Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

Vliv zpracování na obsah těžkých kovů v medu

Diplomová práce

Autor: Bc. Luděk Janata

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vlastimil Dohnal, Ph.D. et Ph.D.

Hradec Králové 2015

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

Zadání diplomové práce

Autor:	**Bc. Luděk Janata**
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Název závěrečné práce:	**Vliv zpracování na obsah těžkých kovů v medu**
Název závěrečné práce AJ:	Influence of processing on heavy metals content in honey

Cíl, metody, předpoklady:

Cílem práce je zjistit, jestli běžné zpracování medu může navyšovat jeho kontaminaci těžkými kovy. Použili jsme k tomu dvě metody vytáčení medu a kontrolní samovolné vytékání. Dále jsme chtěli zjistit vhodnější metodiku mineralizace pro med (suchá cesta vs. mokrá cesta). Předpokládali jsme, že běžné krátké zpracování medu nebude mít vliv na navyšování kontaminace a lepší výsledky pro mokrou cestu mineralizace.

Garantující pracoviště:	Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vlastimil Dohnal, Ph.D. et Ph.D.
Konzultant:	
Oponent:	Mgr. Pavel Buček, Ph.D.
Datum zadání závěrečné práce:	3. 6. 2014
Datum odevzdání závěrečné práce:	30. 6. 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval pod vedením vedoucího diplomové práce samostatně a uvedl jsem všechny použité prameny a literaturu.

V Hradci Králové dne …..... Podpis autora .....

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Vlastimilu Dohnalovi, Ph.D. et Ph.D. za poskytnutí podkladů k této práci a za čas strávený při tvorbě této práce. Dále bych rád poděkoval Františku Janatovi za poskytnuté vzorky medu.

Anotace

JANATA, L. *Vliv zpracování na obsah těžkých kovů v medu*. Hradec Králové: Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové, 2015. 53 s. Diplomová práce.

Tématem diplomové práce je sledování obsahu vybraných těžkých kovů ve vzorcích medu v průběhu jeho zpracování. Stanovení obsahu jednotlivých kovů bude provedeno pomocí atomové absorpční spektroskopie. Před zahájením praktické části práce student vypracuje rešerši, zabývající se různými postupy přípravy vzorků medu k analýze včetně jejich analytických charakteristik. Na základě rešerše bude vybrána vhodná metoda přípravy vzorků a provedeno měření na atomovém spektrometru. Cílem práce bude zjistit vliv technologického postupu získávání medu na koncentraci těžkých kovů v něm obsažených. Vzorek bude nejprve mineralizován zvoleným postupem a následně obsah těžkých kovů stanoven na atomovém absorpčním spektrometru Perkin Elmer. Získané výsledky budou zhodnoceny. Kromě vlivu technologie budou výsledky porovnány s jinými pracemi v České republice i zahraničí.

Klíčová slova: med, těžké kovy, nerezová ocel, AAS

Annotation

JANATA, L. *Influence of processing on heavy metals content in honey*. Hradec Králové: Faculty of Science, University of Hradec Králové, 2015. 53 pp. Diploma Thesis.

Diploma thesis deals with determination of selected heavy metals content in honey samples during processing. The determination of heavy metals content will be performed on atomic absorption spectrometer. Prior the experimental part, the review on sample preparation methods will be done. Next the best approach will be adapted and applied. The goal of this thesis is to identify the influence of technology on the heavy metal content in honey. Firstly, the honey samples will be mineralized using selected approach. Then, the heavy metal contents will be determined by atomic absorption spectrometer Perkin Elmer. The results will be compared with the results of Czech Republic or other countries studies.

Key words: honey, heavy metals, stainless steel, AAS

Obsah

Úvod ... 8
Teoretická část ... 9
1 Med ... 10
1.1 Léčivé vlastnosti medu ... 10
1.2 Složení medu ... 10
1.3 Energetická potřeba včel ... 16
1.4 Legislativní předpisy pro med ... 16
2 Těžké kovy ... 18
2.1 Obecná charakteristika ... 18
2.2 Včely jako bioindikátor těžkých kovů ... 18
2.3 Cesta těžkých kovů do medu ... 19
2.4 Zkoumané prvky ... 22
3 Korozivzdorná ocel ... 27
3.1 Uvolňování prvků z korozivzdorné oceli ... 28
4 Atomová absorpční spektrometrie (AAS) ... 30
Praktická část ... 35
5 Metodika ... 36
5.1 Použité chemikálie a pomůcky ... 36
5.2 Použité přístroje ... 36
5.3 Analýza vzorků medu ... 37
6 Výsledky a diskuze ... 41
6.1 Porovnání způsobů mineralizace ... 41
6.2 Výtěžnost mineralizace ... 42
6.3 Vliv zpracování medu na obsah těžkých kovů ... 43
6.4 Porovnání s jinými studiemi ... 47
Závěr ... 49
Literatura ... 50

Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je důležitý živočišný druh, jehož početnost se v posledních letech značně snižuje. Je vhodným modelovým organismem při zjišťování kvality prostředí, ve kterém žije. Na vysokou bioindikační hodnotu včel poukazují odborné studie, které se zabývají mimo jiné i kontaminací medu těžkými kovy. Na druhou stranu, studií ve kterých byl zjišťován vliv zpracování medu na kontaminaci, není mnoho.

Jako kterákoli lidská činnost, procházelo i zpracovávání medu vývojem vedoucím k jeho zefektivnění a zjednodušení. Již od pravěku docházelo k vykrádání medových plástů divokých včel. Nejstarší dochovaná malba této činnosti se datuje k roku 15 000 - 20 000 před naším letopočtem. Nejprve lidé vykrádali náhodně objevená včelí hnízda, později si místa s hnízdy značili a nakonec si duté pařezy s včelím rojem (tzv. brtě) odnášeli blíže k obydlí. Následovalo vytvoření dvířek pro snazší přístup k medu (vznikl tzv. klát, typ primitivního úlu). Rozvoj moderního včelařství se datuje až ke konci 19. století, kdy se začaly vyrábět rámečky, úly se zadním otevíráním a byl vynalezen medomet. Dnes se užívají tzv. nástavkové úly. Jednotlivé nástavky do sebe zapadají a pomocí mřížky, která brání průchodu matky, je oddělena část pro med od části pro plod.

Med se v současnosti běžně získává medometem, nejčastěji vyrobeným z nerezové oceli a dalšími pomůckami z kovových slitin, které s medem přicházejí do přímého kontaktu a mohou navyšovat koncentrace zejména chromu, niklu a železa. Nezastavil se ani vývoj zařízení pro získávání medu. Nyní je směrován k samostáčecím úlům, jejichž prototyp pod označením „Flow hive“ se již testuje.

Cílem této práce bylo zjistit, dochází-li ke kontaminaci medu těžkými kovy během vlastního zpracování. Pro nepatrnou oxidaci nerezových slitin nelze předpokládat, že by užití nerezových pomůcek přineslo mimořádné rozdíly v koncentracích. Proto byl do průzkumu přidán i starší typ medometu z pocínovaného plechu s narušenou povrchovou vrstvou, jehož použití by mohlo vést k výraznějšímu nárůstu koncentrací některých prvků než u nerezu.

Teoretická část

1 Med

Med je přírodní sladká látka produkovaná včelami z nektaru rostlin a medovice. Medovice je cukerný sekret vylučovaný stejnokřídlým hmyzem. Včely sbírají tyto materiály a přepravují je do úlu ve svém volátku, kde jsou kombinovány s látkami, které umožňují medu dozrát.

Podle Mizrahiho & Lenskyho (1997) je čerstvě vytočený med viskózní kapalina o hustotě přibližně 1,5 g/cm^3, má silně hygroskopický charakter, relativně nízkou tepelnou vodivost, nízké povrchové napětí a nějaký odstín jantarové barvy.

1.1 Léčivé vlastnosti medu

Mimo výraznou energetickou hodnotu medu, jsou důležité i vlastnosti imunologické, antibakteriální, protizánětlivé a antipyretické. Předpokládá se, že med může pomáhat úspěšně léčit trávicí a dýchací obtíže, dále srdeční a revmatická onemocnění. Také byly medu prokázány hojivé účinky a oficiálně byl prohlášen za léčivý (Mizrahi & Lensky 1997).

Med je bohatý na látky, které se řadí do skupiny antioxidantů. Jejich účinek spočívá v navázání na kyslíkové radikály v organismu, čímž je neutralizují. Hlavní skupinu antioxidantů v medu tvoří flavonoidy, z nichž pinocembrin je pro včelí med a propolis jedinečný. Bogdanov (2009) tvrdí, že s rostoucí tmavostí medu se zvyšují jeho antioxidační vlastnosti.

Med má velmi bohaté chemické složení. Nalezneme v něm mnoho druhů sacharidů, bílkovin, enzymů, vitamínů, minerálů, kyselin a dalších látek.

1.2 Složení medu

1.2.1 Sacharidy

Med je minimálně z 80 % tvořen sacharidy. V sušině pak podle Přidala (2003) tvoří dokonce 95-99 %, čímž vytváří tzv. „fyziologické sucho“, které vysokým osmotickým tlakem zabraňuje mikrobiální aktivitě. Dominantním cukrem výchozích látek nektaru a medovice je disacharid sacharóza, která je enzymem invertázou z hltanových žláz včel štěpena na směs glukózy (hroznový cukr) a fruktózy (ovocný cukr) v poměru 1:1, obsah sacharózy v samotném medu se pohybuje pouze okolo 1 %. Během enzymatického štěpení sacharózy se spotřebovává i určité množství vody, čímž se podporuje

zahušťování nektaru a jeho přeměna na med (Veselý 2003). Obsah cukrů v nektaru se pohybuje mezi 5-80 % a liší se podle druhu rostliny, z níž pochází. Například slunečnice obsahuje nektar s přibližně 40% podílem cukrů, to znamená, že hmotnostní výtěžek medu z tohoto nektaru bude zhruba poloviční (Rortais et al. 2005).

Převaha monosacharidů, obzvláště pak vysoký obsah fruktózy, určuje většinu fyzikálních a nutričních charakteristik. Dle Stoklasy (1975) obvykle převažuje fruktóza nad glukózou a způsobuje dlouhodobou tekutost medu, tzn. čím více je v medu glukózy, tím rychleji krystalizuje.

V menším množství jsou pak zastoupeny i další sacharidy. Z disacharidů jsou to sacharóza, maltóza a izomaltóza. Dále trisacharid melecitóza a oligosacharidy (dextriny specifické pro med). Přesné složení je shrnuto v tabulce 1. Dextriny a oligosacharidy jsou přítomny zejména v medovicových medech, kde jejich koncentrace bývá až 10%. Nektarové medy obsahují vyšší cukry pouze do 2-3 % (Přidal 2003).

Množství sacharidů lze dle Borawské et al. (2000) rozčlenit následovně: fruktóza (25-45 %), glukóza (25-37 %), maltóza (2-12 %), sacharóza (0,5-3 %) a mnoho jiných cukrů v minimálním množství dle rostlinného zdroje.

Tabulka 1: Složení medu (Titěra 2006)

Složka (v g na 100 g medu; vyjma pH)	Květový (nektarový) med		Medovicový med	
	průměr	min-max	průměr	min-max
Voda	17,2	15-20	16,3	15-20
Jednoduché sacharidy				
fruktosa	38,2	30-45	31,8	28-40
glukosa	31,3	24-40	26,1	19-32
Disacharidy				
sacharosa	0,7	0,1-4,7	0,5	0,1-4,7
ostatní	5	2-8	4	1-6
Trisacharidy				
melecitosa	<0,1		4	0,3-22
erlosa	0,8	0,6-6	1	0,1-6
ostatní	0,5	0,5-1	3	0,1-6
Vyšší sacharidy	3,1	x	10,1	x
Sacharidy celkem	79,7	x	80,5	x
Minerály	0,2	0,2-0,5	0,9	0,6-2
Aminokyseliny, proteiny	0,3	0,2-0,8	1,1	0,8-1,5
Kyseliny	0,5	0,2-0,8	1,1	0,8-1,5
Hodnota pH	3,9	35-4,5	5,2	4,5-6,5

1.2.2 Vlhkost medu

Obsah vody v medu se odvíjí od jeho zralosti, původu a podmínek skladování. Med je hygroskopický produkt, který dokáže pohlcovat vzdušnou vlhkost, při skladování je třeba zabránit dlouhodobějšímu přímému kontaktu se vzduchem. Dle národní legislativy nesmí vlhkost v medu překročit 20 %. Med s vlhkostí nad 22 % je považován za nezralý, s vlhkostí nad 25 % podléhá fermentaci. Naopak při vlhkosti pod 17 % fermentaci nepodléhá a je mikrobiálně stabilní. Obecně platí, že med s nižší vlhkostí je dozrálejší a kvalitnější (Vorlová et al. 2002).

1.2.3 Kyseliny

Kyseliny jsou důležitou součástí medu, zejména organické. Ovlivňují jeho chuť, stabilitu a řadu cenných vlastností. Nejvíce je zastoupena kyselina glukonová, mezi další patří kyselina citronová, kyselina jablečná a kyselina jantarová. V menším množství jsou pak zastoupeny kyseliny: octová, mravenčí, máselná, mléčná, šťavelová, alfa-ketoglutarová a glykolová. I když med obsahuje hodně druhů organických kyselin, celkově jich je malé množství, obvykle se pohybuje přibližně mezi 25-30 mekv/kg medu. Dle množství těchto kyselin lze určit, zda se jedná o pravý med nebo o sirupovou náhražku (Bogdanov 2009).

Kyselost medu lze rozdělit na aktivní a titrační:

Aktivní kyselost určuje hodnota pH**,** kterou lze vyjádřit jako záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových iontů a pohybuje se obvykle v rozmezí od 3,9 do 4,0. Nektarové medy bývají kyselejší (pH i kolem 3,4), než medy medovicové (pH až 6,1). Příčinou menší aktivní kyselosti medovicových medů je vyšší obsah minerálních látek, které působí tlumivě na kyselost. (např. dle Veselého (1985) je možné podle stanoveného obsahu kyseliny salicylové rozlišit medovicový a nektarový med).

Titrační kyselost medu se vyjadřuje, buď v miliekvivalentech (mekv) na kilogram medu, nebo podle soustavy SI v mmol/kg medu a představuje množství volných kyselin titrovatelných roztokem NaOH (Singhal et al. 1997).

1.2.4 Bílkovinné látky

Stoklasa (1975) uvádí, že bílkoviny a peptidy výživově med obohacují, většina z nich je i biochemicky aktivní. Důležitou roli mají bílkoviny v podobě enzymů, které se dostávají do medu z rostlin a z včelích slinných žláz. Nejdůležitějšími enzymy v medu jsou invertáza a diastáza.

Invertáza – štěpí sacharózu na invertní cukr (směs glukózy a fruktózy). Aktivita tohoto enzymu je důležitým ukazatelem kvality medu. Umí svou funkci i obrátit a vytvářet složité cukry z cukrů jednoduchých. Při tomto procesu spotřebovává hlavně glukózu, která je nejméně rozpustným cukrem. Invertáza pracuje optimálně v rozmezí teplot 35-40 °C a pH 5,9-6,1. Při skladování ve 20 °C klesá aktivita invertázy o 4-7 % za měsíc (Přidal 2003).

Diastáza – soubor enzymů štěpících škrob na jednoduché cukry. Rozlišujeme více druhů diastáz: například α-amylázu štěpící škrob na menší dextriny nebo β-amylázu štěpící škrob od konce molekuly za vzniku maltózy. Diastáza je nejvíce aktivní v rozmezí 45-65 ºC a pH 5,6-5,9 (Přidal 2003). Dle Titěry (2006) existuje spojitost mezi aktivitou diastáz a aktivitami dalších biologicky cenných látek, medy s vysokou aktivitou diastázy mají často i vysoký obsah dalších enzymů. K silnému poklesu enzymové aktivity diastázy dochází při ztekucování medu v mikrovlnných troubách.

Další enzymy – Glukózaoxidáza tvoří z glukózy kyselinu glukonovou a peroxid vodíku (Stoklasa 1975). Drašar et al. (1978) zmiňuje enzymy fosfatázy, které štěpí estery kyseliny fosforečné a účastní se získávání energie v metabolismu živých organismů.

1.2.5 Aminokyseliny

Volné aminokyseliny se přímo podílejí na chuti medu, med může obsahovat až 13 různých volných aminokyselin (fenylalanin, lysin, leucin, alanin, valin, arginin, threonin, serin, glycin, cystin, methionin, kyselina asparagová, kyselina glutamová). Průměrné množství aminokyselin v medu se dle Lampeitla (1996) pohybuje u květového medu kolem 277,2 mg/kg, u medovicového medu dokonce kolem 349,6 mg/kg. Podle obsahu a zastoupení aminokyselin můžeme zjistit geografický původ medu.

Nejvýznamnější a nejvíce zastoupenou aminokyselinou je prolin, jehož množství poukazuje na stupeň zpracování nektaru včelami (Montilla et al. 2006). Prolin se proto často používá jako indikátor falšování medu cukernatými roztoky, pravý med by měl obsahovat prolinu minimálně 180 mg/kg medu (Suhaj & Kováč 1999).

1.2.6 Vitamíny a minerální látky

V medu je obsažena celá řada vitamínů, především vitamíny B komplexu (thiamin, riboflavin a kyselina pantotenová) a vitamín C (kyselina askorbová), naopak neobsahuje téměř žádné vitamíny rozpustné v tucích. Švamberk (2003) předpokládá, že většina vitamínů se do medu dostává z pylu, méně potom z nektaru a medovice. Jejich celkové množství je však zanedbatelné. Med může být považován pouze za doplňkový zdroj vitamínů (tabulka 2). U filtrovaných medů (bez pylu) je množství vitamínů ještě mnohem nižší.

Tabulka 2: Obsah vitamínů v medu (Crane 1990)

Vitamíny	Průměrné množství (mg/100 g)	Doporučená denní dávka (mg) [vyhláška 352/2009 Sb.]
B1(thiamin)	0,004 – 0,006	1,1
B2 (riboflavin)	0,002 – 0,06	1,4
B5 (kyselina pantotenová)	0,02 – 0,11	6
B6 (pyridoxin)	0,008 – 0,32	1,4
B7 (H, biotin)	x	0,05
B9 (kyselina listová)	x	0,2
B12 (kobalamin)	x	0,0025
C (kyselina L-askorbová)	2,2 – 2,4	80

Z hlediska obsahu minerálních látek je dle Přidala (2003) v medu nejvíce draslíku, ve stopovém množství i Na, Cu, Ca, Mg, P, S, Zn, Cl, Fe a Si. V medovicovém medu ještě navíc Ag, V, Sn a Mo. Medovicové medy jsou celkově bohatší na minerální látky než medy nektarové (tabulka 3). Pohl (2009) zmínil, že minerální složení medu je přímo závislé na jeho geografickém původu, který koreluje s geologickým podkladem a tudíž s poměrem minerálních látek v půdě. Podle minerálního složení medu lze částečně určit jeho původ.

Tabulka 3: Obsah minerálních látek v medu (Crane 1990)

Minerální látky	Nektarové medy (mg/kg)	Medovicové medy (mg/kg)
K (draslík)	205	1676
Cl (Chlor)	52	113
S (Síra)	58	100
Na (Sodík)	18	76
Ca (Vápník)	49	51
P (Fosfor)	35	47
Mg (Hořčík)	19	35
Fe (Železo)	2,4	9,4
Mn (Mangan)	0,3	4,1
Cu (Měď)	0,3	0,6

Draslík, který může činit až 85 % minerálního zastoupení, je společně se sodíkem v přímořských oblastech zastoupen mnohem více, než v kontinentálních oblastech (Terrab et al. 2003).

1.2.7 Aromatické látky

Více než 150 aromatických látek vytváří typickou chuť a vůni medu přesto, že je jejich koncentrace zanedbatelná. Charakteristické aromatické složky jsou například aldehydy (oktanal, nonanal, dekanal), estery (etylheptonát, etyloktanoát, etyldekanoát), sulfidy (dimetyltrisulfid), alkoholy (heptanol, oktanol, nonanol, dekanol), kyslíkaté aromatické látky (benzaldehyd), étery, ketony (izoforon) a celá řada dalších látek specifická pro rostlinu, na které je sbírán nektar a pyl (Čajka et al. 2009).

1.2.8 Tuky a barviva

V medu je obsaženo jen nepatrné množství tuků. Titěra (2006) odhaduje pouze 150 mg látek tukové povahy v kilogramu medu. Veselý (2003) tuky rozčlenil následovně:

- 44 % esterů cholesterolu
- 21 % triglyceridů
- 18 % volných kyselin
- 17 % volných mastných kyselin (arachidová, kyprylová, laurová, linoleová, oleová, palmitoleová, palmitová a stearová)

Za zbarvení medu může 11-13 barviv dělících se mezi flavonoidy, anthokyany a produkty degradace cukrů. Rostlinná barviva v medu převažují. Z flavonoidních rostlinných barviv byl v medu prokázán kvercetin a rutin.

1.2.9 Kontaminanty

Aby bylo možné mít prospěšný účinek z medu, musí být bez jakýchkoli kontaminujících látek a nečistot, jako jsou například těžké kovy nebo rezidua pesticidů nad přijatelnou úrovní, které se do medu dostávají suchou nebo vlhkou depozicí (Bibi et al. 2008).

Zdrojem toxických látek v medu mohou být i rostliny, které produkují toxiny, jako jsou například vřesovité rostliny (azalky, kyhanky a kalmie) (Stoklasa 1975).

V neposlední řadě může být med kontaminován včelařem během zpracování nebo konečným spotřebitelem.

1.3 Energetická potřeba včel

Dle Bibiho et al. (2008) včely potřebují čtyři přírodní zdroje ke svému přežití. Těmito produkty jsou: voda, pryskyřice, nektar a pyl. Vodu používají k termoregulaci úlu nebo k ředění medu ke krmení larev. Pryskyřice používají k těsnění děr. Nektar je pak hlavním zdrojem sacharidů, ze kterých včely přijímají energii.

Dle Winstona (1987) včely spotřebují na kilometr letu množství nektaru, které odpovídá 0,5 mg zralého medu. Dále odhaduje, že celkové množství medu, které je potřeba k vývoji včelí larvy, činí asi 142 mg. Larvy prodělávají značný vývoj. I v dospělosti včely mění svoji hodnost v úlu, která určuje jejich činnost v rámci společenstva.

1.4 Legislativní předpisy pro med

Med je kontrolován Státní veterinární správou jako každá potravina živočišného původu. Mimo jiného se zjišťuje i přítomnost kontaminujících látek včetně těžkých kovů (Machová 2001). Dříve, dle vyhlášky 298/1997 Sb., spadal med do kategorie potravin typu B, které měly přesně stanoveny maximální limity škodlivých částic (tabulka 4).

Tabulka 4: Maximální koncentrace těžkých kovů v potravinách dle vyhlášky 298/1997 Sb.

Rizikový prvek	Přípustná koncentrace [mg/kg]
As	3
Cd	0,5
Cu	80
Fe	80
Ni	6
Pb	8
Zn	80

Nové vyhlášky již nestanovují žádné maximální limity rizikových prvků v medu. Dle Pavlíkové (2013) Státní veterinární správa i nadále kontroluje koncentrace nejrizikovějších těžkých kovů (Cd, Pb a do r. 2005 As). Řídí se ovšem pouze podle limitů, které stanovuje hlavní hygienik (tabulka 5).

Tabulka 5: Limity pro vybrané prvky stanovené hlavním hygienikem (Pavlíková 2013)

Rizikové prvky	Akční limit [mg/kg]
Cd	0,5
Pb	0,25
As	0,5

Evropská legislativa je k medu stejně benevolentní. Směrnice rady 2001/110/ES obsahuje pouze předpisy o značení medu a rozdělení medu podle vzniku. O limitech nebo nejvyšších přípustných koncentracích těžkých kovů se nezmiňuje. V případě ovoce a ovocných šťáv, které mají k cukernému složení medu nejblíže, jsou maximální limity stanoveny pouze pro Pb a Cd (oboje 0,05 mg/kg).

2 Těžké kovy

2.1 Obecná charakteristika

V mnoha případech se v oblasti znečištění setkáváme s termínem „těžké kovy“, který v tomto případě není zcela vyhovující, avšak v této práci je používán právě tento zažitý termín. Kritériem pro zařazení do skupiny těžkých kovů je hustota, která je stanovena minimálně na 5 g/cm^3. Z biologického hlediska je mnohem výstižnější pojmenování „toxické kovy“, což jsou všechny kovové a polokovové prvky, které mohou v organismu vyvolat toxické (nežádoucí) účinky. Nejznámějším toxickým kovem, který má nižší hustotu než těžké kovy, je hliník (Pitter 1999).

Nejčastěji sledovanými těžkými kovy jsou v abecedním pořadí Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb a Zn (Kalač & Tříska 1998).

Těžké kovy se přirozeně vyskytují v zemské kůře, v přírodě se nerozkládají a vyznačují se latentní toxicitou. Jsou v prostředí neustále přítomné a mohou volně vstupovat do biologických cyklů, kde v závislosti na speciaci tyto cykly různě ovlivňují.

2.2 Včely jako bioindikátor těžkých kovů

Těžké kovy prostupující do organismů mají tendenci se v jejich tělech hromadit. Vzorek získaný z včelích těl vypovídá o lokalitě, ve které byl získán, protože včela má ideální bioindikační vlastnosti, mezi které patří dle Celliho & Maccagnaniho (2003) a Ghiniho et al. (2004) zejména:

- snadná determinace
- vysoká početnost
- pohyblivost a zároveň fixace k danému bodu (jen okolí úlu – několik desítek km^2)
- citlivost k intoxikaci
- kosmopolitní rozšíření
- dostatečná velikost

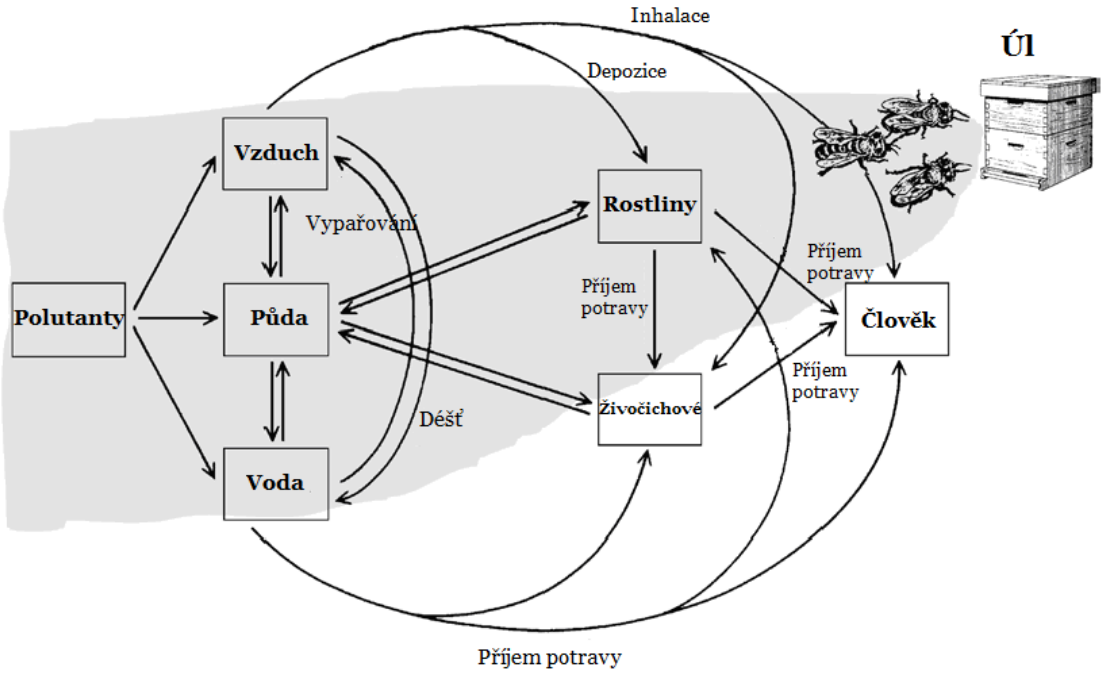
Do určité míry tyto vlastnosti platí i pro jejich produkty, které jsou ovšem tělem organismu přefiltrovány, a mají tím výrazně nižší koncentraci škodlivin. Pro bioindikaci určité oblasti je vždy lepší provádět rozbor přímo z tkání daného

organismu. Ovšem pro konečného spotřebitele je podstatné, že koncentrace škodlivin ve včelích produktech je mnohem nižší než ve včelách samotných (Bogdanov 2006).

Včely nemají podle Weinstocka et al. (2006) po genetické stránce příliš vyvinutý ani imunitní systém proti chorobám, ani obranné mechanismy proti intoxikaci. Spoléhají se především na instinkty a hygienické návyky. Akutní intoxikace, kdy do těla včely vnikne jednorázově vysoká dávka, většinou způsobuje rychlou smrt jedince (např. přímý zásah herbicidním přípravkem). Avšak při chronické intoxikaci (sběr reziduí s nektarem a pylem) včely pravidelně předávají akumulované škodliviny i do svých produktů.

2.3 Cesta těžkých kovů do medu

Porrini et al. (2003) se zabývali vstupem těžkých kovů a pesticidů do životního prostředí a jejich následujícím osudem. Pesticidy jsou chemické sloučeniny vypouštěné do prostoru lidmi a postupem času jsou v životním prostředí rozkládány. Těžké kovy jsou vypouštěny do přírody nejen lidmi z antropogenních zdrojů, ale např. i sopečnou činností, erozí hornin apod. Narozdíl od pesticidů není jejich toxický efekt nijak degradován, pouze mění své místo ve sloučeninách. Pohyb kontaminantů v prostředí znázorňuje obrázek 1.



Obrázek 1: Pohyb znečišťujících látek v prostředí (Porrini et al. 2003)

2.3.1 Z prostředí

Všechny kovy se na Zemi vyskytují přirozeně. Člověk svou činností pouze navyšuje tyto přirozené hodnoty. Podle Peruginiho et al. (2010) se u některých kovů jedná až o 90% podíl antropogenního původu z celkového množství prvku v krajině.

Kontaminace surovin, které včely zapracovávají do svých produktů, může probíhat z ovzduší, z vody, z rostlin nebo z půdy. Podle Porriniho et al. (2003) se těžké kovy mohou do úlu dostat různými způsoby. Přímo ze vzduchu se mohou depozicí ukládat na chlupatá těla včel, které je přenesou do úlu společně s pylem. Tento způsob je znám především pro olovo. Naproti tomu například kadmium bývá absorbováno květinami přes kořeny a včely ho posléze přinesou do úlu v nektaru, vodě nebo medovici. Autor upozorňuje na velký počet proměnných, které mohou ovlivnit transport kovů v krajině a rostlinách (např. počasí, roční období, otevřenost květních obalů atd.).

Rostliny samotné velmi ovlivňují i složení medu, různé rostlinné druhy mají tendenci akumulovat jiné těžké kovy. Dle výsledného rostlinného původu se odvíjí zbarvení medu. González-Miret et al. (2005) zjistili, že tmavší medy obsahují více Cd, Fe a Pb, zatímco ve světlejších typech medu dominuje koncentrace Al a Mg.

Konkrétními případy, kdy dochází ke znečištění prostředí těžkými kovy, jsou podle Kalače & Třísky (1998) zejména:

- větrná eroze polymetalických odpadů ze skládek u kovohutí
- prach z pyrolytických hutních procesů
- průnik do podzemních vod při loužících procesech těžby rud
- spalování uhlí (především hnědého)
- odpadní vody z galvanoven (Ni, Cr, Cd, Zn), koželužen (Cr), brusíren skla (Pb) a složišť popílků
- průmyslová hnojiva spolu s okyselováním půd, které vede ke zvýšené dostupnosti těžkých kovů pro rostliny

2.3.2 Zpracování medu

Během běžného včelařského postupu, kdy se med získává z pláství a stáčí do sklenic konečné spotřeby, přichází med do kontaktu s poměrně vysokým množstvím kovových ploch. Bibi et al. (2008) upozornili na způsob zpracování medu. Je velmi důležité vzít v úvahu typ zařízení pro zpracování medu, stejně jako zařízení pro ukládání medu. Špatné zpracování a skladování je možným zdrojem kontaminace

medu těžkými kovy. Med by neměl být v kontaktu s nerezovými povrchy při sklizni, během zpracování ani při přepravě medu na trh. Takovýto kontakt může navyšovat zejména obsah Cr a med má pak kyselejší chuť. Stejně tak by se med neměl ukládat v pozinkovaných kontejnerech, které mohou působit jako zdroj kontaminace zinkem.

Přehled činností běžného včelařského postupu, kdy může dojít ke kontaminaci medu těžkými kovy je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6: Možná míra kontaminace medu v jednotlivých fázích zpracování

Činnost	Možné kontaminace	Možná míra kontaminace [min. (1) – max. (4)]
Kovové součástky v úlu	Chrom (Cr) Nikl (Ni) Železo (Fe)	1 (takřka bez kontaktu)
Dýmák	Cín (Sn) Chrom (Cr) Nikl (Ni) Zinek (Zn) Železo (Fe)	1-3 (nelze nikdy přesně určit pro mnoho proměnných)
Odvíčkovávání	Chrom (Cr) Nikl (Ni) Železo (Fe)	2 (minimální kontakt)
Stáčení medu	Chrom (Cr) Nikl (Ni) Železo (Fe)	3 (krátký, ale intenzivní kontakt medu s nerezovou plochou)
Filtrování medu	Cín (Sn) Chrom (Cr) Nikl (Ni) Železo (Fe)	3 (krátký, ale intenzivní kontakt medu s nerezovou plochou)
Skladování	Chrom (Cr) Nikl (Ni) Železo (Fe)	4 (možná i silná kontaminace, dle času a teplotním výkyvům)
Šlehání pastovaného medu	Chrom (Cr) Nikl (Ni) Železo (Fe)	3 (krátký, ale intenzivní kontakt medu s nerezovou plochou)

Mezi kovové součásti v úlu patří obvykle hřebíčky zapuštěné ve dřevě, se kterými včely ani jejich produkty většinou do kontaktu nepřicházejí. Dále je zde nerezová síťka, která odděluje jednotlivé nástavky úlu a brání včelí matce, aby procházela z nástavku s larvami (tzv. matečník), do nástavku s medem (tzv. medník).

Během vybírání pláství z úlu jsou včely agresivní. K jejich uklidnění se užívá tzv. dýmák, kovová nádoba, ve které doutná suché dřevo. Při vysokých teplotách může docházet k oxidaci povrchu a kovy mohou být společně s kouřem hnány přímo do úlu. Nerezovým dýmákem může docházet ke kontaminaci chromem, niklem a železem.

Z pocínovaného dýmáku pak ke kontaminaci cínem a z pozinkovaného dýmáku ke kontaminaci zinkem.

Odvíčkování medu probíhá na tzv. talíři k odvíčkování pomocí vidličky či nože na odvíčkování, kdy se plástve zbaví voskové vrstvy, která by bránila vytékání medu. Obě pomůcky jsou vyráběny z nerezové oceli. Alternativní variantou je plastový váleček na odvíčkování.

Vlastní stáčení medu probíhá v sudovém medometu, kde se pomocí odstředivé síly med dostává z pláství na nerezové plochy jeho vnitřní strany, po kterých volně stéká do připravené nádoby. Právě v této části je jedna z největších možností kontaminace Cr, Ni a Fe z nerezové plochy. U některých včelařů se starším typem medometů je možnost kontaminace i jinými kovy.

Filtrování se provádí přes několik cedníků o různé velikosti ok. Med skrze ně protéká a může zde dojít také ke kontaminaci těžkými kovy z nerezu nebo cínem z pocínované varianty cedníku. Existují také plastová provedení cedníků.

Ke skladování medu mohou sloužit libovolné kontejnery a nádoby. Ze včelařských potřeb jsou to zejména barely s plnícím kohoutem k dávkování do sklenic. Tyto barely mohou být plastové nebo nerezové. V závislosti na čase stráveném v tomto barelu a fyzikálních vlivech (zejména teplotních výkyvech) by mohlo docházet i ke značné kontaminaci medu.

Pastovaný med je varianta medu, při které se mícháním se vzduchem dosahuje pastové konzistence. K míchání se v domácích podmínkách používají nerezové hranoly nebo spirály připojené na vrtačku, nekovovou variantou je dřevěný hranol. Pro snadnější zpracování větších množství medu existují i speciální nerezové pastovací přístroje.

2.4 Zkoumané prvky

V současné době nelze zamezit pronikání těžkých kovů do stravy, vody, vzduchu. Nicméně, je možné se snažit minimalizovat jejich kontaminaci. Navíc jsou některé z těchto kovů ve stopovém množství nezbytné pro udržení metabolismu lidského těla, tyto prvky jsou v tabulce 7 označeny jako „biogenní“ (Bibi et al. 2008). Kovy s označením „toxický“ jsou pro živočichy škodlivé v jakémkoli množství a speciaci.

Tabulka 7: Seznam měřených těžkých kovů

Název kovu (značka)	Hustota (g/cm^3)	Toxicita
Chrom (Cr)	7,15	Biogenní
Kadmium (Cd)	8,65	Toxický
Měď (Cu)	8,96	Biogenní
Nikl (Ni)	8,90	Biogenní
Olovo (Pb)	11,34	Toxický
Zinek (Zn)	7,14	Biogenní
Železo (Fe)	7,86	Biogenní

2.4.1 Kadmium (Cd)

Kadmium je relativně vzácný prvek s významnými toxikologickými vlastnostmi. Toxicita kadmia spočívá v podobných chemických vlastnostech, jako má zinek, který může v těle nahrazovat. Váže se na proteiny s SH-skupinou, které jsou obsaženy především v játrech, ledvinách a krevních buňkách (Kalač & Tříska 1998).

Velíšek (2002) tvrdí, že průměrná roční světová produkce kadmia činí zhruba 20 000 tun. Perugini et al. (2010) odhadl antropogenní produkci na 85-90 % z celkového množství kadmia ve vzduchu.

Dle Kalače & Třísky (1998) patří mezi hlavní zdroje znečištění životního prostředí kadmiem těžba a úprava rud, pokovování, výroba fotovoltaických článků a plastických hmot, spalování fosilních paliv a hnojení minerálními hnojivy.

Horák (2004) poukazuje na fakt, že míra toxicity Cd ve formě kovu a kademnatých solí souvisí se způsobem jeho vstupu do těla. Mnohem toxičtěji se projeví při inhalaci než při perorálním požití. Proto problém spojený s nadbytkem Cd může postihnout zejména kuřáky, kteří jeho vysoké dávky inhalují v tabákovém kouři. Množství kadmia v krvi kuřáka může být v porovnání s krví nekuřáka až dvojnásobné. Dle Velíška (2002) může Cd při nadměrném příjmu odvápňovat kosti.

2.4.2 Olovo (Pb)

Perorální vstřebatelnost olova je pouze 10%. Problém může nastat u dětí, které jsou schopny vstřebat až 50 % přijatého olova. Vstřebatelnost olova může být zvýšena i vyšším příjmem bílkovin (Velíšek 2002). Protože med obsahuje jen velmi malé množství bílkovin, nepředpokládá se nebezpečí vysoké vstřebatelnosti.

Olovo reaguje s atomy síry a dusíku, čímž ovlivňuje funkce některých enzymů. Také má tendenci se hromadit ve tkáních. Zejména v kostní dřeni, kde nahrazuje atomy

vápníku a snižuje krvetvorbu, což může vést až k anémii (Kalač & Tříska 1998). Obzvláště nebezpečné formy jsou podle Horáka (2004) oxidy a soli olova, dalšími nebezpečnými formami jsou organokovové sloučeniny, např. tetraethylolovo. Průměrná koncentrace olova, která může způsobit otravu dospělého člověka, je odhadována na 2,56 mg/kg v potravě a 0,2 mg/m^3 ve vzduchu (Prokeš 2005).

Kalač & Tříska (1998) odhadují přirozený roční únik Pb do životního prostředí na 180 000 tun. Přesto je to jen zlomek oproti pěti milionům tun antropogenního původu. Základními antropogenními vstupy Pb do životního prostředí jsou těžba a úprava železných a neželezných rud, spalování uhlí, topných olejů, odpadů a dřeva, a další zdroje. Před rokem 1989 byla dominantním zdrojem motorová paliva, jejichž spalování produkovalo asi 60 % emisí olova.

Olovo se v atmosféře váže na prachové částice, usazuje se s nimi a následně je deponováno na rostlinách, do půdy nebo do vody. Zvýšená hladina olova ve vodních ekosystémech je způsobena spíše těžebními aktivitami, ze kterých se olovo dostává do okolního sedimentu, ve kterém se akumuluje.

Perugini et al. (2010) ve své studii dokázali typickou návaznost na antropogenní rozvoj regionů. To znamená, že olovo se v nejvyšších koncentracích vyskytuje ve městech, průmyslových oblastech a v oblastech s vysokým dopravním zatížením. V těchto oblastech je dle Velíška (2002) koncentrace vyšší až v řádu desetinásobků než v přírodních oblastech. Zdokonalování katalyzátorů a používání bezolovnatého benzínu vedlo k výraznému poklesu koncentrace olova v přírodě i v medu za posledních 20-30 let.

2.4.3 Chrom (Cr)

Chrom je v životním prostředí poměrně rozšířený. V trojmocné podobě je Cr významným biogenním prvkem, jehož deficit může vyvolat i diabetes. Naopak šestimocná forma je pro člověka velmi nebezpečná. Jedná se především o anorganické sloučeniny, které tělo vstřebává mnohem snadněji než trojmocné a mohou způsobit např. silné otoky (Velíšek 2002).

Chrom se uvolňuje do atmosféry jak z přírodních, tak i z antropogenních procesů. Odhaduje se, že se přibližně 75 000 tun ročně uvolní do atmosféry v důsledku antropogenních činností, které představují 60-70 % celkových emisí Cr. Dalších asi 54 000 tun Cr je každoročně uvolněno do životního prostředí samovolně prostřednictvím přírodních procesů. Obecně platí, že koncentrace Cr v konkrétním čase

na konkrétním místě závisí na intenzitě průmyslových procesů v blízkosti a na meteorologických faktorech. Atmosféra je hlavní cestou pro dálkový přenos Cr do různých ekosystémů (Perugini et al. 2010).

Za hlavní antropogenní zdroje Cr v životním prostředí je považována výroba oceli spolu s galvanickým chromováním povrchů a používáním chemikálií v kožedělném průmyslu a z nátěrových hmot (používaných např. jako ochranné nátěry dřeva).

2.4.4 Železo (Fe)

Železo je nejrozšířenějším kovem na Zemi, zároveň se v přírodě vyskytuje pouze ve sloučeninách. Jako základní stavební kámen hemoglobinu pomáhá plnit v lidském těle funkci přenosu kyslíku. Lidské tělo ho dokáže přijmout v dvojmocné a trojmocné podobě. Většinu železa jsou lidé schopni reabsorbovat, proto stačí denní příjem pouze 10-20 mg. Smrtelná dávka se pohybuje až v desítkách gramů. Velmi toxické formy Fe jsou jeho karbonyly (Prokeš 2005).

2.4.5 Nikl (Ni)

Nikl je velmi obtížně vstřebatelný kov, zhruba jen 10 % prvku dokáže lidské tělo vstřebat po perorálním požití, avšak při nedostatku Fe může vstřebatelnost narůst až na 20 %. Nikl není pro živočichy příliš významným prvkem, slouží pouze k aktivaci některých enzymů a pravděpodobně se podílí na zlepšení absorpce Fe (Velíšek 2002).

Horák (2004) i Prokeš (2005) řadí Ni mezi toxikologicky nejvýznamnější těžké kovy, zejména veškeré nikelnaté soli a oxidy. Za nejnebezpečnější formu označují tetrakarbonyl nikl [$Ni(CO)_4$], což je těkavá a snadno inhalovatelná látka schopná dráždit pokožku i dýchací ústrojí. Dle Velíška (2002) souvisí míra toxicity niklu s bránou jeho vstupu do těla.

2.4.6 Zinek (Zn)

Zinek je stejně jako Fe biogenním prvkem, jehož příjem dokáže tělo do značné míry regulovat. Doporučený denní příjem Zn se pohybuje kolem 25 mg. V organické formě lze Zn většinou nalézt jako fytát, ze kterého se obtížné vstřebává. Zinek má podobné vlastnosti jako Cd, Hg a Pb, které ho mohou nahrazovat. Naproti tomu zinečnaté soli mohou být značně toxické (např. smrtelná dávka $ZnSO_4$ byla stanovena na 10 g) (Prokeš 2005).

2.4.7 Měď (Cu)

Měď je dalším z řady biogenních prvků. Stejně jako u Fe a Zn umí tělo příjem do určité míry regulovat. Cu^{2+} tvoří součást enzymů, při nedostatku tohoto iontu se snižuje schopnost přijímat Fe^{2+} potravou. Denně bychom měli přijmout 2-5 mg Cu^{2+} (Prokeš 2005). Dle Velíška (2002) se s deficitem mědi u člověka setkáváme jen velmi vzácně.

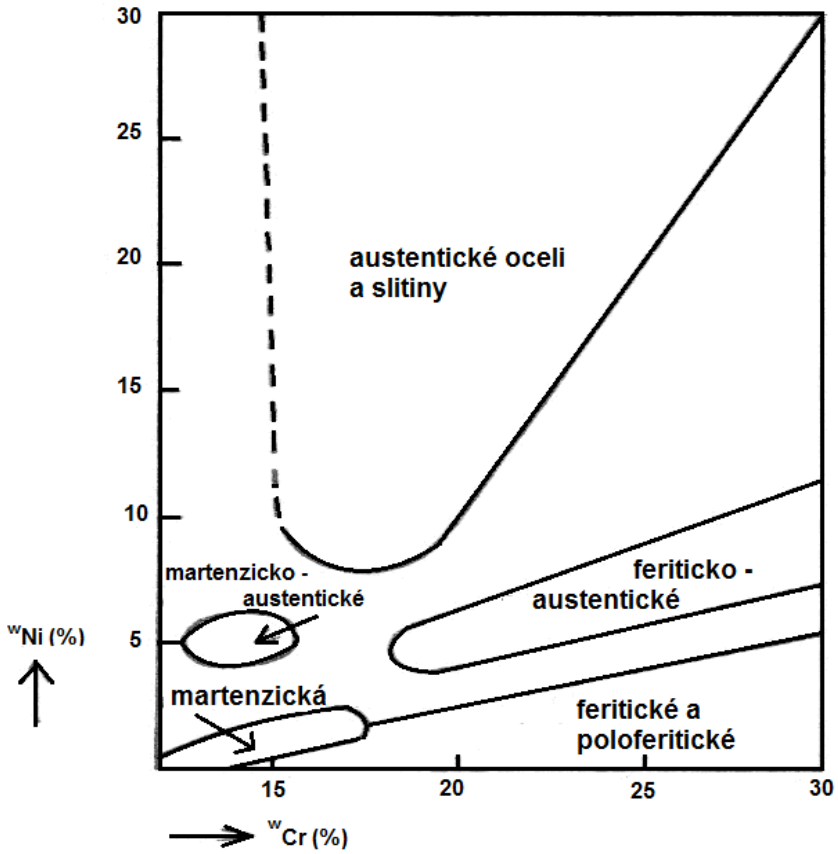
3 Korozivzdorná ocel

Norma EN 10088 definuje nerezavějící oceli jako slitiny na bázi železa, které obsahují nejméně 10,5 % chromu a maximálně 1,2 % uhlíku. Existuje celá skupina nerezových slitin, jejichž hlavním legujícím prvkem kromě chromu bývá nikl, který může být zastoupen až 38 %. Vlastnosti slitin lze měnit v závislosti na obsahu dalších prvků (C, S, Al, Mo, W, N, Cu, Ti, Nb, Zr, C, Mn, Ca a Si).

Hlavní složkou však zůstává Cr, který je zastoupen obvykle 10,5 % – 20 %. Jeho funkcí je pasivace povrchu oceli, která se stává korozivzdornou. Další prvky ve slitině tuto vlastnost chromu ještě umocňují. Světová produkce nerezové oceli v roce 2009 dosáhla 24,6 milionů tun, tedy výrazně méně než například v roce 2006, kdy byla dokonce 28,4 milionů tun (Santonen et al. 2010).

Korozivzdorné oceli jsou z pohledu chemického složení rozděleny dle normy EN 10088 do tří základních skupin (Obrázek 2):

- Feritická (Cr mezi 13 a 30 % a C pod 0,1 %, není kalitelná, má vysokou pevnost, ale je křehká)
- Martenzitická (Cr do 18 %, C do 1,5 %, nejodolnější, vhodné k činnostem za vysokých teplot)
- Austentická (vysokolegovaná, je stabilní za normálních teplot a za mrazu, využívá se hlavně v potravinářském průmyslu)



Obrázek 2: Rozdělení korozivzdorných ocelí dle podílu chromu a niklu (Číhal 1999)

3.1 Uvolňování prvků z korozivzdorné oceli

Nejvíce zkoumaným prvkem, který se z korozivzdorné oceli může uvolňovat je Nikl. Niklu je připisován podíl na mnoha zdravotních problémech, zejména na alergických kontaktních dermatitidách, avšak různými povrchovými úpravami korozivzdorné oceli lze jeho uvolňování regulovat (Santonen et al. 2010).

Hedberg et al. (2010) provedli standardní test dle normy EN 1811, zaměřený na uvolňování Ni z nerezové oceli do umělého potu (velikost částic <45 µm a jemných částic <4 µm). Neprokázali nadměrné louhování Ni do roztoku, ale zjistili, že při větším zastoupení síry v korozivzdorné oceli se z ní Ni uvolňuje snadněji. Haudrechy et al. (1994) ve své studii zjistili, že při snížení pH umělého potu z 6,6 na 4,5 se množství uvolněného niklu téměř zpětinásobilo.

Existuje mnoho faktorů, které pravděpodobně mají vliv na uvolňování Cr a Ni z korozivzdorných ocelí do kyselých potravin. Nejdůležitější jsou dle Stoewsanda et al. (1979): velikost vystavené plochy, pH potravinářského výrobku, teplota, doba kontaktu, typ slitiny nerezavějící oceli, přítomnost organických chelatačních složek v potravinách (např. kyselina citronová).

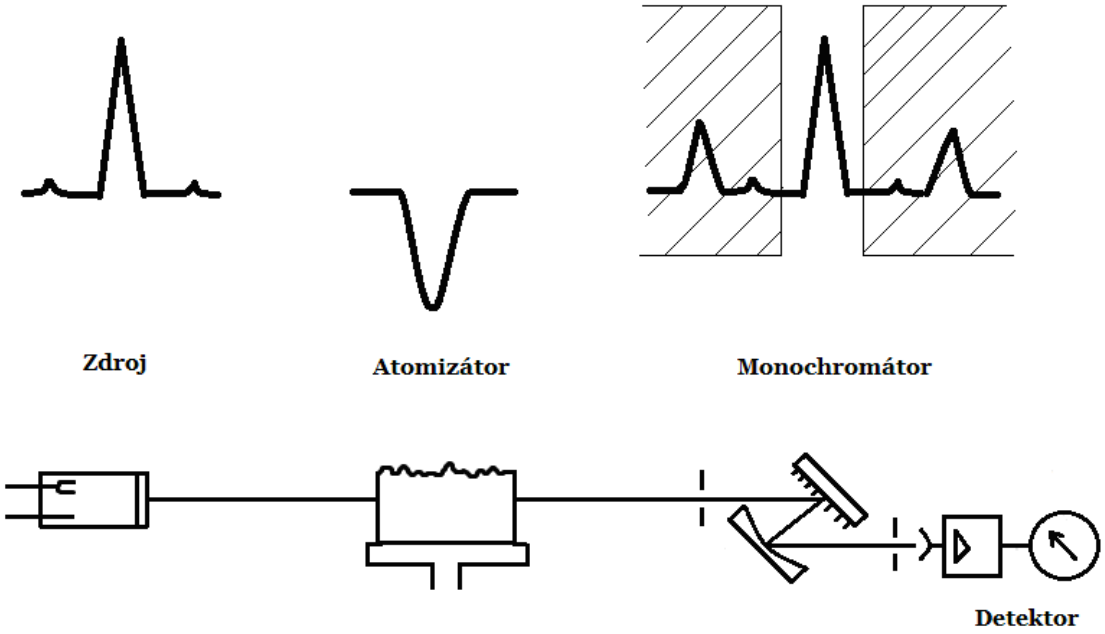
Kyselina citrónová se v medu přirozeně vyskytuje, nicméně mnoho testů dokázalo nízké uvolňování složek z korozivzdorné oceli. Lze proto předpokládat, že biologická dostupnost těchto látek bude také velmi nízká. I uvolňování Ni a Cr přímo z nádobí do slin je zanedbatelné ve srovnání s průměrným denním příjmem těchto prvků z potravy. Dokonce ani implantátům z korozivzdorné oceli k fixování zlomenin, které přichází do přímého kontaktu s tkání, nebyl prokázán toxický účinek. Důvodem je patrně tisíckrát nižší uvolňování Ni z korozivzdorné oceli, než přímo z nikelnatých slitin (Santonen et al. 2010). Dle Hertinga et al. (2008) je uvolňování Ni z nikelnatých slitin dokonce pěttisíckrát vyšší než z nerezové oceli. Uvolňování Cr z korozivzdorných i z chromových ocelí je obdobné.

V neutrálním pH dle Santonena et al. (2010) nedochází k žádnému uvolňování kovů z korozivzdorné oceli. Nejvyšší rozpustnost pak Cr, Ni i Fe mají v kyselém prostředí, Fe má rozpustnost konstantní, Cr se lépe rozpouští ve slabě kyselých potravinách (pH 6-7) a Ni v kyselejších potravinách (pH 3,5-4).

4 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Atomová absorpční spektrometrie je založena na měření absorpce charakteristického monochromatického záření volnými atomy určitého prvku v základním stavu v plynné fázi. Touto metodou lze měřit více než 60 různých prvků. Celá metoda stojí na Kirchhoffově principu, který říká, že atom emitující určité záření je schopen záření o stejné vlnové délce i absorbovat. (Komárek 2000).

AAS je soustava, kterou prochází světelný paprsek od zdroje až k detektoru. Schéma znázorňuje obrázek 3.

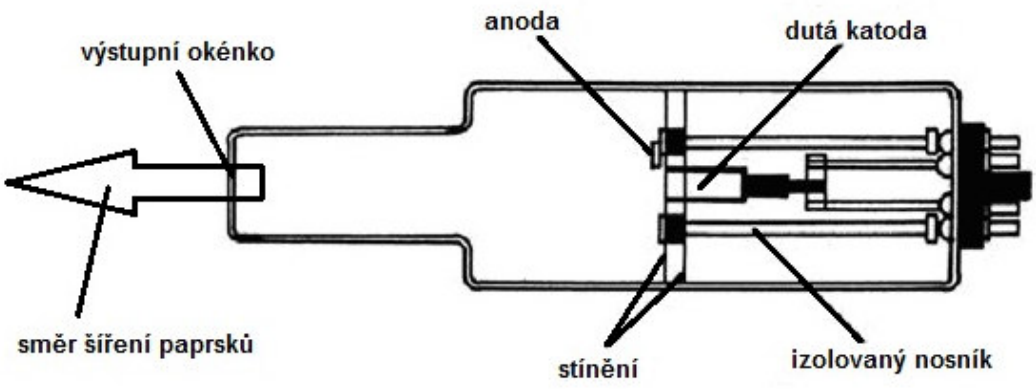


Obrázek 3: Schéma AA spektrometru, v horní části jsou energetické hladiny – emitující u zdroje, absorbující u atomizátoru a propuštěné vlnové délky skrz monochromátor (Komárek 2000)

4.1.1 Zdroj záření

Jako zdroj světla nejčastěji slouží výbojky s dutou katodou. Jsou zhotoveny z optického skla se zatavenými elektrodami, výstupní okénko paprsku je vyrobeno z optického křemene. Dutá katoda je vyrobena z velmi čistého materiálu prvku, který má být lampou stanovován (Obrázek 4). Celá výbojka je vyplněna monoatomickým plynem (Ne nebo Ar). Toto všechno zajišťuje intenzivní a stabilní záření výbojky. Samotné elektrody jsou vyrobeny z kovů s vysokou teplotou tání (W, Zr, Ti, …), aby vydržely doutnavý výboj, ke kterému dochází vložením elektrického napětí na anodu

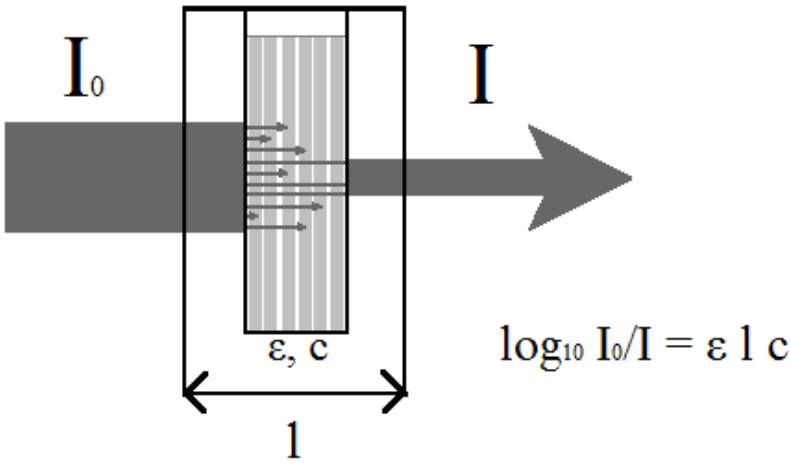
a katodu. Napětí v rozmezí 200-600 V umožňuje excitaci atomů velmi čistého prvku na katodě. Při navracení excitovaných elektronů do základního stavu je uvolněna energie, která je zde doprovázena emisí záření o úzkém rozsahu vlnových délek, charakteristického pro daný prvek (tzv. čárový zdroj záření). Záření ze zdroje je nasměrováno do atomizátoru (Černohorský & Jandera 1997).



Obrázek 4: Schéma duté výbojky (Černohorský & Jandera 1997)

4.1.2 Atomizátor

Prvky mohou být analyzovány pouze v podobě základních atomů. K převedení analyzovaného roztoku na aerosol slouží nebulizér, který následně dopravuje tento aerosol do atomizátoru. K samotné atomizaci je potřeba vysoké množství tepelné energie, která rozbije vzorek aerosolu na jednotlivé atomy v plynném stavu. Pouze v tomto (základním) stavu jsou atomy schopny absorbovat lampou emitované záření. Takovýchto teplot dosáhneme v plameni nebo v grafitové kyvetě. Aby nedošlo ke vznícení grafitové kyvety, je neustále promývána argonem, který brání přístupu kyslíku. Vzniklým mrakem atomů v plynné fázi prochází záření z výbojky s dutou katodou. Jak již bylo řečeno, tyto lampy jsou vyrobeny z čistého prvku a vyzařují záření, které může absorbovat pouze stejný prvek v základním stavu. V atomizéru dochází k absorpci záření přímo úměrně koncentraci analytu ve vzorku dle principu Lambert-Beerova zákona, který je vyznačen na obrázku 5. To znamená, že skrz atomizér projde právě o zachycené množství záření méně, než do něho vstoupilo (Komárek 2000).



Obrázek 5: Lambert-Beerův zákon při průchodu záření atomizérem

Dnes se využívá spíše atomizace za pomoci grafitové kyvety, která potřebuje mnohem méně analytu, nemá tak dlouhou optickou dráhu a lze odporovým ohřevem regulovat teplotu. Teplotu při atomizaci v plameni udává směs použitých plynů, kterou obvykle tvoří acetylen a vzduch (podle poměru plynů lze dosáhnout teplot 2100-2400°C).

4.1.3 Monochromátor a detektor

Monochromátor je optická soustava čoček nebo zrcadel, která má za úkol propustit k detektoru pouze záření o požadovaných vlnových délkách. Čím více optických částí je použito k selekci vlnové délky, tím větší jsou ztráty intenzity záření, což způsobuje zvýšení limitů detekce. Proto se dnes používají odrazová konkávní zrcadla, která mají v porovnání s čočkami zhruba poloviční ztráty.

Propuštěné záření dopadá na detektor, kterým je obvykle fotonásobič. Konstrukčně je fotonásobič evakuovaná skleněná baňka s elektrodami (dynodami), jejíž funkcí je převod impulzů z dopadajících fotonů na elektrický proud. Princip činnosti fotonásobiče spočívá v kaskádovitém znásobení počtu elektronů. Jednotlivé fotony z paprsku, který dopadá na světlocitlivou vrstvu fotokatody, a z ní uvolňují při fotoelektrickém jevu elektrony. Uvolněné elektrony jsou urychleny elektrickým polem a přitaženy k první z dynod. Dopad elektronu na dynodu způsobí uvolnění několika dalších elektronů (max. 4), které jsou znovu urychleny elektrickým polem a dopadají na další dynodu. Ve fotonásobiči obvykle bývá 9-13 dynod, za kterými následuje anoda, generující z dopadajících elektronů proudový signál, který je počítačově vyhodnocen (Černohorský & Jandera 1997).

4.1.4 Interference

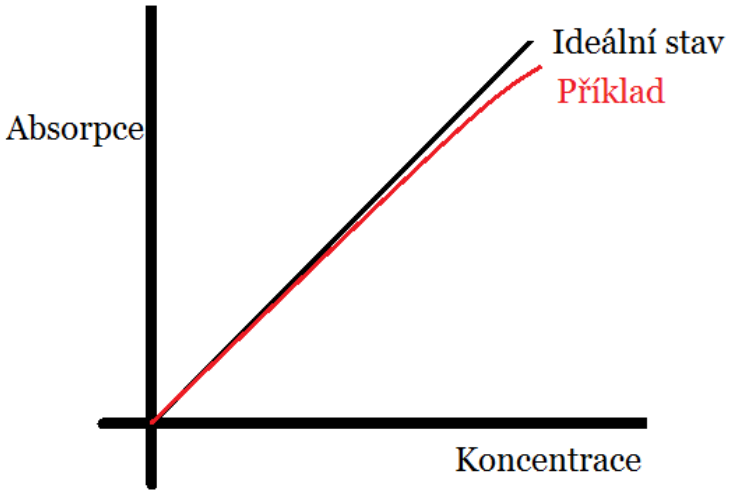
V zásadě by mělo platit pravidlo o přímé úměře koncentrace analytu a změřeném úbytku záření (odpovídající měřenému počtu atomů v základním stavu). Cokoli narušuje tuto úměrnost je nazýváno interferencí. Interferencemi mohou být například:

- absorpce pozadí
- absorpce záření jinými prvky
- vznik iontů při dodání nadměrné energie
- ztráty během transportu analytu vlivem vyšší viskozity

Absorpce pozadí (tzv. nespecifická absorpce) je v AAS nejčastějším rušivým aspektem. K minimalizaci vlivu absorpce pozadí slouží tzv. korekce pozadí. Její nejpoužívanější metodou je simultánní korekce, která využívá kontinuálního zdroje záření. Pro UV oblast spektra, kde dochází k největším ztrátám, je tímto zdrojem deuteriová výbojka. Princip spočívá ve střídání čárového a kontinuálního zdroje v optické dráze spektrometru. Čárový zdroj (výbojka s dutou katodou) slouží k měření absorpce vybrané vlnové délky, a kontinuální zdroj (deuteriová výbojka) k měření absorpce pozadí v měřeném spektrálním intervalu.

Další významnou interferencí může být tzv. paměťový efekt (zbytek posledního vzorku v transportní cestě může ovlivnit nové měření). K minimalizování tohoto jevu je transportní dráha po každém měření propláchnuta destilovanou vodou.

Ke zjištění neznámé koncentrace se užívá metoda kalibrační křivky. Kalibrační křivka je sestavená z výsledků měření řady vzorků o známé koncentraci, která by měla vykazovat přímou úměrnost mezi koncentrací měřeného vzorku a hodnotou signálu. Při vyšších koncentracích však dochází i k větším interferencím při měření, výsledkem bývá křivka, která je naznačena na obrázku 6 (Černohorský & Jandera 1997, Komárek 2000).



Obrázek 6: Kalibrační křivka (ideální x reálná)

Praktická část

5 Metodika

5.1 Použité chemikálie a pomůcky

- deionizovaná voda
- 5% HNO_3 čistoty p.a.+ (Analytika, Praha, CR)
- 65% HNO_3 čistoty p.a.+ (Analytika, Praha, CR)
- 30% H_2O_2 čistoty p.a.+ (Analytika, Praha, CR)
- plyn argon (Argon 5,1 SIAD, Braňany, Česká Republika)
- křemenné kelímky do muflové pece
- křemenné reakční nádobky pro MW 3000
- použité laboratorní pomůcky i vzorkovací nádobky byly vyrobeny z plastu a před použitím byly všechny kusy důkladně vylouhovány 5% HNO_3

5.2 Použité přístroje

- analytické váhy Kern ABS 120-4 (Kern a Sohn, Balingen, Německo)
- vodní lázeň Julabo MB-5 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Německo)
- sporák Eta 2107 (Hlinsko, Česká republika)
- muflová pec MSK 030 (MAT, Ostrava, Česká republika)
- mikrovlnný reaktor Multiwave 3000 (Anton Paar, Graz, Rakousko)
- atomový absorpční spektrometr AAnalyst 400 s grafitovou kyvetou HGA 900 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)
- software WinLab 32 AA od firmy Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA)

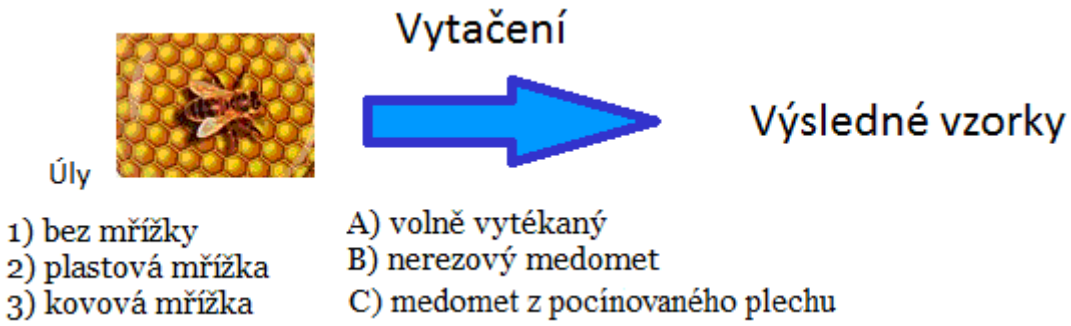
5.3 Analýza vzorků medu

5.3.1 Příprava vzorků

Vzorky medu v různých stádiích zpracování byly získány od chovatele z Libereckého kraje České republiky. Celkem bylo analyzováno 9 typů vzorků, označených kombinací čísla a písmene (schéma rozdělení na obrázku 7). Všechny typy vzorků byly připraveny ve třech opakováních.

Dřevěné úly jsou rozděleny na části sloužící k akumulaci medu (medník) a vývoji larev (matečník). Přechod mezi těmito částmi může být ponechán volný (bez mřížky), ale obvykle je oddělen mřížkou z různých materiálů, aby se zamezilo průchodu včelí matky do medníku, v jehož plástvích by stejně došlo při stáčení medu k úhynu plodu. Označení vzorku číslem ukazuje na použité oddělení medníku a matečníku (mřížkou/bez mřížky).

Med z rámů se stáčí v medometech, písmeno označuje druh použitého medometu. Vzorky označené jako „A“ nebyly stáčeny, ale med byl pouze ponechán, aby samovolně z plástů vykapal.



Obrázek 7: Schéma rozdělení vzorků medu

Ke zklidnění včel byl použit dýmák. Po odmetení včel z rámů malým smetáčkem byl nástavek převezen do místa zpracování, kde byla nerezovými vidličkami na odvíčkování narušena vrchní vosková vrstva. Následně byl rámeček vložen do medometu, kde byl med odstředivou silou, vznikající pravidelným otáčením v bubnu, vytočen na stěny medometu, po kterých volně stékal. V této části byly použity dva typy medometu. Modernější medomet vyrobený z korozivzdorné oceli, ze které by se mohly uvolňovat Fe, Cr a Ni. Materiál, ze kterého byl vyroben druhý typ medometu, není zcela znám, pravděpodobně se jedná o pocínovaný plech, ze kterého by se mohly do medu uvolňovat především Sn a Pb.

Po stočení byly z medu odstraněny hrubé nečistoty filtrací přes nerezové síto. Získané vzorky byly před zpracováním a analýzou skladovány v plastových nádobách při pokojové teplotě.

5.3.2 Úprava vzorků

Před vlastní analýzou je potřeba ze vzorku odstranit vodu a organické složky matrice, analyzuje se zbylá anorganická (minerální) složka. Pro tuto úpravu byly použity dva odlišné postupy:

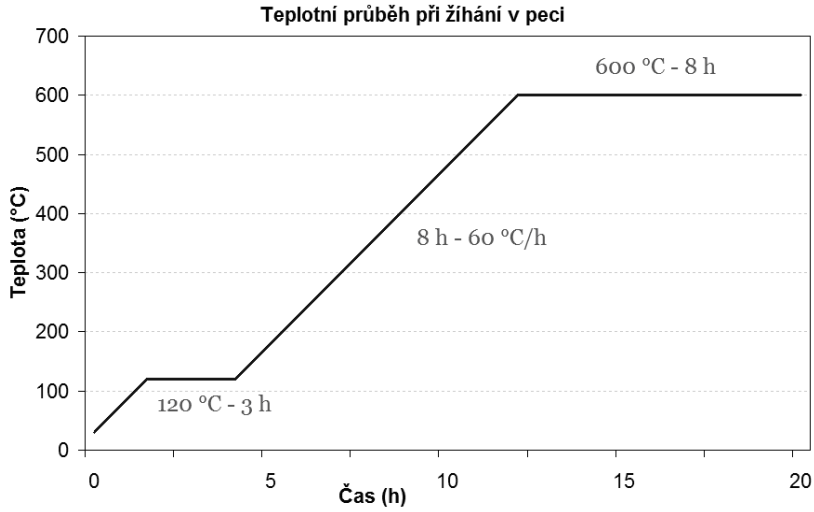
- mineralizace v muflové peci
- mineralizace v mikrovlnném reaktoru MW 3000

5.3.2.1 Mineralizace v muflové peci

Nejprve byly vzorky medu zkapalněny zahříváním na 40 °C ve vodní lázni. Poté bylo na analytických vahách naváženo přibližně 5 g vzorku do křemenného kelímku, který byl uzavřen a za účelem odstranění vody pomalu zahříván na sporáku. Po odpaření vody byly kelímky se vzorky umístěny do muflové pece.

Muflová pec pracovala v následujícím programu: Teplota byla nejprve zvyšována rychlostí (60 °C/h) až na teplotu 120 °C, která byla udržována následující 3 hodiny k odpaření případných zbytků vlhkosti. Po vysušení byla teplota opět zvyšována stejnou rychlostí (60 °C/h) po dobu osmi hodin až na hodnotu 600 °C, která byla udržována po dalších osm hodin.

Vzorky byly odebrány z pece po ochlazení na laboratorní teplotu. Grafický záznam programu je na obrázku 8.



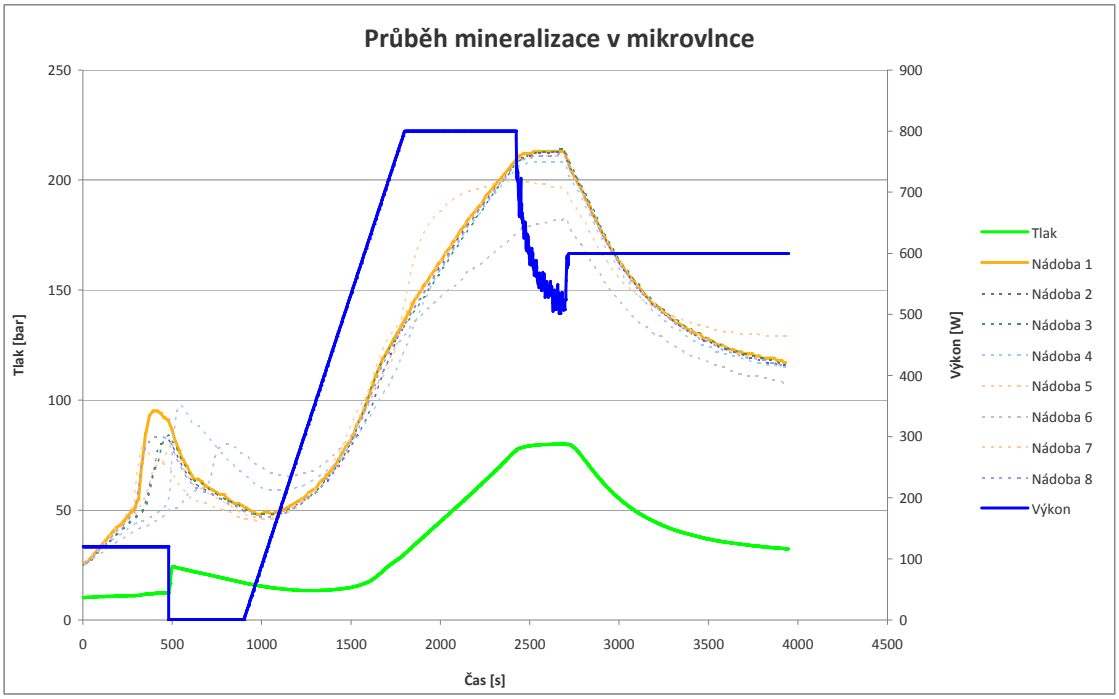
Obrázek 8: Teplotní program nastavený v muflové peci

Po mineralizaci nevykazovaly zpopelněné vzorky žádné významné zbytky organického materiálu (bílý popel a čisté roztoky). Popel ze všech vzorkovacích nádob byl rozpuštěn v 1% HNO_3, převeden do odměrných baněk a doplněn na 25 ml objemu.

5.3.2.2 Mineralizace v mikrovlnném reaktoru

Vzorky byly připraveny navážením přibližně 2 g medu do křemenné reakční nádobky, k navážce byly přidány 3 ml koncentrované HNO_3 a 1 ml 30% H_2O_2. Následně byly nádoby tlakotěsně uzavřeny a umístěny do rotoru mikrovlnného systému.

Program mineralizace byl stanoven následovně: nejprve měl mikrovlnný systém výkon 120 W, který byl udržován 8 minut. Během této doby dochází pouze k mírnému zahřívání vzorků, které nastartuje spontánní oxidační reakce. Tyto reakce jsou prudké a exotermické, provází je nárůst tlaku v nádobách po oxidaci organické hmoty. V dalším kroku byl výkon snížen na 0 W po dobu 7 minut, aby všechny spontánní reakce volně proběhly. Následovalo lineární navyšování výkonu po dobu patnácti minut až na 800 W, který byl dalších 10 minut udržován. Následovalo pětiminutové snižování výkonu na 600 W. Tento výkon byl pak udržován 20 minut. Po procesu mineralizace byly vzorky další hodinu ochlazovány přímo v reaktoru Multiwave 3000. Grafický záznam průběhu je znázorněn na obrázku 9**.**



Obrázek 9: Záznam procesu mineralizace v mikrovlnném reaktoru

Mineralizované vzorky byly přeneseny do 10 ml odměrné baňky a jejich objem doplněn 5% HNO_3 na 10 ml.

5.3.3 Měření

Mineralizované vzorky byly analyzovány pomocí atomové absorpční spektrometrie s elektrotermální atomizací v grafitové kyvetě. Teplotní programy pro analýzu jednotlivých prvků byly použity standardní, podle továrního nastavení výrobcem. Data byla sbírána a vyhodnocována softwarem WinLab 32 AA.

6 Výsledky a diskuze

Cílem výzkumu bylo zjistit, dochází-li během zpracování medu k jeho kontaminaci těžkými kovy. Studie jiných autorů prokázaly, že těžké kovy se kumulují v tělech včel a do medu tak přecházejí v omezené míře (Conti & Botre 2001, Porrini et al. 2003, Bogdanov 2006). Z toho vyplývá, že koncentrace těžkých kovů v medu není primárně příliš vysoká a každá dodatečná kontaminace se výrazněji projeví.

V této práci byl analyzován obsah celkem sedmi kovových prvků ve vzorcích medu, byly to Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb a Zn. Chrom, nikl a železo jsou obsaženy v nerezové oceli nástrojů používaných při zpracování medu, mohly by proto navyšovat své koncentrace v konečném produktu. Kadmium, měď, olovo a zinek nebývají v materiálech použitých včelařských pomůcek obsaženy, proto by jejich koncentrace v medu měla být neměnná.

Výsledky obsahu Zn nejsou uvedeny, neboť při analýze dat byla objevena závada na lampě. Obsah kadmia a olova se nacházel pod limitem stanovitelnosti, proto pro ně nebylo možné provést porovnání.

6.1 Porovnání způsobů mineralizace

Vzhledem k velkým rozdílům v požadavku na množství vzorku a časové náročnosti procesu mineralizace byly nejprve porovnány oba způsoby mineralizace vzorků. Porovnání výsledků je provedeno na zbývajících čtyřech stanovitelných prvcích (Cr, Cu, Fe a Ni). Vzorky mineralizované v mikrovlnném reaktoru vykazují vyšší obsah stanovovaných prvků a lepší reprodukovatelnost měření, přehled výsledků obou metod je uveden v tabulce 8.

Tabulka 8: Porovnání metod mineralizace

Vzorek		Muflová pec		Mikrovlnný reaktor	
		Koncentrace ± SD (µg/kg)	RSD [%]	Koncentrace ± SD (µg/kg)	RSD [%]
2C	Ni	83,93 ± 1,91	2,28	206,01 ± 4,12	2,00
	Fe	851,99 ± 46,40	5,45	1021,84 ± 52,40	5,13
	Cu	47,78 ± 19,00	39,77	195,24 ± 5,27	2,70
	Cr	150,29 ± 110,92 *	73,80	27,15 ± 3,61	13,30
3B	Ni	16,47 ± 8,18	49,66	104,47 ± 26,12	25,00
	Fe	897,24 ± 264,89	29,52	1334,90 ± 98,33	7,37
	Cu	42,85 ± 28,11	65,59	178,13 ± 15,31	8,60
	Cr	449,35 ± 448,47 *	99,81	53,92 ± 7,56	14,02
3C	Ni	59,40 ± 3,91	6,58	163,03 ± 4,88	2,99
	Fe	828,77 ± 53,89	6,50	1640,09 ± 15,56	0,95
	Cu	28,65 ± 6,79	23,69	172,04 ± 1,24	0,72
	Cr	69,60 ± 64,19 *	92,24	18,23 ± 4,21	23,11
* Příčinu neobvykle vysokého obsahu Cr ve vzorcích mineralizovaných v muflové peci, které jsou zatíženy velmi vysokou chybou, se nepodařilo určit					

Pro mineralizace v mikrovlnném reaktoru je potřeba menší množství vzorku (cca 0,5 g oproti 5 g pro mineralizaci v muflové peci), navíc mikrovlnný způsob zkracuje dobu nutnou k mineralizaci vzorku z více než 20 hodin na 2 hodiny. Všechny reakce probíhají v uzavřených nádobách, takže nedochází ke ztrátám analytů odpařováním těkavých sloučenin, a strháváním malých množství pevného vzorku vodní parou. Dále byly analyzovány pouze vzorky mineralizované v mikrovlnném reaktoru.

6.2 Výtěžnost mineralizace

Výtěžnost postupu zpracování byla určena na vzorku kupovaného medu, k němuž bylo před mineralizací přidáno známé množství standardu stanovovaných prvků. Porovnáním přídavku standardu s naměřenou koncentrací lze zjistit výtěžnost. Výtěžnosti jednotlivých prvků obsahuje tabulka 9. Obsah kadmia se u vzorku bez přídavku standardu pohyboval pod limitem stanovitelnosti. Vzorky s přídavkem standardu měly výtěžnost pouze kolem 70-80 %, což by mohlo být způsobeno nízkou citlivostí metody. Výtěžnosti ostatních prvků se pohybují nad 100 %. Limit stanovitelnosti se zřejmě kvůli interferencím a složitosti matrice liší od limitu stanovitelnosti určeného statisticky z měření slepého vzorku. Tomu napovídá i snížení RSD obohacených vzorků.

Tabulka 9: Výtěžnosti mikrovlnného reaktoru pro jednotlivé prvky

Přídavek standardu		Cd	Cr	Cu	Ni
	Koncentrace	Pod limitem detekce	52.29	101.78	51.59
	RSD	-----	37.71%	20.33%	36.16%
300 µg/kg	Koncentrace	253.85	493.89	345.23	355.49
	RSD	0.57%	1.06%	0.86%	0.15%
	Výtěžnost	84.62%	164.63%	115.08%	118.50%
600 µg/kg	Koncentrace	442.25	618.35	623.22	698.33
	RSD	8.83%	0.85%	1.10%	0.56%
	Výtěžnost	73.71%	103.06%	103.87%	116.39%
900 µg/kg	Koncentrace	697.35	958.98	936.81	920.59
	RSD	17.60%	0.26%	1.72%	1.66%
	Výtěžnost	77.48%	106.55%	104.09%	102.29%
1200 µg/kg	Koncentrace	837.49	1119.27	1094.80	1233.07
	RSD	7.80%	0.53%	0.47%	0.59%
	Výtěžnost	69.79%	93.27%	91.23%	102.76%

6.3 Vliv zpracování medu na obsah těžkých kovů

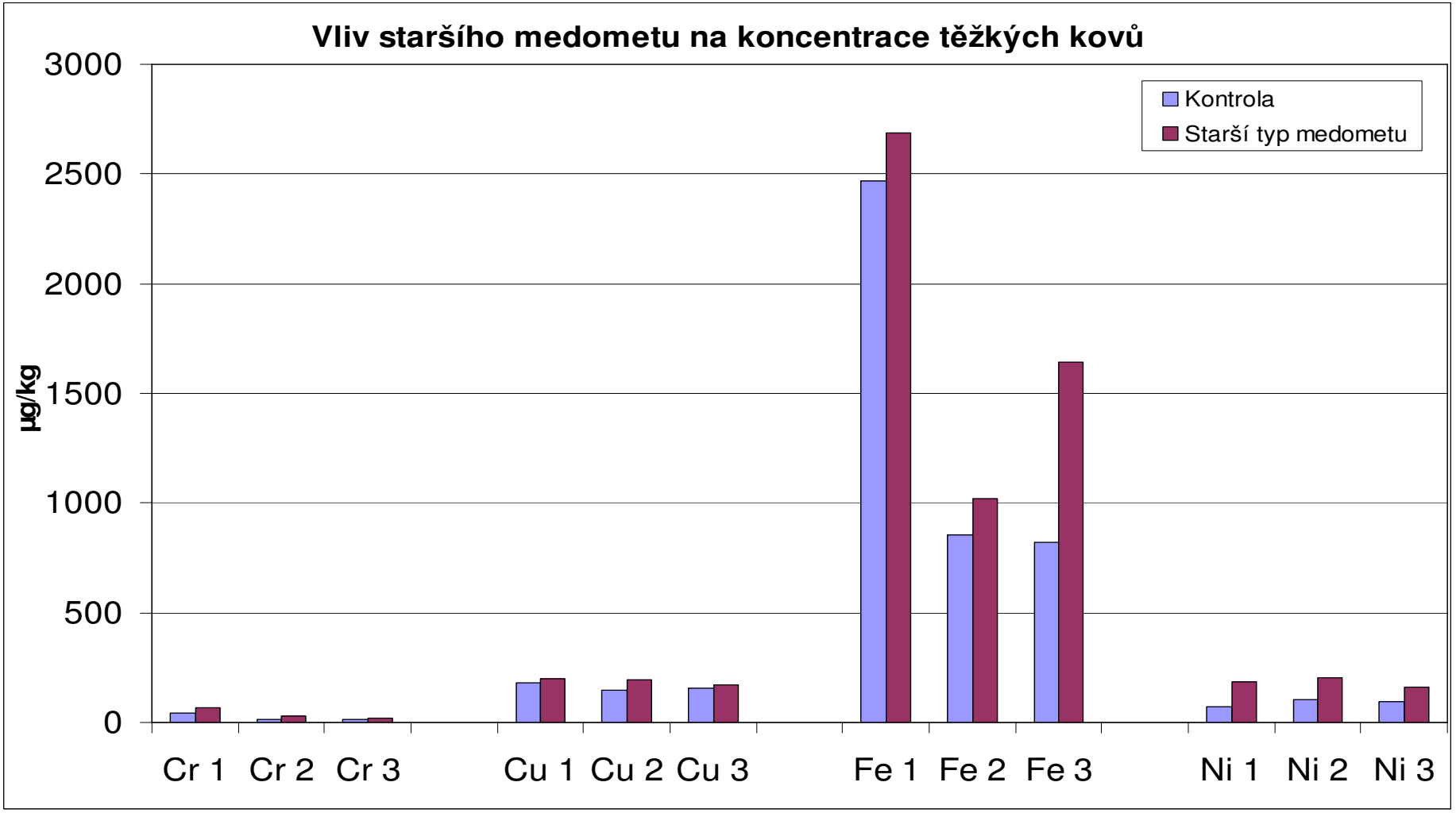
Vzhledem k obecně nízkému obsahu kovů v medu je možné očekávat, že případný nárůst obsahu stanovovaných kovů by byl patrnější, než v případě vzorků s přirozeně vysokými koncentracemi. Výsledky nevykazují rozdíly v koncentracích těžkých kovů při užití rozdílných typů mřížek na oddělení nástavků v úlu. Zřejmě proto, že plocha mřížek v úlu je malá a kontakt včel s nimi minimální. Běžné včelařské zpracování nerezovými pomůckami taktéž nemělo prokazatelný vliv na nárůst koncentrací těžkých kovů v medu. Doba přímého styku medu s nerezovou plochou medometu je krátká, maximálně několik minut. Přidáme-li k tak krátké době již zmíněnou zanedbatelnou rozpustnost korozivzdorných slitin, je patrné, že běžný včelařský postup nemůže významně ovlivňovat koncentrace těžkých kovů v medu. Porovnání všech metod zpracování pro stanovitelné prvky obsahuje tabulka 10.

Je ale nutno poznamenat, že při dlouhodobém kontaktu medu s plochou z korozivzdorné oceli, například při dlouhodobém skladování, kdy med prochází i změnami teplot při ztekucování, by mohlo docházet k výraznější kontaminaci. Dosavadní studie se o tomto vlivu nezmiňují.

Při stáčení starším typem medometu se proti kontrole zvýšily koncentrace všech prvků ve všech případech, tento nárůst ukazuje obrázek 10. Pro většinu prvků byl tento

nárůst malý, pouze u niklu došlo k nárůstu koncentrací ve všech případech minimálně o 50 %. Starší typ medometu měl již narušenou vrchní vrstvu, proto se z něho mohl jakýkoli kov snáze uvolňovat. Pokud med mohl přijít v tomto medometu do kontaktu s nikelnatou sloučeninou, může to vysvětlovat nárůst koncentrace niklu, protože se dle Hertinga et al. (2008) a Santonena et al. (2010) nikl uvolňuje z nikelnatých slitin až pěttisíckrát více než z korozivzdorné oceli. Zároveň hraje v uvolňování niklu významnou roli i pH. Zatímco v neutrálním pH se z nerezu neuvolňuje žádný prvek, v kyselém prostředí se uvolňují nikl, chrom i železo. S klesající hodnotou pH se nikl uvolňuje snadněji, dle Haudrechyho et al. (1994) se snížením pH z 6,6 na 4,5 uvolňování niklu téměř zpětinásobí a nektarový med, který byl v této studii použit, má dle Veselého (2003) pH nejčastěji v rozmezí 3,5-4. Dle Santonena et al. (2010) se chrom uvolňuje nejlépe při pH 6-7, při dalším poklesu pH se uvolňuje obtížněji. Železo se uvolňuje v kyselém prostředí stejnoměrně bez ohledu na hodnotu pH, a i jeho koncentrace se při zpracování v tomto medometu navyšovaly, ačkoli ne v takové míře jako u niklu. Posledním stanovovaným prvkem byla měď, jejíž koncentrace by se zvyšovat neměla, a ani se významně nenavyšovala. Průměrný obsah vypočtený ze všech analyzovaných vzorků byl 171,1 µg/kg s RSD pod 13 %.

Narozdíl od nerezového medometu, z něhož se kovy téměř neuvolňují, mohou být použitím starších typů medometů snáze navýšeny koncentrace těžkých kovů v medu. Tyto medomety často nebývají v dobrém stavu a může docházet k otěru z míst, kde je porušena povrchová ochranná vrstva nebo se vyskytuje koroze. V mnoha případech bývají natřeny barvou, jejíž částečky se také mohou do medu uvolňovat. Dnes jsou medomety vyráběny zejména z nerezu, proto lze předpokládat, že k případnému navyšování koncentrací těžkých kovů v medu během jeho zpracování bude docházet stále řidčeji i díky nahrazování starých plechových medometů novými.



Obrázek 10: Navýšení koncentrací těžkých kovů při užití staršího typu medometu v porovnání s volně vytékaným medem, kde číslo vzorku určuje použitou mřížku na oddělení nástavků (1 – bez mřížky, 2 – plastová, 3 – kovová)

Tabulka 10: Porovnání metod zpracování, kde označení číslem určuje použitou mřížku (1 – bez mřížky, 2 – plastová, 3 – kovová), písmenem použitý medomet (A – volně vytékaný med, B – nerezový medomet, C – starší typ medometu) a označení MIX určuje náhodně odebraný vzorek konečného produktu

Vzorek	Cu		Cr		Fe		Ni	
	Průměr ± SD (µg/kg)	RSD [%]	Průměr ± SD (µg/kg)	RSD [%]	Průměr ± SD (µg/kg)	RSD [%]	Průměr ± SD (µg/kg)	RSD [%]
1A	179,71 ± 6,02	3,35	43,25 ± 4,53	10,47	2466,38 ± 164,27	6,66	69,61 ± 5,33	7,66
1B	178,39 ± 16,27	9,12	38,72 ± 8,66	22,37	944,77 ± 145,58	15,41	88,96 ± 15,76	17,71
1C	200,86 ± 39,71	19,77	66,39 ± 16,10	24,26	2684,96 ± 480,07	17,88	183,58 ± 22,00	11,98
2A	149,36 ± 8,60	5,75	15,26 ± 0,25	1,61	853,49 ± 97,11	11,38	102,38 ± 6,62	6,46
2B	127,16 ± 17,70	13,92	22,96 ± 4,43	19,31	760,45 ± 36,25	4,77	74,98 ± 12,96	17,28
2C	195,24 ± 5,27	2,70	27,15 ± 3,61	13,30	1021,84 ± 52,40	5,13	206,01 ± 4,12	2,00
3A	159,01 ± 11,91	7,49	12,84 ± 1,96	15,24	822,09 ± 140,89	17,14	95,27 ± 13,60	14,27
3B	178,13 ± 15,31	8,60	53,92 ± 7,56	14,02	1334,90 ± 98,33	7,37	104,47 ± 26,12	25,00
3C	172,04 ± 1,24	0,72	18,23 ± 4,21	23,11	1640,09 ± 15,56	0,95	163,03 ± 4,88	2,99
Mix	148,00 ± 7,67	5,18	19,27 ± 1,56	8,11	1008,10 ± 43,31	4,30	78,34 ± 2,54	3,24

6.4 Porovnání s jinými studiemi

Obsah stanovovaných těžkých kovů v analyzovaných vzorcích je v porovnání s jinými studiemi nízký, obsah kadmia a olova byl pod limitem stanovitelnosti. Med byl odebrán v přírodní oblasti bez frekventované dopravní tepny a továren. Na vliv umístění úlů na obsah těchto kovů poukazují studie, pokles koncentrace olova v medu byl dokumentován například ve Švýcarsku. V roce 1984 zde bylo v medu naměřeno 0,2 mg/kg, kdežto v roce 2002 pouze 0,04 mg/kg. Vlivem zákazu používání olovnatého benzínu a zdokonalování katalyzátorů výfukových plynů se snížila koncentrace olova jak v medu, tak i v celém životním prostředí (Bogdanov 2006). S tímto klesajícím trendem může být olovo v medu z určitých oblastí dnes již pod hranicí stanovitelnosti. Na druhou stranu kadmium svoji koncentraci v medu v tomto časovém horizontu nesnižovalo, jeho koncentrace se dlouhodobě pohybují v rozmezí 0,01-0,05 mg/kg (Conti & Botre 2001, Perugini et al. 2010). Přesto ani tento kov nebyl v analyzovaných vzorcích medu stanovitelný. Bogdanov (2006) uvádí ve své rešerši maximální naměřenou hodnotu Cd v hodnotě přesahující 2 mg/kg.

Další měřené prvky se nacházely již ve stanovitelných koncentracích. Chrom měl v kontrolním vzorku koncentraci 0,019 mg/kg, kdežto například Perugini et al. (2010) stanovili až 0,74 mg/kg. Železo, které výrazně dominovalo s koncentrací více než 1 mg/kg, je v porovnání s jinými odbornými studiemi taktéž v nepatrné koncentraci. Obvykle se jeho koncentrace pohybuje mezi 4-8 mg/kg (Bibi et al. 2008, Pavlíková 2013). Výsledek mědi, která měla koncentraci 0,148 mg/kg, je porovnatelný s Bibiho et al. (2008) výzkumem. Ovšem Pavlíková (2013) naměřila koncentraci mědi dokonce přes 1 mg/kg. Jediný nikl, s koncentrací 0,079 mg/kg, byl porovnatelný s dalšími odbornými studiemi, i když se jeho koncentrace pohybovala ve spodních hranicích těchto výzkumů (Porrini et al. 2002, Devillers et al. 2002, Pavlíková 2013). Porovnání koncentrací s jinými výzkumy je obsaženo v tabulce 11.

Tabulka 11: Porovnání koncentrací těžkých kovů z různých studií, výsledky této práce jsou tučně vyznačeny

Prvek	Koncentrace (mg/kg)	Původ vzorku	Reference
Cr	**0,019**	Liberecký kraj, ČR	
	0,012 až 0,618	Chorvatsko	Petrović et al. (1994)
	0,084 až 0,102	Itálie	Conti & Botre (2001)
	0,74	Itálie	Perugini et al. (2010)
Cu	**0,148**	Liberecký kraj, ČR	
	0,023 až 0,498	Vzorky z různých států	Bibi et al. (2008)
	1,098	Zlínský kraj , ČR	Pavlíková (2013)
	12,94	Jordánsko	Atrouse (2004)
	0,82	Polsko	Roman (2010)
Fe	**1,008**	Liberecký kraj, ČR	
	4,345 až 7,433	Vzorky z různých států	Bibi et al. (2008)
	7,829	Zlínský kraj , ČR	Pavlíková (2013)
Ni	**0,079**	Liberecký kraj, ČR	
	0,180	Zlínský kraj , ČR	Pavlíková (2013)
	0,004 až 3,23	Itálie	Porrini et al. (2002)
	0,09 až 0,34	Francie	Devillers et al. (2002)

Porovnávat naměřené koncentrace z různých studií je značně problematické. Jak vypovídá výzkum Peruginiho et al. (2010), koncentrace jednoho prvku se může značně lišit i v průběhu roku. Například naměřená koncentrace Cr byla v srpnu 0,98 mg/kg, kdežto v říjnu jen 0,33 mg/kg. Taktéž záleží na druhu odebraného medu, medy medovicové jsou celkově bohatší na minerální látky než medy nektarové (Crane 1990). V této práci pocházejí analyzované vzorky z medu nektarového, a jejich nízký obsah minerálních látek je v souladu se závěry dalších studií. Obecně lze říci, že med z oblasti sběru není těžkými kovy významně kontaminován.

Závěr

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, do jaké míry může běžné zpracování medu za pomocí kovových pomůcek navyšovat koncentraci těžkých kovů v konečném produktu. Porovnány byly vzorky z úlů s rozdílným způsobem oddělení nástavků. Kontrolní vzorek byl z úlu bez mřížky, další vzorky z úlu s plastovou mřížku a z úlu s kovovou mřížkou. Dále byly s kontrolou (volně vytékaný med) porovnány dva způsoby stáčení medu, pomocí nerezového medometu a pomocí staršího medometu z pocínovaného plechu.

Použity byly dvě metody mineralizace (suchou cestou a mokrou cestou). Výsledky vyšly lépe pro mineralizaci mokrou cestou, které vykazují vyšší obsah stanovovaných prvků a lepší reprodukovatelnost měření. Med je viskózní kapalina a i Adeloju (1989) doporučuje mineralizovat kapalné vzorky mokrou cestou, zatímco tuhé vzorky suchou cestou.

Míra naměřených hodnot těžkých kovů byla v porovnání s jinými studiemi nízká, pro olovo a kadmium dokonce pod hladinou stanovitelnosti. Z pohledu rizika ohrožení zdraví je koncentrace těžkých kovů v medu zanedbatelná.

Použité mřížky na oddělování nástavků nenavyšovaly koncentrace těžkých kovů v medu. Jejich plocha je malá a kontakt včel s nimi zanedbatelný. Ani použitím nerezového medometu se nijak nenavyšovala hladina těžkých kovů. Doba přímého kontaktu medu s nerezovou plochou je velmi krátká a nerezové slitiny jsou vysoce stabilní. Na druhou stranu použitím staršího typu medometu se navýšily koncentrace všech kovů ve všech případech měření. U niklu se jednalo dokonce o minimálně 50% nárůst. Pokud tento typ medometu obsahuje nikl, může se tento kov do medu uvolňovat až tisícinásobně více než z nerezu (Herting et al. 2008, Santonen et al. 2010).

Běžný včelařský postup nemůže významně ovlivnit kontaminaci medu těžkými kovy vzhledem ke krátkému časovému úseku, ve kterém dochází k přímému kontaktu medu s nerezovou plochou. Na druhou stranu starší typy medometu, často již v horším stavu, mohou působit jako zdroj kontaminantů medu. Díky nahrazování starých medometů novými, které jsou vyráběny zejména z nerezu, lze předpokládat, že k případnému navyšování koncentrací těžkých kovů v medu během jeho zpracování bude docházet stále řidčeji.

Literatura

1. ADELOJU, S. B. *Comparison of some wet digestion and dry ashing methods for voltammetric trace element analysis*. The Analyst [online], 1989, vol. 114 [cit. 2015-04-26]. DOI: 10.1039/an9891400455.

2. ATROUSE, O. M.; ORAN, S. A. a AL-ABBADI, S. Y. *Chemical analysis and identification of pollen grains from different jordanian honey samples*. International Journal of Food Science and Technology [online], 2004, vol. 39, 413-417 s. [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.00798.x.

3. BIBI, S.; SYED, H. Z. a RIFFAT, N. M. *Pollen analysis and heavy metals detection in honey samples from seven selected coutries*. Pakistan Journal of Botany [online], 2008. vol. 40, 507-516 s. Dostupné z: http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40(2)/PJB40(2)507.pdf

4. BOGDANOV, S. *Contaminants of bee products*. Apidologie, 2006, vol. 37, 1-18 s. [cit. 2014-09-19]. DOI: 10.1051/apido:2005043. Dostupné z: http://www.apidologie.org/10.1051/apido:2005043

5. BOGDANOV, S. *Honey Composition*. Bee Product Science, 2009. [cit. 2015–01–22].

6. CELLI, G. a MACCAGNANI, B. 2003: *Honey bees as bioindicators of environmental pollution*. Bulletin of Insectology [online], 2003, vol. 56, 137-139 s. [cit. 2015-06-12]. ISSN 1721-8861. Dostupné z: http://www.ask-force.org/web/Bees/Celli-Honeybees-Bioindicators-Bulletin-2003.pdf

7. CONTI, M. E. a BOTRÈ, F. *Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination*. Environmental Monitoring and Assessment [online], 2001, vol. 69, 267-282 s. [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1023/a:1010719107006.

8. CRANE, E. *Bees and beekeeping: science, practice, and world resources*. Ithaca, N.Y. : Comstock Pub. Associates, 1990. 614 s. ISBN 0801424291.

9. ČAJKA, T.; HAJSLOVÁ, J.; PUDIL, F. a RIDDELLOVÁ, K. *Traceability of honey origin based on volatiles pattern processing by artificial neural networks*. Journal of Chromatography [online], 2009, vol. 1216, 1458-1462 s. [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.12.066.

10. ČERNOHORSKÝ, T. a JANDERA, P. *Atomová spektroskopie*. Pardubice : Univerzita Pardubice, 1997. 218 s. ISBN 80-7194-114-x.

11. ČÍHAL, V. *Korozivzdorné oceli a slitiny*. Praha : Academia, 1999. 437 s. Česká matice technická (Academia). ISBN 80-200-0671-0.

12. DEVILLERS, J.; DORÉ, J. C.; VIEL, C.; MARENCO, M.; POIRIER-DUCHENE, F.; GALAND, N. a SUBIRANA, M. *Typology of French acacia honeys based on their concentrations in metallic and nonmetallic elements*. Honey bees : estimating the environmental impact of chemicals, 2002. 263-283 s. ISBN 0-415-27518-0.

13. DRAŠAR, J. *Včelařství*. Praha : Státní zemědělské nakladatelství, 1978. 312 s. ISBN 07-079-78.

14. GHINI, S.; FERNANDEZ, M.; PICÓ, Y.; MARÍN, R.; FINI, F.; MANES, J. a GIROTTI, S. *Occurrence and Distribution of Pesticides in the Province of Bologna, Italy, Using Honeybees as Bioindicators*. Environmental Contamination and Toxicology**,** 2004, vol. 47, 479-488 s. DOI: 10.1007/s00244-003-3219-y.

15. HAUDRECHY, P.; FOUSSEREAU, J.; MANTOUT, B. a BAROUX, B. *Nickel release from nickel-plated metals and stainless steels*. Contact Dermatitis[online], 1994, vol. 31, 249-255 s. [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1111/j.1600-0536.1994.tb01997.x.

16. HEDBERG, Y.; MIDANDER, K. a WALLINDER, I. O. *Particles, sweat, and tears: A comparative study on bioaccessibility of ferrochromium alloy and stainless steel particles, the pure metals and their metal oxides, in simulated skin and eye contact*. Integrated Environmental Assessment and Management [online], 2010, vol. 6, 456-468 s. [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1002/ieam.66.

17. HERTING, G.; WALLINDER, I. O. a LEYGRAF, C. *Metal release rate from AISI 316L stainless steel and pure Fe, Cr and Ni into a synthetic biological medium a comparison*. Journal of Environmental Monitoring [online], 2008, vol. 10, 1092-1098 s. [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1039/b805075a.

18. HORÁK, J.; LINHART, I. a KLUSOŇ, P. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. 188 s. ISBN 80-7080-548-x.

19. KALAČ, P. a TŘÍSKA, J. *Chemie životního prostředí*. České Budějovice : Jihočeská univerzita, 1998. 147 s. ISBN 80-7040-325-x.

20. KOMÁREK, J. *Atomová absorpční spektrometrie*. Brno : Masarykova univerzita, 2000. 85 s. ISBN 80-210-2500-x.

21. LAMPEITL, F. *Chováme včely: úvod do včelaření*. Ostrava : Blesk, 1996. 173 s. ISBN 80-85606-96-8.

22. GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; TERRAB, A.; HERNANZ, D.; FERNÁNDEZ-RECAMALES, M. Á. a HEREDIA, F. J. *Multivariate Correlation between Color and Mineral Composition of Honeys and by Their Botanical Origin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online], 2005, vol. 53, 2574-2580 s. [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1021/jf048207p.

23. MACHOVÁ, J. *Právo ve včelařství*. Praha : Orac, 2001. 165 s. Kapesní příručky. ISBN 80-86199-40-1.

24. MONTILLA, A.; RUIZ-MATUTE, A. I.; SANZ, M. L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. a DEL CASTILLO, M. D. *Difructose anhydrides as quality markers of honey and coffee*. Food Research International, 2006, vol. 39, 801-806 s. DOI: 10.1016/j.foodres.2006.03.002. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996906000494

25. PAVLÍKOVÁ, D. *Stanovení rizikových prvků v medu* [online]. Brno : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013. 42 s. Dostupné z: http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/25214/pavl%C3%ADkov%C3%A1_2013_bp.pdf?sequence=1

26. PERUGINI, M.; MANERA, M.; GROTTA, L.; ABETE, M. C.; TARASCO, R. a AMORENA, M. *Heavy Metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) Contamination in Urban Areas and Wildlife Reserves: Honeybees as Bioindicators*. Biological Trace Element Research [online], 2010, vol. 140, 170-176 s. [cit. 2015-01-15]. DOI: 10.1007/s12011-010-8688-z. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12011-010-8688-z

27. PETROVIĆ, Ž. T.; MANDIĆ, M. L.; GRGIĆ, J. a GRGIĆ, Z. *Ash and chromium levels of some types of honey*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung [online], 1994, vol. 198, 36-39 s. [cit. 2015-04-26]. DOI: 10.1007/bf01195280.

28. PITTER, P. *Hydrochemie*. Praha : Vydavatelství VŠCHT, 1999. 568 s. ISBN 8070803401.

29. POHL, P. *Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries*. TrAC Trends in Analytical Chemistry [online], 2009, vol. 28, 117-128 s. [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1520/d4004-93r98.

30. PORRINI, C.; SABATINI, A. G.; GIROTTI, S.; GHINI, S.; MEDRZYCKI, P.; GRILLENZONI, F.; BORTOLOTTI, L.; GATTAVECCHIA, E. a CELLI, G. *Honey bees and bee produkts as monitors of the enviromental contamination*. Apiacta, 2003, vol. 38, 63-70 s.

31. PORRINI, C; GHINI, S.; GIROTTI, S.; SABATINI, A. G.; GATTAVECCHIA, E. a CELLI, G. *Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy*. Honey bees : estimating the environmental impact of chemicals, 2002. 201-262 s. ISBN 0-203-27408-3.

32. PROKEŠ, J. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Praha : Galén, 2005. 248 s. ISBN 80-7262-301-x.

33. PŘIDAL, A. *Včelí produkty*. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. 95 s. ISBN 80-7157-717-0.

34. ROMAN, A. *Levels of copper, selenium, lead, and cadmium in forager bees*. Polish Journal of Environmental Studies, 2010. 663-669 s.

35. SANTONEN, T.; STOCKMANN-JUVALA, H. a ZITTING, A. *Review on toxicity of stainless steel.* Helsinki, Finland : Finnish Institute of Occupational Health, 2010. 87 s. ISBN 978-952-261-039-3

36. SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. a REGE, D. V. *Handbook of indices of food quality and authenticity*. Cambridge : Woodhead, 1997. 560 s. ISBN 9781855732995.

37. STOEWSAND, G. S.; STARRIER, J. R.; KOSIKOWSKI, F. V.; MORSE, R. A.; BACHE, C. A. a LISK, D. J. *Chromium and nickel in acidic foods and by-products contacting stainless steel during processing*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology [online], 1979, vol. 21, 600-603 s. [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1007/bf01685476.

38. STOKLASA, J. *Včelí produkty ve výživě, lékařství, farmacii a kosmetice*. Praha : SZN, 1975. 164 s. Živočišná výroba (Státní zemědělské nakladatelství).

39. SUHAJ, M. a KOVÁČ, M. *Metódy identifikácie falšovania a autentifikácie potravín*. Bulletin of Food Research, 1999, vol. 3, 10 s. ISSN 1335-3179.

40. ŠVAMBERK, V. *Záhadné včely: tajemný svět včel II*. Líbeznice : Víkend, 2003. 96 s. ISBN 80-7222-285-6.

41. TERRAB, A.; GONZÁLEZ, A. G.; DÍEZ, M. J. a HEREDIA, F. J. *Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003, vol. 83, 637-643 s. DOI: 10.1002/jsfa.1341. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.1341

42. TITĚRA, D. *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. Praha : Ve spolupráci s Českým svazem včelařů vyd. nakl. Brázda, 2006. 175 s. ISBN 80-209-0347-x.

43. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Tábor : OSSIS, 2002. 331 s. ISBN 80866590031.

44. VESELÝ, V. *Včelařství*. Praha : Brázda, 2003. 270 s. ISBN 80-209-0320-8.

45. VORLOVÁ, L. *Med: souborná analýza*. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, 2002. 67 s. ISBN 80-7305-450-7.

46. WEINSTOCK, G. M.; ROBINSON, G. E.; GIBBS, R. A. a kol. *Insights into social insects from the genome of the honeybee Apis mellifera*. Nature, 2006, vol. 443. DOI: 10.1038/nature05260.

Použité vyhlášky a normy

1. Vyhláška ministerstva zdravotnictví ČR č. 298/1997 Sb.: kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné. Sbírka zákonů ČR, 1999, částka 2. Dostupné z: http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?zdroj=sb99003&cd=76&typ=r

2. Vyhláška ministerstva zdravotnictví ČR č. 352/2009 Sb.: kterou se mění vyhláška č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin. Sbírka zákonů ČR, 2009, částka 10. Dostupné z: http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=352/2009&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy

3. EN 1811. Reference test method for release of nickel from products intended to come into direct and prolonged contact with the skin. Brusel : European Committee for Standardization, 1998.

4. ČSN EN 10088-1. Korozivzdorné oceli - Část 1: Přehled korozivzdorných ocelí. Praha : Český normalizační institut, 2005.