

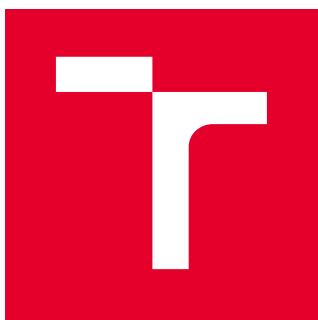
VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2018

Aneta Habartová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VYUŽITÍ TECHNIKY DGT PRO STANOVENÍ RTUTI V
TEKUTÝCH OCHUCOVADLECH POTRAVIN**

USE OF DGT TECHNIQUE FOR MERCURY DETERMINATION IN FOOD LIQUID FLAVORINGS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Aneta Habartová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1273/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Aneta Habartová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Využití techniky DGT pro stanovení rtuti v tekutých ochucovadlech potravin

Zadání bakalářské práce:

1. vypracování literární rešerše k tématu práce
2. provedení základních testů DGT s vybraným typem sorpčního gelu
3. ověření vlivu prostředí na správnou funkci DGT
4. aplikace techniky DGT v reálném vzorku
5. zpracování naměřených výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Aneta Habartová
student(ka)

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá ověřením možnosti využití techniky difúzního gradientu v tenkém filmu (DGT) pro analýzu potravin. Zároveň se zaměřuje na testování nového typu sorpčního gelu obsahujícího Purolite S924, komerčně dostupného, pro stanovení rtuti v tekutých ochucovadlech potravin. V teoretické části je uvedena charakteristika a výroba rybích omáček, jsou popsány analytické metody pro stanovení rtuti a technika DGT. Experimentální část se zabývá optimalizací přípravy sorpčního gelu a validací techniky DGT pro stanovení rtuti v rybích omáčkách. Technika DGT po validaci byla úspěšně použita pro analýzu reálných vzorků rybích omáček.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with varification of the use of the diffusive gradient in thin films technique (DGT) for food analysis. It focuses on testing a new type of sorption gel containing Purolite S924 as well, commercially available for mercury determination in food liquid flavorings. Theoretical part contents of characteristics and production of fish sauces are described analytical methods for mercury determination and DGT technique. Experimental part focused on optimization of preparation of sorption gel and validation DGT techniques for mercury determination in fish sauces. After validation DGT technique was successfully used for analysis real samples of fish sauces.

KLÍČOVÁ SLOVA

rybí omáčka, rtuť, Purolite S924, DGT, CV-AAS

KEYWORDS

fish sauce, mercury, Purolite S924, DGT, CV-AAS

HABARTOVÁ, A. *Využití techniky DGT pro stanovení rtuti v tekutých ochucovadlech potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 42 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům je se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat panu doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi věnoval v průběhu vykonávání této práce. V neposlední řadě chci poděkovat rodině, která mě podporuje po celé studium.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Rybí omáčka.....	8
2.1.1	Výroba rybí omáčky.....	8
2.1.2	Chemické a biochemické složení rybí omáčky	9
2.1.3	Chuť a aroma rybí omáčky.....	10
2.1.4	Mikrobiologie fermentované rybí omáčky.....	10
2.2	Kontaminace rtutí.....	11
2.2.1	Toxicita rtuti pro ryby (vodní živočichy).....	11
2.2.2	Toxicita rtuti pro člověka	12
2.3	Výskyt rtuti v životním prostředí	12
2.4	Legislativní normy	14
2.5	Stanovení rtuti	15
2.5.1	Metody stanovení rtuti	15
2.5.1.1	Analyzátor rtuti AMA 254	15
2.6	Technika difúzního gradientu v tenkém filmu (DGT)	16
2.6.1	Princip DGT	16
2.6.2	Difúzní gely v DGT.....	18
2.6.2.1	Polyakrylamidový gel	18
2.6.2.2	Agarosový gel	19
2.6.3	Sorpční gely v DGT	19
2.6.3.1	Purolite S924	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Laboratorní vybavení	21
3.1.1	Chemikálie	21
3.1.2	Pomůcky.....	21
3.1.3	Přístroje	21
3.1.3.1	Popis přístroje AMA 254	21
3.1.3.2	Stanovení rtuti na přístroji AMA 254	22
3.2	Popis analyzovaných vzorků.....	23
3.3	Pracovní postupy	23
3.3.1	Příprava difúzního gelu	23
3.3.2	Příprava sorpčního gelu.....	23

3.3.3	Sestavení jednotek DGT.....	24
3.3.4	Modelový roztok rtuti.....	24
3.4	Základní testy pro ověření funkčnosti DGT v modelovém roztoku.....	25
3.4.1	Test lineární akumulace rtuti v závislosti na čase	25
3.4.2	Test opakovatelnosti měření.....	25
3.4.3	Test lineární akumulace rtuti v závislosti na reciproké difúzní tloušťce	25
3.4.4	Test vlivu koncentrace NaCl na techniku DGT	26
3.5	Základní testy pro ověření funkčnosti DGT v roztoku rybí omáčky	26
3.5.1	Test lineární akumulace rtuti v závislosti na čase	26
3.5.2	Test opakovatelnosti měření.....	26
3.6	Analýza reálného vzorku.....	26
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	27
4.1	Limity detekce a kvantifikace přístroje AMA 254.....	27
4.2	Limity detekce a kvantifikace techniky DGT	27
4.3	Optimalizace přípravy sorpčního gelu	27
4.4	Základní testy pro ověření funkčnosti DGT.....	28
4.4.1	Test lineární akumulace rtuti v závislosti na čase	28
4.4.2	Test lineární akumulace rtuti v závislosti na reciproké difúzní tloušťce	29
4.4.3	Test opakovatelnosti měření.....	29
4.4.4	Test vlivu koncentrace NaCl na techniku DGT	30
4.5	Ověřování funkčnosti techniky DGT v roztoku rybí omáčky.....	31
4.5.1	Test lineární akumulace rtuti v závislosti na čase	31
4.5.2	Test opakovatelnosti a výtěžnosti měření	32
4.6	Analýza reálného vzorku – rybí omáčky.....	33
5	ZÁVĚR.....	34
6	SEZNAM LITERÁRNÍCH ZDROJŮ.....	35
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	40
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ	42

1 ÚVOD

Fermentované produkty rybolovu byly konzumovány již od starověku. Římská fermentovaná rybí omáčka (*garum*) byla původně vyráběna z vnitřností a krve makrel. Po 9 měsících fermentace byla získána čirá hnědá kapalina a oddělená nehydrolyzovaná tkáň z fermentační nádrže byla využita pro výrobu rybí pasty, která byla silnější a hustší než rybí omáčka. Dnes se výroba rybích omáček přesunula do jihovýchodní Asie, především do Vietnamu, Thajska, Japonska, Číny a Filipín. Rybí omáčka je oblíbenou přísadou při vaření díky její výrazné chuti a aroma.

Ryby používané k výrobě rybích omáček mohou být kontaminovány kovy vyskytujícími se v sladkých a slaných povrchových vodách jak z přírodní, tak antropogenní činnosti. Přítomnost kovů v potravinách může ohrožovat zdraví člověka. Z těchto důvodů je potřeba mít k dispozici vhodné analytické techniky umožňující sledovat množství kovů v potravinách a kontrolovat tak bezpečnost potravin. Jedním ze sledovaných kovů, obzvláště v případě ryb a výrobků z ryb, je rtuť.

Analýza rtuti v potravinách vyžaduje použití vysoce citlivých technik. Při analýze potravin, jakými jsou například rybí omáčky, komplikuje navíc analýzu vysoký obsah soli a dalších látek ve vzorku. Pro separaci analytu od složité matrice se používá řada metod, převážně různých druhů extrakcí. Tyto postupy jsou poměrně náročné, a proto je snahou analytických chemiků objevovat jiné postupy.

V roce 1994 byla poprvé představena technika difúzního gradientu v tenkém filmu (DGT), která značně zjednodušila stanovení zinku v mořské vodě. Tato technika byla v posledním desetiletí dále rozvíjena a v současnosti je možné tuto techniku použít pro stanovení více než 55-ti prvků periodické soustavy prvků, včetně rtuti. Ačkoliv je technika DGT nejčastěji využívána v environmentální analýze, v posledních letech byla použita i pro jiné účely, například pro stanovení olova v sójových omáčkách.

Cílem této bakalářské práce je test nového sorpčního gelu obsahující sorbent Purolite S924. Sorpční gel byl vložen do vzorkovací jednotky DGT a technika DGT byla následně testována, zda je možné ji v tomto uspořádání použít pro analýzu rtuti. Po ověření správné funkce techniky DGT byla tato technika použita pro stanovení rtuti v rybích omáčkách.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rybí omáčka

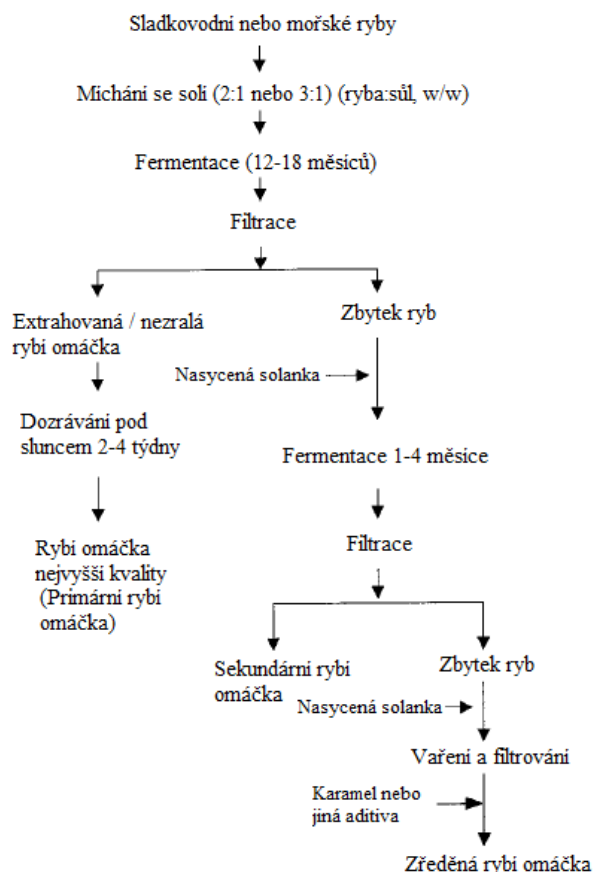
Rybí omáčka je čirá hnědá tekutina se slanou chutí a jemným rybím aroma [1]. Díky své charakteristické chuti se využívá k přípravě různých pokrmů, především v oblasti jihovýchodní Asie, jako je Vietnam, Thajsko, Japonsko, Filipíny, Čína a Indonésie [2]. V poslední době se však objevuje jak na asijských, tak na evropských trzích [3]. Rybí omáčka je tedy tradiční koření vyráběné fermentací ryb po dobu několika měsíců až dvou let za použití vysokého obsahu soli [4]. Nejčastěji používané druhy ryb pro výrobu omáček jsou ančovičky, kapři, makrely a sardinky [5]. Rybí omáčka je velmi dobrým zdrojem vitamínu B12 a minerálů, jako je sodík, vápník, hořčík, železo, mangan a fosfor. Přestože omáčka obsahuje širokou škálu živin, její nutriční hodnota je ohrožena kvůli vysoké koncentraci soli, která může činit až 270 g.l⁻¹ [1, 6].

2.1.1 Výroba rybí omáčky

Rybí omáčka je výsledkem fyzikálních, chemických a mikrobiologických změn, ke kterým dochází při vysoké koncentraci soli a při nízké hladině kyslíku během fermentace. Primárními surovinami pro výrobu rybí omáčky jsou ryby a sůl. Obecně platí, že míchání ryb a soli je prvním krokem při výrobě omáčky. Poměr ryb a soli se pohybuje od 2:1 do 6:1 (ryba:sůl) v závislosti na zemi [1].

Tradiční výroba omáčky spočívá v použití mletých nebo lisovaných ryb, které jsou umístěny do speciálních nádob v solných vrstvách se solí přibližně v poměru 3:1. Nádoby jsou poté téměř ponořeny do země, těsně uzavřeny a ponechány v zemi několik měsíců. V prvním stádiu fermentace, asi po 3 dnech, je odčerpána z fermentační nádrže krvavá kapalina (nouc-boi). Doba fermentace pro menší ryby je přibližně 6 měsíců, v případě větších ryb se doba fermentace pohybuje okolo 18 měsíců. První supernatant shromážděný v prvním fermentačním cyklu se označuje jako primární nebo vysoce kvalitní rybí omáčka. Poté je do fermentační nádrže přidána horká slaná voda, aby proběhla extrakce další omáčky nazvána jako sekundární nebo nekvalitní rybí omáčka. Extrakt získaný vroucím roztokem má nízkou trvanlivost vzhledem k nízkému obsahu soli a vysoké hodnotě pH. Některé přísady, jako karamel, melasa, pražená kukuřice, mohou být přidány k rybám před druhým extrakčním cyklem pro zlepšení barvy produktu. Místo použití přísad je do nekvalitních surovin přidáván vysoce kvalitní extrakt z prvního fermentačního cyklu, aby se zlepšila barva i chuť výsledné omáčky. Obrázek 1 představuje obecný postup výroby rybí omáčky [1].

Nejpoužívanější solí pro výrobu rybí omáčky je solární sůl (sůl krystalizovaná ze slunce a větru z přírodních solných roztoků obsažených v otevřených rybnících pro úpravu tvrdé vody), kamenná sůl (mineralizovaná forma chloridu sodného, známá jako halit) a vakuová sůl (rafinovaná kamenná sůl; solanka používaná pro přípravu kamenné soli je čištěna od chemikálií pomocí vakua) [1, 4].



Obrázek 1. Obecné schéma výroby rybí omáčky [1].

2.1.2 Chemické a biochemické složení rybí omáčky

Rybí omáčka je produkt obohacený o proteiny, které byly získány přirozenou hydrolýzou endogenními enzymy a mikroorganismy. Hlavní změnou při fermentaci je přeměna proteinů na peptidy o nízké molekulové hmotnosti a volné aminokyseliny. Protože většina polypeptidového dusíku klesá během fermentace, dochází pak ke zvýšení obsahu aminokyselin. Hodnota pH klesá díky uvolnění volných aminokyselin z proteinů a velkých peptidů. Navíc dochází k poklesu celkových lipidů, ale složení mastných kyselin se během fermentace výrazně nemění. Ve srovnání se sójovou omáčkou je chemické složení rybí omáčky velmi podobné. Obsah chloridu sodného a pH jsou však podstatně vyšší než u sójové omáčky. Kromě toho je i obsah kyseliny octové vyšší v rybí omáčce, zatímco obsah kyseliny mléčné je vyšší v sójové omáčce [1].

Rybí omáčka obsahuje průměrné množství chloridu sodného $26 \pm 3,7 \%$, což je vyšší než u sójové omáčky (Tabulka 1). Průměrná hodnota pH se pohybovala mezi 5,3 a 6,7 a většina organických kyselin vyskytujících se v rybí omáčce byla ve formě solí. Ve vzorcích rybí omáčky nebyl nalezen žádný cukr ani alkohol [1].

Tabulka 1. Porovnání chemického složení rybí a sójové omáčky [1].

	Rybí omáčka	Sójová omáčka
pH	5,3–6,7	4,7–4,9
NaCl (g.dl ⁻¹)	22,5–29,9	16,0–18,0
Celkové aminokyseliny (g.dl ⁻¹)	2,9–7,7	5,5–7,8
Glutamová kyselina (g.dl ⁻¹)	0,38–1,52	0,9–1,3
Celkové organické kyseliny (g.dl ⁻¹)	0,21–2,33	1,4–2,1
Octová kyselina (g.dl ⁻¹)	0,6–2,0	0,1–0,3
Mléčná kyselina (g.dl ⁻¹)	0,06–0,48	0,04–0,05
Jantarová kyselina (g.dl ⁻¹)	0,02–0,18	0,04–0,05
Redukující cukry (g.dl ⁻¹)	Stopové množství	1,0–3,0
Alkohol (g.dl ⁻¹)	Stopové množství	0,5–2,0

2.1.3 Chut' a aroma rybí omáčky

Chut' rybí omáčky je způsobena kumulativním účinkem jak těkavých mastných kyselin, tak i netěkavých mastných kyselin spolu s dalšími biochemickými reakcemi. Sloučeniny z enzymatického a mikrobiálního rozkladu bílkovin nebo jiných dusíkatých látek přispívají k aroma rybí omáčky. Aroma rybí omáčky je primárně způsobeno funkcemi aerobních a anaerobních bakterií přítomných ve fermentační nádrži [1].

K typickému aroma rybí omáčky přispívají amoniakální, sýrařské a masové tóny. Amoniakální tóny se připisují amoniaku, aminům a dalším zásaditým sloučeninám obsahující dusík. Sýrařský tón je způsoben především těkavými mastnými kyselinami o nízké molekulové hmotnosti (octová, ethanolvá, propionová a butyrová), methyketonem a kyselinou 2- methylpropanovou. Těkavé kyseliny jsou rozvíjeny během fermentace. Senzorický masový tón je mnohem komplikovanější než předchozí dva tóny a nebyl dobře charakterizován. Bylo zkoumáno, že masový pach vznikl oxidací látky, která mohla být extrahována zcela z rybí omáčky izopropanolem. Kyselina glutamová také přispívá k masové vůni. Histidin a prolin můžou hrát taky důležité role při aroma rybí omáčky [1, 2].

2.1.4 Mikrobiologie fermentované rybí omáčky

Rybí omáčka má velmi vysokou koncentraci soli (25–30 %). Sůl kontroluje typ mikroorganismu a zpomaluje nebo zabíjí některé patogenní mikroby během fermentace. Mikroorganismy působící během produkce rybí omáčky jsou obecně klasifikovány jako halofilní. Důležitou rolí mikroorganismů v rybí omáčce jsou degradace bílkovin a vývoj aroma a chuti. Pokud je rybí omáčka produkována za aseptických podmínek, není typická rybí vůně vyvinuta. Bakterie účastnící se produkce rybí omáčky lze rozdělit do dvou skupin [1].

První skupinou jsou bakterie, které produkují proteolytické enzymy. Mezi ně patří *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Halococcus sp.*, *Halobacterium*

salinarum. Vysoce koncentrovaný NaCl (25 %) nemá žádný vliv na proteolytickou aktivitu enzymů z *H. salinarium*. Nicméně chelatační činidlo, jako je EDTA, úplně inaktivuje tyto enzymy. Zinečnatý iont (Zn^{2+}) a hořečnatý iont (Mg^{2+}) mohou aktivovat enzymovou aktivitu pomalu. Enzymy z halofilních bakterií mohou plně fungovat v prostředí s vysokým obsahem soli, ale většina z nich je neúčinná v nepřítomnosti soli [1].

Druhou skupinou jsou bakterie, které se týkají vývoje chuti a aroma. 10 ze 17 typů *Bacillus* izolovalo při produkci měřitelné množství těkavých kyselin. *Staphylococcus* druh 109 také produkovat významné množství těkavých kyselin [1].

2.2 Kontaminace rtutí

Ryby pro výrobu rybí omáčky jsou široce konzumované potraviny a poskytují mnoho důležitých živin pro lidskou stravu. Ryby jsou schopné absorbovat prvky, které jsou obsaženy ve vodě nebo potravě ryb, ať už jsou esenciální nebo neesenciální a tyto prvky se ukládají do svalové tkáně. Ryby jsou součástí skupiny potravin, které mohou ve své struktuře akumulovat velké množství prvků [6]. Jakmile se těžké kovy začnou šířit prostřednictvím potravní sítě, mohou se nakonec nahromadit na nebezpečné úrovni a představovat potenciální riziko pro lidské zdraví [7]. Mezi kovy, způsobující vysokou toxicitu pro vodní živočichy a člověka, se řadí především rtuť, arsen, selen, olovo a kadmium [3, 6, 7].

Rtuť, která je předmětem zájmu této práce, je díky své akumulaci prostřednictvím vodních potravních řetězců pro ryby nebezpečná i v relativně nízkých koncentracích [8]. Masožravé druhy ryb v horní části potravního řetězce obsahují nejvyšší koncentraci rtuti [9].

Rtuť je vysoce toxický prvek, který je přítomen v životním prostředí v několika různých formách, které vykazují řadu toxikologických vlastností [10]. Rtuť existuje ve třech základních formách: elementární rtuť (Hg^0), anorganické sloučeniny rtuti a organické sloučeniny rtuti (především alkylové sloučeniny rtuti) [10]. Organické sloučeniny, jako je methylrtuť (MeHg), jsou mnohem více toxické než anorganické formy rtuti v důsledku přítomnosti alkylové skupiny, která snižuje rozpustnost a vytváří lipofilní molekulu schopnou snadno procházet buněčnou membránou [11]. Toxicita jednotlivých forem rtuti klesá v řadě alkylrtuťnaté sloučeniny (především MeHg) > páry elementární rtuti > rtuťnaté soli > arylrtuťnaté a alkoxyrtuťnaté sloučeniny > rtuťné soli. Z hlediska toxikologických účinků v potravinách je nejdůležitější již zmiňovaná MeHg [12].

2.2.1 Toxicita rtuti pro ryby (vodní živočichy)

Vazba rtuti na thiolové (-SH) skupiny bílkovin je základním mechanismem toxického působení rtuti na ryby a ostatní vodní živočichy. Rtuť působí jako enzymový jed. Toxicita rtuti pro ryby je významně ovlivněna formou jejich výskytu ve vodě [13].

Organokovové sloučeniny rtuti mají vysokou bioakumulační schopnost, která je spjata s jejich lyofilní povahou, a tak ji umožňují snadný průnik biologickými membránami. Vodní organismy přijímají sloučeniny rtuti buď přímo z vody (sedimentu) nebo častěji se do vodních organismů dostávají s potravou. Přes povrch těla nebo respiračními orgány přijímají vodní organismy rozpuštěné sloučeniny rtuti absorpcí nebo adsorpcí. Při příjmu MeHg potravou musí nejprve dojít k jejímu uvolnění z potravy trávením (degradací potravy) v žaludku a ve střevch

[14]. V rybím mase dochází ke koncentrování MeHg. Ryby jsou významnou složkou potravy především v přímořských oblastech nebo v oblastech velkých jezer, proto MeHg obsažená v rybím mase vstupuje do suchozemského potravního řetězce [15].

Bylo prokázáno, že sloučeniny rtuti poškozují některé důležité orgány, tkáně ryb a mohou mít i škodlivý vliv na jejich reprodukci [13].

2.2.2 Toxicita rtuti pro člověka

Rtuť se do metabolismu u lidí nejčastěji dostává expoziční cestou inhalační, orální a dermální. Expozice sloučeninami rtuti se u lidí projevuje neurologickými, reprodukčními, vývojovými a karcinogenními účinky a mohou končit dokonce i smrtí [14]. Z potravy se v tenkém střevě vstřebává asi 7 % přítomné rtuti. Resorbovaná rtuť se zachytává v mozku, ledvinách a v játrech. Z jater se vylučuje část rtuti žlučí do střeva. Rtuť se může kumulovat ve vlasech i nehtech [12].

K otravě elementární rtutí může dojít buď inhalací par nebo požitím rtuti. Při otravě požitím rtuti se objevuje zvýšené slinění, kovová chuť v ústech, otoky dásní apod. Při inhalační expozici k tomu přistupují další příznaky jako zánět průdušek, kašel a dýchací potíže [12].

Při profesionální expozici může docházet k otravám anorganickými sloučeninami rtuti např. u pracovníků v chemických provozech a laboratořích [12]. Při akutní intoxikaci jsou kritickými orgány především ledviny a trávicí ústrojí [15].

Organokovové sloučeniny rtuti mají schopnost snadno pronikat bariérami krev–mozek a placentou a ukládají se ve vlasech a ledvinách. Jsou asi 10krát toxičtější než anorganické formy rtuti [14]. Jedna z nejtoxičtějších sloučenin rtuti je MeHg [15]. Řada sloučenin rtuti je ve vodním prostředí degradována organismy a uvolněná rtuť může být mikroorganismy methylována na MeHg, a vniknout do potravních řetězců a vyvolat hromadné otravy jako následek požívání ryb [16]. Již při nízkých koncentracích má MeHg neurotoxické účinky. Dochází k poruchám ledvin, smyslových funkcí, poruchám řeči a polykání [17]. MeHg má také teratogenní účinky [11, 18]. Otrava lidí MeHg je známá jako tzv. Minamata disease [19].

2.3 Výskyt rtuti v životním prostředí

Rtuť je perzistentní v životním prostředí a může být rozptýlena na velkých vzdálenostech prostřednictvím atmosférických, oceánských, vodních a biotických transportních vektorů [11]. Její koncentrace je v zemské kůře přibližně $80 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a v mořské vodě $0,3 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ [20]. Rtuť může být do životního prostředí přiváděna jak přírodními zdroji, tak antropogenními aktivitami. Přírodní zdroje zahrnují sopečnou činnost, lesní požáry a odpařování z povrchů vod. K antropogenním aktivitám patří zpracování nerostných surovin, mineralizace, výroba alkalických chloridů a spalování fosilních paliv. Drobné těžby zlata jsou hlavním zdrojem antropogenní emise rtuti do atmosféry s průměrnou celosvětovou emisí 727 tun za rok. Spalování fosilních paliv představuje také další hlavní zdroj emisí rtuti do atmosféry s průměrnou celosvětovou emisí 475 tun za rok [20].

Osud rtuti v životním prostředí je určen několika fyzikálními a chemickými procesy, včetně emisí, dopravy, chemie a depozice [21]. Všechny tyto transporty hrají důležitou roli v biogeochemickém cyklu rtuti (Obrázek 2) [20]. Rtuť je rozdělena do tří chemických druhů,

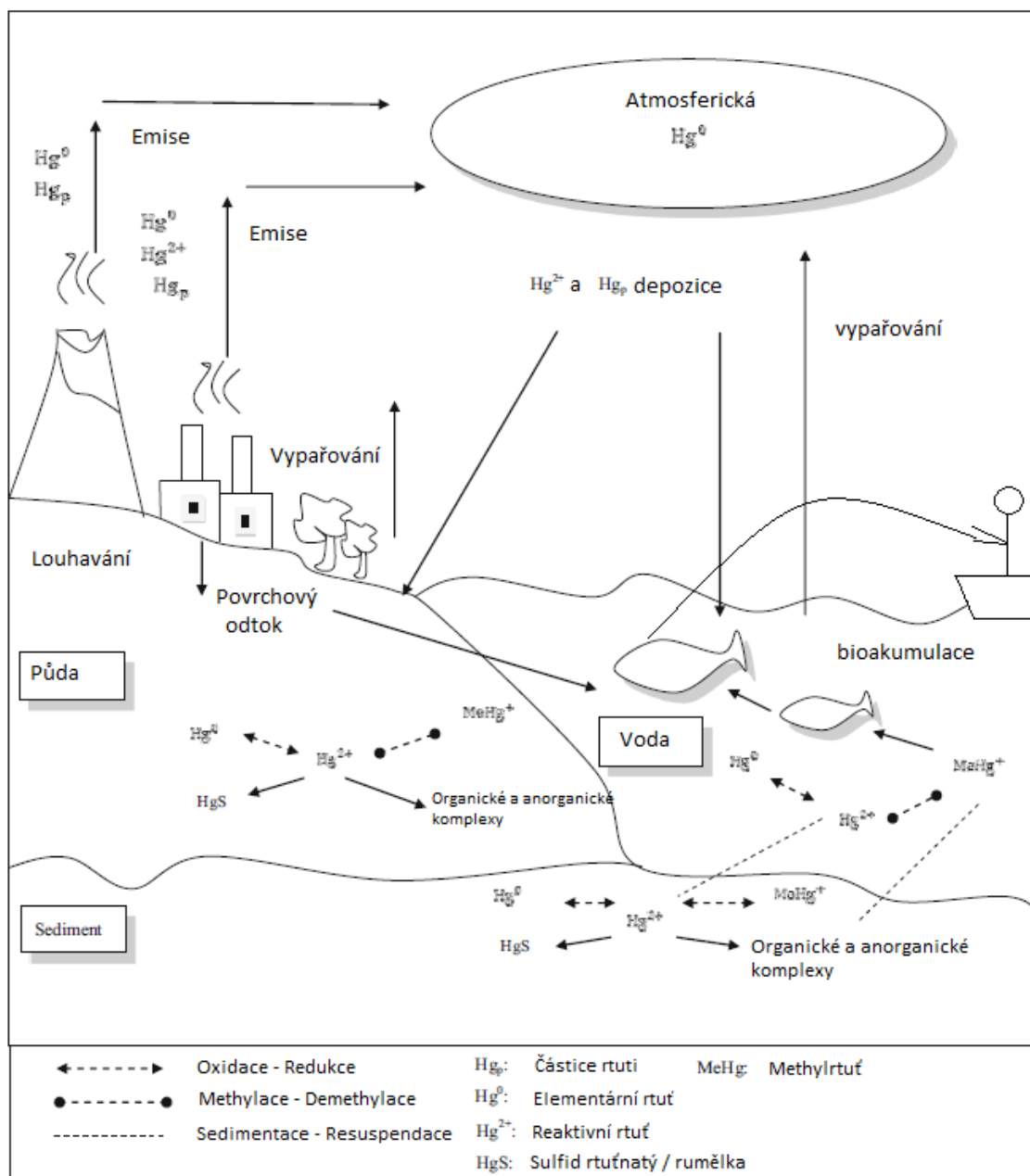
a to elementární rtuť (Hg^0), anorganické rtuti (Hg^{2+}) a organické formy, především MeHg. Tyto chemické formy rtuti přítomné v různých částech životního prostředí určuje biogeochemická cyklizace rtuti [22].

Elementární rtuť tvoří přibližně 90 % celkové rtuti. Plynná Hg^0 činí přibližně 95 % atmosférické rtuti. V atmosféře může Hg^0 cirkulovat v rozmezí 0,8 měsíce až 1,7 roku. Chování Hg^0 v atmosféře je dáno jeho jedinečnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Hg^0 má vysoký tlak par a nízkou rozpustnost ve vodě, což společně s pomalou oxidační rychlostí podporuje jeho dlouhodobý atmosférický transport od zdroje emisí. V plynné formě se může přepravovat na dlouhé vzdálenosti a rozptýlit tak v celosvětovém měřítku. Proto je rtuť považována za globální znečištění [20–22]. Když se Hg^0 uvolňuje do ovzduší z přírodních nebo antropogenních zdrojů, dochází k plynným a vodním reakcím, které ovlivňují transport a ukládání rtuti v atmosféře. Hg^0 může být oxidován na Hg^{2+} atomem bromu nebo v přítomnosti ozonu a vodíku. Rtuťová pára se snadno transportuje do atmosféry, usazuje se na zemi a ve vodě a pak se částečně uvolňuje do atmosféry [22].

Rozpustná rtuť ve formě Hg^{2+} se ukládá v povrchové vodě a na povrchu půdy mokrou (dešťovou a sněhovou) a suchou (gravitační usazování a povrchovou) sorpcí, také má nižší tlak par a je rozpustnější ve vodě oproti Hg^0 . Do půdy a vody je Hg^{2+} uložena v poměru 60:40. Nicméně Hg^{2+} může být převedena zpět na Hg^0 a vrácena do atmosféry za nezbytných podmínek, jako je fotolytická redukce a redukcí hydroperoxylového radikálu HO^2 [20, 22].

Rtuť ve formě Hg^{2+} může být ve vodním prostředí přeměněna chemickou reakcí – methylací za působení bakterií na MeHg [23]. Faktory, jako je slanost vody a koncentrace sulfidů ovlivňují chemickou přeměnu rtuti ve vodním systému. Vysoká hladina slanosti může inhibovat methylaci rtuti. Methylace Hg^{2+} v oceánech a mořích probíhá pomaleji než ve sladké vodě. Vysoké koncentrace sulfidů ve vodě, zejména v oceánu, také inhibují rtuť methylací v důsledku tvorby HgS [22]. MeHg je označována za nejtoxičtější formu rtuti. Ryby poté mohou absorbovat vzniklou MeHg z vody jak přes jejich žábry, tak přes přijatou potravou. Dravé ryby jsou vystaveny vyšším hladinám MeHg z jejich kořisti. MeHg se pevně váže na bílkoviny v tkáních ryb, včetně svalů [23]. Stupeň akumulace rtuti v rybích tkáních závisí hlavně na koncentraci tohoto prvku v prostředí, zejména v dnových sedimentech; na fyzikálně – chemických a biologických vlastnostech vody; a na druhu, věku a hmotnosti ryb [24]. Rtuť se poté dostává do potravního řetězce prostřednictvím spotřeby ryb a mořských produktů a stává se potenciální hrozbou pro lidské zdraví [25].

Pokud jde o půdu a sediment, je přirozená koncentrace rtuti v půdě velmi nízká, v rozmezí 0,01–0,2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ po celém světě. Vyšší koncentrace rtuti v půdách jsou způsobeny především antropogenní činností. V půdě se vyskytují různé formy rtuti. Hg^{2+} je biologicky dostupný druh rtuti, který může být absorbován rostlinami, na rozdíl od Hg^0 nebo HgS (rumělka). Biochemickou transformaci rtuti v půdách ovlivňuje organická hmota a teplota půdy [22].



Obrázek 2. Biogeochemický cyklus rtuti. Převzato a upraveno z [22].

2.4 Legislativní normy

Organismy účastníci se potravního řetězce hrají klíčovou roli při vylučování rtuti a následném trofickém přenosu. Sladkovodní nemasožravé ryby obsahují nižší koncentrace $MeHg$. Vyšší trofické třídy, jako jsou dravé ryby, mohou obsahovat až 106krát vyšší koncentrace celkové rtuti než obsahuje okolní voda. Ryby vyskytující se v tropických vodách mohou mít rychlejší a vyšší míru akumulace $MeHg$ než v mírných oblastech [11].

Celková koncentrace rtuti v rybách, používaných pro výrobu rybích omáček, se pohybuje v rozmezí asi od 0,07 do 0,10 $mg \cdot kg^{-1}$ [26]. Tyto koncentrace rtuti jsou relativně nízké v porovnání s maximálním povoleným obsahem rtuti dané Nařízením komise EU. Nařízení

uvádí, že produkty rybolovu a svalovina ryb má mít maximální limit $0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ čerstvé hmotnosti [27].

2.5 Stanovení rtuti

Rtuť a její sloučeniny způsobují kontaminaci vodních ekosystémů a tím i kontaminaci potravin, proto je stanovení rtuti věnována mimořádná pozornost. V posledních desetiletích dochází k rychlému vývoji nových analytických technik, které umožňují stanovení rtuti a jejich sloučenin v různých složkách životního prostředí.

Stanovení stopových koncentrací rtuti ve vysoce slaných omáčkách je považováno za obtížnou úlohu. Většinou jsou problémy analýzy spojené se složitou maticí vzorku a nízkou koncentrací rtuti. Analýza rtuti vyžaduje citlivé analytické techniky a často prekoncentrační krok [34].

Při stanovení celkového obsahu rtuti ve vzorku je nutné nejprve převést rtuť, vzhledem ke stabilitě chemických forem, z organické formy na anorganickou (Hg^{2+}) oxidací silnými kyselinami (HCl , H_2SO_4) nebo oxidačními činidly (H_2O_2 , KMnO_4). Takto připravená anorganická rtuť může být stanovena přímou detekcí nebo detekcí po redukci na atomární rtuť [14].

Během odběru, uchování a analýzy vzorku pro stanovení chemických forem rtuti je nutné zajistit, aby nedocházelo ke změnám ve složení vzorku [14].

2.5.1 Metody stanovení rtuti

K vlastnímu stanovení rtuti se využívá atomová absorpční spektrometrie (AAS), atomová emisní spektrometrie (AES), atomová fluorescenční spektrometrie (AFS), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) nebo nedestruktivní metody, mezi které patří rentgenfluorescenční spektrometrie XRF a PIXE [14].

Stanovení chemických forem rtuti se provádí kombinací tandemových technik se separačními metodami (plynovou chromatografií, vysoce účinnou kapalinovou chromatografií) s prvkově selektivní detekcí [14].

Pro stanovení celkového obsahu rtuti se s výhodou používá speciální analyzátor AMA 254 (Advance Mercury Analyser), případně TMA 254 (Trace Mercury Analyser) [14].

Z důvodu využití pouze AMA 254 v této práci, bude tomuto přístroji věnována největší pozornost.

2.5.1.1 Analyzátor rtuti AMA 254

Analyzátor rtuti AMA 254, vyvinutý společností Altec, Ltd., Česká republika jako pokročilá verze analyzátoru Trace Mercury TMA 254 je jednocelový atomový absorpční spektrometr. Umožňuje přímé stanovení rtuti v různých pevných i kapalných látkách bez předběžné úpravy nebo předběžné koncentrace vzorku [29]. Rozklad vzorku probíhá *in situ* přímo v přístroji. Zde je nejprve vzorek vysušen a spálen atmosféře bohaté na kyslík (99,5 %). Rozkladné produkty jsou transportovány přes amalgamátor, kde je rtuť selektivně zachycena. Poté je rtuť

vypuzena krátkodobým ohřevem do první měřící kyvety (delší), a poté do druhé měřící kyvety (kratší). Rtuť je tedy měřena dvakrát, ale s odlišnou citlivostí v první a druhé kyvetě [29, 30].

Analyzátor rtuti poskytuje detekční limit 0,01 ng a z pracovního rozsahu zařízení vyplývá, že maximální množství rtuti ve vzorku by nemělo překročit 500 ng z důvodu omezené kapacity amalgamátoru [29].

2.6 Technika difúzního gradientu v tenkém filmu (DGT)

Technika difúzního gradientu v tenkém filmu (Diffusive Gradients in thin films technique, DGT) je technika založená na procesech difúze a platností Fickových zákonů. Poprvé byla technika popsána v roce 1994 [31]. V současnosti se používá pro měření *in situ* stopových koncentrací celé řady převážně kineticky labilních kovových specií v oblasti monitorování znečištění životního prostředí v přírodních vodách, půdách a sedimentech [32]. V posledních letech byla tato technika využita taky v analýze potravin. První zmínka o využití techniky DGT v analýze potravin pochází z roku 2014, kde v časopise Food Chemistry Hong Chen a kol. publikovali aplikaci techniky DGT pro stanovení olova v sójových omáčkách [33].

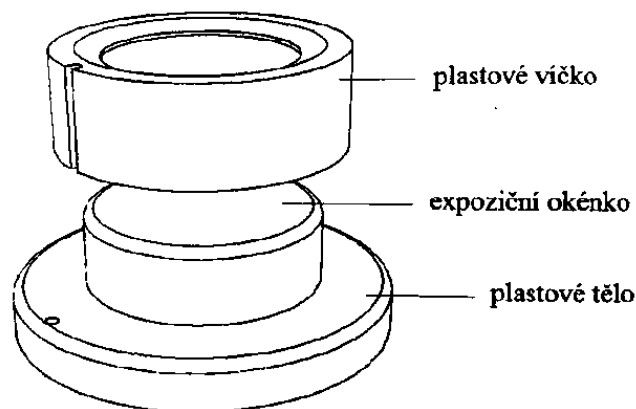
Techniku DGT lze využít pro stanovení stopových a ultrastopových koncentrací řádově v jednotkách $1 \cdot 10^{-12} \text{ g.l}^{-1}$ [32] více než 55 prvků [34].

K výhodám techniky DGT se řadí vysoká citlivost, jednoduchost provedení, prekoncentrační schopnosti, finanční nenáročnost, zachování distribuce a stability analytu během vzorkování, možnost využití pro současné stanovení více prvků, také ke speciální analýze, dále je schopna oddělit měřené analyty od komplikované matrice [28, 35].

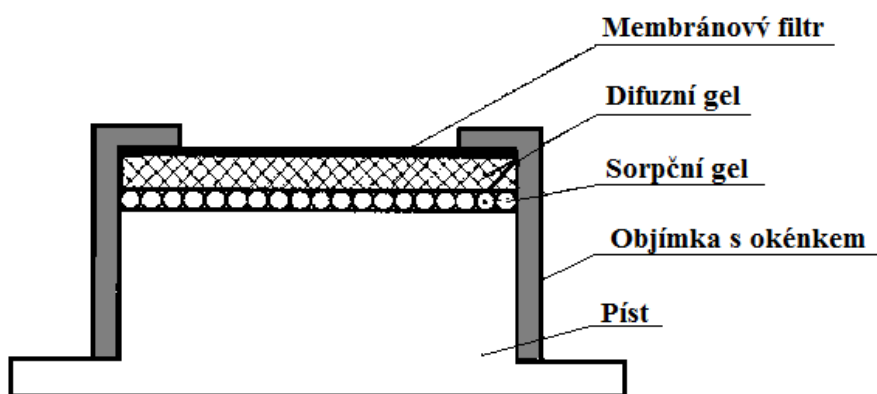
2.6.1 Princip DGT

Princip techniky DGT je založen na kinetické separaci specií z roztoku a jejich kumulaci v sorpčním médiu. K měření ve vodném prostředí se využívá vzorkovací jednotka, ve které jsou uloženy dva typy hydrogelů (sorpční a difúzní) společně s membránovým filtrem. Vzorkovací jednotka je vyrobena z plastu ve tvaru pístu (Obrázek 3), na který je položeno víčko s expozičním okénkem. První vrstvu tvoří hydrogel obsahující specifické sorpční médium, druhou vrstvu difúzní hydrogel. Oba tyto gely překrývá membránový filtr, který je chrání před mechanickým poškozením (Obrázek 4) [28, 32].

Po ponoření vzorkovací jednotky do sledovaného roztoku začnou ionty kovů difundovat difúzní vrstvou známé tloušťky Δg a vážou se na sorbent uložený v sorpčním gelu. Zde jsou prošlé ionty imobilizovány na funkčních skupinách na povrchu iontoměniče do doby, dokud není jeho kapacita plně nasycena [28, 32, 36].



Obrázek 3. Schematické znázornění vzorkovací jednotky [37].



Obrázek 4. Schematické znázornění jednotlivých gelů v jednotce DGT [37].

V difúzním gelu tak dochází k ustavení lineárního koncentračního gradientu ve velmi krátké době (Obrázek 5). Pokud je tento gradient během doby (t) měření konstantní, lze provést výpočet toku analytu (F) přes difúzní vrstvy tloušťky Δg pomocí 1. Fickova zákona difúze podle rovnice (1):

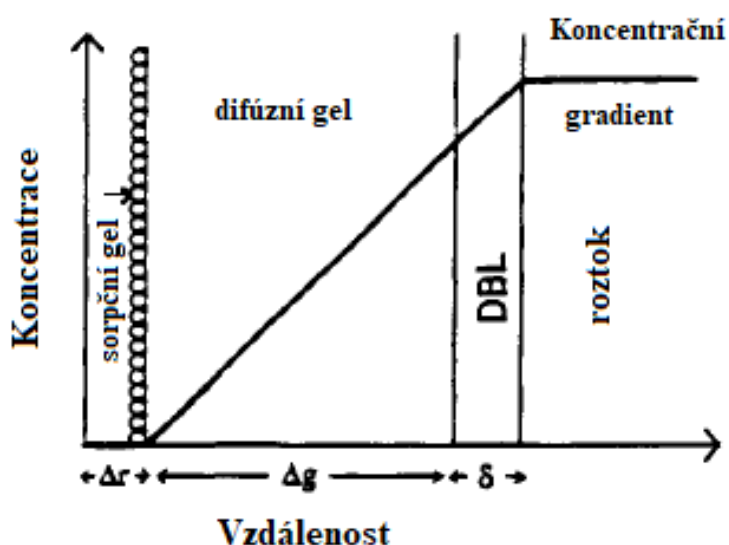
$$F = \frac{M}{A \cdot t} = \frac{D \cdot c}{\Delta g} \quad (1)$$

M je množství kovu v sorpčním gelu, A je plocha exponovaného difúzního gelu, D je difúzní koeficient kovu v gelu a c je koncentrace v měřeném roztoku.

Koncentrace analytu c v měřeném roztoku může být zpětně vypočtena z naměřeného toku F dle rovnice (2):

$$c = \frac{M \cdot \Delta g}{D \cdot t \cdot A} \quad (2)$$

Množství kovu M zachyceného v sorpčním gelu může být po vysušení gelu stanoveno pomocí přímých technik, např. rentgenovou fluorescencí XRF nebo technikou PIXE (částicemi indukovaná rentgenová emise). Alternativou těchto technik může být eluce kovu ze sorpčního gelu za použití známého objemu elučního činidla (nejčastěji pomocí zředěné kyseliny dusičné pro analýzu kovů) a následná analýza eluátu atomovou absorpční, atomovou emisní či hmotnostní spektrometrií. V případě stanovení rtuti se využívá přímé analýzy pomocí jednoúčelového atomového absorpčního spektrometru AMA 254 [28, 32, 37].



Obrázek 5. Schematické znázornění koncentračního gradientu ve vzorkovací jednotce DGT. Převzato a upraveno z [40].

2.6.2 Difúzní gely v DGT

Difúzní gel tvoří vrstvu mezi sorpčním gelem a membránovým filtrem vzorkovací jednotky. Ionty kovů přechází přes vrstvu difúzního gelu difúzí až k sorpčnímu gelu. Vhodným výběrem difúzního gelu lze určit, které formy kovů budou měřeny pomocí techniky DGT.

Základní vlastností difúzních gelů je velikost pórů, kterou lze měnit při přípravě gelu použitím vhodného monomeru a síťovadla. Různá velikost pórů pak určuje velikost specií schopných procházet gelem. Nejběžněji používaným difúzním gelem je polyakrylamidový gel, jiným používaným gelem je agarosový gel [32].

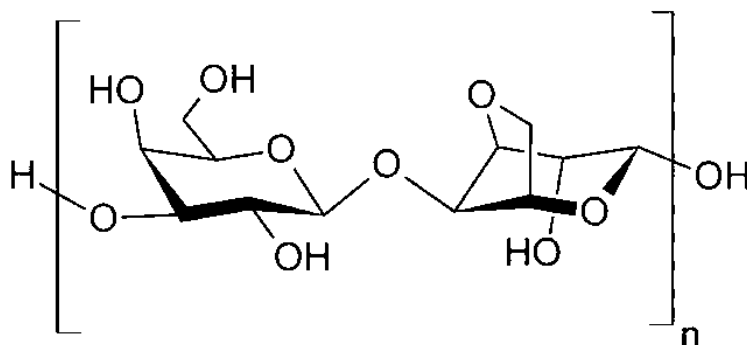
2.6.2.1 Polyakrylamidový gel

Polyakrylamidový gel je běžně používaným gelem v technice DGT. Přípravuje se polymerizací směsi agarosového síťovadla a monomerního akrylamidu po přidání katalyzátoru N,N,N',N' -tetramethylethylendiamin (TEMED) a iniciátoru polymerizační reakce $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$.

Takto získaný gel má velikost pórů 2–5 nm [14]. Z důvodu navázání rtuti na volné aminové skupiny gelu omezující její difúzi k iontoměničce, nelze tento gel využít k jejímu stanovení. Proto byl polyakrylamidový gel nahrazen gelem agarosovým [28].

2.6.2.2 Agarosový gel

Agarosa je lineární polysacharid sestávající z opakujících se jednotek agarobiosy, která je tvořena vzájemně vázanou β -D-galaktopyranosou a 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranosou (Obrázek 6). Po rozpuštění agarosy v horké vodě dochází ke vzniku dvojšroubovice, které jsou při ochlazení roztoku asociovány do trojrozměrné sítě pomocí hydrofobních interakcí a vodíkových vazeb [32]. Agarosový gel se používá pro stanovení rtuti [28].



Obrázek 6. Struktura agarosy [39].

2.6.3 Sorpční gely v DGT

Sorpční gel se nachází utěsněn ve vzorkovací jednotce společně s difúzním gelem a membránovým filtrem. V sorpčním gelu (polyakrylamidový, agarosový) je navázáno sorpční médium, kterým bývá iontoměnič sloužící ke stanovení kovů a jejich specií [28].

Nejpoužívanějším chelatujícím iontoměničem je Chelex-100, který obsahuje navázané skupiny kyseliny iminodietové. Slouží pro stanovení celé řady kovových specií *in situ* v přírodních vodách, ale také pro měření koncentrací stopových, minoritních a majoritních v jezerech, řekách a mořích [32]. Jednotka DGT obsahující sorpční gel s navázaným iontoměničem Chelex-100 je schopna měřit pouze rtuť vázanou ve slabých anorganických komplexech. Proto byly dále vyvíjeny nové sorpční gely, obsahující takové funkční skupiny, které jsou schopny vázat rtuť i v komplexech s větší konstantou stability [37].

Vzhledem k vysoké afinitě rtuti k thiolovým (-SH) skupinám, byly hledány nové iontoměniče, které by obsahovaly tyto -SH skupiny ve své struktuře. Mezi takové iontoměniče se řadí například Spheron-Thiol, Duolite GT73, Iontisorb AV-MP nebo v práci využitý Purolite S924 [37, 38].

2.6.3.1 Purolite S924

Purolite S924 je chelatující iontoměnič na bázi polystyrenu určený pro selektivní zachytávání rtuti. Rtuť je silně vázána na funkční skupiny (-SH) a vytváří vysoce stabilní komplexy s vysokou selektivní afinitou ve srovnání s jinými těžkými kovy. Purolite S924 je náchylný

k oxidaci, proto je dlouhodobý kontakt s atmosférou škodlivý. Doporučuje se, aby byl tento iontoměnič skladován pod vodou. Kapacita tohoto iontoměniče je udávána na 200 g.l⁻¹ rtuti Purolite S924 pracuje v rozsahu pH 1–11 [38].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

- Ultračistá deionizovaná voda vyrobená sanitací ELGA Purelab
- Kyselina dusičná 67 %, p.a.+ (Analytika Praha spol. s.r.o., ČR)
- Standardní roztok rtuti 1 g.l⁻¹ (Analytika Praha spol. s.r.o., ČR)
- Agarosa, Type I, Sigma-Aldrich, USA
- Dusičnan sodný, Lachema a.s., Brno, ČR
- Chlorid sodný, Lachema a.s., Brno, ČR

3.1.2 Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Jednotky DGT, DGT Research Ltd., Lancaster, UK
- Mikropipety, Thermo Scientific, finnpipette F1
- Třepačka, yellow line, Labicom s.r.o.
- Chladnička, Gorenje
- Vařič (topná deska), ETA 2107
- Míchačka, Biotech, Color squid
- Vícemístná magnetická míchačka, Helago, Jelo Tech
- Analytické váhy, Denver Instruments, SRN
- Membránový filtr, Pall Corporation, USA (Supor, velikost pórů 0,45 μm, průměr 2,5 cm, tloušťka 0,140 mm)
- Purolite S924, Lenntech, Netherlands

3.1.3 Přístroje

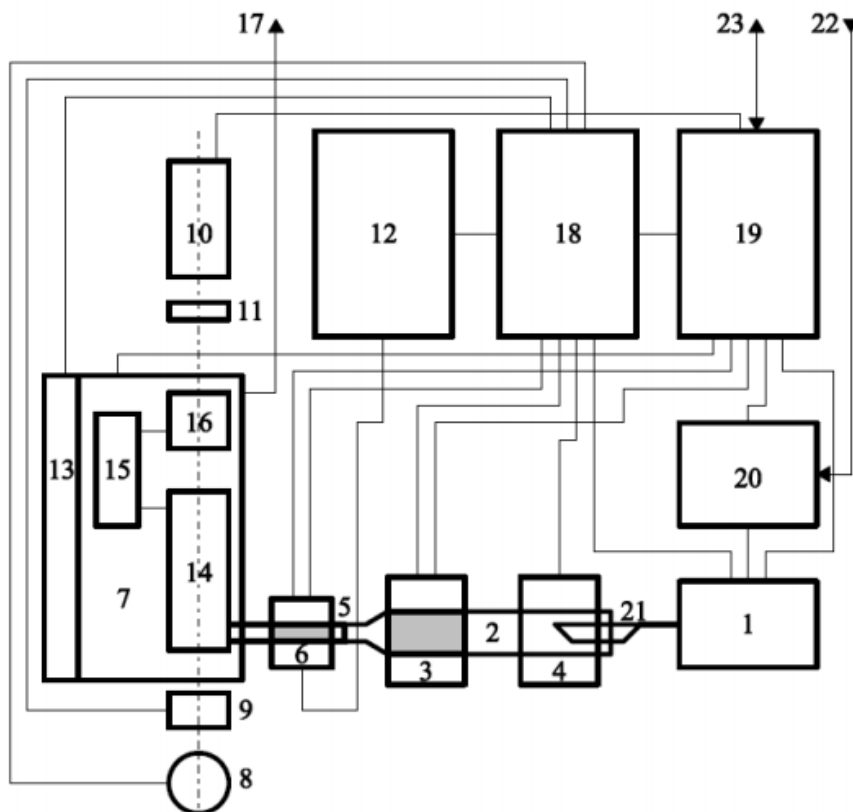
- AMA 254, Altec, Ltd., Česká republika

3.1.3.1 Popis přístroje AMA 254

Dávkovací zařízení (1) a dávkovací lodička (21) slouží k zavádění vzorku do přístroje. Vstupní část spalovací trubice (2) slouží pro termický rozklad vzorku pomocí spalovací pece (4). Druhá část spalovací trubice je vyplněna katalyzátorem, který je vyhříván na konstantní teplotu cca 550 °C, pomocí katalytické pece (3).

Amalgamátor (5) slouží pro zachycení rtuti z proudu plynných produktů rozkladu vzorku. Zachycená rtuť je uvolněna ohřevem pomocí vypuzovací pece (6). Blok měřících kyvet vyhříván pomocí topného elementu (13) na teplotu 120 °C, obsahuje dvě sériově uspořádané kyvety. Délky první (14) a druhé kyvety (16) jsou v poměru 10:1. Mezi tyto kyvety je zapojena zpoždovací nádobka (15), která je umístěna mimo optickou osu přístroje. Objem zpoždovací nádoby je delší než měřící kyveta (14). Zdrojem záření je nízkotlaká rtuťová výbojka (8), která může být zastíněna clonou (9). Součástí detektoru (10) je interferenční filtr (11), který izoluje spektrální čáru rtuti 253,65 nm. Chladicí čerpadlo (12) slouží k urychlení chladnutí amalgamátoru po vypuzení rtuti. Analogová elektronika (18) obsahuje zdroj pro rtuťovou

výbojku, napájecí zdroje pro digitální část a výkonové spínače pro pece a ostatní akční členy. Digitální část (19) obsahuje kromě číslicových obvodů A/D převodník také měřící zesilovače detektoru a čidel. Sériová komunikace (23) umožňuje komunikaci s PC. Celým přístrojem trvale protéká kyslík, od vstupu (22) až po výstup (17). Průtok kyslíku je udržován na konstantní hodnotě pomocí regulátoru průtoku (20) (Obrázek 7) [12].



Obrázek 7. Schéma přístroje AMA 254 [12].

3.1.3.2 Stanovení rtuti na přístroji AMA 254

Pro měření množství rtuti v exponovaných gelech a roztoku rtuti byl využit analyzátor rtuti (ADVANCE MERCURY ANALYSER, AMA 254).

Po spuštění programu byl vždy přístroj ponechán v klidu po dobu 20 minut na ustálení teplot pecí. Poté bylo na dávkovací lodičku napipetováno 100 μ l ultračisté vody pro vyčištění přístroje od zbytkové kontaminace. Čištění bylo opakováno do té doby, dokud naměřená absorbance neklesla pod hodnotu 0,003.

Pro měření rtuti v modelových roztocích bylo na lodičku nadávkováno 100 μ l z roztoku rtuti s programem 60-60-45 (sušení-rozklad-čekání), pro exponované gely s programem 60-150-45. Pomocí řídicího počítače byla lodička se vzorkem vnesena do spalovací trubice. Vzorek byl nejprve řízeným ohřevem vysušen a poté spálen v proudu kyslíku při teplotě 850–900 $^{\circ}$ C. U vzniklých rozkladných produktů, které prošly přes katalyzátor a u nichž byla dokončena oxidace, byly zachyceny látky kyselého povahy. Produkty spalování byly dále vedeny proudem kyslíku přes amalgamátor, ve kterém se selektivně zachytává rtuť. Aby se zabránilo kondenzaci

vody u rozkladných produktů, obsahujících obvykle vodní páru, je celá plynová cesta až po výstup z bloku měřících kyvet vyhřívána na teplotu 120 °C [12].

Po dokončení rozkladu vzorku byla měřena zachycená rtuť. Nejprve dochází k automatickému nulování pro měření absorbance, poté je rtuť uvolněna z amalgamátoru krátkodobým ohřevem. Páry rtuti jsou nosným plynem unášeny přes delší měřící kyvetu (v grafu měřený jako první pík). Potom je veškerá rtuť shromážděna ve zpoždovací nádobce (zobrazeno v grafu jako minimum mezi píky). Nakonec rtuť vstupuje do druhé (kratší) měřící kyvety (v grafu měřený jako druhý pík). Celková zjišťovaná rtuť je tedy měřena dvakrát, ale s odlišnou citlivostí [12].

Veškerá naměřená data byla vysílána do řídicího počítače, kde byla pomocí ovládacího programu převedena do formy přístupné uživateli [12].

Na závěr byl přístroj opět pročištěn se 100 µl ultračisté vody s programem 60-60-45 do poklesu absorbance pod 0,003 a ponechán 20 minut pro zchlazení teplot pecí. Poté byly přístroj i počítač vypnuty [12].

3.2 Popis analyzovaných vzorků

Vzorky pro analýzu byly zakoupeny na asijské tržnici. Celkem byly použity 2 vzorky rybích omáček, které se lišily v množství ryb: Nấm Ngủ a Nước Mắm cá Com Cao Cáp. Všechny tři omáčky byly vyrobeny ve Vietnamu.

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Příprava difúzního gelu

Difúzní gel byl připraven z 1,5% roztoku agarosy. Odměrným válcem bylo odměřeno 10 ml ultračisté vody. Na analytických vahách bylo zváženo 0,3 g agarosy a převedeno společně s vodou do Erlenmeyerovy baňky. Ta byla vložena do vodní lázně a za občasného promíchání byla agarosa v ultračisté vodě rozpuštěna.

Pomocí mikropipety bylo nabráno odpovídající množství rozpuštěného roztoku a opatrně vstříknuto mezi dvě předem připravená a předehřátá skla. Mezi skly byl umístěn tzv. skinner o tloušťce 0,5 mm, který byl přichycen pomocí svorek.

Skla s naplněným agarosovým roztokem byla vložena do chladničky a chlazena ve vertikální poloze asi 30 minut. Po ztuhnutí roztoku byla skla vytažena, pročištěna vodou a vzniklý gel byl opatrně oddělen od vrchního skla. Do hotového gelu byla vyražena kolečka o průměru 2,5 cm. Takto vzniklé gely byly uloženy do nádoby s ultračistou vodou.

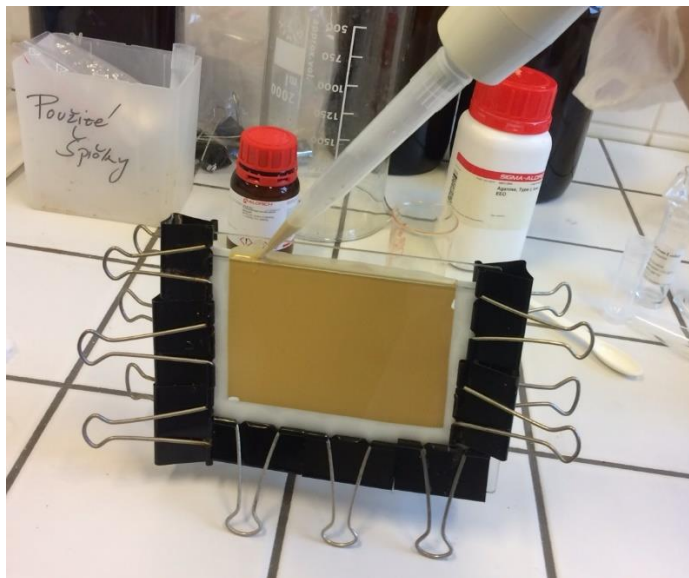
3.3.2 Příprava sorpčního gelu

Sorpční gel byl připraven z agarosového gelu a komerčně dostupného sorbentu Purolite S924.

Nejprve byl připraven agarosový (difúzní) gel stejně jako v kapitole 3.2.1. Poté bylo do zkumavky odváženo 0,35 g sorbentu Purolite S924 na analytických vahách. Mikropipetou bylo odměřeno odpovídající množství agarosového gelu a vstříknuto do připravené zkumavky. Vše bylo důkladně promícháno pomocí třepačky. Promíchaný roztok byl ihned odebrán

mikropipetou a vstříknut opět mezi dvě předem připravená a nahřátá skla, mezi nimiž byl umístěn skinner o tloušťce 0,5 mm (Obrázek 8).

Skla s naplněným sorpčním gelem byla umístěna do chladničky a chlazena v horizontální poloze asi 15 minut. Po ztuhnutí roztoku byla skla vytažena, pročištěna vodou a vzniklý gel byl opatrně oddělen od vrchního skla. Do hotového sorpčního gelu byla vyražena kolečka o průměru 2,5 cm. Takto vzniklé gely byly uloženy do nádoby s ultračistou vodou.



Obrázek 8. Příprava sorpčního gelu.

3.3.3 Sestavení jednotek DGT

Plastové vzorkovací jednotky pro DGT byly před použitím uloženy v roztoku kyseliny dusičné. Po vyjmutí byly jednotky opláchnuty ultračistou vodou. Na plastové tělo expozičního okénka jednotky byly postupně vkládány gely v pořadí sorpční gel, difúzní gel. Na difúzní gel byl vložen membránový filtr, který slouží proti mechanickému poškození gelů. Vše bylo uzavřeno plastovým víčkem.

Před vložením jednotek do roztoků, byly silonovým vláknem přivázány k sobě pomocí malých otvorů na každé jednotce. Pro udržení jednotky v roztoku byla dovnitř pístu vložena zátěž z olova.

3.3.4 Modelový roztok rtuti

Do větší skleněné nádoby bylo odměřeno 1–4 ultračisté vody v závislosti na experimentu. Mikropipetou bylo napipetováno takové množství standardního roztoku rtuti o koncentraci 1 g.l^{-1} , aby výsledná koncentrace rtuti činila asi 20 g.l^{-1} . Do roztoku bylo přidáno takové množství dusičnanu sodného a chloridu sodného, aby jejich výsledná koncentrace byla $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$. Vzniklý roztok byl míchán pomocí magnetické míchačky asi 1 hodinu pro ustálení koncentrace rtuti.

3.4 Základní testy pro ověření funkčnosti DGT v modelovém roztoku

3.4.1 Test lineární akumulace rtuti v závislosti na čase

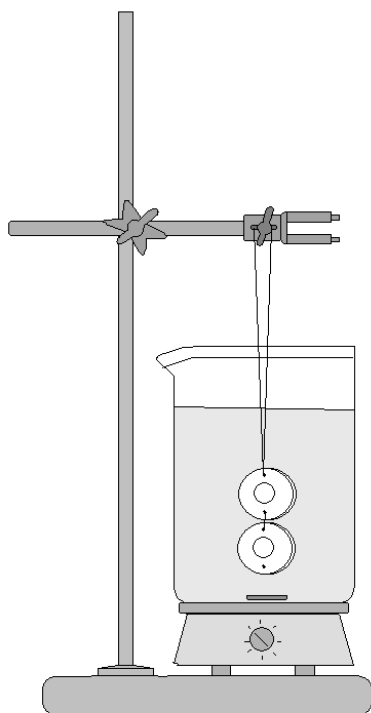
Test nasycenosti byl proveden v modelovém roztoku rtuti připraveném podle kapitoly 3.3.4. Do roztoku bylo vloženo 8 jednotek DGT. Každé 2 hodiny byly vytaženy dvě jednotky z roztoku rtuti, promyty ultračistou vodou, rozebrány a koncentrace rtuti v sorpčním gelu byla proměřena na přístroji AMA 254. Opět byla v průběhu měření kontrolována koncentrace rtuti v roztoku.

3.4.2 Test opakovatelnosti měření

Byl připraven modelový roztok rtuti podle podkapitoly 3.3.4. Do takto připraveného roztoku byly vloženy připravené jednotky DGT a pomocí silonu přidělány ke stojanu (Obrázek 9). Jednotky byly ponechány v roztoku rtuti po dobu 4 hodin.

Po uplynutí stanovené doby byly jednotky z roztoku vytaženy, opláchnuty ultračistou vodou, rozebrány a koncentrace rtuti v sorpčních gelech byla proměřena na přístroji AMA 254.

Před začátkem, v průběhu i na konci měření byla postupně kontrolována koncentrace rtuti v roztoku pomocí přístroje AMA 254.



Obrázek 9. Aparatura pro základní testy.

3.4.3 Test lineární akumulace rtuti v závislosti na reciproké difúzní tloušťce

Pro tento experiment byly použity difúzní gely se čtyřmi různými tloušťkami 0,25 mm; 0,50 mm; 0,75 mm a 1,00 mm. Z těchto gelů bylo sestaveno 8 jednotek a vloženo do roztoku, který byl připraven stejně jako v kapitole 3.3.4.

Jednotky byly ponechány v roztoku 4 hodiny, po uplynutí této doby byly jednotky vytaženy, promyty ultračistou vodou, rozebrány a koncentrace rtuti v sorpčních gelech byla proměřena na přístroji AMA 254. Opět byla v průběhu měření kontrolována koncentrace rtuti v roztoku.

3.4.4 Test vlivu koncentrace NaCl na techniku DGT

Do modelového roztoku rtuti bylo přidáno takové množství chloridu sodného, aby výsledná koncentrace chloridů v roztoku byla v rozmezí 2–50 g.l⁻¹. Takto připravený roztok byl ponechán jednu hodinu míchán pro ustálení koncentrace. Poté byly do roztoku vloženy připravené jednotky. Po 4hodinové expozici byly jednotky z roztoku vytaženy, rozebrány a bylo proměřeno množství nakumulované rtuti v testovaném sorpčním gelu.

3.5 Základní testy pro ověření funkčnosti DGT v roztoku rybí omáčky

3.5.1 Test lineární akumulace rtuti v závislosti na čase

Test nasycenosti byl proveden v 5krát zředěné rybí omáčce, do které byly přidány asi 3 µl standardního roztoku rtuti. Do roztoku bylo vloženo 6 jednotek. Každé 2 hodiny byly vytaženy dvě jednotky z roztoku, promyty ultračistou vodou, rozebrány a koncentrace rtuti v sorpčním gelu byla proměřena na přístroji AMA 254. Opět byla v průběhu měření kontrolována koncentrace rtuti v roztoku.

3.5.2 Test opakovatelnosti měření

Byl připraven roztok rybí omáčky, která byla 5krát zředěna ultračistou vodou. Do takto připraveného roztoku bylo napipetováno takové množství standardního roztoku rtuti, aby výsledná koncentrace činila 3 µg.l⁻¹. Jednotky byly ponechány v roztoku rtuti po dobu 4 hodin. Po uplynutí stanovené doby byly jednotky z roztoku vytaženy, opláchnuty ultračistou vodou, rozebrány a koncentrace rtuti v sorpčních gelech byla proměřena na přístroji AMA 254. Opět byla v průběhu měření kontrolována koncentrace rtuti v roztoku.

3.6 Analýza reálného vzorku

Pro testování reálného vzorku byl připraven roztok naředěním rybí omáčky 5krát ultračistou vodou. Do roztoku byly vloženy 4 jednotky DGT. Po 72 hodinách byly jednotky z roztoku vytaženy, opláchnuty ultračistou vodou, rozebrány a koncentrace rtuti v sorpčních gelech byla proměřena na přístroji AMA 254. Opět byla v průběhu měření kontrolována koncentrace rtuti v roztoku. Pro měření byly vybrány dvě rybí omáčky.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Limity detekce a kvantifikace přístroje AMA 254

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) přístroje AMA byl vypočítán z hodnot slepého stanovení rtuti. Byla provedena analýza rtuti bez navážení vzorku do dávkovací lodičky ($n = 6$). Průměrná hodnota slepého stanovení rtuti byla $0,041 \pm 0,009$ ng. Z této hodnoty byl vypočítán LOD a LOQ podle rovnic (3) a (4):

$$\text{LOD} = x_o + 3\sigma \quad (3)$$

$$\text{LOQ} = x_o + 10\sigma \quad (4)$$

kde x_o je průměrná hodnota slepého stanovení a σ značí směrodatnou odchylku.

Hodnota LOD byla určena na 0,71 ng a hodnota LOQ na 1,39 ng.

4.2 Limity detekce a kvantifikace techniky DGT

Pro zjištění limitu detekce a kvantifikace techniky DGT byly proměřeny neexponované sorpční gely na přístroji AMA 254. Celkem byly analyzovány 4 gely, naměřené průměrné množství rtuti v gelech činilo $0,74 \pm 0,09$ ng. Dle rovnice (2) bylo přepočteno množství rtuti v neexponovaných gelech na koncentraci c_{DGT} . Limit detekce a kvantifikace byl vypočten z rovnic (3) a (4), kde za x_o byla dosazena koncentrace c_{DGT} přepočtená z množství rtuti v neexponovaných gelech za předpokladu expozičního času (t) 72 hodin, difúzního koeficientu (D) $3,42 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, expoziční plochy (A) $3,14 \text{ cm}^2$ a tloušťky difúzní vrstvy (Δg) $0,067 \text{ cm}$.

Výsledná hodnota LOD byla určena na $0,025 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ a hodnota LOQ na $0,076 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Takové hodnoty LOD značí, že technikou DGT lze měřit i velmi nízké koncentrace rtuti oproti přístroji AMA 254.

4.3 Optimalizace přípravy sorpčního gelu

Pro optimalizaci přípravy sorpčního gelu byl použit sorbent Purolite S924. Příprava byla provedena dle standardních podmínek. První potíže nastaly při smísení sorbentu s agarosovým gelem, kdy byl připravený sorpční gel vstříknut mezi dvě skla, bohužel sorbent nebyl homogenně rozptýlen po celé ploše šablony. Tvořily se shluky, které při přípravě sorbentu Purolite S916 a S920 nenastaly. Proto byla navážka sorbentu upravena z 0,50 g na 0,35 g na 5 ml 1,5% agarosového gelu. Po takové úpravě se už shluky netvořily a sorpční gel byl plně homogenní.

Při oddělování gelu ze skel se vyskytl další problém, sorpční gel se lepil na skla a trhal se. Proto byl upraven agarosový gel z 1,5% na 2%. Byla tedy navýšena navážka agarosy. Dále byl gel ponechán v chladničce pouze 15 minut, aby bylo oddělení od skel snazší. Po těchto úpravách už se gel podařilo oddělit s minimálními problémy.

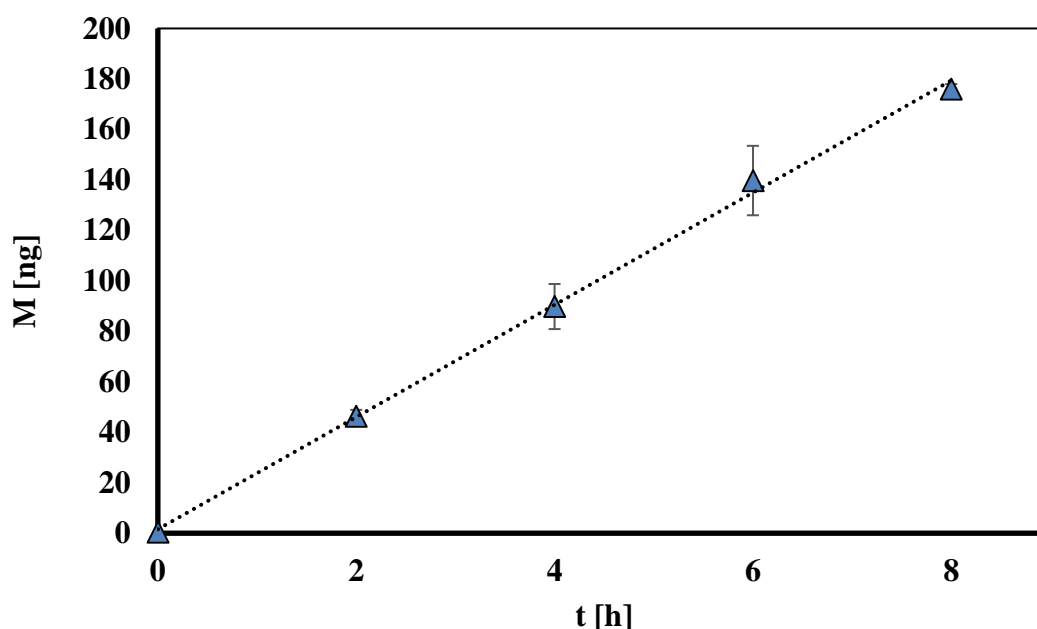
4.4 Základní testy pro ověření funkčnosti DGT

4.4.1 Test lineární akumulace rtuti v závislosti na čase

První experiment ověřování funkčnosti DGT se týkal časové závislosti. Jednotky DGT se známou tloušťkou agarosového gelu byly vystaveny po dobu 8 hodin míchanému modelovému roztoku. Každé 2 hodiny byly vyjmuty vždy dvě jednotky, které byly rozebrány tak, aby nedošlo k poškození sorpčního gelu pro jeho analýzu. Exponovaný sorpční gel byl poté změřen na analyzátoru rtuti AMA 254.

Množství akumulované rtuti (M) bylo vyneseno do grafu v závislosti na době expozice (t) (Obrázek 10). Pro množství rtuti naabsorbované v sorpčním gelu za těchto podmínek se předpokládá, že je ekvivalentní k množství iontů rtuti procházejícího difúzní vrstvou [41].

Množství rtuti zachycené v sorpčních gelech lineárně vzrůstalo s časem, zároveň M odpovídalo teoretickému množství, vypočteného ze základní rovnice pro techniku DGT. Tím byla potvrzena správnost a funkčnost připravených gelů, respektive techniky DGT.



Obrázek 10. Množství rtuti naakumulované v sorpčním gelu v závislosti na čase v modelovém roztoku rtuti.

Závislost byla použita pro výpočet difúzního koeficientu společně s rovnicí (5):

$$D = \frac{k \cdot \Delta g}{A \cdot t_s} \quad (5)$$

kde za k byla dosazena směrnice regresní přímky, za A plocha exponované části gelu, jehož hodnota činila $3,14 \text{ cm}^2$. Tloušťka difúzní vrstvy Δg byla určena na $0,067 \text{ cm}$ (difúzní gel, membránový filtr, DBL). Za t_s byl dosazen čas pro přepočítání hodin na sekundy, tedy 3600 s . Po dosazení hodnot do rovnice (5) byl difúzní koeficient spočten na $6,23 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

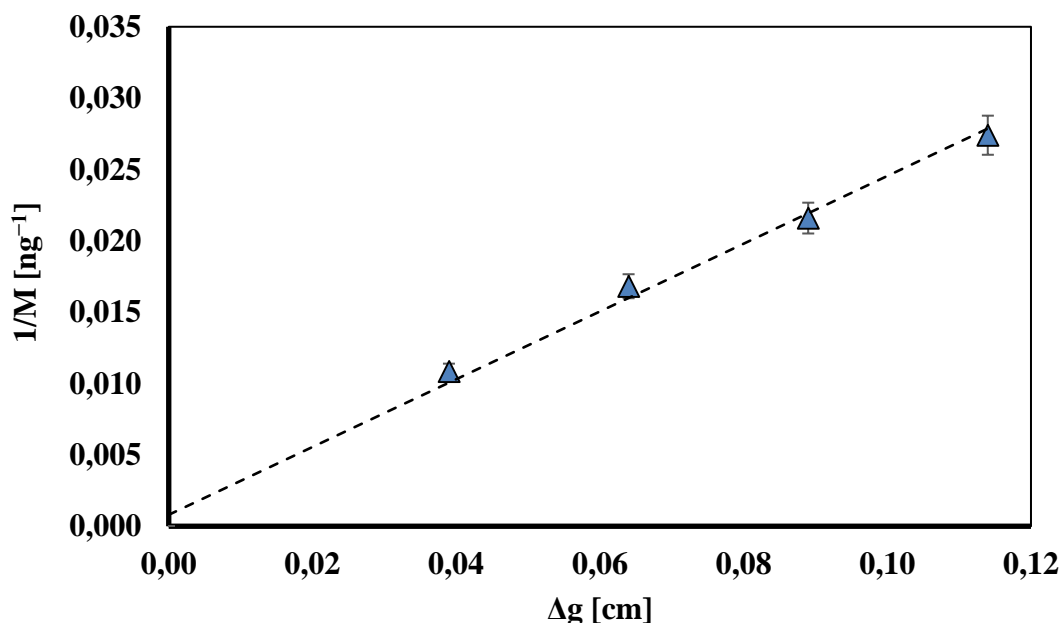
Ve studii Dočekalová a kol. byl difúzní koeficient v agarosovém gelu stanoven na $8,86 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ [42]. Rozdílné hodnoty difúzních koeficientů mohly být způsobeny přítomností chloridů, které byly použity z důvodu modelování matrice reálného vzorku, které obsahují velké množství této soli.

4.4.2 Test lineární akumulace rtuti v závislosti na reciproké difúzní tloušťce

Byl proveden druhý základní test pro techniku DGT. V tomto experimentu byly do modelového roztoku rtuti, popsaného v 3.3.4, ponořeny jednotky DGT, které obsahovaly 4 různé tloušťky difúzního gelu v rozmezí od 0,25 mm do 1 mm. Doba expozice jednotek v roztoku byla 4 hodiny.

Při použití DGT se obecně předpokládá, že je tloušťka DBL dostatečně tenká ve srovnání s tloušťkou difúzní gelové vrstvy a membránového filtru, která se při výpočtech vynechává. V práci Warkena a kol. bylo zjištěno, že tloušťka DBL není zanedbatelná. Bylo diskutováno, že tloušťka DBL je v mírně až dobře promíchávaných roztocích 0,23 mm, avšak podstatně silnější v roztocích špatně míchaných. Tloušťka DBL může ovlivnit chybu měření i na 20 % [43]. Proto byla tloušťka DBL pro dané měření proměřena.

Pro výpočet DBL byla sestavena závislost reciprokého množství M v ng^{-1} v závislosti na použitých tloušťkách difúzních gelů v cm [43] (Obrázek 11). DBL byla určena ze sklonu této závislosti na 0,03 mm. Hodnota DBL byla následně přičítána k tloušťce Δg v dalších výpočtech.



Obrázek 11. Závislost reciprokého množství rtuti na tloušťce difúzního gelu.

4.4.3 Test opakovatelnosti měření

Při testu opakovatelnosti byla naměřena koncentrace rtuti c_{AMA} , získána přístrojem AMA 254 v modelovém roztoku, zprůměrována a porovnána s koncentrací c_{DGT} získané technikou DGT. Koncentrace c_{DGT} byla vypočtena podle rovnice (2). Do této rovnice bylo dosazeno za M

průměrné množství rtuti naabsorbované v sorpčních gelech, udávané v ng. Tloušťka difúzní vrstvy byla určena na 0,067 cm (0,050 cm pro difuzní gel, 0,014 cm pro membránový filtr a 0,003 cm pro DBL). Hodnota difuzního koeficientu D byla spočtena na $6,23 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Čas t byl stanoven na 14400 s, což odpovídá 4 hodinové expozici, plocha exponovaného difuzního gelu byla $3,14 \text{ cm}^2$. Tabulka 2 obsahuje výsledky testu opakovatelnosti měření.

Tabulka 2. Porovnání koncentrací naměřené technikou DGT a přístrojem AMA 254 pro ověření správné funkce a připravenosti sorpčních gelů.

M [ng]	c_{AMA} [$\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	c_{DGT} [$\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]	rozdíl [%]
86,3	$22,5 \pm 0,7$	$20,6 \pm 0,7$	8,4

Z naměřených výsledků lze vyčíst, že koncentrace naměřená metodou DGT se příliš neliší od koncentrace naměřené analyzátozem rtuti AMA 254. Rozdíl činil asi 8 %, což podle DGT Research Ltd. je dostatečné pro správnou funkci sorpčních gelů.

4.4.4 Test vlivu koncentrace NaCl na techniku DGT

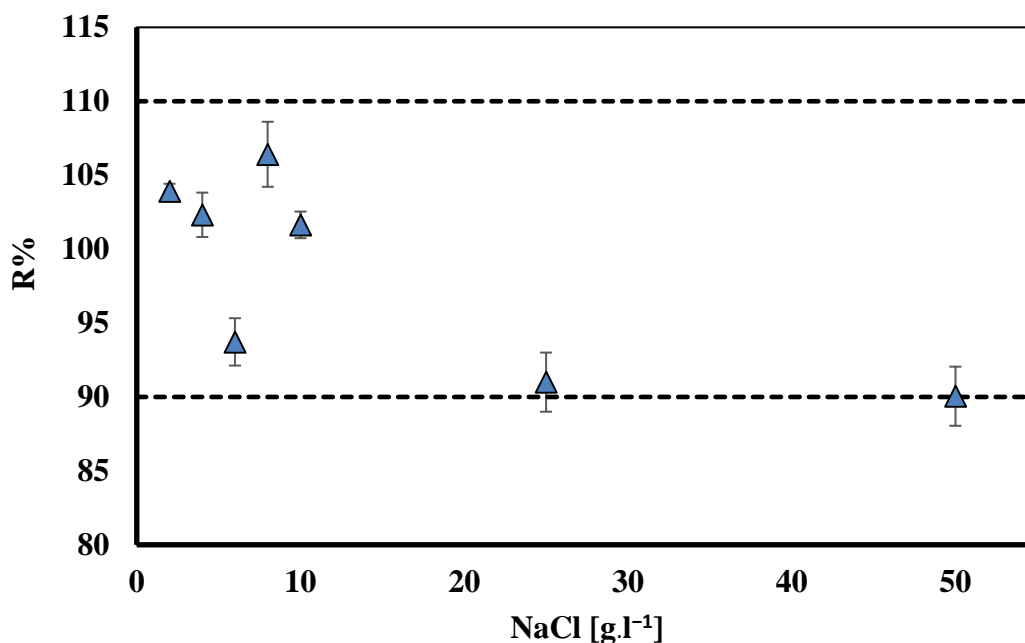
Vysoký obsah soli by mohl mít vliv na měření pomocí techniky DGT, proto byla technika testována ve vodných roztocích rtuti s koncentrací NaCl v rozmezí $2\text{--}50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obrázek 12). Výtěžnost rtuti $R\%$ byla vypočtena z rovnice (6):

$$R\% = \frac{c_{DGT}}{c_{AMA}} \cdot 100 \% \quad (6)$$

kde c_{DGT} značí koncentraci rtuti naměřenou technikou DGT a c_{AMA} koncentraci rtuti naměřenou přístrojem AMA 254.

Výtěžnosti rtuti v rozmezí koncentrací NaCl $2\text{--}10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v roztoku mírně kolísali, kdy se výtěžnost rtuti pohybovala v rozmezí 100-105 %. Takové kolísání hodnot lze připsat tomu, že pro každý experiment byl připraven zcela nový roztok. Se zvyšující se koncentrací NaCl výtěžnost rtuti nepatrně klesla k 90 %. Celková výtěžnost by se měla pohybovat v rozmezí 90 až 110 %, což bylo splněno.

Ke snížení výtěžnosti přispívá kompetitivní difúze mezi Hg^{2+} a Na^+ , která se navyšuje s postupným zvyšováním koncentrace NaCl [33].



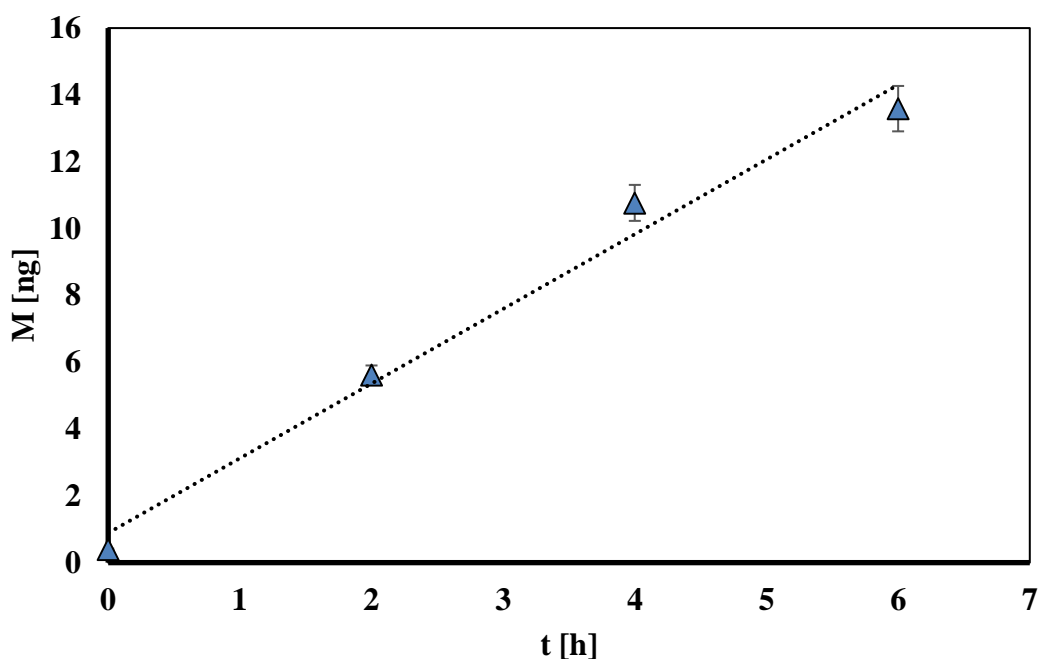
Obrázek 12. Ovlivnění prostředí chloridy. Závislost koncentrace NaCl ve vodném roztoku rtuti na výtěžnosti techniky DGT.

4.5 Ověřování funkčnosti techniky DGT v roztoku rybí omáčky

4.5.1 Test lineární akumulace rtuti v závislosti na čase

Rybí omáčka obsahuje kromě vysokého množství soli i dusíkaté látky. Z celkového obsahu dusíku 20 g.dl^{-1} je přítomno 16 g ve formě aminokyselin a oligopeptidů, proto je rybí omáčka považována za dobrý zdroj bílkovin [2]. Z tohoto důvodu byla ověřena linearita akumulace rtuti v závislosti na době expozice a byl ověřen difúzní koeficient. Ověření bylo provedeno v 5krát zředěné rybí omáčce, ke které byl přidán standardní roztok rtuti tak, aby výsledná koncentrace rtuti v roztoku byla $3 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ (Obrázek 13).

Z grafu lze vyčíst, že závislost naakumulované rtuti v sorpčním gelu lineárně vzrůstala s časem. Naměřené množství rtuti v sorpčních gelech však neodpovídalo teoretickému množství vypočítaného ze základní rovnice DGT s difúzním koeficientem $6,23 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Hodnota teoretického množství rtuti byla téměř o polovinu vyšší. Proto byl přepočítán difúzní koeficient pro roztok rybí omáčky.



Obrázek 13. Množství rtuti naakumulované v sorpčním gelu v závislosti na čase ve zředěné rybí omáčce.

Pro výpočet difúzního koeficientu byla využita rovnice (5). Zde byly použity pro výpočet stejné hodnoty jako v kapitole 4.4.1. Pouze směrnice regresní přímky k se lišila pro naředěnou rybí omáčku. Difúzní koeficient byl určen na $3,42 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Takové snížení koeficientu mohlo být způsobené interakcí rtuti s obsaženými bílkovinami, které tak mohou bránit difúzi rtuti difúzním gelem.

4.5.2 Test opakovatelnosti a výtěžnosti měření

Pro ověření opakovatelnosti a výtěžnosti měření ve zředěné rybí omáčce byl proveden další základní test. Zde byly použity sorpční gely vytvořené z několika sérií a byla testována jejich příprava. Pro analýzu byly vloženy do roztoku rybí omáčky jednotky DGT, ve kterých bylo množství rtuti naakumulované v sorpčních gelech zprůměrováno. Taktéž celková koncentrace rtuti naměřená přístrojem AMA 254 měřená v průběhu 4hodinové expozice, byla přepočtena na průměrnou hodnotu.

Tabulka 3 uvádí naměřené a vypočítané výsledky měření a jejich výtěžnost. Výtěžnost $R\%$ byla vypočtena z rovnice (6) a činila tak 102,2 %. Hodnota vyhovuje podmínkám, kdy se má $R\%$ pohybovat v rozmezí 90–110 %. Také bylo ověřeno, že přidané množství rtuti odpovídalo naměřenému množství rtuti.

Tabulka 3. Poměr koncentrací naměřených přístrojem AMA 254 a technikou DGT, uváděných jako výtěžnost měření.

M [ng]	$c_{\text{AMA}} [\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}]$	$c_{\text{DGT}} [\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}]$	R%
7,4	$3,1 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,6$	102,2

4.6 Analýza reálného vzorku – rybí omáčky

Pro první analýzu byla vybrána rybí omáčka Nưóc Mắm cá Com Cao Cáp, která obsahovala 95 % ančoviček neboli sardel. Ančovičky použité pro výrobu této omáčky byly divokého původu, zachycené v Pacifickém oceánu. Rybí omáčka obsahovala 26 g proteinů ve 100 ml.

Pro druhou analýzu byla vybrána rybí omáčka Nắm Ngủ, která obsahovala více než 97 % ančoviček neboli sardel odchycených na farmě. Dále obsahovala 10 g.l⁻¹ celkového dusíku, z toho 6,25 g proteinů a 0 g lipidů ve 100 ml.

Rybí omáčka byla vždy 5krát zředěna ultračistou vodou. Jednotky byly ponechány v roztoku po dobu 72 hodin. Poté bylo proměřeno množství rtuti zachycené v sorpčních gelech a rovnicí (1) přepočítáno na koncentraci c_{DGT} . Výsledkem bylo porovnání koncentrace rtuti naměřené technikou DGT s koncentrací rtuti získanou naměřením pomocí přístroje AMA 254 (Tabulka 4).

Doba expozice byla převzata z práce [33]. Z důvodu vyššího množství rtuti zachyceného v sorpčním gelu (45,6 ng a 28,9 ng) a lineární závislosti získané v kapitole 4.6.1 lze říci, že pro analýzu by mohla být využita i kratší doba expozice, např. 24 hodin.

Koncentrace rtuti v omáčce zjištěná analýzou AMA 254 a pomocí techniky DGT se liší o cca 10 %. Chybu lze připsat tomu, že při měření takto nízkých koncentrací dochází k větším chybám měření při technice AAS. Koncentrace rtuti naměřená pomocí AMA 254 může být ovlivněna složitou maticí rybích omáček. Výťažnost R% se pohybuje v rozmezí 109–111 %. Lze tedy konstatovat, že technika DGT je vhodná pro měření rtuti v rybích omáčkách.

Tabulka 4. Výsledky koncentrací rtuti naměřených technikou DGT a přístrojem AMA. Zároveň porovnání dvou různých rybích omáček touto analýzou.

M [ng]	c_{AMA} [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	c_{DGT} [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	R%
45,6	4,3 ± 0,2	5,3 ± 0,4	108,8
28,9	2,4 ± 0,3	3,3 ± 0,3	111,1

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci byl použit sorpční gel pro techniku DGT obsahující sorbent Purolite S924. Technika DGT byla následně testována pro možnost stanovení rtuti v modelových roztocích a následně byla použita pro stanovení rtuti v rybích omáčkách.

Při přípravě sorpčního gelu bylo nutné vyřešit problém s křehkostí gelu připraveného podle standardních podmínek. Tento problém se podařilo vyřešit snížením navážky sorbentu použitého pro přípravu gelu a zvýšením koncentrace nosného agarosového gelu z 1,5% na 2%. Připravené gely byly vloženy do plastových vzorkovacích jednotek DGT a technika DGT byla testována v modelovém roztoku rtuti. Provedením základních testů doporučených firmou DGT Research Ltd bylo zjištěno, že množství rtuti v sorpčních gelech lineárně vzrůstalo s rostoucí dobou expozice jednotek DGT v roztoku rtuti a také že množství rtuti akumulované v sorpčním gelu za expoziční čas 4 hodiny lineárně vzrůstalo s reciprokou tloušťkou difúzního gelu. Z provedených experimentů byl vypočítán efektivní difúzní koeficient rtuti, který byl $6,23 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a tloušťka vrstvy difúzního rozhraní (DBL), která byla 0,003 cm. Z naměřených dat bylo zjištěno, že technika DGT pracuje správně, stanovený difúzní koeficient rtuti odpovídá hodnotám publikovaných v literatuře a také, vzhledem k nízké hodnotě DBL, že míchání modelových roztoků míchadlem při 400 ot/min je dostatečné a míchání neovlivňuje naměřené výsledky. Vzhledem k tomu, že rybí omáčky obsahují vysokou koncentraci soli, byl testován vliv koncentrace NaCl v roztoku na stanovení rtuti technikou DGT. Koncentrace NaCl do $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ neovlivňovala správnost měření technikou DGT.

Po provedení testů v modelovém roztoku byla technika DGT testována v rybí omáčce naředěné ultračistou vodou v poměru 1:4. Testy opět potvrdily správnou funkci techniky DGT, vypočítaný efektivní difúzní koeficient byl však nižší ($4,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Nižší stanovený difúzní koeficient rtuti v zředěné rybí omáčce lze vysvětlit interakcí rtuti s jinými složkami rybí omáčky než jen se solí (např. s aminokyselinami a peptidy).

Optimalizovaná technika DGT byla použita pro stanovení rtuti ve dvou vzorcích rybí omáčky. Pro kontrolu byla koncentrace rtuti v rybí omáčce také stanovena přímo technikou CV-AAS. Rybí omáčka vyrobená z ryb odlovených v oceánu obsahovala asi 5krát vyšší koncentraci rtuti než omáčka vyrobená z ryb odlovených na farmě. Koncentrace rtuti naměřené přímo technikou CV-AAS a technikou DGT byly porovnatelné. Při hodnocení výsledků je potřeba uvést, že v jednom vzorku rybí omáčky byla koncentrace rtuti na hraně limitů detekce techniky CV-AAS, zatímco technika DGT díky zakoncentrování rtuti v sorpčním gelu byla schopná detekovat i velmi nízké koncentrace rtuti. Při porovnání obou technik je dále potřeba vyzdvihnout schopnost techniky DGT separovat rtuť ze složité matrice. Zatímco analýza sorpčních gelů byla bezproblémovou analýzou, analýza rybích omáček snižovala životnost použité instrumentální techniky díky vysokému obsahu soli ve vzorku. Po několika analýzách byla viditelná koroze všech kovových součástí přístroje AMA 254.

6 SEZNAM LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

- [1] LOPETCHARAT, K., Yeung J. CHOI, Jae W. PARK a Mark A. DAESCHEL. FISH SAUCE PRODUCTS AND MANUFACTURING: A REVIEW. *Food Reviews International* [online]. 2001, 17(1), 65-88 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1081/FRI-100000515. ISSN 8755-9129. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/FRI-100000515>
- [2] FUKAMI, Katsuya, Sachiyo ISHIYAMA, Hitoshi YAGURAMAKI, Takuya MASUZAWA, Yoshimitu NABETA, Kenichi ENDO a Mitsuya SHIMODA. Identification of Distinctive Volatile Compounds in Fish Sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2002, 50(19), 5412-5416 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1021/jf020405y. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf020405y>
- [3] SASAKI, Tetsuya, Ryohei ARAKI, Toshihide MICHIHATA, Miyuki KOZAWA, Koji TOKUDA, Takashi KOYANAGI a Toshiki ENOMOTO. Removal of cadmium from fish sauce using chelate resin. *Food Chemistry* [online]. 2015, 173, 375-381 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.08.134. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614015404>
- [4] WAISUNDARA, Viduranga, Nilakshi JAYAWARDENA a Mindani WATAWANA. Safety of Fermented Fish Products. *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods* [online]. Elsevier, 2016, 2016, , 149-168 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1016/B978-0-12-800605-4.00008-6. ISBN 9780128006054. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128006054000086>
- [5] MCIVER, Robert C., Roger I. BROOKS a Gary A. REINECCIUS. Flavor of fermented fish sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1982, 30(6), 1017-1020 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1021/jf00114a003. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00114a003>
- [6] DA SILVA, Daniel Levi França, Meire Ane Pitta DA COSTA, Laiana Oliveira Bastos SILVA a Walter Nei Lopes DOS SANTOS. Simultaneous determination of mercury and selenium in fish by CVG AFS. *Food Chemistry* [online]. 2018, , - [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.05.020. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618308100>
- [7] LIU, Yuan, Guijian LIU, Zijiao YUAN, Houqi LIU a Paul K.S. LAM. Heavy metals (As, Hg and V) and stable isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in fish from Yellow River Estuary, China. *Science of The Total Environment* [online]. 2018, 613-614, 462-471 [cit. 2018-05-13]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.088. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969717324294>
- [8] PARANJAPE, Avnee R., Britt D. HALL a John SMOL. Recent advances in the study of mercury methylation in aquatic systems. *FACETS* [online]. 2017, 2(1), 85-119 [cit. 2018-05-13]. DOI: 10.1139/facets-2016-0027. ISSN 2371-1671. Dostupné z: <http://facetsjournal.com/doi/10.1139/facets-2016-0027>

- [9] JUNQUÉ, Eva, Mercè GARÍ, Rosa Maria LLULL a Joan O. GRIMALT. Drivers of the accumulation of mercury and organochlorine pollutants in Mediterranean lean fish and dietary significance. *Science of The Total Environment* [online]. 2018, 634, 170-180 [cit. 2018-05-13]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.335. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718310957>
- [10] SYVERSEN, Tore a Parvinder KAUR. The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2012, 26(4), 215-226 [cit. 2018-05-13]. DOI: 10.1016/j.jtemb.2012.02.004. ISSN 0946672X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X12000077>
- [11] REICHELTL-BRUSHETT, Amanda J., Jane STONE, Pelli HOWE, Bernard THOMAS, Malcolm CLARK, Yusthinus MALE, Albert NANLOHY a Paul BUTCHER. Geochemistry and mercury contamination in receiving environments of artisanal mining wastes and identified concerns for food safety. *Environmental Research* [online]. 2017, 152, 407-418 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1016/j.envres.2016.07.007. ISSN 00139351. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935116302882>
- [12] Velíšek J. *Chemie potravin*. 2. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-01-1.
- [13] Cibulka J. *Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře*. Praha: Academia, 1991. ISBN 80-200-0401-7.
- [14] HOUSEROVÁ, P., K. JANÁK, P. KUBÁŇ, J. PAVLÍČKOVÁ a V. KUBÁŇ. Chemické formy rtuti ve vodních ekosystémech-vlastnosti. *Chemické listy* [online]. 2006, 100(10), 862-876 [cit. 2018-05-13]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1874/1874>
- [15] Bencko V., Lener J., Cikrt M. *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. 2. přepracované a doplněné vyd., v Grada Publishing 1. vyd. Praha: Grada, 1995. ISBN 80-7169-150-X.
- [16] Klein O., Bencko V. *Ekologie člověka*. Praha: Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-432-1.
- [17] Kastnerová M. *Výživové poradenství v praxi: vědecká monografie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2014. ISBN 978-80-7394-500-8.
- [18] Kubáčková J. *Chemie a toxikologie potravin*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2014. ISBN 978-80-7464-598-3.
- [19] Modrá H. *Toxikologie potravin: vybrané kapitoly*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-750-3.
- [20] GONZALEZ-RAYMAT, Hansell, Guangliang LIU, Carolina LIRIANO, Yanbin LI, Yongguang YIN, Jianbo SHI, Guibin JIANG a Yong CAI. Elemental mercury: Its unique properties affect its behavior and fate in the environment. *Environmental Pollution* [online]. 2017, 229, 69-86 [cit. 2018-04-27]. DOI:

- 10.1016/j.envpol.2017.04.101. ISSN 02697491. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749116325519>
- [21] KIKUCHI, Tetsuro, Hisatoshi IKEMOTO, Katsuyuki TAKAHASHI, Hisashi HASOME a Hiromasa UEDA. Parameterizing Soil Emission and Atmospheric Oxidation-Reduction in a Model of the Global Biogeochemical Cycle of Mercury. *Environmental Science & Technology* [online]. 2013, 47(21), 12266-12274 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1021/es401105h. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/es401105h>
- [22] LI, W. C. a H. F. TSE. Health risk and significance of mercury in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2015, 22(1), 192-201 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1007/s11356-014-3544-x. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3544-x>
- [23] OKYERE, H., R.B. VOEGBORLO a S.E. AGORKU. Human exposure to mercury, lead and cadmium through consumption of canned mackerel, tuna, pilchard and sardine. *Food Chemistry* [online]. 2015, 179(22), 331-335 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.01.038. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615000400>
- [24] KRAL, Tomas, Jana BLAHOVA, Lenka SEDLACKOVA, Jiri KALINA a Zdenka SVOBODOVA. Mercury in canned fish from local markets in the Czech Republic. *Food Additives & Contaminants: Part B-Surveillance* [online]. 2016, 10(2), 149-154 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1080/19393210.2017.1284904. ISSN 1939-3210. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19393210.2017.1284904>
- [25] FENG, Xinbin a Gary N. BIGHAM. Mercury biogeochemical cycling in mercury contaminated environments. *Applied Geochemistry* [online]. 2011, 26(2), 153- [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/j.apgeochem.2010.11.012. ISSN 08832927. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0883292710002532>
- [26] LIU, Jin-Ling, Xiang-Rong XU, Shen YU, Hefa CHENG, Jia-Xi PENG, Yi-Guo HONG a Xin-Bin FENG. Mercury contamination in fish and human hair from Hainan Island, South China Sea: Implication for human exposure. *Environmental Research* [online]. 2014, 135, 42-47 [cit. 2018-05-12]. DOI: 10.1016/j.envres.2014.08.023. ISSN 00139351. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935114002898>
- [27] Nařízení Komise (ES) č. 420/2011 ze dne 29. dubna 2011, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity kontaminujících látek v potravinách. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2011, L 111, s.54
- [28] A Sorption Gel with Titanium Dioxide for Mercury Determination by the Technique of Diffusion Gradient in Thin Film. *Chemické listy* [online]. 2013, 107(2), 160-164 [cit. 2017-12-28]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/768/768>

- [29] SYBALOVÁ, Jiřina, Jan KUČERA, Marek FIKRLE a Barbora DRTINOVÁ. Determination of the total mercury in contaminated soils by direct solid sampling atomic absorption spectrometry using an AMA-254 device and radiochemical neutron activation analysis. *Microchemical Journal* [online]. 2013, 110, 691-694 [cit. 2017-12-28]. DOI: 10.1016/j.microc.2013.08.004. ISSN 0026265X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X13001458>
- [30] Návod na obsluhu přístroje AMA 254. Altec s. r. o. Praha, 2000.
- [31] DAVISON, W. a H. ZHANG. In situspeciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* [online]. 1994, 367(6463), 546-548 [cit. 2017-12-27]. DOI: 10.1038/367546a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/367546a0>
- [32] DIVIŠ, P., H. DOČEKALOVÁ a V. ŘEZÁČOVÁ. Gel techniques for in situ measurement in natural waters, soils and sediments. *Chemické listy* [online]. 2005, 99(9), 640-646 [cit. 2017-12-29]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2017/2017>
- [33] CHEN, Hong, Lianwen GUO, Menghan ZHANG, Jiali GU, Keli ZHONG, Le BO a Jianrong LI. Determination of lead in soybean sauces by the diffusive gradients in thin films technique. *Food Chemistry* [online]. 2014, 165, 9-13 [cit. 2017-12-29]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.105. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614008218>
- [34] GARMO, Øyvind Aaberg, Oddvar RØYSET, Eiliv STEINNES a Trond Peder FLATEN. Performance Study of Diffusive Gradients in Thin Films for 55 Elements. *Analytical Chemistry* [online]. 2003, 75(14), 3573-3580 [cit. 2017-12-29]. DOI: 10.1021/ac026374n. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac026374n>
- [35] *Workshop Speciační analýza 2017: 22.-25. května 2017, Skalka u Ježova*. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2017. ISBN 978-80-88195-02-3.
- [36] ŘEZÁČOVÁ-SMETKOVÁ, V., B. DOČEKAL a H. DOČEKALOVÁ. Application of diffusive gradients in thin film technique to soil characterization. *Chemické listy* [online]. 2005, 99(8), 594-599 [cit. 2018-05-13]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2025/2025>
- [37] Diviš, Pavel. *Vývoj a aplikace techniky difúzního gradientu v tenkém filmu pro stanovení rtuti v přírodních vodách*. Brno: VUTIUM, 2013. Vědecké spisy Vysokého učení technického v Brně. Habilitační a inaugurační spisy. ISBN 978-80-214-4781-3.
- [38] Ion Selective / Chelating Purolite S924. *Lenntech* [online]. Netherlands, 1993 [cit. 2018-05-13]. Dostupné z: <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Purolite-S924-L.pdf>
- [39] WANG, Zheng, Kun YANG, Haining LI, et al. In situ observation of sol-gel transition of agarose aqueous solution by fluorescence measurement. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, 112, 803-808 [cit. 2018-05-14]. DOI:

- 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.020. ISSN 01418130. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017346937>
- [40] ZHANG, Hao. a William. DAVISON. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. *Analytical Chemistry* [online]. 2002, 67(19), 3391-3400 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1021/ac00115a005. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00115a005>
- [41] DIVIŠ, Pavel, Roman SZKANDERA, Lukáš BRULÍK, Hana DOCEKALOVÁ, Peter MATÚŠ a Marek BUJDOŠ. Application of New Resin Gels for Measuring Mercury by Diffusive Gradients in a Thin-films Technique. *Analytical Sciences* [online]. 2009, 25(4), 575-578 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.2116/analsci.25.575. ISSN 0910-6340. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/analsci/25.575?from=CrossRef>
- [42] DOCEKALOVA, H a P DIVIS. Application of diffusive gradient in thin films technique (DGT) to measurement of mercury in aquatic systems. *Talanta* [online]. 2005, 65(5), 1174-1178 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.08.054. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914004005387>
- [43] WARNKEN, Kent W., Hao ZHANG a William DAVISON. Accuracy of the Diffusive Gradients in Thin-Films Technique: Diffusive Boundary Layer and Effective Sampling Area Considerations. *Analytical Chemistry* [online]. 2006, 78(11), 3780-3787 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1021/ac060139d. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac060139d>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie
CV-AAS	atomová absorpční spektrometrie s generováním studených par (cold vapour atomic absorption spektrometry)
AES	atomová emisní spektrometrie
AFS	atomová fluorescenční spektrometrie
AMA 254	jednoúčelový atomový absorpční spektrometr (Advance Mercury Analyser 254)
DBL	difúzní hraniční vrstva (Diffusive Boundary Layer)
DGT	technika difúzního gradientu v tenkém filmu (Diffusive Gradient in Thin films technique)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EFSA	evropský úřad pro bezpečnost potravin
EU	evropská unie
HCl	kyselina chlorovodíková
Hg ⁰	elementární rtuť
Hg ²⁺	rtuťnatý iont, anorganická rtuť
HO ²	hydroperoxylový radikál
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HgS	sulfid rtuťnatý (rumělka)
H ₂ SO ₄	kyselina sírová
ICP-MS	spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
Mg ²⁺	hořečnatý iont
MeHg	methylrtuť
NaCl	chlorid sodný
Na ⁺	sodný iont
PIXE	prvková analýza pomocí protonového svazku
XRF	rentgenofluorescenční spektrometrie
-SH	thiolová skupina
TMA 254	stopový analyzátor rtuti (Trace Mercury analyser 254)

Zn^{2+}

zinečnatý iont

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

A	expoziční plocha (cm^2)
c	koncentrace analytu v měřeném roztoku ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
c_{AMA}	koncentrace rtuti změřená přístrojem AMA 254 ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
c_{DGT}	koncentrace rtuti zjištěná technikou DGT ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
D	difúzní koeficient kovu ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)
δ	tloušťka difúzní hraniční vrstvy (mm)
Δg	tloušťka difúzní vrstvy (cm)
F	tok analytu ($\text{mol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
M	množství kovu zachycené v sorpčním gelu (ng)
$R\%$	výtěžnost měření (%)
t	doba expozice jednotek DGT v roztoku (s)
t_s	čas určený pro přepočet hodiny na sekundy (3600 s)