří analýz, a směrodatná odchylka měření.

Tab. 3: Celkový obsah rtuti ve vzorcích svaloviny

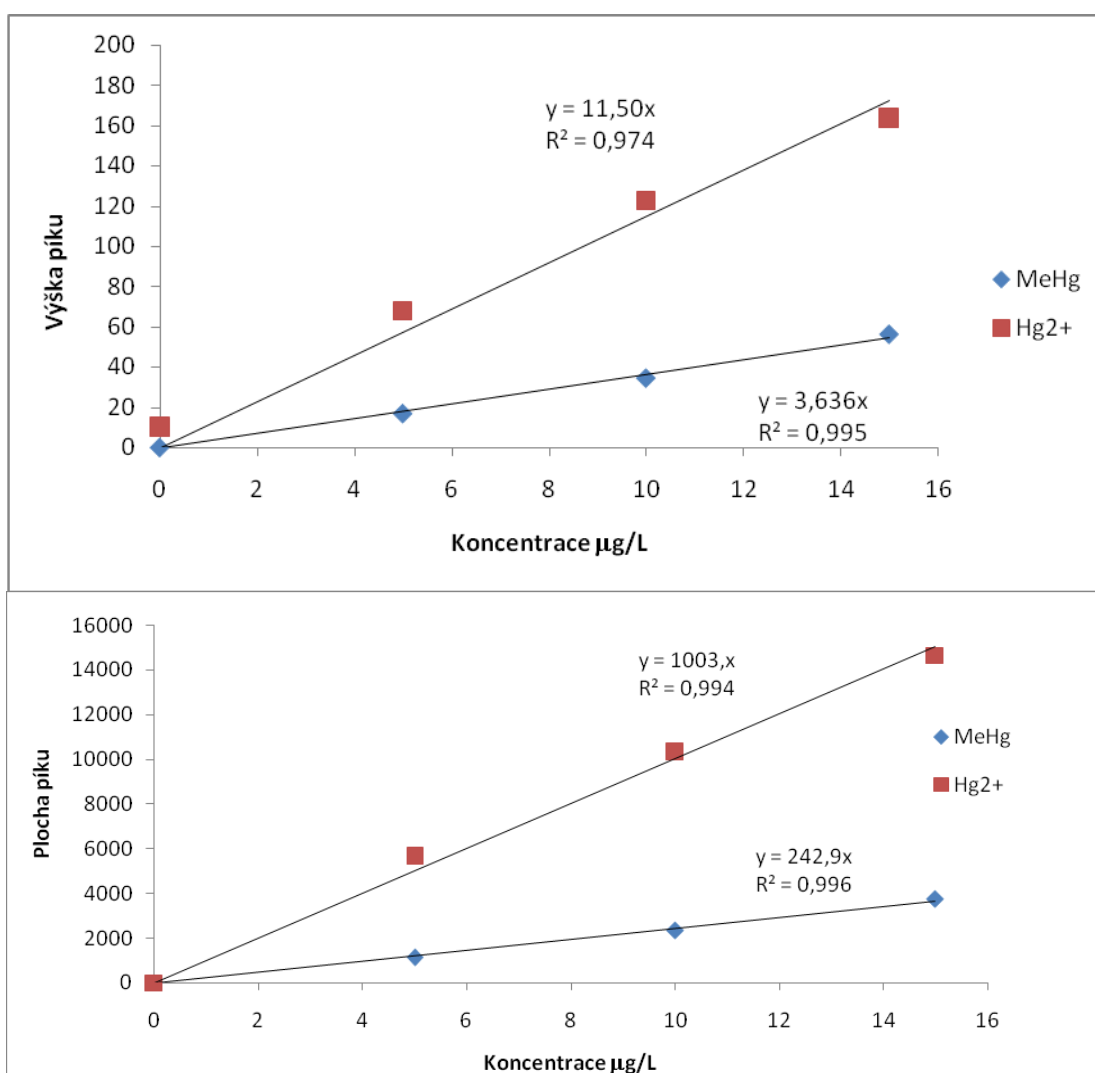
Vzorek č.	Průměrný obsah celkové rtuti v čerstvé hmotě [mg.kg ⁻¹]	Průměrný obsah celkové rtuti v sušině [mg.kg ⁻¹]	Směrodatná odchylka
1	0,0358	0,1417	0,0004
2	0,0147	0,0487	0,0001
3	0,0134	0,0592	0,0001
4	0,0147	0,0528	0,0001
5	0,0168	0,0703	0,0003
6	0,0099	0,0405	0,0001
7	0,0182	0,0750	0,0002
8	0,0493	0,1919	0,0007
9	0,0493	0,1942	0,0005
10	0,0254	0,0550	0,0008

Maximální limit rtuti 0,50 mg.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti ryb, stanovený podle Nařízení Komise (EU) č. 420/2011, nebyl překročen v žádném ze stanovovaných vzorků pangase spodnookého.

5.3 Stanovení chemických forem rtuti LC-CV-AFS

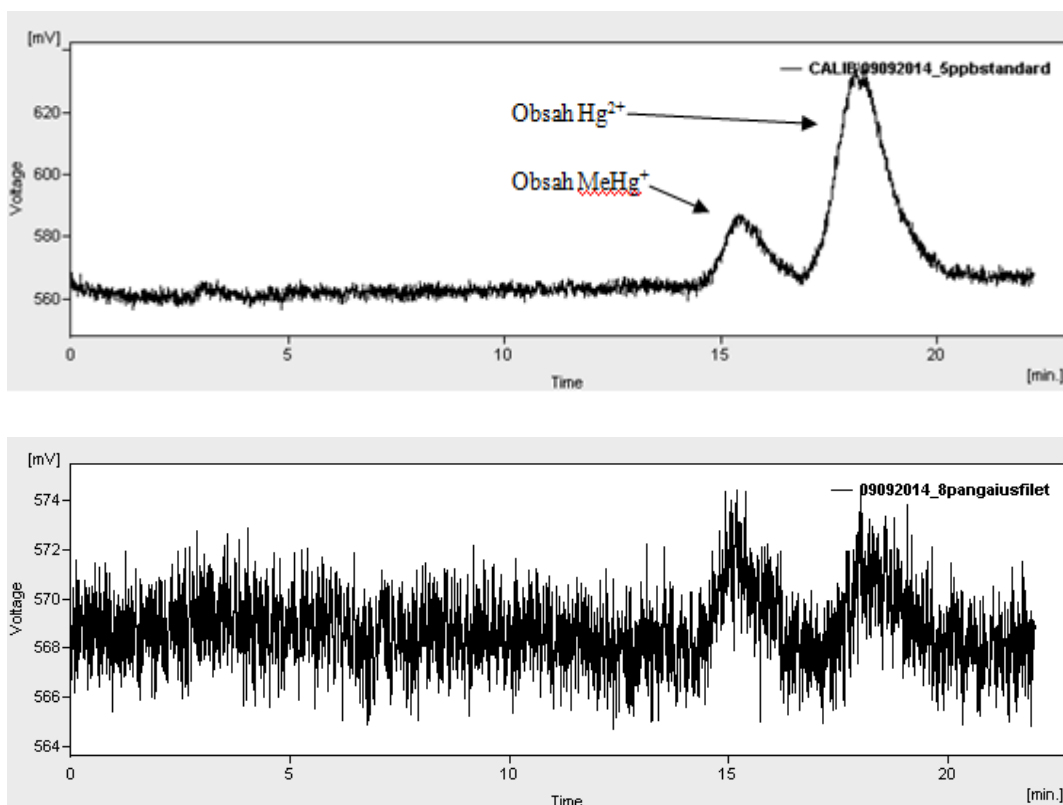
5.3.1 Validace CV-AFS

Pro stanovení chemických forem rtuti pomocí LC-CV-AFS byla použita již zoptimalizovaná metoda (HOUSEROVÁ et al., 2006b). Atomový fluorescenční spektrometr byl kalibrován standardními roztoky o koncentracích 5; 10; 15 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Hg^{2+} a MeHg^+ v $2,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl + $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl . Výsledné kalibrační křivky byly lineární (obr. 20).



Obr. 20: Kalibrační křivky LC-CV-AFS

Správnost stanovení byla ověřena analýzou standardního referenčního materiálu rybího proteinového homogenátu DORM-4 s certifikovaným obsahem MeHg (jako Hg) = $0,354 \pm 0,031 \text{ mg.kg}^{-1}$. V referenčním materiálu bylo analýzou stanoveno $0,341 \pm 0,018 \text{ mg.kg}^{-1}$ MeHg. Stanovená hodnota byla shodná s hodnotou certifikovanou a metoda tedy poskytovala správné výsledky. Mez detekce LOD (limit of detection) byla pro MeHg^+ $0,024 \text{ mg.kg}^{-1}$ a pro Hg^{2+} $0,008 \text{ mg.kg}^{-1}$ (při doplnění na 25 ml a navážce 1000 mg).



Obr. 21: Chromatogram standardu MeHg^+ a Hg^{2+} (o koncentraci $5 \mu\text{g.l}^{-1}$) a vzorku č. 8

5.3.2 Obsah chemických forem rtuti ve vzorcích pangase

Obsah methylrtuti MeHg^+ a anorganické rtuti Hg^{2+} ve vzorcích svaloviny pangase je uveden v tabulce č.4.

Tab. 4: Obsah chemických forem rtuti ve vzorcích svaloviny

Vzorek č.	Obsah MeHg ⁺ v sušině [mg.kg ⁻¹]	Obsah Hg ²⁺ v sušině [mg.kg ⁻¹]
1	0,1104	<LOD
2	<LOD	<LOD
3	0,0350	0,0160
4	0,0420	0,0100
5	0,0610	<LOD
6	<LOD	<LOD
7	0,0480	0,0160
8	0,1300	0,0330
9	0,1423	0,0450
10	0,0380	0,0150

Vzorky pangase spodnookého obsahovaly 59 – 87 % methylrtuti.. U dvou vzorků byl obsah obou sledovaných chemických forem rtuti pod mezí detekce, tedy nižší než 0,024 mg.kg⁻¹ pro MeHg⁺ a 0,008 mg.kg⁻¹ pro Hg²⁺. Vzhledem k nízkým obsahům chemických forem rtuti stanoveným ve vzorcích se RSD stanovení pohybovaly mezi 15 - 20 %.

5.4 Hodnocení zdravotního rizika z konzumace pangasů dle Kannana a WHO

5.4.1 Metoda dle Kannana

Pro hodnocení zdravotního rizika z konzumace pangasů z hlediska celkového obsahu rtuti byl použit vzorec pro výpočet indexu rizika (H), který je uveden v kapitole 3.7.

$$D = c \cdot I / W \cdot 1000$$

$$H = D / RfD$$

Za hodnotu *c* byla dosazena nejvyšší hodnota obsahu celkové rtuti v čerstvé hmotě ze všech vzorků, která činila 0,0493 mg.kg⁻¹. Při určení hodnoty *I* byl použit údaj z českého statistického úřadu pro rok 2013, kdy byla spotřeba ryb 5,3 kg/os/rok, tedy

14,52 g/os/den. Za hodnotu W byla dosazena průměrná tělesná hmotnost konzumenta 70 kg a za hodnotu RfD referenční dávka pro rtuť, která činí 0,0003 mg/kg/den.

$$D = \frac{0,0493 * 14,52}{70 * 1000} = 1,02^{-5} \text{ mg/kg}$$

$$H = \frac{1,02^{-5}}{0,0003} = 0,034$$

Výsledný index rizika je nižší než hodnota 1 z čehož vyplývá, že vzorek s nejvyšším obsahem celkové rtuti (vzorek č. 9), a tedy ani žádný jiný ze stanovovaných, nemůže být pro spotřebitele nebezpečný. Ani v případě, kdy byla pro výpočet použita hodnota nejvyššího obsahu celkové rtuti v sušině, nepřekročil index rizika hranici 1.

5.4.2 Metoda dle WHO

Pro hodnocení zdravotního rizika z konzumace pangasů z hlediska obsahu methylrtuti byla použita metoda dle WHO, která je podrobněji uvedena v kapitole 3.7.

$$D = EL \cdot W$$

$$NTL = D / c$$

$$PP = NTL / P$$

Za hodnotu EL byl dosazen expoziční limit stanovený světovou zdravotnickou organizací (WHO), který činí 1,6 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Jako průměrná tělesná hmotnost konzumenta W byla použita hodnota 70 kg. Za hodnotu c byla dosazena nejvyšší hodnota průměrného obsahu methylrtuti v čerstvé hmotě ze všech vzorků, která činila 0,0361 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Jako hmotnost jedné porce P byla dosazena hodnota 170 g.

$$D = 1,6 * 70 = 112 \mu\text{g}$$

$$NTL = \frac{112}{0,0361} = 3102,5 \text{ g}$$

$$PP = \frac{3102,5}{170} = 18,25$$

Výsledná hmotnost pro naplnění toxikologického limitu je 3102,5 g svaloviny pangase s nejvyšším obsahem methylrtuti v sušině (vzorek č. 9). To znamená, že při hmotnosti 170 g jedné porce pangase, je pro naplnění toxikologického limitu nutné sníst více než 18 porcí za týden.

6 ZÁVĚR

Náplní této bakalářské práce byla problematika stanovení celkového obsahu rtuti a obsahu specií rtuti ve vzorcích pangase spodnookého. Vzorky použité k analýze byly zakoupeny v běžné spotřebitelské obchodní síti České republiky, konkrétně v supermarketech Albert, Billa, Interspar, Kaufland a Tesco.

Pro vlastní stanovení byly odebrané vzorky svaloviny upraveny lyofilizací a následně uchovávány zmražené. Z výsledků stanovení obsahu vody a sušiny vyplývá, že s výjimkou dvou vzorků značky MAMKA a IGLO obsahují veškeré zakoupené vzorky pangase více než 70 % vody.

Stanovení celkového obsahu rtuti ve vzorcích bylo provedeno na jednouúčelovém atomovém absorpčním spektrometru AMA 254. Celkový obsah rtuti v čerstvé hmotě svaloviny se pohyboval v rozmezí 0,0099 – 0,0493 mg.kg⁻¹, přičemž nejnižší obsah byl naměřen ve vzorku č. 6 (ICE-CAP, 500 g) a nejvyšší ve vzorku č. 8 a 9 (PANGASIUS FILET, 300 g a KIMBEX, 600 g). Před vlastním stanovením specií rtuti pomocí LC-CV-AFS, byla provedena extrakce vzorků mikrovlnným extraktorem. Z výsledků získaných kapalinovou chromatografií ve spojení s atomovou fluorescenční detekcí vyplývá, že obsah methylrtuti ve vzorcích se pohyboval v rozmezí 59 – 87 %. U vzorků č. 2 a 6 (IGLO, 250 g a ICE CAP, 500g) byl obsah obou sledovaných chemických forem rtuti pod mezí detekce, tedy nižší než 0,024 mg.kg⁻¹ pro MeHg⁺ a 0,008 mg.kg⁻¹ pro Hg²⁺.

U žádného ze stanovovaných vzorků nebyl překročen maximální limit rtuti 0,50 mg.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti ryb, stanovený podle Nařízení Komise (EU) č. 420/2011. Výsledky hodnocení potenciálního rizika z konzumace pangase spodnookého ukázaly, že spotřebitel by musel zkonsumovat přes 18 porcí této ryby týdně, aby byl naplněn toxikologický limit. Ačkoli z výsledků vyplývá, že zakoupené vzorky pangase spodnookého nejsou z hlediska obsahu rtuti nebezpečnou potravinou, je třeba ryby i nadále pravidelně kontrolovat.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ANON. Sum rekini. In: *Wikipedia.org* [online]. 1.9.2014 [cit. 2014-11-01]. Dostupné na: http://pl.wikipedia.org/wiki/Sum_rekini

ANON. Účinky kovů ve vodních ekosystémech (zdroje, kumulace, detekce). In: *Rybarstvi.eu* [online]. Brno, 29. 08. 2014 [cit. 2015-3-7]. Dostupné z: <http://www.rybarstvi.eu/dok%20rybari/ekotoxikologie/kovy.pdf>

ALTEC s.r.o., 2002: *Pracovní návod pro obsluhu AMA 254*, Praha.

BENCKO V. et al., 1995. *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., ISBN 80-7169-150-x..

CIBULKA J. et al., 1991. *Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře*. Praha: Academia, ISBN 80-200-0401-7.

ČSÚ. *Spotřeba potravin a nealkoholických nápojů*. [online]. 5.12.2013 [cit. 2014-11-29]. Dostupné z: http://www.czso.cz/csu/tz.nsf/i/spotreba_potravin_klesa_20131205

DOUŠA M., 2002. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ISBN 80-86548-09-0.

DVOŘÁČEK P., 2011. *Analýza sloučenin rtuti v tresčích játrech a jejich zdravotní rizika*. Diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická.

HOUSEROVÁ P., 2005. *Stanovení přechodných kovů v biologických materiálech metodami atomové spektrometrie: Stanovení chemických forem rtuti v biologických materiálech*. Disertační práce. Brno: MENDELU, Ústav chemie a biochemie.

HOUSEROVÁ P. et al., 2006a. *Chemické formy rtuti ve vodních ekosystémech - vlastnosti, úrovně, koloběh a stanovení*. *Chemické listy*, 100, 862-876 s.

HOUSEROVÁ P. et al., 2006b. *Liquid chromatographic - cold vapour atomic fluorescence spectrometric determination of mercury species*. *Journal of Separation Science*, 29, 248-255.

KAFKA Z. & PUNČOCHÁŘOVÁ J., 2002. *Těžké kovy v přírodě a jejich toxicita*. Chemické listy, 96, 611–617 s.

KRUŽÍKOVÁ K. et al., 2008. *Mercury and methylmercury in muscle tissue of chub from the Elbe River main tributaries*. Czech J. Food Sci., 26, 65–70 s.

MAREŠ J., GRMELA J. & BRABEC T., 2011. *Pangas nebo pangasius, rybí druh šířící se našimi kuchyněmi*. Výživa a potraviny, 3, 36-40 s. ISSN 1211-846X.

MARŠÁLEK P., 2006. *Methylrtuť ve vodních ekosystémech*. Vodňany: Bulletin VÚHR, 42 (3), 117-124 s.

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 420/2011, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. [online]. 30.4.2011 [cit. 2014-10-29]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:111:FULL:CS:PDF>

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. [online]. 19.12.2006 [cit. 2014-10-29]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:CS:PDF>

OKÁČOVÁ L. et al., 2010. *Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek jejich modifikací*. Chemické listy, 104, 21-26 s.

ORBAN E. et al., 2008. *New trends in the seafood market. Sutchi catfish (Pangasius hypophthalmus) fillets from Vietnam: Nutritional quality and safety aspects*. Food Chemistry, 110, 383-389 s.

PAVELKA V. & SCHÜTZ A., 1979. *Anorganická chemie pro pedagogické fakulty*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. ISBN 14-160-79.

REMY H., 1962. *Anorganická chemie II*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha, ISBN nevedeno, 806 s.

RUSEK V., 2001. *Základy toxikologie a úvod do problematiky hygieny a bezpečnosti práce v chemické laboratoři*. Univerzita Pardubice, 125 s.

SPĚVÁČKOVÁ V. & KNOTKOVÁ J., 1998. *Prvková analýza klinických materiálů - aplikace elektrotermické atomové absorpční spektrometrie*. Chemické listy, 92, 287-293 s.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. Global mercury assessment. In: *Chem.unep.ch* [online]. 27.2.2015 [cit. 2015-03-01]. Dostupné na: <http://www.chem.unep.ch/mercury/Report/Chapter7.htm>

VIČAROVÁ P., 2012. *Obsah rtuti v sladkovodních rybách z lokalit okresu Žďár nad Sázavou*. Bakalářská práce, MENDELU Brno, Fakulta agronomická.

8 SEZNAM TABULEK

Tab. 1: <i>Optimalizované parametry AMA 254</i>	31
Tab. 2: <i>Sušina a obsah vody ve vzorcích</i>	35
Tab. 3: <i>Celkový obsah rtuti ve vzorcích svaloviny</i>	37
Tab. 4: <i>Obsah chemických forem rtuti ve vzorcích svaloviny</i>	40

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: <i>Biogeochemický cyklus rtuti</i>	15
Obr. 2: <i>Schematické znázornění alkylace a biotransformace rtuti v důsledku metabolické činnosti bakterií B</i>	17
Obr. 3: <i>Schéma přístroje AMA 254</i>	22
Obr. 4: <i>Základní kroky speciální analýzy</i>	23
Obr. 5: <i>Pangasius hypophthalmus</i>	25
Obr. 6: <i>Vzorek 1 - Nowaco</i>	27
Obr. 7: <i>Vzorek 2 - Iglo</i>	27
Obr. 8: <i>Vzorek 3 - Animalco</i>	28
Obr. 9: <i>Vzorek 5 - Euro Frigo</i>	28
Obr. 10: <i>Vzorek 4 - Nautica</i>	28
Obr. 11: <i>Vzorek 6 - Ice cap</i>	28
Obr. 12: <i>Vzorek 7 - S-budget</i>	29
Obr. 13: <i>Vzorek 8 - Pangasius filet</i>	29
Obr. 14: <i>Vzorek 9 - Kimbex</i>	29
Obr. 15: <i>Vzorek 10 - Mamka</i>	29
Obr. 16: <i>Přístroj AMA 254</i>	32
Obr. 17: <i>Optické uspořádání AFS</i>	33
Obr. 18: <i>Schematické uspořádání HPLC-CV-AFS systému pro stanovení specií rtuti</i> ..	34
Obr. 19: <i>Kalibrační křivky AMA 254</i>	36

Obr. 20: Kalibrační křivky LC-CV-AFS	38
Obr. 22: Chromatogram standardu 5 ppb a vzorku č. 8	39

10 SEZNAM ZKRATEK

AMA 254	Advanced Mercury Analyser 254
APDC	Amonná sůl pyrrolidin-1-yl-dithiokarbamátu
CE	Kapilární elektroforéza
DDTC	Sodná sůl diethyldithiokarbamátu
E 451	Tripolyfosfát sodný
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
CV-AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie s technikou generace studených par
CV-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s technikou generace studených par
Hg ⁰	Elementární rtuť
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LOD	Limit of detection (mez detekce)
MeHg	Methylrtuť
MWE	Mikrovlnná extrakce
PTFE	Polytetrafluorethylen (teflon)
PTWI	Prozatímní tolerovaný týdenní příjem

PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed (Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva)
RSD	Relativní směrodatná odchylka
S _{bl}	Směrodatná odchylka signálu pozadí (blanku)
TBA	Tetrabutylamonium-bromid
T-Hg	Celkový obsah rtuti
TWI	Tolerovaný týdenní příjem
UV/VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)