

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

ANALÝZA ALKYLDERIVÁTŮ RTUTI V BIOTICKÝCH MATRICÍCH.

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LENKA TUHOVČÁKOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

ANALÝZA ALKYLDERIVÁTŮ RTUTI V BIOTICKÝCH MATICÍCH.

ANALYSIS OF ALKYL-DERIVATIVES OF MERCURY AT BIOTIC MATRIXES.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

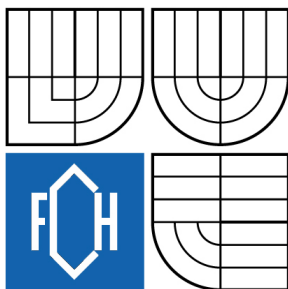
LENKA TUHOVČÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. HELENA DOLEŽALOVÁ
WEISSMANNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0270/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka)	Tuhovčáková Lenka	
Studijní program	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (M2805)	
Studijní obor	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí diplomové práce	Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	

Název diplomové práce:

Analýza alkylderivátů rtuti v biotických maticích.

Zadání diplomové práce:

1. zpracování literární rešerše
2. výběr separačních technik
3. analýza alkylderivátů rtuti
4. vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Lenka Tuhovčáková
student(ka)

Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Rtuť, zvláště její organické formy alkylderiváty, jsou závažným nebezpečím pro životní prostředí a lidskou populaci díky jejich toxickým vlastnostem a snadné akumulaci v potravním řetězci. Z tohoto důvodu je důležité stanovovat tyto velmi toxické sloučeniny ve vodě a v sedimentu v suchozemských a vodních živočiších.

Tato práce se zabývá stanovením alkylderivátů rtuti v rybí svalovině. Pro izolaci methylrtuti ze vzorků byla využita extrakce založená na vyluhování kyselinou chlorovodíkovou s následnou extrakcí do toluenu. Na stanovení výše uvedených specií byla využita technika plynové chromatografie s mikrodetektoem elektronového zachytu. Výhoda této metody je možnost přímého stanovení MeHg bez zařazení derivatizačního kroku, ale hlavní nevýhoda je chvostování píků, což je způsobeno polaritou methylrtuti. Tento jev byl zde viditelný. Mez detekce byla stanovena na 11 ng/g. Pro stanovení výtěžnosti byl použit certifikovaný referenční materiál CRM 464 svaloviny tuňáka. Hodnota byla určena na 64,9%. Obsah methylrtuti v analyzovaných rybích tkáních byl v rozsahu od 16,31 – 268,77 ng/g. Výsledky byly porovnány s obsahem celkové rtuti a relativní obsah MeHg byl od 14,71% do 55,53% celkové rtuti.

ABSTRACT

Mercury, especially its organic derivatives bring significant risk to the environment and human population due to their toxic properties and easy accumulation in the food chain. For this reason it's important to determine these very toxic compounds in marine and terrestrial animals, in water and sediment.

This study is focused on determination of alkyl – derivatives of mercury in fish tissues. The extraction based on acidic digestion in hydrochloric acid and subsequent extraction with toluene was used for isolation of methyl – mercury from samples. Gas chromatography with electron capture microdetection was used for identification of before – mentioned species. The main advantage of this technique is the possibility of a direct measurement of methylmercury without using any derivatization step, but the main disadvantage is a peak tailing. This effect was outward. Detection limit of the method was established on 11 ng/g. The CRM 464 reference material – tuna fish – was used for the recovery evaluation and on the result is $64,9 \pm 2,0\%$. The contents of methylmercury in fish tissues were within the range from 16,31 to 268,77 ng/g. The results were compared with amounts of total Hg and relative methylmercury contents were in range from 14,71% to 55,53%.

KLÍČOVÁ SLOVA

rtuť, alkylderiváty rtuti, separační techniky, biotické matrice

KEYWORDS

mercury, alkyl - derivatives of mercury, separation techniques, biotic matrixes

TUHOVČÁKOVÁ, L. *Analýza alkylderivátů rtuti v biotických matricích*. Brno, 2008. 61s. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí diplomové práce Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

V Brně dne 1.5.2008

.....
Lenka Tuhovčáková

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucí diplomové práce Mgr. Heleně Doležalové Weissmannové, Ph.D. za věnovaný čas a cenné rady. Také děkuji odbornému konzultantovi panu doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. a Ing. Ludmile Mravcové za pomoc v laboratořích. Dále bych chtěla poděkovat, že mi bylo umožněno zpracovávat diplomovou práci na Ústavu veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulty veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

Zvláštní poděkování patří mým rodičům za to, že mi umožnili studovat na této škole.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. CHEMICKÉ FORMY RTUTI	7
2.1.1. <i>Anorganické formy rtuti</i>	7
2.1.2. <i>Organické formy rtuti</i>	8
2.2. BIO - GEOCHEMICKÝ CYKLUS CHEMICKÝCH FOREM RTUTI.....	10
2.2.1. <i>Formy rtuti v atmosféře</i>	11
2.2.2. <i>Formy rtuti v terestrickém ekosystému</i>	11
2.2.3. <i>Formy rtuti ve vodním ekosystému</i>	12
2.3. ALKYLDERIVÁTY RTUTI – ORGANICKÉ FORMY RTUTI	13
2.3.1. <i>Vlastnosti alkylderivátů rtuti</i>	13
2.3.2. <i>Toxicita a ekotoxicita alkylderivátů rtuti</i>	13
2.4. METHYLRTUŤ	15
2.4.1. <i>Afinita methylrtuti k –SH skupinám</i>	16
2.4.2. <i>Methylace anorganické rtuti za vzniku methylrtuti</i>	17
2.4.2.1. <i>Biotický způsob methylace</i>	17
2.4.2.2. <i>Abiotický způsob methylace</i>	18
2.4.3. <i>Bioakumulace methylrtuti ve vodních ekosystémech a v tkáních vodních organismů</i>	18
2.4.4. <i>Odhad expozice obyvatelstva methylrtuti v ČR</i>	20
2.5. STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU RTUTI	21
2.6. STANOVENÍ ALKYLDERIVÁTŮ RTUTI	22
2.6.1. <i>Faktory ovlivňující stabilitu specií rtuti během odběru, skladování a přípravy vzorků</i>	23
2.6.2. <i>Metody izolace methylrtuti ze vzorku</i>	24
2.6.3. <i>Prekoncentrace</i>	24
2.6.4. <i>Metody separace a detekce methylrtuti</i>	26
2.6.5. <i>Speciační analýza methylrtuti s použitím GC-ECD</i>	28
2.6.6. <i>Speciační analýza methylrtuti s použitím HPLC – CV – AFS</i>	29
2.6.7. <i>Speciační analýza methylrtuti s použitím HPLC – CV – AAS</i>	29
2.7. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ ANALYTICKÝCH DAT	30
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
3.1. CHEMIKÁLIE	33
3.2. PŘÍSTROJE.....	33
3.2.1. <i>Odstředivka</i>	33
3.2.2. <i>Analyzátor rtuti AMA 254</i>	33
3.2.2.1. <i>Zpracování vzorku AMA 254</i>	33
3.2.3. <i>Plynový chromatograf s detekcí elektronového záchytu GC/μECD</i>	34
3.2.3.1. <i>Zpracování vzorků v systému GC/μECD</i>	34
3.3. REÁLNÉ VZORKY RYB	35
3.3.1. <i>Zpracování ryb</i>	36
3.3.2. <i>Extrakce</i>	36
3.4. CERTIFIKOVANÝ REFERENČNÍ MATERIÁL	36

3.5.	VZORKY S PŘÍDAVKEM STANDARDU METHYLRTUTI	37
3.6.	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	37
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1.	KALIBRACE PŘÍSTROJE AMA	38
4.2.	KALIBRACE PŘÍSTROJE GC/ μ ECD	38
4.3.	EXTRAKCE, VÝTĚŽNOST METODY	40
4.3.1.	<i>Certifikovaný referenční materiál</i>	<i>40</i>
4.3.2.	<i>Vzorky s přídatkem standardu methylrtuti</i>	<i>40</i>
4.3.3.	<i>Srovnání výtěžnosti použitím CRM a vzorků se standardním přídatkem</i>	<i>41</i>
4.4.	PŘESNOST STANOVENÍ METHYLRTUTI GC/ μ ECD	42
4.5.	REÁLNÉ VZORKY	42
4.5.1.	<i>Stanovení methylrtuti</i>	<i>42</i>
4.5.2.	<i>Srovnání obsahů methylrtuti MeHg a celkové rtuti THg</i>	<i>50</i>
5.	ZÁVĚR	55
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	56
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	60

1. ÚVOD

Rtuť se nachází ve všech složkách ekosystému a je považována za globální polutant. Sloučeniny rtuti se nacházejí v atmosféře, ve vodě, v horninách i v organismech. Patří mezi jednu z nejtoxičtějších látek vyskytujících se v životním prostředí a v biotě, díky svému akumulacnímu a perzistentnímu charakteru [1]. Toxicita rtuti je závislá na formě výskytu. Za nejtoxičtější formu rtuti je považována methylrtuť. Ta vzniká methylací anorganické formy rtuti některými bakteriemi žijících v sedimentech. Ze sedimentů se rtuť dostává do vody, poté do vodních organismů a postupuje dále potravním řetězcem. Zejména organické formy rtuti mají schopnost kumulovat se v organismech [2]. Jejich vyšší koncentrace v organismech působí neurotoxicky, poškozují centrální nervovou soustavu. Díky své lipofilitě methylrtuť proniká přes biologické membrány, krev – mozek, placenta. Vzhledem k rozdílné ekologické toxicitě jednotlivých forem rtuti je důležité stanovit ve složkách životního prostředí nejen celkovou rtuť, ale také její jednotlivé formy [3]

Mezi nejčastěji používané techniky pro stanovení specií rtuti patří plynová a kapalinová chromatografie ve spojení s UV/VIS, atomovou absorpční, emisní a hmotnostně spektrometrickou detekcí. V této práci je použita technika plynové chromatografie s mikrodetektořem elektronového záchytu. Pomocí této metody byl stanoven obsah methylrtuti v biotických maticích – rybách a posouzena kontaminace studovaných organismů tímto polutantem.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Chemické formy rtuti

Rtuť se vyskytuje v omezeném počtu oxidačních stavů – 0, +I, +II. Přesto vytváří širokou škálu sloučenin, které se liší svými fyzikálními, chemickými i toxickými vlastnostmi. Rozlišují se formy anorganické, kam se řadí rtuť elementární spolu s rtuťnými a rtuťnatými sloučeninami a organické formy rtuti, tzv. organokovové/organortuťnaté sloučeniny [3].

2.1.1. Anorganické formy rtuti

Elementární rtuť je jediným prvkem, jehož páry jsou výhradně jednoatomové [3]. Za normálního tlaku rtuť vře při 358,53 °C, přičemž vznikají v průhledu modré páry. Za normální teploty je rtuť stříbrolesklá kapalina, která po silném ochlazení tuhne ve stříbrolesklé osmistěny, které poté tají při teplotě -38,87 °C. Rtuť těká s vodní parou, je dobrým elektrickým vodičem, je toxická skoro ve všech sloučeninách a slévá se s různými kovy za vzniku amalgamů [4].

V přírodě se v kovové formě vyskytuje pouze sporadicky. Vyskytuje se zhruba ve dvaceti minerálech, z čehož nejvíce rozšířená je rumělka, HgS, cinabarit. Dalšími minerály, které můžeme v přírodě nalézt jsou tiemannit HgSe, coloradoit HgTe, kalomel Hg₂Cl₂ a coccinit Hg₂I₂ [4].

Do prostředí se dostává rtuť jak z přírodních, tak z antropogenních zdrojů. Hlavními přírodními zdroji jsou větrná eroze, mořské aerosoly, říční odnos, zvětrávání hornin, těkání kovové rtuti z ložiskových akumulací a sopečná činnost. Stále větší roli však hrají zdroje antropogenní. Přírozené i antropogenní emise činí v současnosti řádově 10⁷ kg Hg za rok [7].

Přírozené zdroje: ve formě sloučenin – vyvěřelé sloučeniny, sedimentované sulfidové minerály, v elementární formě vzácně

Antropogenní zdroje:

- některé fungicidy používané při výrobě celulózy a papíru
- zpracování chlorovaných uhlovodíků [8]
- výroba chloru amalgamovým způsobem – v Evropě představují emise z továren na výrobu chloru asi 14% celkových antropogenních emisí rtuti
- spalování – fosilní paliva (uhlí ropa, plyn), dřevo, odpady, odpadní kaly, krematoria [9]
- destilace olejů a uhlí
- výroba elektrických kontaktů
- zemědělská mořidla (Ceresan, Ceresol, TAG a další)
- amalgamace
- regulační technika
- lékařství – aktivní složka různých diuretik, antiseptik, kožních léčiv a zubních amalgamů
- laboratorní barviva [8]
- těžba, úprava a zpracování rud a kovů

- elektrochemie (elektrody, kaly z elektrolýzy solanek)
- chemické a výrobní procesy: Hg sloučeniny, barvy, baterie, teploměry, výchozí látky a katalyzátory pro různé chemické výrobky [10]
- vysokoteplotní procesy: tavení, výroba koksu, litiny, cementu a vápna
- další zdroje: fluorescenční lampy, skládky nebezpečných a komunálních odpadů, skládky hlušiny, narušení povrchu [8].

Mezi další anorganické formy rtuti se řadí rtuťné Hg_2^{2+} a rtuťnaté Hg^{2+} sloučeniny. Mezi nejvíce vyskytující se formy jednomocné rtuti jsou halogenidy. Nejznámější sloučenina obsahující Hg_2^{2+} ion je kalomel Hg_2Cl_2 . Je poměrně málo rozpustný ve vodě (2 mg/l při 25 °C). Dvojmocná rtuť vytváří mnohem větší množství chemických sloučenin než rtuť jednomocná. Patří mezi ně oxidy, sulfidy, halogenidy, soli silných oxokyselin a řada koordinačních sloučenin obsahujících především sulfidické vazby $\text{Hg}^{\text{II}}-\text{S}$ a dále vazby $\text{Hg}^{\text{II}}-\text{X}$ či $\text{Hg}^{\text{II}}-\text{N}$ [3].

Toxicita elementární rtuti a jejich anorganických forem se projevuje především napadením jater, ledvin a gastrointestinálního traktu. Za normálních podmínek však nezůstávají v těle dost dlouho, aby se zde mohly akumulovat. Mezi akutní projevy otravy rtuti se řadí bolesti břicha, průjemy a zvracení. Projevy chronické otravy bývají často nespecifické - od studených končetin, vypadávání vlasů, přes zažívací poruchy, různé psychické potíže až po závažné stavy jako např. chudokrevnost, léčbě odporující chronická kandidóza, revmatické choroby či onemocnění ledvin [5]. Elementární rtuť se také vyznačuje svojí neurotoxicitou. Poškození nervové soustavy je zapříčiněno tím, že páry elementární rtuti mohou prostupovat přes hematoencefalickou bariéru díky své dobré rozpustnosti v tucích. Neurotoxicita rtuti se projeví už při velmi malých koncentracích, proto se tento účinek řadí mezi tzv. kritické toxické účinky rtuti [6]. Kalomel je nejčastěji příčinou akutních otrav perorální cestou. Do organismu se však může dostat také cestou dermální, která je příčinou většinou chronických otrav. Smrtelná dávka je 0,2 až 1 g. Příznaky otravy se nejprve projeví pálením v ústech, sliněním, bolestmi břicha a dostaví se krvavé průjemy. Postupně zduří slinné žlázy a začíná zánět ústní sliznice. Chronická expozice je doprovázena tvorbou šedého lemu kolem zubních krčků a poté se zuby začnou uvolňovat. Dostaví se typické příznaky otravy rtutí – poškození ledvin, urémie (hromadění dusíkatých látek v organismu způsobené nedostatečnou funkcí ledvin). A nelze-li ledviny nahradit, nastává smrt [11]. Toxicita dvojmocných anorganických forem rtuti je nízká. Konkrétně sulfid rtuťnatý není považován za jed. Pokud však budeme uvažovat chronickou otravu sulfidem rtuťnatým, může docházet k jeho přeměně na toxičtější formy, neboť má schopnost kumulace v organismu.

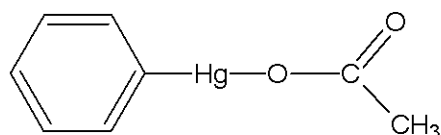
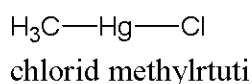
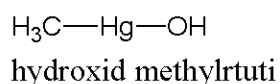
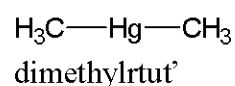
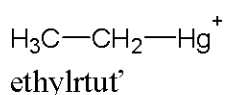
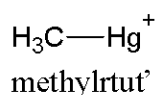
2.1.2. Organické formy rtuti

Organokovové formy rtuti jsou organické formy, ve kterých má rtuť oxidační číslo +II. Je známo velké množství organortuťnatých sloučenin, z nichž některé mají určité pozitivní fyziologické vlastnosti. Získávají se reakcí chloridu rtuťnatého a Grignardových činidel ve vhodných molárních poměrech [4]. Tyto sloučeniny obsahují jeden nebo dva uhlovodíkové zbytky navázané na atom kovu a vytváří tak sloučeniny typu RHgX nebo RHgR' , kde R a R' jsou uhlovodíkové zbytky. Nejčastěji se jedná o metylové ($-\text{CH}_3$), ethylové ($-\text{C}_2\text{H}_5$) nebo fenylové ($-\text{C}_6\text{H}_5$) či tolylové ($-\text{C}_7\text{H}_7$) skupiny. Symbol X pak označuje anionty, jako jsou

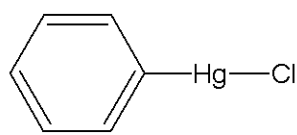
halogenidy, dusičnany, sulfidy či sírany [3]. Podle typu navázaných skupin (alkyly nebo arily) se rozlišují dva typy organokovových sloučenin, alkylderiváty a arylderiváty. Mezi nejčastěji vyskytující se alkylderiváty patří sloučeniny jako methylrtuť MeHg^+ , dimethylrtuť $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, ethylrtuť $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$, hydroxid a chlorid methylrtuti CH_3HgOH , CH_3HgCl . Mezi často vyskytující se arylderiváty patří sloučeniny jako octan fenylrtuti $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgOCOCH}_3$ a chlorid fenylrtuti $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgCl}$ [4,20]. Strukturní vzorce všech organických sloučenin rtuti jsou zobrazeny na obr. 2.1.

Arylderiváty jsou v porovnání s alkylderiváty rtuti méně toxické. Jsou také méně nebezpečné pro CNS. Jejich toxicita se projevuje především vznikem dermatitid až tvorbou puchýřů (zejména po delším kontaktu), hojících se i několik týdnů. Po požití lokálně dráždí sliznici zažívacího traktu. Mohou také poškozovat srdeční sval (extrasystoly a jiné poruchy rytmu), vzácněji poškozují ledviny, játra a krvetvorbu [20]. Chlorid fenylrtuti je pro centrální nervovou soustavu méně toxický než alkylderiváty rtuti. Způsobuje však závažné poškození jater, srdce, vznik anémie, leukopenie (snížený počet bílých krvinek) a alergie. Vstřebává se pokožkou. Octan fenylrtuti je účinnou součástí mořidel pro obilí (Ceresan, Ceresol, TAG a další). Akutní otrava touto látkou způsobuje progresivní slabost, slinění, nauseu (nucení ke zvracení), krvácení dásní a v těžkých případech ztuhnutí svalů a oslabení zraku. Chronické otravy mají za následek poruchy funkce jater, ledvin a krvetvorby [11].

Organokovové sloučeniny rtuti jsou v životním prostředí poměrně často vytvářeny z anorganických forem rtuti mechanismem neenzymatického přenosu methylové skupiny z methylkobalaminu na Hg^{2+} [3]. Užívají se pro svoje fungicidní a pesticidní vlastnosti jako mořidla obilí (např. fenylmerkuriacetát, methylrtuť. a j.), dále v medicíně jako desinficiencia (např. fenylmerkuriborát, fenylmerkurisalicylát a j.) a jako diuretika (např. Salyrgan, Uragan, Mercuretin aj.) [20].



octan fenylrtuti

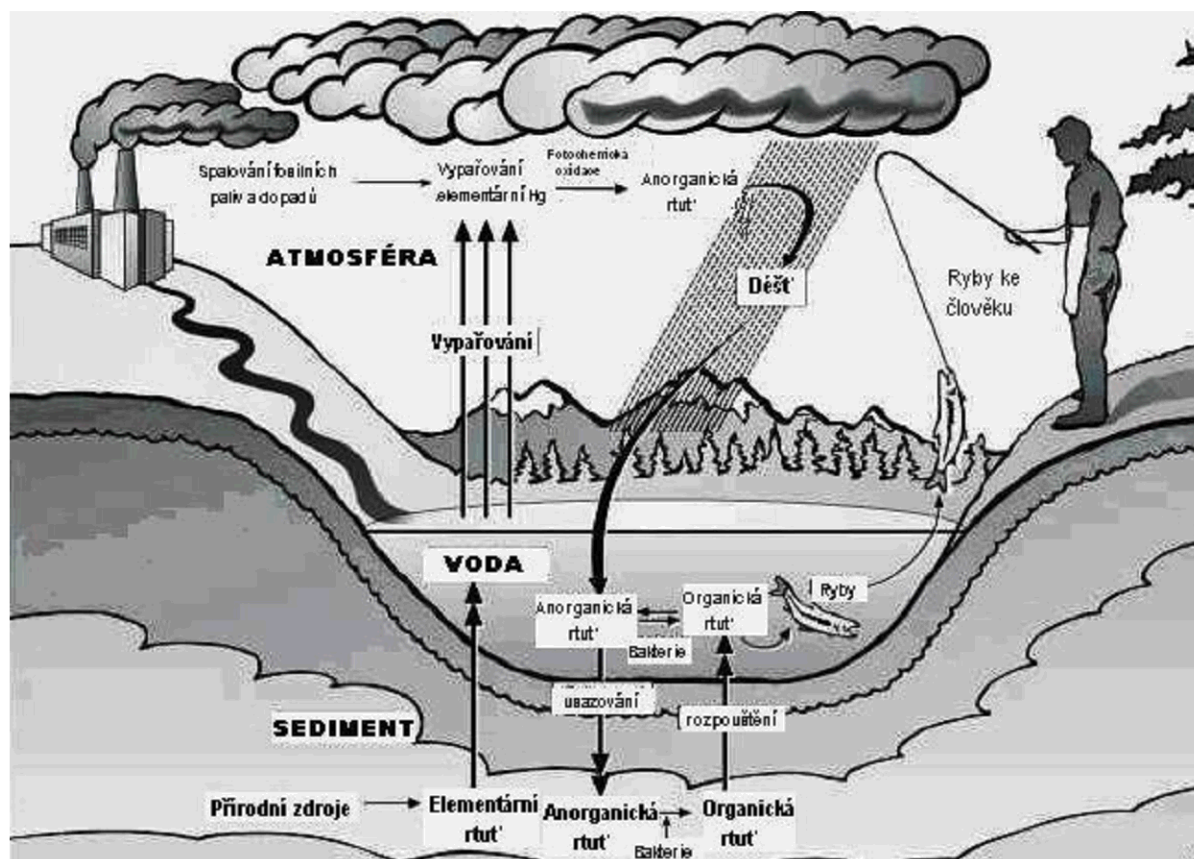


chlorid fenylrtuti

Obr.2.1. Vzorce organokovových sloučenin rtuti.

2.2. Bio - geochemický cyklus chemických forem rtuti

Bio – geochemický cyklus (obr. 2.2) rtuti a jejich sloučenin je charakterizován jako součet všech vstupů a výstupů sloučenin rtuti v daném ekosystému a je neustále opakován. Prvním krokem je uvolnění těkavých forem rtuti z půdy, skal, povrchových vod, vulkánů a také z antropogenní činnosti. V atmosféře mohou být tyto emise transportovány na dlouhé vzdálenosti (např. větrem) a poté deponovány mokrou či suchou depozicí na zem nebo do povrchových vod. Zde dochází k jejich sedimentaci a biologické konverzi. Těkavé formy rtuti se uvolní výparem zpět do atmosféry a ty formy, které mají schopnost bioakumulace (hlavně organické formy), se bioakumulují v potravním řetězci [12]. Část rtuti je také navázána do nerozpustných sloučenin. Pro toto navázání jsou důležité thiolové skupiny –SH, přítomné v molekulách tvořící rozpuštěný organický uhlík (DOC = dissolved organic carbon). Tyto skupiny jsou obsaženy především v hydrofobní frakci rozpuštěné organické hmoty (DOM = dissolved organic matter) v podobě huminových a fulvových kyselin [3]. Konstanty stability ($\log K$) komplexů rtuti s molekulami (skupinami) vyskytujícími se v DOC v porovnání s $\log K$ rtuti a běžných komplexotvorných činidel uvádí tabulka 2.1.



Obr.2.2. Cyklus rtuti v životním prostředí [13].

Tabulka 2.1. Konstanty stability ($\log K$) komplexů rtuti s molekulami (skupinami) vyskytujícími se v DOC v porovnání s $\log K$ rtuti a běžných komplexotvorných činidel [3].

Ligand	Log K_{HgL}	Log K_{HgL_2}
Glycin	10,3	19,2
Cystein	14,4	-
Thiomočovina	11,4	22,1
EDTA	21,5; 23,1	-
Kys. thiosalicylová	25,7	-
Glutathion	-	30,7
Diethyldithiokarbamat	-	33,4
Sulfid	-	37,7
Kys. thioglykolová	34,5	43,8
Humínové kyseliny	-	26,1 – 32,2*
Hydrofobní kompl. z odpadních vod	-	>30*

* typ a množství koordinujících ligandů není znám

2.2.1. Formy rtuti v atmosféře

V atmosféře se rtuť z 95 % vyskytuje ve formě elementární rtuti (Hg^0). Zůstává zde od 6 dní až po 2 roky. Přibližně 5 % atmosférické rtuti je navázáno na částičky, které přetrvávají v atmosféře kratší dobu a ukládají se zpět v podobě mokrého nebo suchého spadu snadněji než volná rtuť. Přibližně 66 % atmosférické rtuti se vrací na zemi mokrou depozicí. Rtuť přítomná v atmosféře většinou cykluje na patřičné zemské polokouli. Může se však také vlivem cirkulace deponovat na značné vzdálenosti od zdroje [3]. Koncentrace celkové rtuti v atmosféře severní polokoule je zhruba 2 ng/m^3 . Na jižní polokouli je hodnota asi o polovinu nižší. Hodnota rtuti v obydlených oblastech je většinou vyšší než 10 ng/m^3 . Zastoupení jednotlivých forem rtuti v atmosféře: 75 % elementární rtuť, 20 % methylrtuť a 5 % dvojmocné anorganické sloučeniny rtuti [14]. Přeměnu jednotlivých forem rtuti v atmosféře znázorňuje obr. 3.2.

2.2.2. Formy rtuti v terestrickém ekosystému

V zemské kůře se rtuť vyskytuje poměrně vzácně. Průměrný obsah rtuti je asi 80 mg/1000 kg [2]. Hlavní sloučeninou, která je obsažena v zemské kůře je rumělka HgS , která se vyskytuje především blízko sopečných vulkánů.

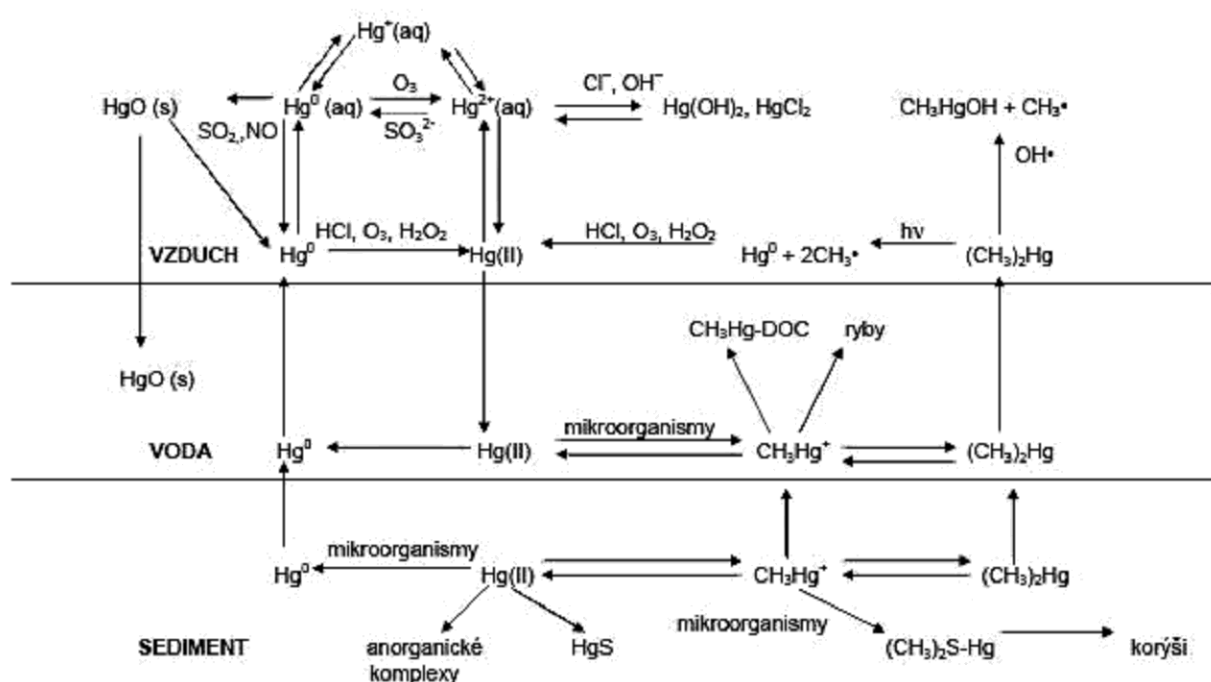
Koncentrace rtuti v půdách závisí na geologickém charakteru půd a také na vzdálenosti zdroje emisí rtuti. Kdybychom neuvažovali lokální zdroje znečištění, tak obsah rtuti závisí na typu podloží, pH půdy, pohybu vody, zvětrávání a biologických procesech [15]. Rtuť tvoří stabilní komplexy s organickými substancemi půd. Z tohoto důvodu je přítomná rtuť v neutrálních a humózních půdách rychle vázána do komplexů a díky tomu málo dostupná pro rostliny [16]. Vyšší obsah rtuti však byl zaznamenán např. u některých obilovin [17]. Průměrné obsahy rtuti v různých typech půd se pohybují od $0,01 \text{ } \mu\text{g/g}$ do $0,3 \text{ } \mu\text{g/g}$. Všeobecně se uvádí, že v půdách s vyšším obsahem humusu se vyskytuje vyšší množství rtuti [16].

2.2.3. Formy rtuťi ve vodním ekosystému

Sloučeniny rtuťi jsou uvolňovány do vodních ekosystémů převážně z antropogenních zdrojů. Výskyt a transport rtuťi a jejích sloučenin ve vodních ekosystémech je poněkud odlišný od jiných těžkých kovů v důsledku vysoké tenze par kovové rtuťi a vysoké reaktivity iontů rtuťi se sloučeninami obsahující koncové $-SH$ a alkylové skupiny [14].

Rtuť se vyskytuje ve vodních ekosystémech ve velkém množství chemických forem. Z anorganických rozpuštěných forem se vyskytuje v elementární Hg^0 , Hg^{2+} , $[HgOH]^+$, $[Hg(OH)_2(aq)]^0$, $[Hg(OH)Cl]^0$ a v chlorokomplexech $[HgCl]^+$ až $[HgCl_4]^{2-}$. Z organických forem rtuťi se nejčastěji vyskytují alkylderiváty jako chlorid methylrtuťi a dimethylrtuť. V závislosti na složení vody a hodnotě pH se tvoří rovnováha mezi jednotlivými formami výskytu. Probíhá zde také transformace anorganických forem rtuťi na organické a naopak biochemickou i chemickou cestou [18]. Přeměny jednotlivých forem rtuťi ve vodním ekosystému znázorňuje obr. 2.3.

Přirozený obsah rtuťi je v otevřeném oceánu $0,5 - 3 \text{ ng/l}$, v pobřežních vodách potom $2 - 15 \text{ ng/l}$. V řekách a v jezerech se rtuť vyskytuje v koncentraci asi $1 - 3 \text{ ng/l}$. Speciace rtuťi ve vodách závisí na typu vodního ekosystému. V oceánech převažuje Hg^{2+} ve formě chloridu, ve sladkovodních ekosystémech se vyskytuje převážně methylrtuť. Zde se pohybuje její množství v rozmezí $1 - 6 \%$ [14].



Obr. 2.3. Koloběh a přeměny forem rtuťi v jednotlivých složkách životního prostředí [3].

2.3. Alkylderiváty rtuti – organické formy rtuti

Alkylderiváty rtuti řadí se mezi organokovové sloučeniny rtuti se vyznačují vysokým bioakumulačním potenciálem. Tyto organické formy rtuti jsou vytvářeny z anorganických forem rtuti procesem methylace [19]. Řadí se mezi nejjedovatější organické sloučeniny rtuti, jsou 10 – 100krát toxičtější než anorganické formy [20]. Také jsou více toxické než arylderiváty. Toto tvrzení dokládá fakt, že u otrav alkylderiváty rtuti byla v mozku nalezena 10x vyšší koncentrace rtuti než např. u otravy sublimátem (jejich toxicita je srovnávána se sublimátem), u otrav arylderiváty byla zjištěna toxicita dokonce 1,5 – 2krát nižší než u otravy sublimátem. Alkylderiváty jsou zvláště nebezpečné také proto, že jsou prchavé a výrazně rozpustné v tucích, což usnadňuje jejich cestu potravním řetězcem až k člověku [19].

2.3.1. Vlastnosti alkylderivátů rtuti

Obsahují jeden nebo dva uhlovodíkové zbytky, methylové a ethylové, navázané na atom kovu a tvoří tak sloučeniny typu $RHgX$ nebo $RHgR'$. Symboly R, R' jsou uhlovodíkové zbytky a symbol X označuje anionty, nejčastěji halogenidy, dusičnany, sulfidy či sírany [3]. Sloučeniny $RHgX$ jsou krystalické látky, jejichž vlastnosti se odvíjejí od povahy X. Je-li X atom nebo skupina schopná tvořit se rtutí kovalentní vazby (např. Cl, Br, J, CN, SCN, OH aj.), vzniká kovalentní nepolární látka více rozpustná v organických rozpouštědlech než ve vodě. Je-li X ion síranový nebo dusičnanový, vzniká látka solného charakteru a pravděpodobně zcela iontová. Dialkylové sloučeniny jsou nepolární, těkavé a toxické kapaliny nebo nízko tající pevné látky. Tepelně jsou nestálé a citlivé na světlo. Sloučeniny R_2Hg vykazují velmi nízkou reaktivitu vůči kyslíku, vodě, aktivnímu vodíku a organickým funkčním skupinám [4].

2.3.2. Toxicita a ekotoxicita alkylderivátů rtuti

O míře toxicity alkylderivátů rozhoduje jejich koncentrace v matricích a ve složkách životního prostředí, na cestě intoxikace, době expozice a jejímu opakování [21]. Letální dávky LD_{50} pro krysy orální cestou je 29,915 $\mu\text{g}/\text{kg}$, cestou abdominální 11 mg/kg a svalovou 23 mg/kg . Letální dávky pro myši LD_{50} orální cestou je 57,600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a cestou abdominální je 10 mg/kg [52].

Methylrtuť je velmi silný neurotoxin, který napadá centrální nervový systém (CNS). Rapidně mění či ničí strukturu buněk nebo ovlivňuje biochemické reakce v buňkách. Už při velmi malých dávkách poškozuje funkci buněk [13]. Biochemicky spočívá její neurotoxicita v tom, že napadá přímo neurony. Způsobí tak zpomalení motorických a smyslových funkcí. Děje se to proto, že methylrtuť ovlivňuje syntézu, absorpci a uvolnění nebo degradaci neurotransmiterů, které jsou pro transmissi nepostradatelné (zajišťují přenos vzruchu). Důsledkem je potom parestézie (porušení vnímání pocitu na kůži), ataxie (porucha koordinace pohybů), křeče, ochabnutí svalstva, zúžení zorného pole, zhoršení schopnosti řeči a sluchu a také částečné ochrnutí. Nejčastější cestou vstupu methylrtuti do organismu je gastrointestinální trakt [23]. Až 95 % methylrtuti přijaté člověkem v rybách bylo absorbováno gastrointestinálním traktem [15]. Při požití je methylrtuť tělem snadno distribuována, byla analyzována v mozku už po 5 minutách nitrožilního podání a po 4 hodinách orálního podání

[24]. Methylrtuť se také může vstřebávat pokožkou a po jejím zasažení dochází k pocitu místního tepla, zčervenání a tvorbě puchýřů, které se špatně hojí [11]. Dobře se rozpouští v tucích, což vysvětluje její snadný přechod přes membránu krev – mozek a také difúzi do buněčných membrán [24]. Také přechází přes plodovou placentu, tudíž je nebezpečná pro těhotné ženy. Může vyvolat poškození plodu nebo spontánní potrat [17]. Riziko poškození plodu nastává při koncentraci rtuti ve vlasech 15 – 20 mg/kg (u dospělých jedinců se příznaky otravy objeví až při koncentraci Hg vyšší než 30 mg/kg). Tolerovatelná dávka pro člověka je 33 µg při hmotnosti 70 kg [24].

Dimethylrtuť se vyznačuje vysokým stupněm toxicity. Do těla často proniká dermální cestou. Již po krátké expozici může způsobit okamžitou smrt [25].

Ethylrtuť má podobné toxické účinky jako methylrtuť, napadá centrální nervový systém, ledviny a imunitní systém [21]. Při akutní intoxikaci ethylrtutí je její poločas rozpadu v krvi relativně krátký, 7 – 10 dní. Tedy nebezpečí hromadění ethylrtuti v organismu je malé. Kation ethylrtuťnatý totiž nevytváří komplexy strukturně podobné methioninu, a tudíž není přes hematoencefalickou membránu transportován aktivně jako methylrtuť [6].

Hydroxid methylrtuti se kumuluje v mozku a je teratogenní. Chlorid methylrtuti má toxické účinky na centrální nervovou soustavu a při styku s pokožkou se projeví vznikem puchýřů [11].

Ekotoxicita je jednou ze základních charakteristik chemických látek, přípravků a odpadů. Představuje akutní či pozdní nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí. Stanovuje se pomocí testů akutní toxicity, které se provádějí na zástupcích ryb, zooplanktonu, fytoplanktonu a vyšších rostlin [26]. U rostlin se ekotoxicita rtuti projevuje redukcí fotosyntézy v důsledku snížené syntézy chlorofylu, sníženého dýchání a příjmu vody. Methylrtuť přímo ovlivňuje metabolismus organel v cytoplazmě [3]. Ekotoxicita u bezobratlých organismů je kromě vývojové vyspělosti závislá na mnoha faktorech jako je teplota vody, koncentrace iontů, koncentrace rozpuštěné organické hmoty (DOM), průtok vody a samozřejmě koncentrace jednotlivých forem rtuti [3]. Rtuť v koncentraci 0,02 – 0,095 mg/l je toxická pro perloočky, přičemž druhové složení zooplanktonu povrchových vod výrazně ovlivňuje již hodnota 0,002 mg/l [8].

Bylo prokázáno, že sloučeniny rtuti poškozují některé důležité orgány a tkáně ryb, zejména parenchymatózní. Rtuť má také negativní vliv na reprodukci ryb. Ve velmi nízkých koncentracích způsobují snížení životnosti spermií, sníženou produkci jiker a sníženou přežitelnost oplozených jiker a plůdku. Akutní letální koncentrace organických sloučenin rtuti u lososovitých ryb se pohybuje v rozmezí 0,025 až 0,125 mg/l a u kaprovitých ryb v rozmezí 0,20 – 0,70 mg/l [8].

Vodní ptáci a savci (např. kormorán, norek aj.) jsou nejčastěji exponováni sloučeninami methylrtuti, a to přijímáním kontaminované potravy. Toxické účinky rtuti závisí na mnoha faktorech, mezi které patří množství zkonsumované potravy, trofická úroveň konzumovaných ryb, obsah rtuti v potravě a dále tělesná hmotnost zvířat přijímajících tuto kontaminovanou potravu [3].

U mnoha druhů ptáků se otrava rtutí projevuje reprodukčními problémy, dále změnou chování a vyšší embryonální úmrtností. Dalšími příznaky otravy je vyzáblost, nekoordinované pohyby a zčeřené peří ptáků. Sloučeniny methylrtuti se koncentrují hlavně v bílku, kdežto anorganické formy převážně ve žloutku vejce. Účinkům methylrtuti jsou odolnější mořští ptáci v porovnání s ptáky žijícími a lovcími na souši [3]. U rybožravých ptáků může dosahovat koncentrace rtuti vysokých úrovní a tím ovlivnit jejich reprodukční schopnosti, imunitní a nervový systém [27].

U obratlovců byl prokázán příznivý vliv selenu na dekontaminaci organismu po otravě rtutí. Přesný mechanismus však není znám. Předpokládá se však, že anorganické formy rtuti vznikající demethylací methylrtuti v játrech, jsou vázány selenem a vytvářejí tak Hg – selenoproteiny a selenid HgSe. Poměr Hg : Se byl v játrech arktických mořských savců stanoven na 1:1 [3].

2.4. Methylrtuť

Methylrtuť je obecně používaný termín pro všechny sloučeniny kationtu monomethylrtuti CH_3Hg^+ , většinou je pod tímto názvem uváděna suma všech jeho sloučenin [15].

Methylrtuť je silný neurotoxin, který v minulosti způsobil mnoho tragických otrav. K těmto událostem došlo v 50. a 60. letech minulého století v Japonsku (Minamata disease) a počátkem 70. let v Iráku. Zdrojem methylrtuti při epidemiích v Japonsku byly ryby žijící ve vodách znečištěných odpady z chemické továrny vyrábějící chlor. V Iráku to pak bylo obilí mořené fungicidy na bázi sloučenin methylrtuti, které bylo původně určeno jako osivo, ale z neznalosti a nouze bylo použito k domácí přípravě chleba. Onemocněly desetitisíce osob, stovky jich zemřely a exponovaným matkám se narodily stovky dětí s těžkým kongenitálním postižením. Tyto draze zaplacené zkušenosti byly nejenom zdrojem mnohostranných poznatků o otravě methylrtutí, ale na jejich základě byla přijata účinná preventivní opatření. Byla zakázána výroba pesticidů obsahujících organické sloučeniny rtuti a upustilo se i od přidávání takových fungicidních přípravků do latexových barev učených k vnitřním nátěrům [6].

Methylrtuť je v podstatě nejběžnější organická forma vyskytující se v biologických systémech. Je rozpustná ve vodě a poměrně stabilní díky kovalentní vazbě mezi uhlíkem a rtutí. Snadno prostupuje přes biologické membrány a má dlouhý poločas rozpadu, až 70 dní (pro dravé ryby jako je štika je poločas rozpadu methylrtuti až 170 dní) [24]. Ze všech sloučenin rtuti má methylrtuť největší rozdělovací koeficient oktanol – voda ($K_{ow} = [\text{Hg}]_{\text{okt}} : [\text{Hg}]_{\text{voda}}$; $\log K_{ow} = 1,7 - 2,5$), která určuje jeho vysokou afinitu k tukům. Ve srovnání s jinými organochlorovanými sloučeninami (např. sloučeniny DDT $>5,5$) je jeho hodnota relativně nízká. Ale právě kombinace lipofility a vysoké afinity k –SH skupinám proteinů podporuje její retenci v biotě [28].

Tabulka 2.2. Fyzikálně – chemické vlastnosti methylrtuti CH_3Hg^+ [28].

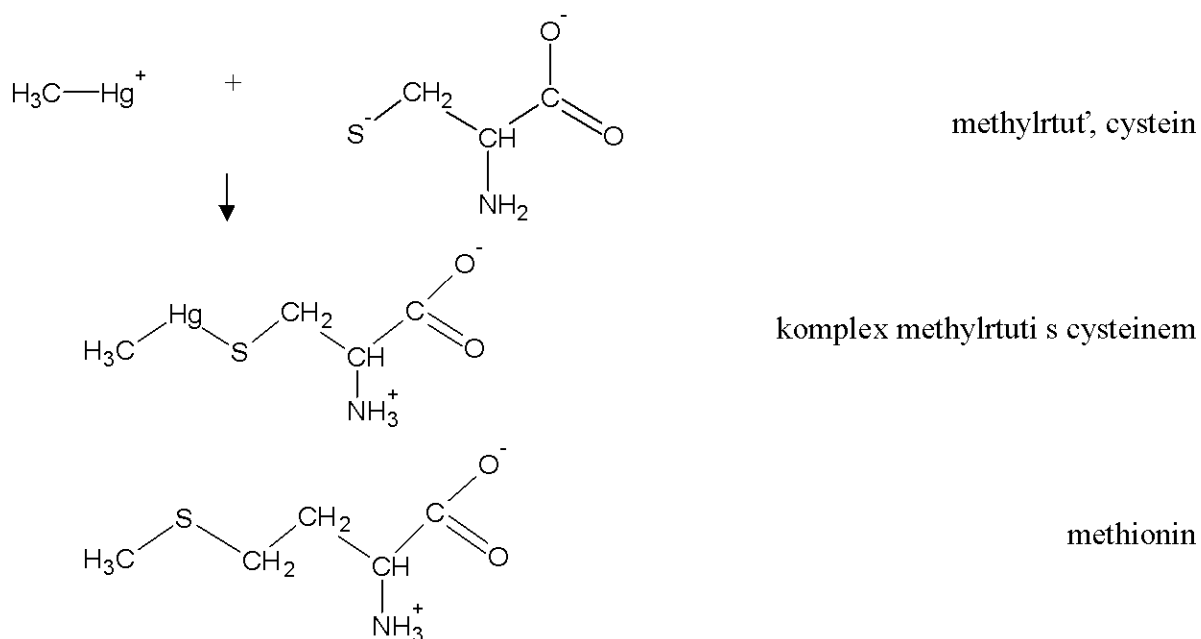
Vlastnost	Hodnota
Molekulární hmotnost	215,63
Bod varu	$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$: 92 °C/98,66 kPa
CAS No.	22967-92-6
hustota	$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$: 3,1874
K_{oc} (organický uhlík) ^b	DOC zvyšuje rozpustnost
$\log K_{\text{sed}}$	2,9 – 3,2 (redukován DOC ve vodě)
$\log K_{\text{susp.č.}}$	5,73
$\log K_{\text{ow}}$	1,7 – 2,54
tenze par, Pa	CH_3HgCl : 1,13/20 °C
rozpustnost ve vodě	1 $\mu\text{g/l}$

^b ... K se týká rozdělovacího koeficientu mezi indikovanou fází a vodou (koncentrací rtuti v každém médiu). Například K_{ow} = oktanol/voda rozdělovací koeficient; $K_{\text{susp.č.}}$ = suspendované částice/voda; K_{sed} = sediment/voda; K_{oc} = organický uhlík/voda.

2.4.1. Afinita methylrtuti k –SH skupinám

Methylrtuť se téměř výlučně váže na proteiny a nízkomolekulární sloučeniny proteinové povahy, které obsahující redukované atomy síry v struktuře glutathionu, cysteinu, homocysteinu a metalothioninu [29]. Hirayama (1980, 1985) zjistil, že po intravenózním podání chloridu methylrtuti společně s cysteinem se zvýšila absorpce methylrtuti v mozku. Tato absorpce byla poté inhibována další aminokyselinou, neutrálním fenylalaninem, a tím byl podán důkaz, že transport přes membránu krev – mozek je spjat s nosičem aminokyselin nebo s L – systémem.

Poté v r. 1987 Aschner a Clarkson studovali rozdíly mezi distribucí methylrtuti u gravidních a negravidních krysk tak, že jim podávali infuzi L – cysteinu a L – a D – leucinu a jako srovnávací vzorek byla použita solná infuze. U L – cysteinu byl opět pozorován nárůst absorpce methylrtuti. U L – leucinu bylo pozorováno snížení absorpce methylrtuti jen u negravidních krysk a u D – leucinu v porovnání se solnou infuzí nebyl pozorován žádný efekt. Dále také zjistili, že methylrtuť zapříčinila zvýšení absorpce MeHg v mozku jak matky, tak plodu a také, že infuze L – leucinu způsobila snížení absorpce methylrtuti také jak u matky, tak i plodu. Závěrem bylo, že methylrtuť s cysteinem vytváří komplex, který je strukturou velmi podobný methioninu. Proto je transportován přes membránu krev – mozek aktivním transportem, stejně jako methionin [24]. Podobnost struktur methioninu a komplexu rtuti s cysteinem lze srovnat na obrázku 2.4.



Obr. 2.4. Vzorec methioninu a komplexu methylrtuti s cysteinem.

2.4.2. Methylace anorganické rtuti za vzniku methylrtuti

Proces methylace objevili Jensen a Jerlenov v roce 1969. Zjistili že Hg^{2+} může být methylována některými mikroorganismy v určitém prostředí na monomethylrtuť, která může být dále transformována na těkavou kapalnou dimethylrtuť [2]. Methylace je velmi důležitý proces, jelikož usnadňuje přeměnu mezi jednotlivými rtuťnatými sloučeninami. Odehrává se jak s sedimentu, tak v mořské i sladkovodní vodě [25].

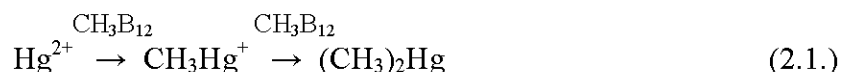
Jedná se většinou o mikrobiálně řízený proces, který probíhá jak za anaerobních, tak aerobních podmínek. Tento proces (děj, transformace) je výrazně ovlivňován fyzikálně – chemickými parametry vodního ekosystému jako jsou pH, teplota vody, přítomnost světla, redoxní potenciál a koncentrace kyslíku ve vodě, pokud jde o aerobní methylaci. V kyselém prostředí je methylace výrazně urychlena, stejně tak ji urychluje vyšší teplota [14]. Methylace v sedimentech je hlavním zdrojem methylrtuti ve vodních ekosystémech. Tato nejtoxičtější forma rtuti se ze sedimentů dostává do vody, bentosu, vodních rostlin a dále potravním řetězcem až do vodních a vyšších organismů [2].

Methylace probíhá biotickým způsobem (mikroorganismy v sedimentech, i v trávicím ústrojí ryb) a způsobem abiotickým.

2.4.2.1. Biotický způsob methylace

Biotický způsob methylace rtuti v organismech může probíhat enzymaticky nebo neenzymaticky. Neenzymatický způsob je častější. Vyznačuje se mikrobiální methylací Hg^{2+} iontů methylkobalaminovými sloučeninami (CH_3B_{12}) v přítomnosti různých typů mikroorganismů žijících v sedimentech a majících schopnost redukovat sulfáty. Tuto

schopnost mají zejména bakterie rodu *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas* a jiné. Reakci methylace rtuťnatých iontů popisuje rovnice 2.1.:



Pro zúčastněné mikroorganismy představuje methylace detoxifikační mechanismus (methylací se rtuť mobilizuje a může být mnohem snadněji vyloučena z bakteriální buňky; pokud se vytvoří dimethylrtuť, rtuť v této formě může snadno vytékat z prostředí mikroorganismů). Methylrtuť může být demethylována a dále redukována na elementární rtuť. Redukce oxidovaných forem rtuti pomocí cytoplazmatické reductázy na elementární rtuť je velmi běžným detoxifikačním mechanismem zvyšujícím podstatně odolnost mikroorganismů vůči silně jedovatým Hg^{2+} . Elementární rtuť je těkavá, tedy může snadno vytékat do prostředí. Redukce rtuti probíhá v aerobních podmínkách a není spojena se získáním energie. Provádí ji aerobní a fakultativně anaerobní bakterie rodu *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Vibrio* aj. [7].

Rychlost tvorby methylrtuti potom závisí také na koncentraci methylkobalaminových sloučenin, koncentraci Hg^{2+} , přítomnosti organických a anorganických komplexotvorných látek, množství a druhu mikroorganismů. Důležitým faktorem je zde také množství a charakter DOM a koncentrace DOC. Se vzrůstající koncentrací DOC je methylace Hg^{2+} snižována, protože dochází k rychlé sorpci Hg^{2+} na organické částice a Hg^{2+} již nejsou přístupné mikrobiální methylaci. Optimální pH pro průběh mikrobiální methylace je 4,7 [3]. Nejrychleji dochází k methylaci na povrchu sedimentu, který je v kontaktu s vodou, a tato rychlost klesá směrem do hloubky. To odpovídá poklesu mikrobiální aktivity s hloubkou sedimentu a je ve shodě se zjištěním, že k methylaci dochází pouze v místech s vysokou mikrobiální aktivitou. Ve vodě nad takovým sedimentem je však proces methylace rtuti nízký, ale detekovatelný [14].

2.4.2.2. Abiotický způsob methylace

Abiotická methylace představuje asi jen 10% celkové produkce methylrtuti [24]. Probíhá zejména v přítomnosti vyšší koncentrace huminových kyselin. Rtuťnaté ionty jsou na methylrtuť přeměňovány methyl deriváty olova nebo cínu [14].

2.4.3. Bioakumulace methylrtuti ve vodních ekosystémech a v tkáních vodních organismů

Bioakumulace (hromadění v živých organismech) je proces, během kterého živé organismy mohou zachytávat a koncentrovat chemické látky buď přímo z okolního prostředí, ve kterém žijí nebo nepřímo z jejich potravy [30].

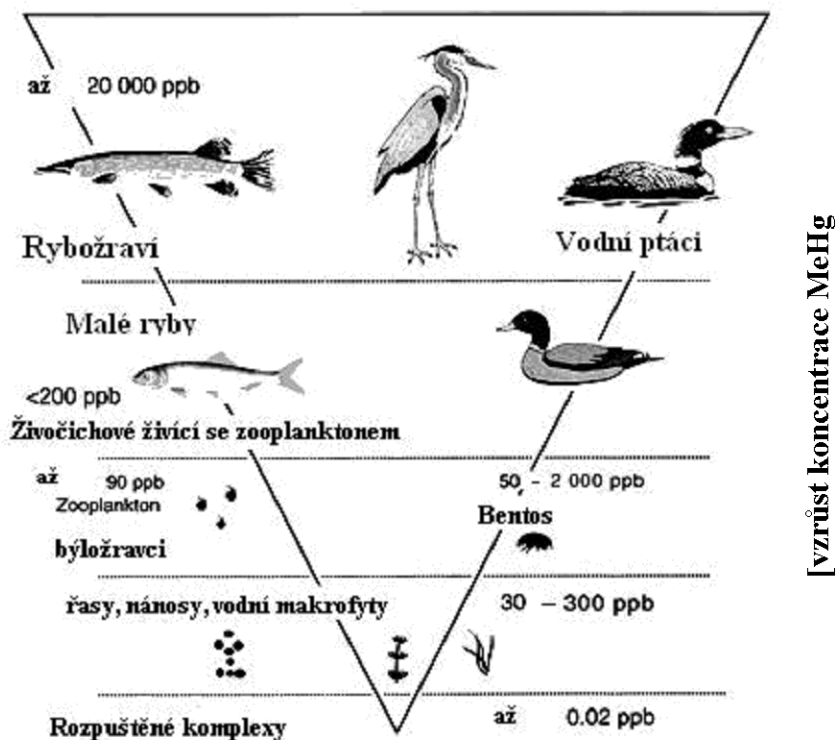
Bioakumulace methylrtuti je způsobena její lipofilní povahou. Akumuluje se v potravním řetězci mnohem jednodušeji než anorganické formy [25]. Akumulační koeficient u některých organismů dosahuje hodnot 10^5 až 10^6 . Například při otravě v Minimatě byla zjištěna poměrně nízká koncentrace rtuti v mořské vodě, a to v rozmezí 0,1 – 1 $\mu\text{g/l}$, ale v rybím masu

byla zjištěna koncentrace až 50 mg/kg. Toto odpovídá bioakumulačnímu koeficientu $5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^5$ [5].

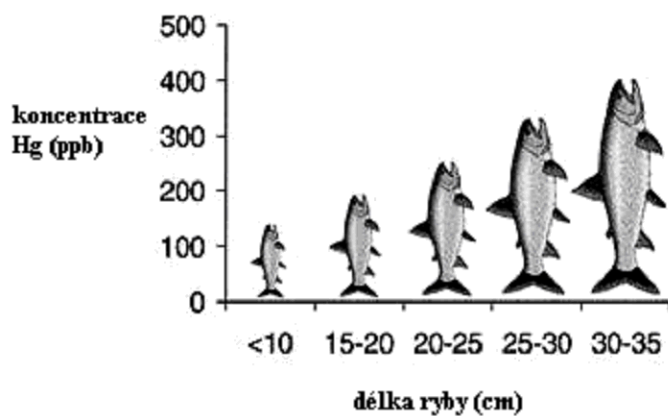
Bioakumulaci ve vodních ekosystémech ovlivňuje celá řada faktorů, jako jsou pH vody, teplota vody, množství DOM, struktura potravního řetězce, druh sedimentu a jeho eroze. Vztahy mezi těmito faktory nejsou dostatečně známy a často jsou místně specifické. Díky tomu mohou mít dvě jezera, která mají stejné chemické, fyzikální a biologické charakteristiky, rozdílné koncentrace methylrtuti ve vodě, tkáních ryb a dalších vodních organismech [14].

Bioakumulace v tkáních vodních organismů je závislá na jejich trofické úrovni potravní pyramidy obr. 2.5. Např. bezobratlé organismy obsahují pouze kolem 50 % celkové rtuti ve formě methylrtuti [3], ryby asi 60 % celkového obsahu rtuti [31], ale piscivorní ptáci mají v tkáních ve formě MeHg až 95 % z celkového obsahu rtuti [3]. Ve tkáních bezobratlých organismů žijících v sedimentech (zoobentos) se nachází obvykle vyšší obsahy rtuti než u bezobratlých organismů žijících ve vodním sloupci. Toto pozorování je v souladu s vyšší koncentrací rtuti obsažené v jejich potravě. U ryb dravých jako jsou žralok, mečoun či tuňák najdeme porovnání s druhy nedravými vyšší obsah rtuti [32]. Bioakumulaci MeHg v tkáních ryb také podporuje fakt, že ryby přednostně vylučují anorganickou rtuť, jelikož má kratší poločas rozpadu než rtuť organická. Obsah methylrtuti koreluje s věkem a tedy i jejich velikostí (platí čím větší ryba, tím větší koncentrace rtuti), jak ukazuje obr. 2.6., a v některých případech i s jejich pohlavím [14]. Obsah methylrtuti je závislý také na ročním období. V létě je akumulace MeHg vyšší, jelikož ryby v létě přijímají více potravy. Dalšími parametry ovlivňujícími bioakumulaci MeHg jsou pH, obsah DOC, tvrdost vody či obsah kyslíku. Bioakumulace methylrtuti vzrůstá s klesající hodnotou pH a s rostoucím obsahem DOC, naopak klesá s rostoucí tvrdostí vody či obsahem kyslíku. Obsah methylrtuti se také rozdílný v jednotlivých tkáních. Ve většině případů bývá menší zastoupení MeHg v játrech ve srovnání s ostatními orgány díky v játrech probíhající demethylaci [3].

Výsledkem bioakumulace je rozdílná hodnota koncentrace methylrtuti v tkáních ryb a okolní vodě. Poměr mezi obsahem MeHg v tkáních a v okolní vodě je zhruba 10 000 – 100 000 [14].



Obr.2.5. Bioakumulace methylrtuti v závislosti na trofické úrovni potravního pyramidy [13].



Obr. 2.6. Závislost koncentrace rtuti na délce ryb [13].

2.4.4. Odhad expozice obyvatelstva methylrtutí v ČR

Expoziční dávky methylrtuti jsou v ČR ovlivněny tím, že Česká Republika nemá moře. Proto jsou všechny mořské výrobky importovány z různých částí světa. Produkce sladkovodních ryb dosahuje asi 21000 tun, ale velký podíl je exportován. Některé naše vodní toky jsou methylrtutí kontaminovány. Pro sportovní rybáře (asi 10000 osob) se počítá přídatná spotřeba ryb okolo 10 g/osoba/den (70% rybiho masa představuje kapr). Celková spotřeba je v populaci tradičně nízká a činí okolo 11 g jedlého podílu ryb/osoba/den.

V letech 1999 – 2003 byl prováděn monitoring dietární expozice člověka (program MZ ČR), který měl prozkoumat rozsah obsahu rtuti v potravinách na trhu v ČR. Bylo k dispozici 1852 výsledů, z nichž 1005 bylo >LoQ, LoQ = 0,01 – 0,2 µg/kg. Byl zjištěn poměrně úzký rozsah hodnot pro jednotlivé druhy potravin, význam měl jen pro následující skupiny: mořské ryby a sladkovodní ryby, uzené a marinované ryby, konzervované ryby a rybí saláty a dále pro koření a játra. Pomocí těchto údajů a průměrné spotřeby potravin pro populaci byl proveden bodový odhad expoziční dávky pro populaci ČR. Průměrná expozice byla odhadnuta na 0,08 µg celkové rtuti/kg t.hm./týden, což představuje pouze okolo 5 % revidované PTWI (= „provisional tolerable weekly intake“, přechodný tolerovatelný týdenní příjem) JECFA FAO/WHO (= Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) pro MeHg [33].

2.5. Stanovení celkového obsahu rtuti

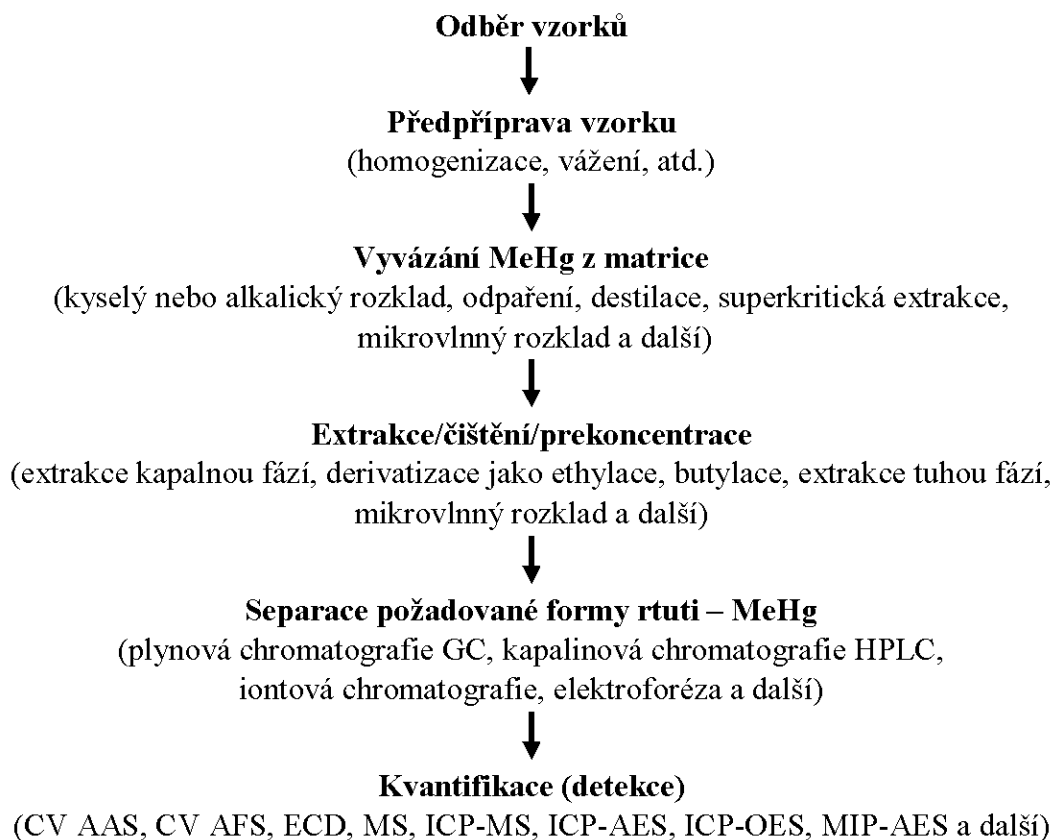
Jelikož MeHg je nejtoxičtější forma rtuti, musí se ve vzorcích stanovovat nejen celkový obsah rtuti, ale i obsah MeHg [34]. Stanovení celkové rtuti je však také velmi důležité, neboť může sloužit jako kontrola stanovení jednotlivých specií rtuti.

Nejčastěji se ke stanovení celkového obsahu rtuti ve vzorcích používá detekce atomovou absorpční spektrometrií (AAS), jelikož rtuť absorbuje záření o vlnové délce 253,7 nm. Rtuť ve vzorku lze stanovit různými technikami atomové absorpční spektrometrie. Jsou to plamenová AAS, atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou ionizací (ET – AAS), atomová absorpční spektrometrie s generováním studených par rtuti (CV-AAS) a atomová absorpční spektrometrie s termooxidačním rozkladem vzorku.

Nejvíce využívaná je metoda AAS s termooxidačním rozkladem vzorku. Pro tento účel byl vyvinut speciální analyzátor AMA 254 (Advanced Mercury Analyser). Umožňuje přímé stanovení rtuti v pevných a kapalných vzorcích. Princip stanovení pomocí toho analyzátoru spočívá v termooxidačním rozkladu vzorku s následným zachycením a obohacením rtuti v amalgamátoru [53]. Vzorek je spálen v kyslíku na lodičce z niklu nebo platiny při teplotě 850 – 900 °C. Spaliny jsou poté vedeny do katalytické pece vyhřáté na 650 °C, kde dojde k dokončení oxidace a na bazičkových složkách katalyzátoru se zachytí oxidy dusíku a síry. Spaliny jsou dále transportovány proudem kyslíku do amalgamátoru tvořeného křemelinou potaženou zlatem, kde se zachytí rtuť a ostatní složky projdou dále. Po nahromadění je rtuť vypuzena rychlým ohřevem do tzv. tandemových kyvet, kde je změřena absorpce záření parami rtuti. Prostor, ve kterém jsou umístěny kyvety, je termostatován na teplotu nad bodem varu vody, aby se zamezilo její kondenzaci [54].

2.6. Stanovení alkylderivátů rtuti

Metody stanovení methylrtuti spadají do oblasti tzv. **speciačních analýz**. Speciační analýza je definovaná jako stanovení jednotlivých fyzikálně chemických forem prvku, přičemž součet jejich koncentrací tvoří celkovou koncentraci prvku ve vzorku. Pro rozlišení jednotlivých forem prvku se využívají rozdíly v chemických a fyzikálních vlastnostech těchto forem [35]. Speciační analýza ve srovnání se stanovením celkových obsahů kovů s sebou nese zvýšené nároky na přípravu, na samotnou analýzu a na sestavu analytické instrumentace. Speciační analýza zahrnuje několik kroků, které jsou schematicky zobrazeny na obr. 2.7. Charakteristickým prvkem speciačních analýz je spojení separační techniky (plynová, kapalinová chromatografie) a selektivní či neselektivní detekce, tzv. **tandemové techniky** („hyphenated techniques“) [14].



Obr.2.7. Jednotlivé kroky speciační analýzy [14].

2.6.1. Faktory ovlivňující stabilitu specií rtuti během odběru, skladování a přípravy vzorků

Odběr a uchovávání vzorku pro stanovení chemických forem rtuti je velmi náročný na standardizaci podmínek, protože díky správným podmínkám nedojde ke změně složení vzorku v procesu jeho odběru, uchovávání a analýzy.

Velmi důležitý je odběr vzorků. Musí se zajistit, aby odebraný materiál byl až do doby analýzy reprezentativním vzorkem analyzovaného materiálu [3]. Také se musí zajistit, aby v průběhu odběru a následné úpravy nedošlo k poklesu jak celkového množství rtuti ve vzorku, tak jednotlivých forem rtuti. Během skladování může docházet k procesům transformace a degradace jednotlivých forem rtuti. Potom však analytická data neposkytují správné informace o obsahu jednotlivých specií v původním systému.

Pokles obsahu celkové a jednotlivých forem rtuti ve vzorku může nastat pomocí několika mechanismů jako absorpce na povrch stěn odběrové nádoby nebo na povrchu částic rozpustné organické matrice (DOM) [36]. Toto bylo hlavně prokázáno na skleněných odběrových lahvích, proto se na odběr používají nádoby z polytetrafluoroethylenu (PTFE) nebo PYREX skla [2]. Dalším zdrojem ztrát je odpařování a transformace těkavých forem rtuti a to hlavně přeměny MeHg na anorganickou rtuť Hg^{2+} . Vzhledem k tomu je tedy velmi důležité vzorek zakonzervovat tak, aby se v průběhu skladování obsah specií rtuti neměnil.

Stabilita sloučenin ve vzorku je ovlivněna mnoha faktory jako je složení vzorku (matrice), koncentrace jednotlivých specií a řadou regulovatelných fyzikálních a chemických veličin jako jsou skladovací teplota, pH vzorku, iontová síla, materiál skladovací nádoby, expozice slunečním a gama zářením [36]. Doporučuje se skladovat vzorky ve tmě, v suchu a při teplotě 4 °C, jelikož MeHg podléhá okamžitému rozkladu po působení UV záření. Proto je dobré tyto podmínky dodržovat [2]. Iontová síla by měla být spíše nižší, jelikož při vysoké iontové síle (0,5 M NaCl) jsou ztráty methylrtuti vyšší než v deionizované vodě. Množství ztrát methylrtuti v prvních 4 dnech klesá v pořadí: bakteriální mořská voda > mořská voda > deionizovaná voda. Bylo prokázáno, že bakterie hrají velmi důležitou roli ve ztrátách methylrtuti. Co se týče gama záření, bylo zjištěno, že je velice vhodné pro stabilitu MeHg ve vzorcích sedimentu. Bylo také dokázáno, že gama záření zajišťuje stabilitu referenčního materiálu přes 12 měsíců při teplotách od 20–40 °C [36].

Stabilita vzorků se podpoří jejich zmrazením a jejich uchováváním v ledničce v nádobách z PTFE nebo borosilikátového skla. Dobré je také použití konzervačních činidel. Jako konzervační činidlo pro konzervaci MeHg se používá methanol nebo směs HCl a NaCl [3].

Biologické vzorky a sedimenty se většinou konzervují lyofilizací nebo zmrazením v místě odběru. V několika studiích nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi výsledky analýz vzorků čerstvých a lyofilizovaných. Naopak ale v některých pracích bylo dosaženo lepších výsledků při analýze vzorků lyofilizovaných [9]. Pokud se vzorek po odběru zmrazí, musí se před jeho přípravou k analýze dobře rozmrazit a zhomogenizovat.

U většiny biologických vzorků je v průběhu skladování minimální nebezpečí přeměny methylrtuti na anorganickou rtuť, bohužel u sedimentů byla tato přeměna během skladování pozorována a to až z 50%. U vzorků ryb, přírodních vod a jiných biologických materiálů tento jev není významný [2].

Přeměna methylrtuti na anorganickou rtuť byla také pozorována při použití nevhodného izolačního postupu a rovněž při alkalickém nebo kyselém rozkladu za horka, při použití tetraethylboritanu sodného jako ethylačního činidla a v acetonových či acetonitrilových extraktech vzorků. Degradace MeHg na Hg^{2+} byla zaznamenána také v cysteinových extraktech, pokud docházelo současně k oxidaci cysteinu na cystin v dichlormethanových extraktech [3].

2.6.2. Metody izolace methylrtuti ze vzorku

Aby mohl být analyt stanoven, musí být nejdříve provedena jeho izolace ze vzorku. Při izolaci dochází k jeho vytěsnění z matrice a zakoncentrování na detekovatelnou hodnotu. Musí se přitom postupovat tak, aby nedocházelo ke ztrátám a ke kontaminaci. Zároveň nesmí docházet k jakékoli změně formy dané specie a extrakční výtěžky musí být kvantitativní a reprodukovatelné. Tudíž je tato část asi nejkomplikovanější z celé analýzy [3].

Izolace CH_3Hg skupin z biologických materiálů, kde jsou vázány zejména na thiolové skupiny proteinů, se používá extrakce koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Reakcí vzniká chlorid methylrtuti CH_3HgCl . Pro některé materiály, jako je rybí tkáň nebo vlasy, je používána alkalická hydrolyza, při níž se štěpí tuky a bílkoviny. Usnadní se tak uvolnění CH_3Hg skupiny [37]. Mezi další používané metody pro izolaci methylrtuti z matrice se řadí superkritická fluidní extrakce, mikrovlnná extrakce MWE, zrychlená extrakce rozpouštědlem ASE nebo extrakce rozpouštědlem za vysokých tlaků PSE aj. [38].

Pro izolaci MeHg z rybí svaloviny extrakci kyselinou chlorovodíkovou byl použit následující postup [37]: Svalovina byla nejdříve rozrušena zahříváním při $60\text{ }^\circ\text{C}$ hydroxidem sodným ($c = 3\text{ mol/l}$) po dobu 30 min. Analyt byl pak následně uvolněn z matrice přidáním HCl ($c = 3\text{ mol/l}$) (pH směsi muselo být menší než 1) a půl hodiny extrahován v ultrazvukové lázni. Proteiny ve směsi byly vysráženy upravením pH na hodnotu 3,5 roztokem hydroxidu sodného a poté byly odfiltrovány (oddělení proteinů je kritickou fází celého postupu, proto je nutné předem zjistit nejvhodnější pH pro určitou matici).

2.6.3. Prekoncentrace

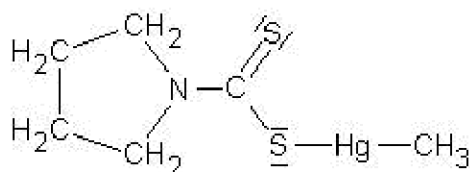
Specie rtuti se ve vodách vyskytují v dosti nízkých koncentracích. Citlivost metod stanovení rtuti často není dostatečná, a proto je nutné zařadit prekoncentrační krok. Pro tento účel se používají metody jako jsou derivatizace, extrakce z kapaliny do kapaliny, extrakce tuhou fází SPE nebo mikroextrakce tuhou fází SPME [39].

Extrakce z kapaliny do kapaliny patří mezi dosud často používané metody pro oddělení, zakoncentrování a přečištění analytu. Při klasickém postupu je chlorid methylrtuti (CH_3HgCl) nejprve extrahován z vodné fáze do organického nepolárního rozpouštědla, nejčastěji toluenu nebo chloroformu. Následuje další přečištění reextrakcí do vodného roztoku thiosíranu sodného. Velká nevýhoda tohoto postupu je však to, že dochází ke značným ztrátám analytu. Jsou uváděny i více než 60% úbytky, proto se pomalu od tohoto postupu prekoncentrace upouští [37].

Mikroextrakce tuhou fází SPME (Solid Phase Micro-Extraction) je sorpčně-desorpční technika, kterou vyvinuli Janusz Pawliszin a jeho spolupracovníci na začátku devadesátých let pro jednoduchou přípravu vzorků s následnou analýzou plynovou chromatografií [38]. Tato metoda byla vyvinuta, aby redukovala nevýhody (časová náročnost, toxicita organických rozpouštědel) již existujících extrakčních metod [41]. SPME umožňuje až 12 násobnou prekoncentraci methylrtuti [3]. Metoda je založena na vytvoření rovnováhy mezi matricí a stacionární fází na vlákne. Po ustavení rovnováhy je vlákno termicky desorbováno do nástřikové komůrky plynového chromatografu [41]. Ve spojení s kapalinovou chromatografií je desorpce analytu složitější. Instrumentace se skládá z šesticestného kohoutu se speciálním desorpčním vláknem umístěným ve vzorkovací smyčce. Analyt je desorbován z vlákna organickým rozpouštědlem nebo mobilní fází, protože termální desorpce za vysoké teploty by mohla způsobit degradaci polymeru nebo také neúplnou desorpci netěkavých sloučenin z vlákna. Spojení SPME – HPLC má omezené použití právě kvůli optimalizaci desorpčních podmínek a také kvůli malému počtu komerčně dostupných vláken [42].

Další prekoncentrační technikou je extrakce tuhou fází SPE (Solid Phase Extraction). SPE je založena na rovnovážné distribuci analytu mezi matricí a tuhou fází, přičemž rovnováha je posunuta ve prospěch tuhé fáze. Používá se v případech, kdy koncentrace polutantů ve vodě je nižší, než je mez stanovitelnosti použité analytické metody nebo, když vysoká koncentrace interferujících látek znemožňuje přímé stanovení [43]. Pro SPE se nejčastěji používají mikrokolonky s hydrofobním sorbentem (C18) modifikovaným chelatačními činidly:

- diethyldithiokarbamát (DDTC)
- pyrrolidindithiokarbamát (PDC)
- 1,5-difenyl-3-thiokarbazon = dithizon
- bis(2-hydroxyethyl)dithiokarbamát
- merkptoethanol [44]
- 2- sulfanylethanol [3].



Obr. 2.8. Struktura komplexu methylrtuti s PDC. [39]

Tato chelatační činidla ve své struktuře obsahují síru, která umožní navázání specií rtuti za vzniku stabilního komplexu. Eluce tohoto komplexu je pak založena na vymytí vzniklého komplexu organickým rozpouštědlem (methanol, ethanol, acetonitril) nebo na tvorbě komplexu eluční činidlo/analyt, který je silnější než komplex komplexotvorné činidlo/analyt [44].

Autoři [37] použili SPE k další izolaci a prekoncentraci směsi dříve získané izolací kyselinou chlorovodíkovou (postup viz. výše). Sorpění kolonka byla 15 minut sušena prosáváním vzduchu. Eluce analytu byla provedena dvakrát 0,5 ml methanolu. K filtrátu bylo poté přidáno 0,1 ml roztoku APDC (= amonná sůl pyrrolidindithiokarbamátu)

($c = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/l}$). Získaný extrakt byl odpařen do sucha při 60°C proudem dusíku a rozpuštěn v 0,2 ml mobilní fáze. Takto získaný vzorek byl přímo nastříkovan do kapalinového chromatografu. Výťažnost analytu v jednotlivých stupních analytického postupu byla testována na pěti hladinách koncentrace s pětinásobným opakováním na každé hladině. Stupeň SPE byl testován roztoky CH_3HgCl o koncentraci Hg 0,5 – 25 mg/l, SPE s následným odpařením do sucha roztoky o koncentraci rtuti 0,1 – 5 mg/l a celý postup s přídatkem CH_3HgCl v množství 0,1 – 5 μg Hg k 10 g čerstvé svaloviny. Podle výsledků autoři [37] určili, že ztráty analytu pro uvedený postup analýzy nejsou na hladině spolehlivosti $P = 0,9$ statisticky významné. Celkovou mez stanovitelnosti metody v přepočtu na vzorek o hmotnosti 10 g pak určili na 26 $\mu\text{g/kg}$.

2.6.4. Metody separace a detekce methylrtuti

Separace je nejdůležitější krok speciální analýzy. Mezi nejčastěji používané metody separace patří chromatografie a to zejména plynová chromatografie (GC) a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) [45].

Separace chemických forem rtuti pomocí HPLC se provádí nejčastěji chromatografií s obrácenými fázemi (= nepolární stacionární a polární mobilní fáze) využívajících chelatačních popřípadě ion – párových interakcí mezi modifikátorem mobilní fáze a analyty na jedné straně a hydrofobních interakcí mezi modifikátorem mobilní fáze a stacionární fází na straně druhé. Modifikátory vytváří stabilní komplexy se sloučeninami rtuti a pomáhají tak překonat významné rozdíly v chemických i fyzikálních vlastnostech jednotlivých forem rtuti a tím umožňují stanovit diametrálně odlišné sloučeniny v jednom separačním kroku [3].

Jako modifikátory se používají:

- **chelatační činidla:** 2-sulfanylethanol
L-cystein
směs 2-sulfanylethanolu s L-cysteinem [3]
dithizon
2-merkapt ethanol
diethyldithiokarbamátu (DDTC)
pyrrolidindithiokarbamát (PDC) [39]
- **ion-párová činidla:** směs tetrabutylamonium-bromidu (TBA) s NaCl [3].

Modifikace chemických forem rtuti pomocí komplexotvorných činidel (např. sirnými sloučeninami) je popsána rovnicemi (2.2.) a (2.3.) [3]; pomocí ion-párových činidel pak rovnicemi (2.4.) až (2.9.) [46].





R = alkyl, X⁻ = halogenid.

Hlavní výhodou při použití kapalinové chromatografie je jednoduchá příprava vzorku. Další výhody jsou eliminace derivatizačního kroku, separace při laboratorní teplotě, dávkování většího množství vzorku, snadné vyhodnocení či automatizace. Hlavní nevýhodou separace pomocí kapalinové chromatografie jsou vyšší detekční limity (DLs), které se pohybují v rozmezí 20 až 1000 pg [47, 45].

Při separaci chemických forem rtuti pomocí GC je důležité převést všechny analyty chemickou modifikací (derivatizací) na těkavé, termicky stabilní formy [40]. Při derivatizaci nesmí docházet k porušení původních vazeb v analyzovaných chemických formách rtuti. Derivatizace také slouží k vyizolování analytů z matrice. Mezi nejvíce používané metody derivatizace se řadí alkylace Grignardovými činidly v nevodném prostředí, alkylace tetraethylboritany ve vodném prostředí při pH 5 – 6 nebo tvorba hydridů s KBH₄ ve vodném prostředí. Z těchto postupů je nejvíce propracována ethylace tetraethylboritanem sodným (NaBEt₄). Nevýhodou ethylace NaBEt₄ je znemožnění stanovení ethylrtuti a nízká čistota ethylačního činidla. Stanovení ethylrtuti umožňuje derivatizace tetrapropylboritanem sodným [3]. Pro chromatografickou separaci se používají kapilární kolony s nepolárními typy fází na bázi poly(dimethylsiloxanu), případně s 5% fenylových skupin.

K detekci chemických forem rtuti se nejvíce používají detekce AFS (= atomová fluorescenční spektrometrie) CV – AFS (= atomová fluorescenční spektrometrie studenou parou), CV – AAS (= atomová absorpční spektrometrie studenou parou), ECD (=detektor elektronového záhytu) [3,47]. CV – AAS se vyznačuje mnoha výhodami mezi které patří vysoká citlivost, absence spektrálních interferencí, relativně nízké provozní náklady, jednoduchost, rychlost a snadná akceptace kapalných vzorků [46]. Hlavní nevýhodou ECD je nízká selektivita detekce, která se zvyšuje začleněním čistícího kroku. Při spojení GC s AFS jsou všechny chemické formy rtuti po chromatografické separaci nejprve převedeny pyrolýzou na elementární rtuť, která je následně detekována. Hlavní výhodou této detekce je nízká pořizovací cena a jednoduché ovládání přístroje [3]. Mezi další často používané techniky detekce patří UV/VIS (= absorpční spektrofotometre v ultrafialové a viditelné oblasti), ICP – MS (= hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou) nebo MS po elektronové ionizaci, ICP – OES (= optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou), AES (= atomová emisní spektrometrie) ICP – AES (= atomová emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou), MIP – AES (= atomová emisní spektrometrie s mikrovlnně vázanou plazmou), elektrochemické a piezoelektrické detektory [2,3]. Nevýhodou UV/VIS detektorů je však malá selektivita při identifikaci jednotlivých organokovových sloučenin [2]. Při piezoelektrické detekci jsou chemické formy rtuti redukovány na elementární rtuť chloridem cínatým. Vzniklá elementární rtuť je poté detekována jako amalgám po reakci se zlatem, kterým je pokryt křemenný krystal. Tato metoda detekce je velmi jednoduchá a rychlá, může být tedy použita jako rychlé monitorovací a ověřovací zařízení k analýze přírodních pitných vod [20]. Hlavní výhodou ICP – MS je možnost multiprvkové a multiizotopické analýzy [3].

V předchozích výzkumech zabývajících se stanovením methylrtuti kapalinovou a plynovou chromatografií bylo dosaženo různých detekčních limitů. Dosažené detekční limity různých detekčních technik uvádí tabulka 2.3. [47].

Tabulka 2.3. Meze detekce pro stanovení methylrtuti jednotlivými detekčními technikami spojenými s HPLC. [47,3,25].

Metoda	Mez detekce MeHg ⁺
HPLC-UV-VIS	0,10 – 25 ng
HPLC-CV-AAS	80×10^{-3} - 1,0 ng
HPLC-CV-AAS ^a	20×10^{-3} - 0,10 ng
GC-AAS	0,1 ng
HPLC-CV-AFS	20×10^{-3} ng
HPLC-CV-AFS ^a	$8,0 \times 10^{-3}$ ng
GC-AFS	0,25 pg
HPLC-ICP-AES	46×10^3 ng
HPLC-CV-ICP-AES	7,4 – 9,4 ng
HPLC-CV-MIP-AES	35×10^{-3} ng
GC-ICP-MS	0,9 pg
GC-MIP-AES	0,8 pg

^a ... byla použita prekoncentrace

2.6.5. Speciační analýza methylrtuti s použitím GC-ECD

GC-ECD je metoda, která byla používána po mnoho let spolu s metodami jako CV-AAS pro stanovení methylrtuti a jiných organokovových sloučenin v mořských biologických vzorcích.

Hlavní výhodou této techniky je možnost přímého stanovení methylrtuti bez zařazení derivatizačního kroku [51]. Jejím použitím by totiž došlo k odstranění halogenu. Proto se vyextrahované halogenidy rtuti převádějí pouze do organického rozpouštědla jako je benzen, toluen nebo hexan.

Hlavní nevýhodou použití detektoru elektronového záchytu je nízká selektivita detekce. Selektivita se proto zvyšuje začleněním čistícího kroku, který však může vnést do analýzy mnoho chyb [3]. Další problém použití GC-ECD pro stanovení monoalkylderivátů rtuti je jejich polarita. Díky této vlastnosti dochází k absorpci na aktivní místa stacionární fáze v malých koncentracích, což způsobuje např. rozšiřování píků a změnu retenčních časů.. Tyto problémy pak ovlivňují reprodukovatelnost metody. K prevenci těchto problémů se proto používá pasivace chromatografické kolony opakovaným injektováním soli rtuti. Tato úprava ale vede k navýšení času analýzy a také k velkému opotřebení stacionární fáze.

Použití kapilárních kolon je výhodnější než použití kolon náplňových kvůli jejich větší inertnosti, která minimalizuje absorpční procesy na aktivní místa stacionární fáze. Přesto však se předešlých pracích více používaly kolony náplňové [51].

2.6.6. Speciační analýza methylrtuti s použitím HPLC – CV – AFS

Stanovení specií rtuti HPLC-CV-AFS zahrnuje jak izolaci a separaci, tak detekci analytu. Formy rtuti jsou nejprve vyextrahovány do vodného roztoku, poté jsou mobilní fází, ve které se mísí s komplexotvorným činidlem, unášeny na kolonu HPLC. Zde se vytvořené komplexy zachytí a oddělí. Oddělené putují systémem a podléhají redukci na plynnou Hg^0 (metoda CV), která je poté detekována atomovou fluorescenční spektrometrií. Pomocí této metody lze stanovovat MeHg^+ , EtHg^+ , PhHg^+ a Hg^{2+} .

Jako mobilní fáze může být použit roztok methanolu se sulfanylethanolem v acetátovém pufru (pH 5). Zvýšením koncentrace sulfanylethanolu se značně zvýší citlivost MeHg^+ a anorganické rtuti. Pro redukci specií na plynnou formu rtuti Hg^0 se mobilní fáze mísí s redukčním činidlem, např. s chloridem cínatým (SnCl_2) v zásaditém či kyselém roztoku nebo s tetrahydroboritanem sodným (NaBH_4). Hlavní nedostatek při použití tetrahydroboritanu v redukčním kroku je generování vodíku současně s produkcí elementární rtuti. Vodík, kromě toho, že snižuje bezpečnost práce, také potlačuje fluorescenční signál rtuti. Působí tedy jako interferent. Pokud se k redukci specií rtuti používá SnCl_2 , je potřeba před redukcí přeměnit organickou rtuť na anorganickou formu Hg^{2+} . Pro převedení organických forem se používají oxidační činidla jako peroxodisíran draselný, směs bromidu a bromičnanu draselného, příp. UV záření. Při použití redukčního činidla NaBH_4 není potřeba použít oxidační krok, protože tato sloučenina rozkládá anorganické a organické formy rtuti na elementární formu [47].

Na detekci specií rtuti může mít vliv již použité extrakční činidlo. Např. kyselina thiooctová obsažená v extrakčním činidle má negativní vliv na analytický signál AFS detektoru. Vytváří komplexy, které se při působení UV záření (použité pro oxidaci na Hg^{2+}) nepřeměňují zcela kvantitativně na Hg^{2+} a redukcí SnCl_2 nevzniká elementární rtuť. AFS signál je snížen. Je tedy lepší použít směs 6 M HCl v přítomnosti 0,5 či 1 M NaCl. Při použití UV detekce jsou hlavními nedostatky nízká selektivita a citlivost, které vedou k absenci signálu některých specií). Při použití AFS detektoru je fluorescence elementární rtuti rušena organickými rozpouštědly [2].

2.6.7. Speciační analýza methylrtuti s použitím HPLC – CV – AAS

Spojení CV – AAS se používá jako vhodný detektor pro kapalinovou chromatografii. Eluát z kapalinového chromatografu je on-line smícháván s redukčním činidlem NaBH_4 za vytváření těkavých sloučenin rtuti. Inertní plyn Ar je dávkován přímo do separátoru plynné a kapalné fáze. S jeho pomocí se plynné specie rtuti zbavují kapalnou fázi. Poté je plynná rtuť detekována atomovou absorpční spektrometrií při 254 nebo 185 nm. Vytváření plynných specií rtuti a separace plynné a kapalnou fáze jsou nekritičtějšími kroky celé analýzy. Může zde docházet až k 80% ztrátám rtuti. S větším průtokem argonu je těkavá rtuť snadněji dopravována do absorpčního spektrometru. Tím se však sníží citlivost, protože se zvýší tok plynu přes absorpční kolonku. Problém je také vodní pára, která se může dostat do AAS. Absorbuje totiž záření a tím ovlivní výsledky. Proto se mezi separátor plynné a kapalnou fáze a AAS zařazuje komponenta nazývaná se sušící trubička Nafion, která má plyn zbavit par kapalnou fáze. Páry se absorbují na kyselinou sulfonovou uvnitř trubičky a poté jsou transportovány přes teflonovou vrstvu trubičky. Problém je zde ale s MeHg^+ , protože methylrtuť zde s vodou může vytvářet hydrid methylrtuti. Proto je nutné, aby se zařízení

zahřívalo na teplotu až 800 °C v přítomnosti MgO. Tím je docíleno to, že všechny specie rtuti jsou redukovány na Hg⁰ už předtím než dorazí do sušící trubičky.

Spojení HPLC-CV-AAS má levné provozní náklady, ale vyžaduje určité manipulační schopnosti, protože neexistuje dost dostupných automatických systémů [50].

2.7. Statistické vyhodnocení analytických dat

Při hodnocení analytických metod a výsledků se využívají matematicko – statistické metody. Jsou vhodným nástrojem zkoumání systému v případech, kdy je nutno učinit objektivní závěr o celku složeném z velkého množství jednotek, přičemž z nějakých důvodů je možno prozkoumat jen malou, vybranou část tohoto celku [49].

Základní charakteristiky analytických výsledků:

Přesnost metody: vlastnost souboru výsledků, získaných paralelně analýzou dokonale homogenního vzorku je statisticky ovlivněna mírou nahodilých chyb. Kvantitativní charakteristikou je relativní směrodatná odchylka jednoho stanovení a interval spolehlivosti aritmetického průměru výsledku.

$$s_x = s_y / a \quad (2.1.)$$

a je směrnice kalibrační křivky.

$$s_{x(\text{rel})} [\%] = \frac{s_x}{x} \cdot 100 \quad (2.2.)$$

$$L_{1,2} = \bar{x} \pm s_x \cdot \frac{t_\alpha}{\sqrt{n}} \quad (2.3.)$$

Primární veličinou je s_y naměřeného signálu

$$s_y = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.4.)$$

Opakovatelnost metody: je vlastnost souboru výsledků, získaných v dané laboratoři jedním pracovníkem podle určitého definovaného postupu z různých podílů dokonale homogenního vzorku v různých časových obdobích.

Reprodukovatelnost metody: je vlastností souborů výsledků, získaných po dle téhož postupu pro stejný vzorek v jiných laboratořích. Kvantitativní charakteristikou jsou stejné parametry jako u přesnosti.

Správnost metody: je míra shody výsledku analýzy se skutečným obsahem analyzované komponenty ve vzorku na určité hladině významnosti.

Spolehlivost analytické metody: výsledky analýzy vykazují maximální přesnost a správnost současně. Celková chyba je vyjádřena vztahem:

$$D = \frac{100 \left(d + \frac{ts}{\sqrt{n}} \right)}{\mu} \quad (2.5.)$$

kde $d = d_0 - ts/\sqrt{n}$, $d_0 = \bar{x} - \mu$, s je směrodatná odchylka jednoho stanovení; t ($n-1$, $\alpha = 0,039$).

Je-li $d_0 < ts/\sqrt{n}$, je $d \rightarrow 0$ a výsledný výraz je

$$D = \frac{100ts}{\mu\sqrt{n}} \quad (2.6.)$$

a výsledky nezávisí na $d_0 = \bar{x} - \mu$ a jsou zatíženy jen náhodnými chybami.

Je-li $d_0 > ts/\sqrt{n}$, je $d = d_0 - ts/\sqrt{n}$ a výsledný výraz je

$$D = 100 \frac{d_0}{\mu} \quad (2.7.)$$

Výsledná chyba nezávisí na směrodatné odchylce jednoho stanovení, rozhodující je především soustavná chyba a tedy správnost analytického postupu.

Mez detekce: je množství nebo koncentrace analytu, které poskytuje analytický signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky signálu pozadí s_0 (slepého pokusu, pozadí) dělenému směrnici kalibrační křivky a .

$$S_{\text{lim}} = \bar{S}_0 + 3s_0 \text{ resp. } (S_{\text{lim}} - \bar{S}_0) = 3s_0 \quad (2.8.)$$

$$c_{\text{lim}} = 3S_{\text{lim}} / a \quad (2.9.)$$

Mez stanovitelnosti: je množství nebo koncentrace analytu, odpovídající desetinásobku hodnoty směrodatné odchylky signálu slepého pokusu, děleného směrnici kalibrační křivky.

$$S_{\text{lim}} = \bar{S}_0 + 10s_0 \quad (2.10.)$$

$$c_{\text{lim}} = 10S_{\text{lim}} / a \quad (2.11.)$$

kde \bar{S}_0 je aritmetický průměr signálu slepého pokusu (pozadí), a je směrnice kalibrační křivky. Neuvažuje se při tom soustavná chyba.

Citlivost analytické metody: je u relativní metody charakterizována směrnici lineární kalibrační závislosti. Pokud závislost není lineární, pak odpovídá směrnici křivky v bodě, který přísluší obsahu stanovované složky nebo může být směrnice extrapolována k $c \rightarrow 0$.

Výtěžnost je definována jako poměr změřeného výsledku k referenční hodnotě. Nejčastěji se uvádí v procentech. Celková výtěžnost metody se stanovuje pro více koncentračních úrovní analytu ve vzorku.

$$\bar{R}_m = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^l R_{ij}}{nl} = \frac{\sum_{j=1}^l R_j}{l} \quad (2.12.)$$

kde \bar{R}_m je celková průměrná výtěžnost metody, l je počet koncentračních úrovní analytu, n je počet paralelních stanovení pro jednu koncentrační úroveň analytu, R_{ij} je výtěžnost jednoho stanovení a R_j je průměrná výtěžnost stanovení pro jednu koncentrační úroveň analytu.

$$\bar{R}_j = \frac{\sum_{i=1}^n R_{ij}}{n} \quad (2.13.)$$

$$R_{ij} = 100 \cdot \frac{x_{ij}}{X_j} \quad (2.14.)$$

kde x_{ij} je stanovené množství analytu a X_j je známé referenční množství analytu.

Směrodatná odchylka s (pro $n \leq 7$) vypočtená z rozpětí (dle Dean-Dixona):

$$s = k_n \times R \quad (2.15.)$$

kde k_n je tabelovaný koeficient pro jednotlivá n (pro $n = 3$ $k_n = 0,5908$) a R je rozpětí výsledků (rozdíl extrémních hodnot):

$$R = x_{\max} - x_{\min} \quad (2.16.)$$

Relativní směrodatná odchylka průměru je mírou přesnosti stanovení:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \% \quad (2.17.)$$

kde \bar{x} je aritmetický průměr paralelních měření dán vztahem $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum x_i$.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Chemikálie

- Standard MeHgCl PESTANAL, 100 mg, Sigma – Aldrich, USA
- Aceton, čistota p.a. LACHEMA s.r.o. ČR
- Toluén PESTANAL Sigma – Aldrich Laborchemikalien, Německo
- HCl, čistota p.a. LACHEMA s.r.o. ČR
- Na₂SO₄ bezvodý, čistota p.a. LACHEMA s.r.o. ČR

3.2. Přístroje

3.2.1. Odstředivka

Pro oddělení toluénové a vodné fáze byla použita stolní centrifuga Hettich EBA 8S.

3.2.2. Analyzátor rtuti AMA 254

Pro stanovení celkové rtuti v biotických maticích byl použit analyzátor AMA 254 (Advanced Mercury Analyser) Altec, Praha, Česká republika. Výsledky zaznamenal a zpracoval software WinAMA software.



Obr. 3.1. AMA 254

3.2.2.1. Zpracování vzorku AMA 254

Homogenizované vzorky ryb byly naváženy do vypálených lodiček (navážka cca 100 mg), umístěny do spalovací lodičky a zavedeny do spalovací trubice. Ohřevem spalovací pece byly vzorky po dobu 90 sec. vysušeny a poté termicky rozkládány po dobu 190 sec v proudu kyslíku. Rozkladné produkty byly dále vedeny přes amalgamátor, kde byla selektivně zachycena rtuť. Protože rozkladné produkty obvykle obsahují vodní páru, vyhřívá se celá plynová cesta až po výstup z bloku na 120 °C, aby se zabránilo kondenzaci vody. Po dokončení rozkladu vzorku a stabilizaci teploty se změřilo zachycené množství rtuti. Poté byla rtuť z amalgamátoru uvolněna krátkodobým ohřevem. Oblak rtuťových par byl nosným plynem unášen přes měřící kyvetu (pík 1). Prakticky veškerá rtuť se shromáždila ve zpoždovací nádobce (minimum mezi píky) a z ní pak vstoupila do druhé měřící kyvety (pík 2). To samé množství rtuti je tedy měřeno 2krát jen s odlišnou citlivostí (poměr citlivosti první a druhé kyvety je 15:1). Po 45 sec byl výsledek zaznamenán na PC, který jej zpracoval a přepočítal podle naváženého množství vzorku.

Tabulka 3.1. Podmínky měření AMA 254.

Parametry	
Zdroj záření	Nízkotlaká Hg výbojka
Vlnová délka	253,65 nm
Interferenční filtr	254 nm Pološířka 9 mm
Detektor	Křemíková UV dioda
Nosný plyn, průtok	O ₂ , 200 ml/min

3.2.3. Plynový chromatograf s detekcí elektronového záchytu GC/ μ ECD

Na analýzu methylrtuti v biotických maticích byl použit plynový chromatograf Agilent 6890 Series, G1530 – 90310 s mikrodetektoem elektronového záchytu (μ -ECD) a kapilární kolonou DB – 608 J&W Scientific o rozměrech 30 m \times 0,530 mm a tloušťkou filmu stacionární fáze 0,50 μ m. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru HP Chemstation verze A 6.0.



Obr. 3.2. Plynový chromatograf Hewlett Packard 6890 Series.

3.2.3.1. Zpracování vzorků v systému GC/ μ ECD

. Vzorky ve vialkách byly automaticky nastříkovány do plynového chromatografu pomocí automatického dávkovače. Bylo zkoušeno různé nastavení přístroje – teplotní program kolony, průtok make – up plynu aj. a vybráno to nejlepší. Jako nejlepší se jevílo následující nastavení. Do přístroje byl injektován 1 μ l vzorku bezděličově s teplotou injektoru 250°C. Teplotní program termostatu byl nastaven na 100°C po dobu jedné minuty, poté se teplota zvyšovala 10°C/min do 200°C, kde setrvala 2 min. Jako nosný plyn bylo použito helium o průtoku 3 ml/min. Teplota mikrodetektoru byla nastavena na 250°C. Jako make – up plyn byl použit dusík a jeho průtok činil 20 ml/min.

Tabulka 3.2. Podmínky měření GC/μECD

Parametry	
Kolona	DB – 608, 30 m × 0,530 mm × 0,50 μm
Dávkování	Bezděličové
Teplota injektoru	250°C
Nosný plyn, průtok	He, 3 ml/min
Teplotní program kolony	1 min při 100°C, nárůst 10°C/min do 200°C, 2 min při 200°C
Teplota detektoru	250°C
Make – up plyn, průtok	N ₂ , 20 ml/min

3.3. Reálné vzorky ryb

Vzorky 1 – 6:

- Místo odlovu: Brněnská přehrada - Bažiny
- Datum odlovu: 7.listopadu 2007
- Způsob skladování: hluboké zmrazení (- 25°C)
- Datum zpracování: 7. dubna 2008
- Informace o rybách:

Vzorek	Druh ryby (česky)	Druh ryby (latinsky)	Celková hmotnost (g)	Hmotnost svaloviny (g)
1	Plotice obecná	<i>Rutilus rutilus</i>	299,48	80,65
2	Cejn velký	<i>Abramis brama</i>	199,90	74,41
3	Cejn velký	<i>Abramis brama</i>	194,94	58,04
4	Cejn velký	<i>Abramis brama</i>	201,16	80,42
5	Cejn velký	<i>Abramis brama</i>	320,49	101,83
6	Lín obecný	<i>Tinca tinca</i>	653,31	141,07

Vzorky 7 – 12:

- Místo odlovu: Brněnská přehrada - Bažiny
- Datum odlovu: 8.srpna 2007
- Způsob skladování: hluboké zmrazení (- 25°C)
- Datum zpracování: 7.dubna 2008
- Informace o rybách:

Vzorek	Druh ryby (česky)	Druh ryby (latinsky)	Celková hmotnost (g)	Hmotnost svaloviny (g)
7	Kapr obecný	<i>Cyprinus carpio</i>	209,45	69,32
8	Kapr obecný	<i>Cyprinus carpio</i>	234,98	78,65
9	Kapr obecný	<i>Cyprinus carpio</i>	241,76	82,89
10	Plotice obecná	<i>Rutilus rutilus</i>	123,56	39,65
11	Cejn velký	<i>Abramis brama</i>	215,80	72,81
12	Lín obecný	<i>Tinca tinca</i>	265,84	90,54

3.3.1. Zpracování ryb

Ryby byly odloveny pracovníky Povodí Moravy, kteří jsou pro tuto činnost akreditováni. Pro odlov měli zpracován plán pokusu v souladu s novelizovaným zákonem č. 77/2004 Sb. na ochranu zvířat proti týrání. Po rozmrazení byly ryby zváženy, vykuchány a byla oddělena svalová tkáň od kůže. Po dočištění a homogenizaci byly vnitřnosti, kůže a svalovina samostatně zváženy. Pro další postupy analýzy byla brána pouze svalovina.

3.3.2. Extrakce

Na vyizolování methylrtuti ze vzorků ryb byla použita metoda extrakce publikovaná v [55], která je založena na vyluhování kyselinou chlorovodíkovou a extrakci do toluenu. Do centrifugační zkumavky se naváží 0,2 g zhomogenizovaného vzorku. K němu se přidá 5 ml acetonu a míchá se po dobu 30 sec. Vzorek se nechá 5 min. odstředit při 3500 ot./min. Po skončení odstředování se odpipetuje 4 ml acetonu bez rozrušení suspenze. Tento postup se opakuje 3krát, 2krát se 4 ml acetonu a 1krát se 4 ml toluenu. Po odebrání toluenu se do zkumavky přidá 0,7 ml HCl (1:1) a 4 ml toluenu. Nejprve se míchá jen vodná fáze do vytvoření pastové konzistence, poté se míchá spolu s toluenovou fází po dobu 1 min. Následuje pětiminutové odstředování při 3500 ot./min. Toluenový extrakt č. 1 se odpipetuje do zkumavky, do které se předem naváží 2 g bezvodého síranu sodného. Extrakce se opakuje stejným způsobem ještě jednou přidáním 4 ml toluenu. Po odstředění se toluenový extrakt č.2 přidá k extraktu č.1, uzavře se zátkou a nechá se stát 1 hod. při 4 °C. Takto připravený kombinovaný extrakt se převede do vialky a je připraven k analýze. Každý vzorek byl takto extrahován 3krát a každý extrakt byl se 3krát nastříknut do plynového chromatografu.

3.4. Certifikovaný referenční materiál

Pro určení výtěžnosti metody byl použit certifikovaný referenční materiál CRM 464 tuňáka s obsahem celkové rtuti THg = 5,24 µg/g a methylrtuti MeHg = 5,5 µg/g (Institute for Reference Materials and Measurements, Belgie). Methylrtuť z něj byla izolována stejnou metodou extrakce jaká byla použita u reálných vzorků. Navážka ale činila pouze 0,1 g. Paralelně bylo vyextrahováno 5 vzorků, každý vzorek byl změřen 3x.

3.5. Vzorky s přidavkem standardu methylrtuti

Do 1 g rybího masa bylo přidáno 8 a 4 μl standardu o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$, aby výsledná nalezená koncentrace v 0,2 g vyextrahovaného vzorku činila 10 a 20 ng/ml (4 μl pro 10 ng/ml a 8 μl pro 20 ng/ml). Standard byl přidán do vzorku, který byl řádně zhomogenizován a nechal se stát do druhého dne v lednici. Druhý den se provedla extrakce stejným postupem jako u reálných vzorků.

3.6. Zpracování výsledků

Výsledky experimentální části byly zpracovávány v programu Microsoft Office Excel 2003. Při analýze paralelních měření jsou výsledky vyhodnoceny jako průměrná hodnota \pm směrodatná odchylka měření.

Obsahy methylrtuti jsou uvedeny v ng/g a pak jsou srovnány s obsahem celkové rtuti jako výtěžek v procentech, odvozený od celkového množství rtuti THg zjištěném na přístroji AMA 254.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Kalibrace přístroje AMA

Přístroj AMA 254 byl nakalibrován na standard 10 ng/ml servisním pracovníkem při poslední kontrole. Kalibrace se tedy neprováděla, jen byla zkontrolována a ověřena její správnost.

4.2. Kalibrace přístroje GC/ μ ECD

Plynový chromatograf byl kalibrován vždy před měřením analyzovaných vzorků použitím roztoků s rozsahem koncentrací 5; 10; 20; 80; 200; 500 ng/ml. Roztoky byly připraveny ředěním standardu MeHgCl toluenem na požadované koncentrace. Chromatogramy kalibrační řady jsou zobrazeny na obr. 4.1. Výsledná kalibrační křivka pro stanovení methylrtuti je znázorněna na obr. 4.2. Retenční čas methylrtuti byl 6,527 min.

Mez detekce byla spočítána jako podíl výšky píků signálu nejméně koncentrovaného bodu kalibrační řady (H_1) a signálu šumu (H_s):

$$\frac{\text{signál}}{\text{šum}} = \frac{H_1}{H_s} = \frac{65,4}{1,2} = 54,5$$

Tato hodnota se přepočítá na hodnotu 3:

$$\begin{array}{r} 5 \text{ ng/ml} \dots\dots\dots 54,5 \\ x \dots\dots\dots 3 \\ \hline x = 0,275 \text{ ng/ml} \end{array}$$

Mez detekce byla stanovena na **0,275 ng/ml**, což odpovídá hodnotě **11 ng/g**.

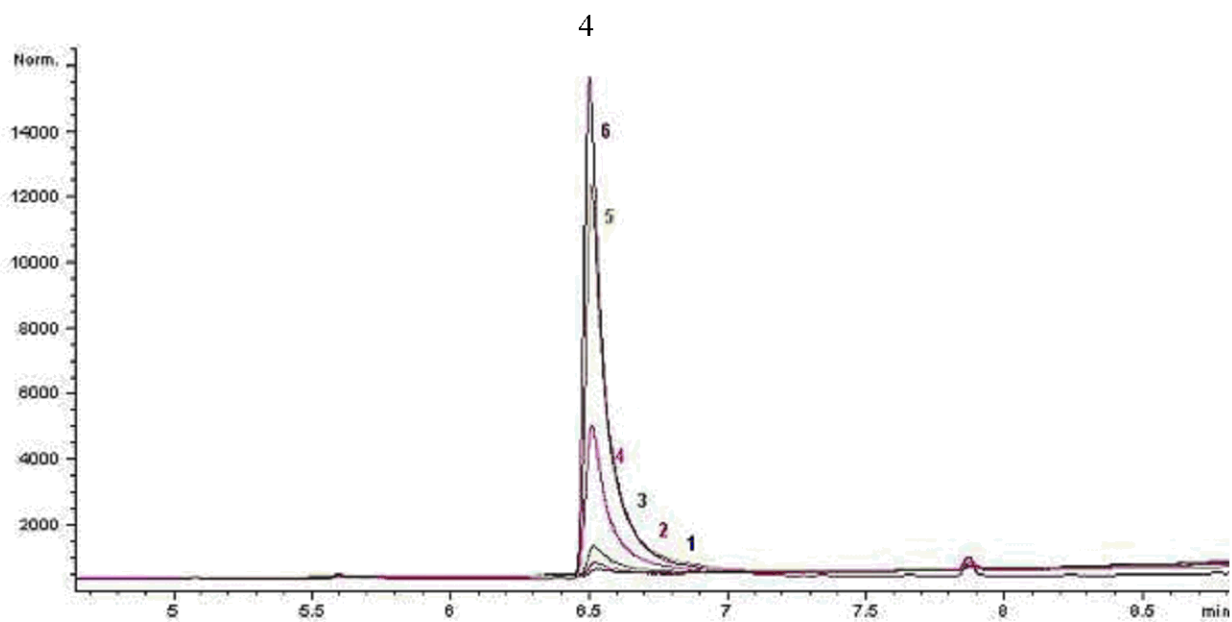
Mez stanovitelnosti byla spočítána jako podíl výšky píků signálu nejméně koncentrovaného bodu kalibrační řady (H_1) a signálu šumu (H_s):

$$\frac{\text{signál}}{\text{šum}} = \frac{H_1}{H_s} = \frac{65,4}{1,2} = 54,5$$

Tato hodnota se přepočítá na hodnotu 10:

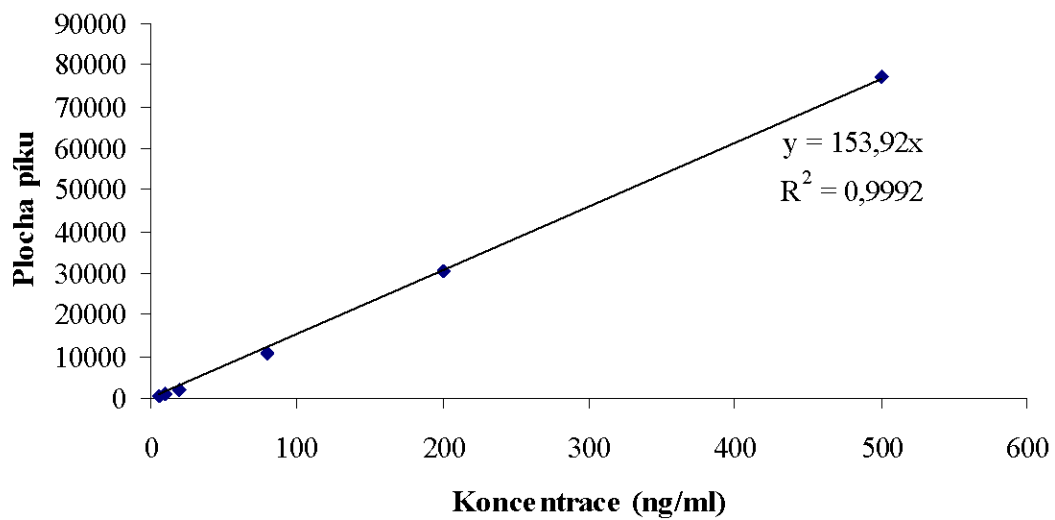
$$\begin{array}{r} 5 \text{ ng/ml} \dots\dots\dots 54,5 \\ x \dots\dots\dots 10 \\ \hline x = 0,917 \text{ ng/ml} \end{array}$$

Mez stanovitelnosti byla určena **0,917 ng/ml** což odpovídá hodnotě **36,68 ng/g**.



Obr.4.1. Chromatogramy jednotlivých bodů kalibrační křivky.

1: 5 ng/ml, 2: 10 ng/ml, 3: 20 ng/ml, 4: 80 ng/ml, 5: 200 ng/ml, 6: 500 ng/ml



Obr. 4.2. Kalibrační křivka pro stanovení methylrtuti pomocí GC/ μ ECD

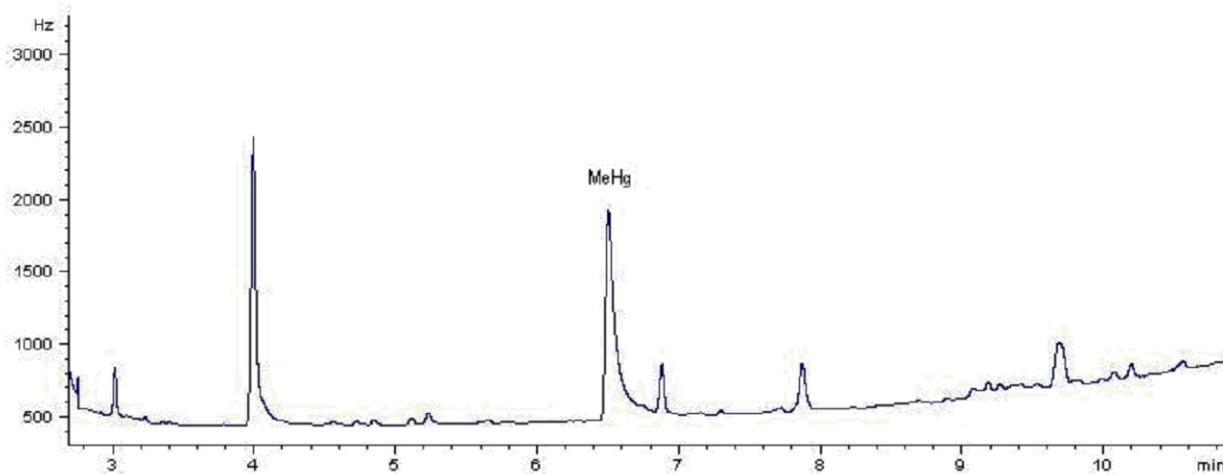
4.3. Extrakce, výtěžnost metody

4.3.1. Certifikovaný referenční materiál

Pro stanovení výtěžnosti metody byl použit certifikovaný referenční materiál CRM 464. Výtěžnost extrakce byla stanovena průměrně na $64,9\% \pm 2,0\%$. Nebylo tedy dosaženo takových výsledků jako v publikaci [55], kde činila výtěžnost 90%. Mohlo to být způsobeno použitým certifikovaným referenčním materiálem, který měl krátce po expirační době. Obsah rtuti, tedy i methylrtuti, mohl být nepatrně jiný než byl uveden. V tabulce 4.1. jsou zobrazeny výsledky výtěžnosti jednotlivých paralelních stanovení obsahu methylrtuti v CRM (označení 1 – 5), na obr. 4.3. je znázorněn vybraný chromatogram vybraného certifikovaného referenčního materiálu.

Tabulka 4.1. Výtěžnosti 5 paralelně měřených certifikovaných referenčních materiálů.

CRM	Průměrná plocha píků	c(ng/ml)	Zjištěný obsah MeHg (ng/g)	Deklarovaný obsah MeHg (ng/g)	Výtěžnost (%)
1	6163,81	40,05	3559,60	5500,00	$64,72 \pm 0,51$
2	7030,21	45,67	3653,96	5500,00	$66,44 \pm 3,80$
3	6938,18	45,08	3606,12	5500,00	$65,57 \pm 1,71$
4	6884,60	44,73	3578,27	5500,00	$65,06 \pm 0,61$
5	6625,99	43,05	3443,86	5500,00	$62,62 \pm 3,59$



Obr. 4.3. Chromatogram vybraného certifikovaného referenčního materiálu.

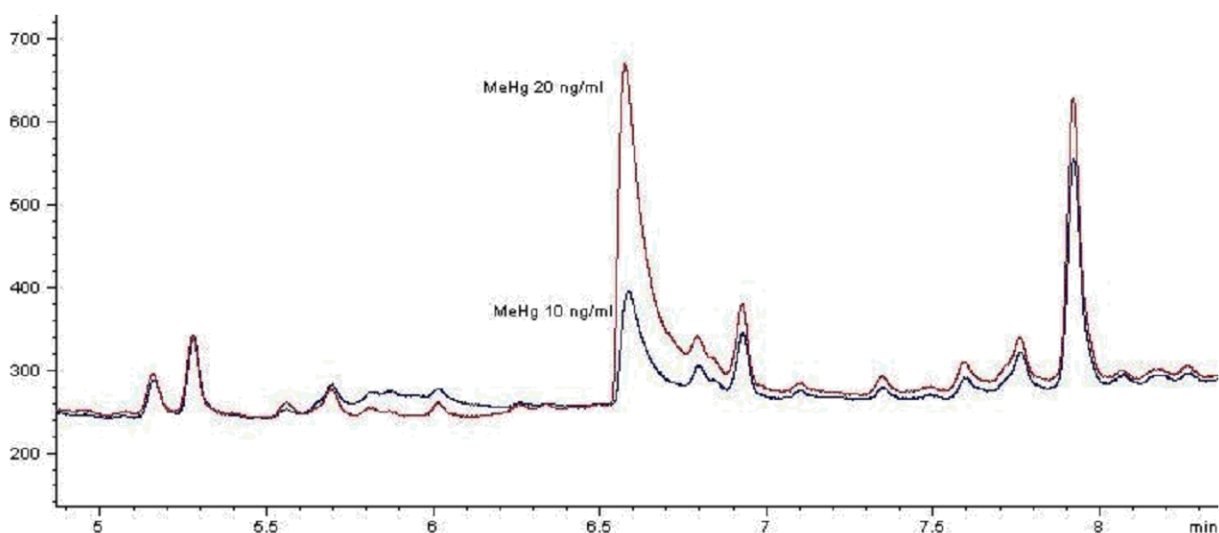
4.3.2. Vzorky s přidavkem standardu methylrtuti

Výtěžnost metody byla posouzena také podle ze vzorků se standardním přidavkem 10 a 20 ng/ml (každý vzorek byl 3krát extrahován → označení A, B, C). Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 4.2. Je patrné, že výtěžnost metody opět nedosáhla takové hodnoty jako

v publikaci [55]. Výtěžnost byla stanovena na $53,4\% \pm 6,8\%$. Důvod může spočívat v nedostatečném uležení vzorků s naspikovaným standardem a tím nedostatečným prostoupením methylrtuti do tkáně. Na obr. 4.4 jsou zobrazeny chromatogramy vzorků se standardním přídatkem 10 a 20 ng/ml.

Tabulka 4.2. Výsledky vzorků se standardním přídatkem 10 a 20 ng/ml.

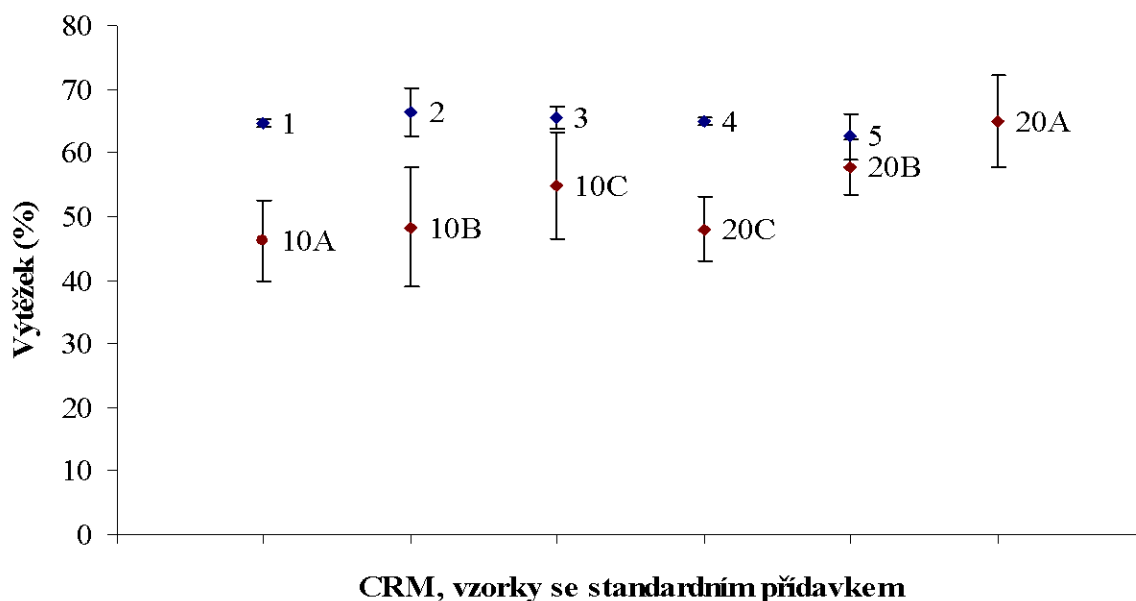
Vzorky	Průměrná plocha píků	c (ng/ml) nalezeno	c (ng/ml) přidáno	Výtěžnost (%)
10A	765,81	4,62	10,00	$46,16 \pm 6,38$
10B	802,40	4,84	10,00	$48,37 \pm 9,26$
10C	909,20	5,48	10,00	$54,81 \pm 8,41$
20A	2155,59	12,99	20,00	$64,97 \pm 7,12$
20B	1913,93	11,54	20,00	$57,68 \pm 4,29$
20C	1594,47	9,61	20,00	$48,06 \pm 5,15$



Obr. 4.4. Chromatogramy vybraných vzorků se standardním přídatkem 10 a 20 ng/ml.

4.3.3. Srovnání výtěžnosti použitím CRM a vzorků se standardním přídatkem

Z obrázku 4.5. je patrné, že výtěžnost stanovená u vzorků se standardním přídatkem je nižší než u vzorků certifikovaného referenčního materiálu. Mohl to zapříčinit vliv matrice. Certifikovaný referenční materiál je ve formě prášku, upravený tak, aby po dobu své expirační doby obsahoval konstantní obsah rtuti/methylrtuti a neobsahuje tolik nečistot, které by mohly rušit stanovení. Přestože je v extrakčním postupu zařazen čistící krok, zřejmě není úplně dostatečný. Lze to vypožorovat z chromatogramů obou typů vzorků, u vzorků se standardním přídatkem lze vidět více píků nečistot než v chromatogramu vzorku certifikovaného referenčního materiálu.



Obr. 4.5. Srovnání výtěžnosti metody podle certifikovaného referenčního materiálu a vzorků se standardním přídatkem.

1 – 5: certifikovaný referenční materiál; 10 A, B, C: vzorek se standardním přídatkem 10 ng/ml; 20 A, B, C: vzorek se standardním přídatkem 20 ng/ml.

4.4. Přesnost stanovení methylrtuti GC/ μ ECD

Bylo provedeno 5 paralelních měření certifikovaného referenčního materiálu. Ten byl zpracován stejným extrakčním postupem jako reálné vzorky. Výsledky jsou znázorněny v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3. Přesnost stanovení obsahu methylrtuti GC/ μ ECD.

	Průměrný obsah (ng/g)	RSD (%)
MeHg	3568,36	1,79

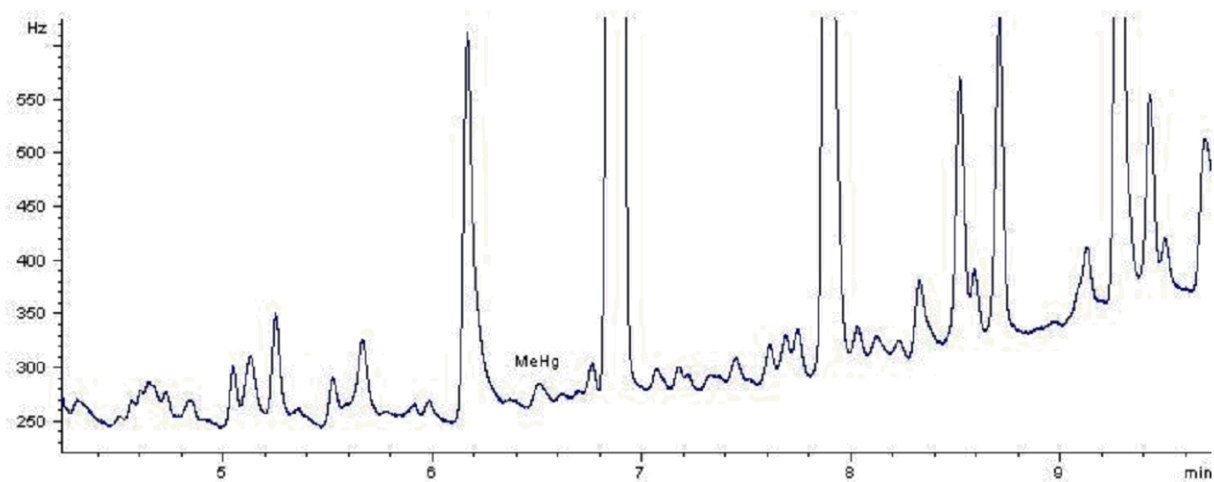
4.5. Reálné vzorky

4.5.1. Stanovení methylrtuti

V každém vzorku byl měřen obsah methylrtuti MeHg metodou GC/ μ ECD. Každý vzorek byl 3krát extrahován (označení A, B, C) a 3krát analyzován. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 4.4 – 4.15. jako hodnota \pm relativní směrodatná odchylka. Chromatogramy jednotlivých vzorků jsou zobrazeny na obr. 4.6. – 4.17.

Tabulka 4.4. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 1.

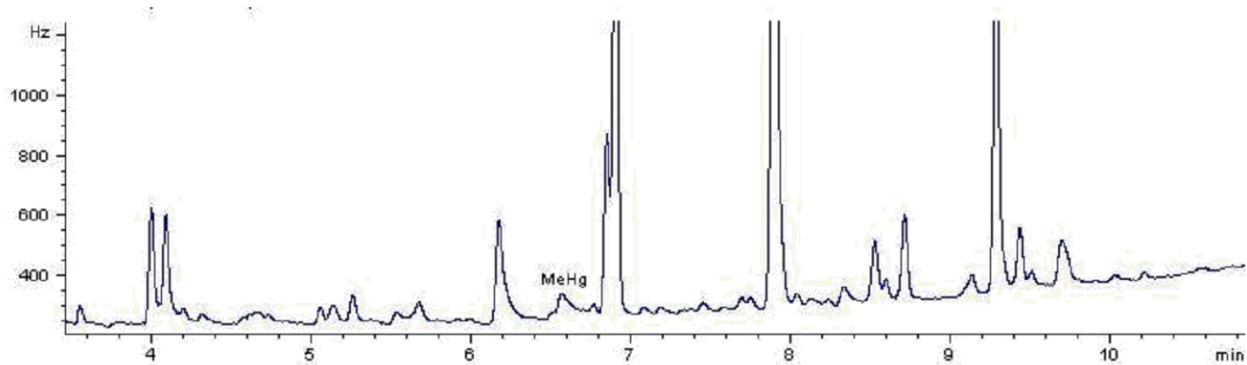
Vzorek 1			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	103,73	0,66	23,85 ± 1,50
B	79,91	0,51	20,21 ± 3,47
C	80,46	0,51	20,35 ± 2,12



Obr. 4.6. Chromatogram vzorku 1.

Tabulka 4.5. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 2.

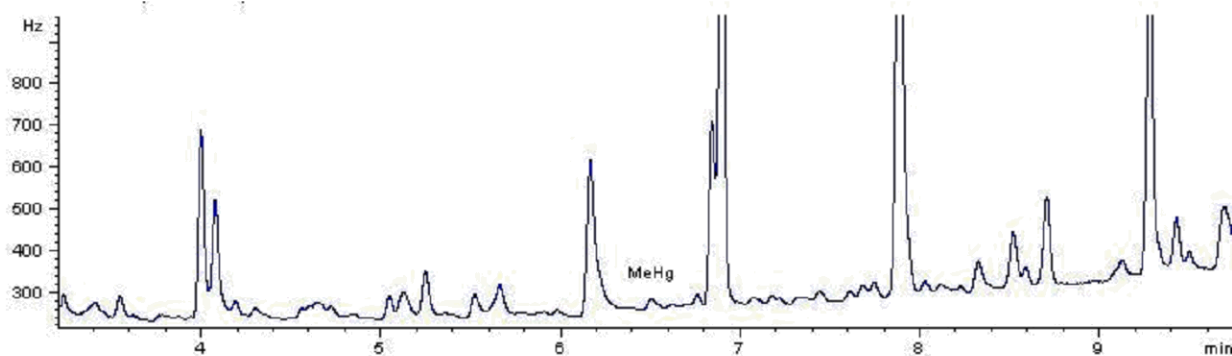
Vzorek 2			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	450,49	2,85	113,99 ± 11,96
B	450,55	2,85	119,96 ± 5,67
C	408,28	2,58	108,70 ± 9,12



Obr. 4.7. Chromatogram vzorku 2.

Tabulka 4.6. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 3.

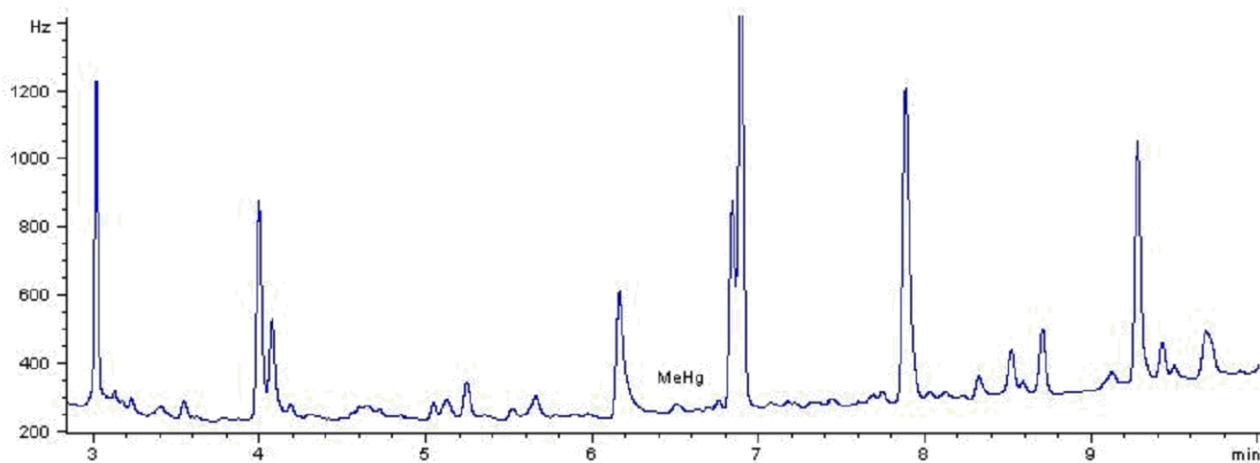
Vzorek 3			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	127,34	0,81	30,68 ± 7,32
B	66,39	0,42	16,79 ± 4,55
C	87,01	0,55	22,01 ± 6,71



Obr. 4.8. Chromatogram vzorku 3.

Tabulka 4.7. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 4.

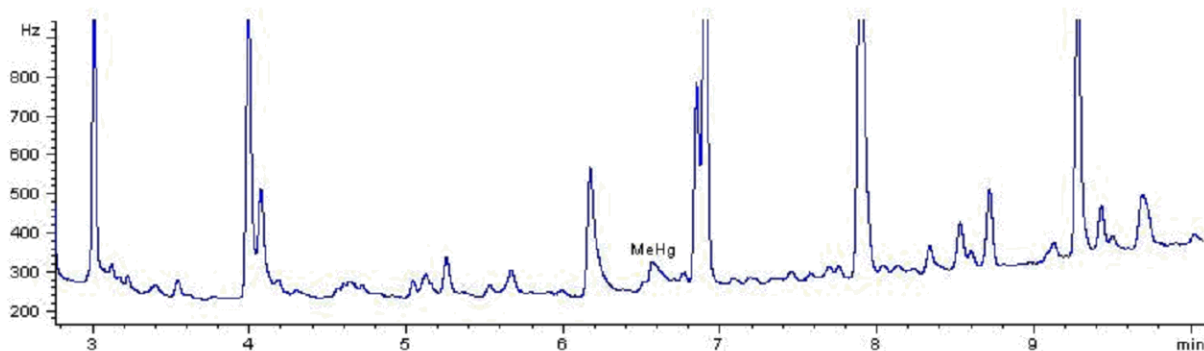
Vzorek 4			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	98,79	0,63	24,99 ± 3,68
B	72,72	0,46	18,39 ± 5,08
C	84,25	0,53	21,31 ± 4,42



Obr. 4.9. Chromatogram vzorku 4.

Tabulka 4.8. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 5.

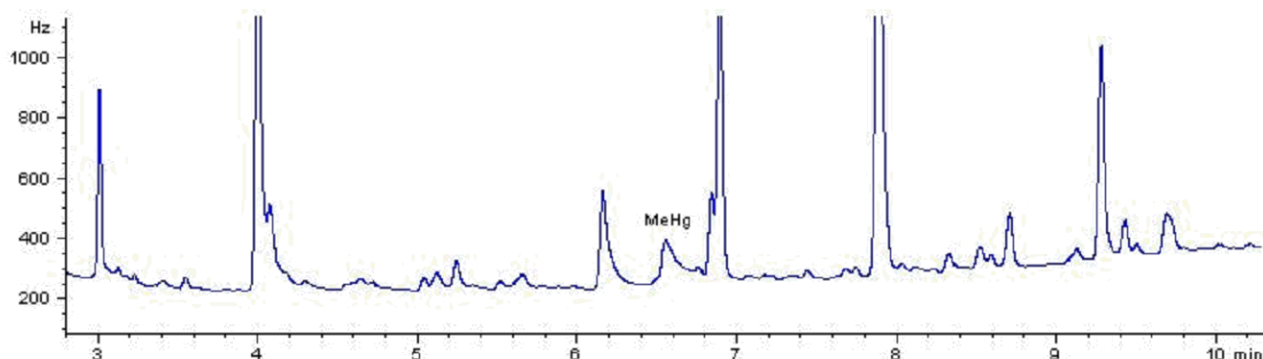
Vzorek 5			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	400,35	2,53	96,44 ± 2,81
B	327,77	2,07	82,90 ± 6,65
C	356,35	2,25	90,13 ± 10,47



Obr. 4.10. Chromatogram vzorku 5.

Tabulka 4.9. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 6.

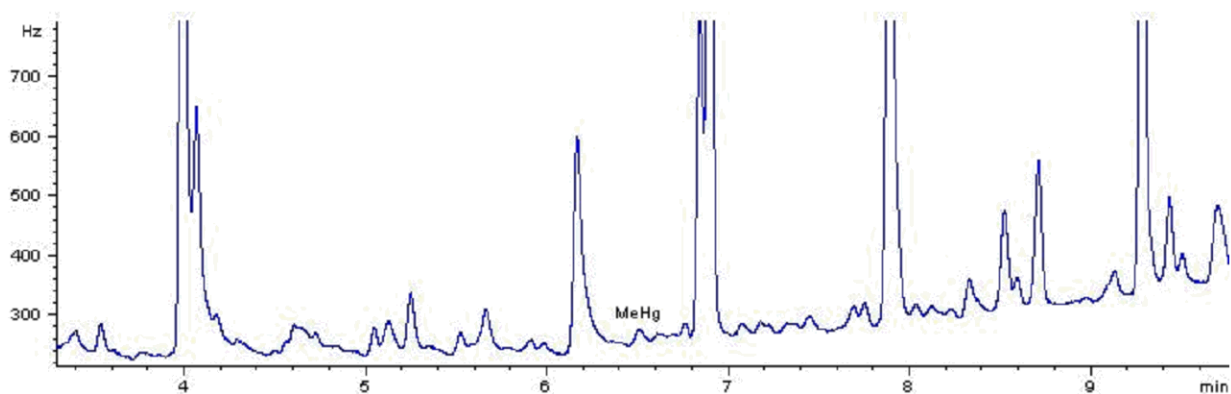
Vzorek 6			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	1168,11	7,39	268,60 ± 6,26
B	1124,85	7,11	270,97 ± 0,64
C	1001,84	6,34	266,74 ± 7,54



Obr. 4.11. Chromatogram vzorku 6.

Tabulka 4.10. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 7.

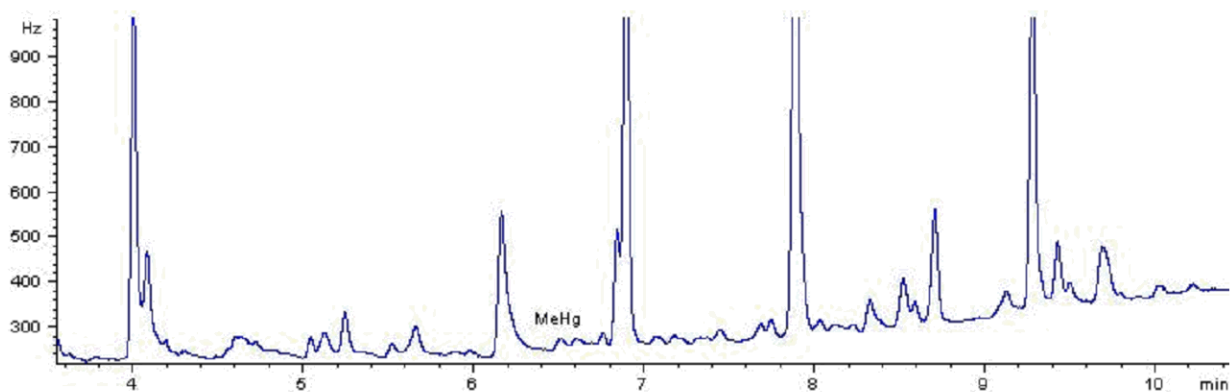
Vzorek 7			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	80,10	0,51	19,51 ± 5,36
B	84,16	0,53	21,28 ± 6,39
C	48,20	0,31	12,19 ± 8,79



Obr. 4.12. Chromatogram vzorku 7.

Tabulka 4.11. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 8.

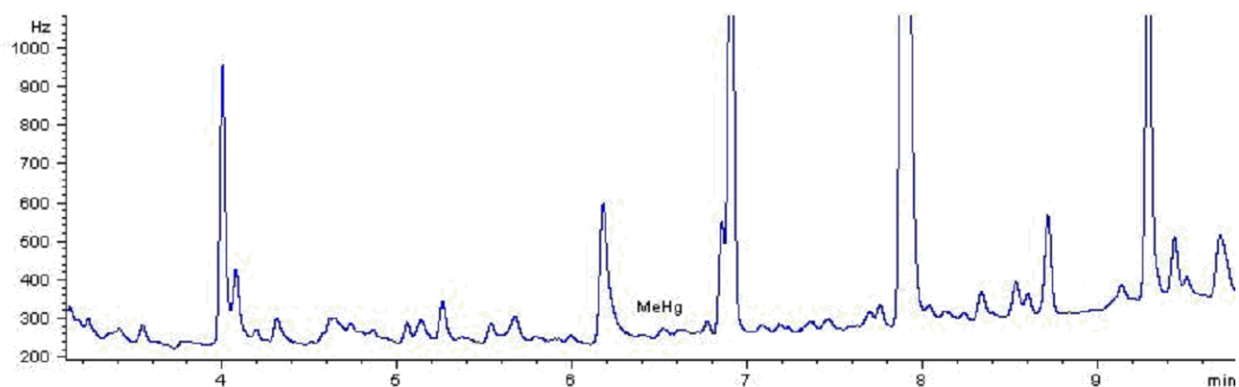
Vzorek 8			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	84,61	0,54	19,45 ± 3,58
B	83,45	0,53	20,10 ± 4,54
C	49,40	0,31	13,15 ± 8,46



Obr. 4.13. Chromatogram vzorku 8.

Tabulka 4.12. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 9.

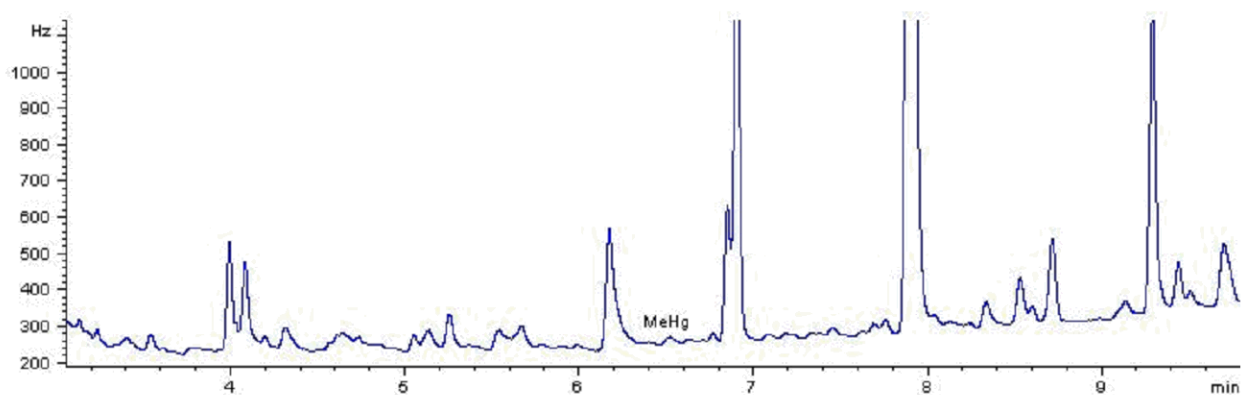
Vzorek 9			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	73,28	0,46	17,65 ± 7,35
B	84,58	0,54	21,39 ± 5,55
C	56,01	0,35	14,17 ± 8,14



Obr. 4.14. Chromatogram vzorku 9.

Tabulka 4.13. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 10.

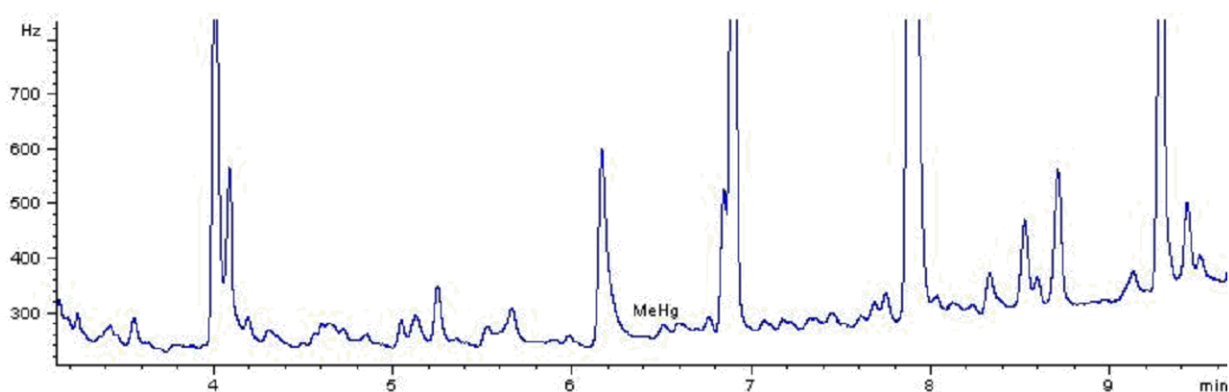
Vzorek 10			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	76,75	0,49	17,65 ± 11,26
B	84,05	0,53	20,25 ± 4,53
C	68,00	0,43	18,10 ± 1,10



Obr. 4.15. Chromatogram vzorku 10.

Tabulka 4.14. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 11.

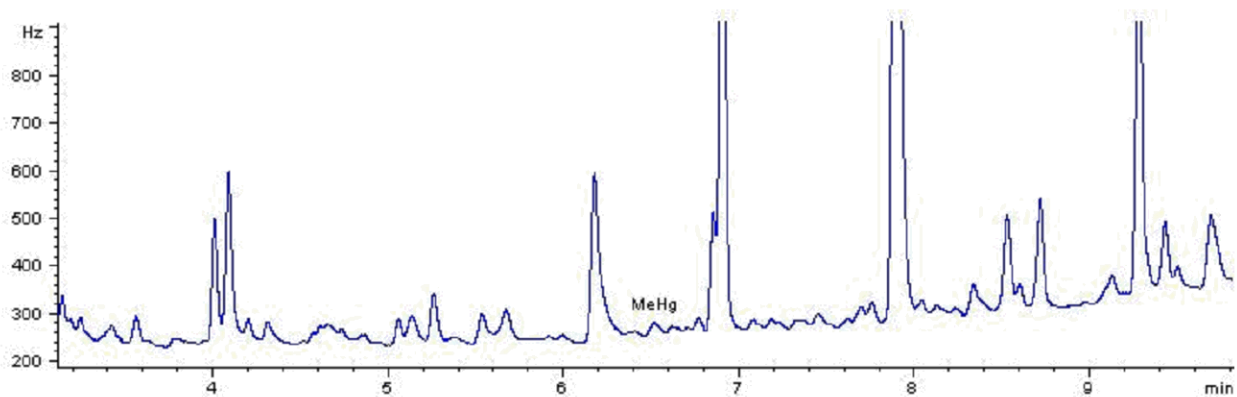
Vzorek 11			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	69,84	0,44	16,82 ± 1,94
B	98,20	0,62	24,84 ± 6,40
C	48,91	0,31	12,37 ± 6,80



Obr. 4.16. Chromatogram vzorku 11.

Tabulka 4.15. Výsledky obsahu MeHg pro vzorek 12.

Vzorek 12			
	Průměrná plocha píků	c (ng/ml)	Obsah (ng/g)
A	78,99	0,50	18,16 ± 4,94
B	77,22	0,49	18,60 ± 7,77
C	45,65	0,29	12,16 ± 7,11



Obr. 4.17. Chromatogram vzorku 12.

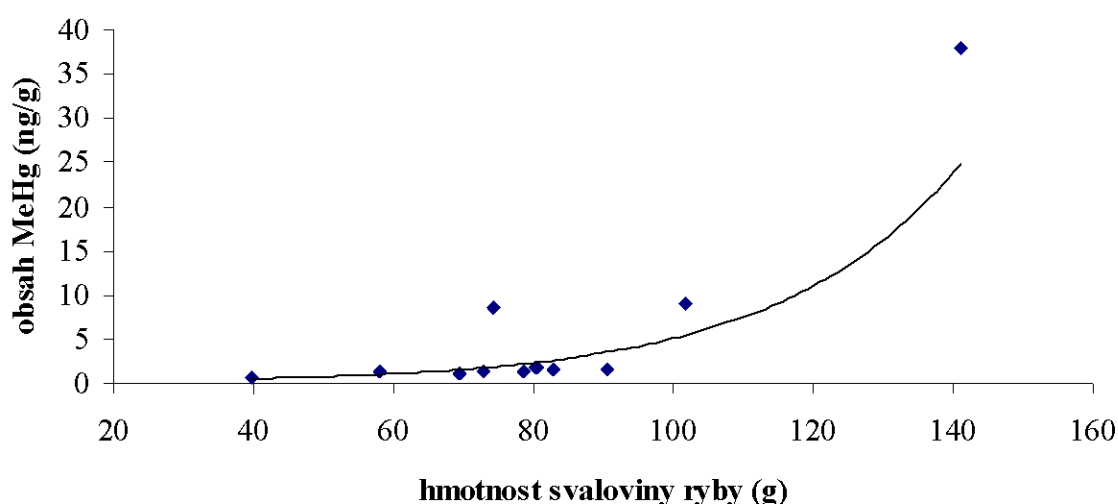
Shrnutí:

Vzorky ryb 1 – 12 obsahovaly množství methylrtuti v rozmezí 16,31 – 268,77 ng/g. Tabulka 4.16. shrnuje veškeré výsledky od obsahu MeHg v jednotkách ng/g až po přepočítané množství methylrtuti v celé rybě. Podle výsledků je patrné, že mimo vzorků 2, 5 a 6 byl stanoven obsah methylrtuti nižší než byla mez stanovitelnosti metody (38,68 ng/g), pod mezí detekce (11 ng/g) nebyl žádný analyzovaný vzorek. Nejvíce methylrtuti obsahoval vzorek 6 – lín obecný, nicméně ani ten nepřesáhl limit stanovený Ministerstvem zdravotnictví ČR, který má hodnotu 0,5 mg/kg pro svalovinu ryb a 1 mg/kg pro štiku obecnou.

Jak dokazuje obr. 4.18. obsah methylrtuti jasně koreluje s hmotností ryb (čím větší ryba, tím větší množství MeHg). To potvrzuje bioakumulaci methylrtuti v rybách.

Tabulka 4.16. Shrnutí obsahů methylrtuti v reálných vzorcích ryb.

Vzorek	Druh ryby	Průměrný obsah MeHg (ng/g)	Hmotnost svaloviny ryb (g)	Obsah MeHg ve svalovině ryb (μg)	Celková hmotnost ryby (g)	Množství MeHg v rybách (μg)
1	Plotice obecná	21,47 ± 2,37	80,65	1,73	299,48	6,41
2	Cejn velký	114,20 ± 8,92	74,41	8,50	199,90	22,83
3	Cejn velký	23,16 ± 6,19	58,04	1,34	194,94	4,51
4	Cejn velký	21,56 ± 4,39	80,42	1,73	201,16	4,34
5	Cejn velký	89,83 ± 6,64	101,83	9,15	320,49	28,79
6	Lín obecný	268,77 ± 4,82	141,07	37,91	653,31	175,59
7	Kapr obecný	17,66 ± 6,85	69,32	1,22	209,45	4,13
8	Kapr obecný	17,57 ± 5,53	78,65	1,38	234,98	4,29
9	Kapr obecný	17,74 ± 7,02	82,89	1,47	241,76	2,31
10	Plotice obecná	18,67 ± 5,63	39,65	0,74	123,56	3,89
11	Cejn velký	18,01 ± 5,05	72,81	1,31	215,80	4,33
12	Lín obecný	16,31 ± 6,61	90,54	1,48	265,84	4,13



Obr. 4.18. Korelace mezi koncentrací MeHg a hmotností svaloviny různých druhů ryb.

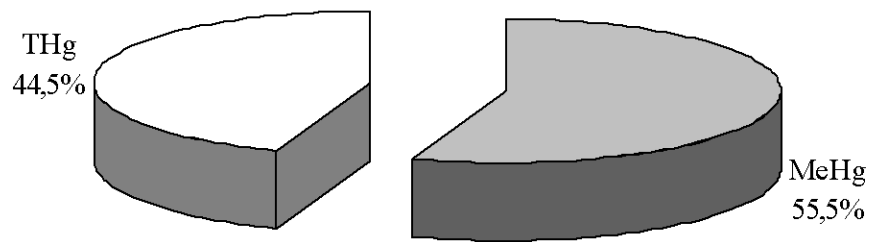
4.5.2. Srovnání obsahů methylrtuti MeHg a celkové rtuti THg

Vzorky ryb byly také měřeny na celkový obsah rtuti pomocí analyzátoru AMA 254. Každý vzorek byl změřen 3krát. Tabulka 4.17. uvádí výsledky obsahu celkové rtuti \pm směrodatná odchylka, zároveň tabulka znázorňuje k porovnání obsahy methylrtuti \pm směrodatná odchylka. Obsah celkové rtuti byl v rozmezí hodnot 38,67 – 578,10 ng/g. Nejvíce THg obsahoval vzorek 6 – lín obecný. V tabulce je také vyjádřen poměr obsahu MeHg stanovení GC/ μ ECD k celkovému obsahu rtuti THg stanoveném na AMA 254. Obsah methylrtuti vzhledem k celkovému obsahu rtuti byl v rozmezí od 14,71% do 55,53%. Výsledek tedy nepotvrzuje studie, že většina rtuti v rybách je obsažena ve formě methylrtuti. Toto tvrzení však musí být zohledněno vzhledem k výtěžnosti extrakčního postupu, která byla maximálně 65%. Z tohoto důvodu musí být tedy řečeno, že nízký obsah MeHg není způsoben faktem, že by vzorky ryb neobsahovaly většinu rtuti ve formě methylrtuti, ale tím, že došlo k jejímu nevyizolování z matrice pomocí použité extrakční metody. Na obr. 4.19 – 4.30. jsou pak schématicky znázorněny poměry obsahů MeHg a THg.

Tabulka 4.17. Obsahy celkové rtuti THg, methylrtuti MeHg a poměr obsahů MeHg stanovené GC/ μ ECD k THg stanovené na AMA 254.

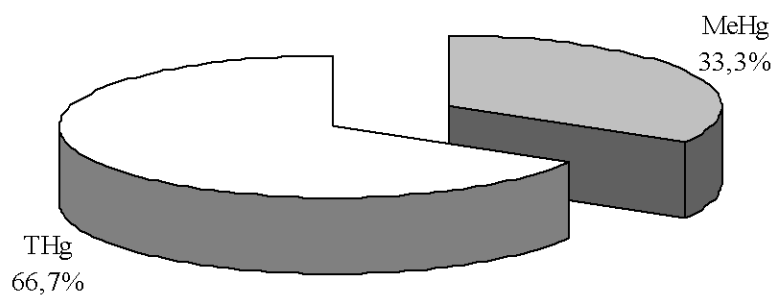
Vzorek	Celková THg (ng/g)	Obsah MeHg (ng/g)	Poměr obsahů MeHg a THg (%)
1	38,67 \pm 15,34	21,47 \pm 2,36	55,53
2	343,30 \pm 8,51	114,20 \pm 8,92	33,27
3	67,10 \pm 1,35	23,16 \pm 6,19	34,51
4	54,76 \pm 6,10	21,56 \pm 4,39	39,38
5	325,46 \pm 12,65	89,82 \pm 6,64	27,60
6	578,10 \pm 8,42	268,77 \pm 4,81	46,49
7	100,59 \pm 11,18	17,66 \pm 6,84	17,56
8	116,22 \pm 5,27	17,57 \pm 5,52	15,12
9	102,84 \pm 5,62	17,74 \pm 7,02	17,25
10	73,14 \pm 4,85	18,67 \pm 5,63	25,52
11	122,40 \pm 3,67	18,01 \pm 5,05	14,71
12	98,24 \pm 9,94	16,31 \pm 6,61	16,60

Vzorek 1
poměr obsahu MeHg a THg 55,5%



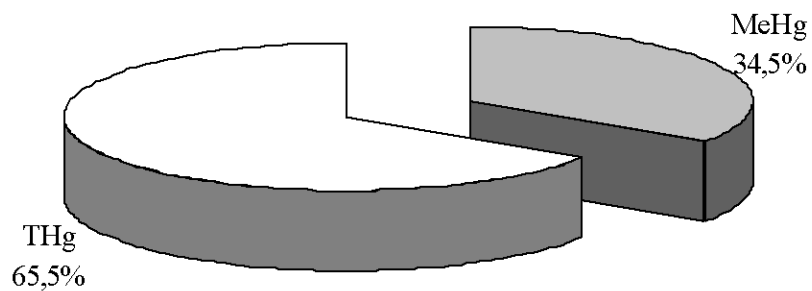
Obr. 4.19. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.1.

Vzorek 2
poměr obsahu MeHg a THg 33,3%



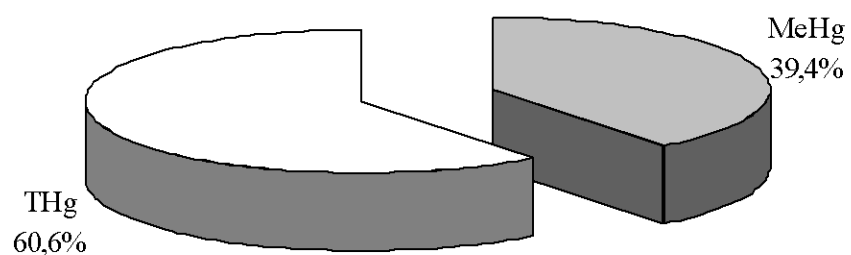
Obr. 4.20. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.2.

Vzorek 3
poměr obsahu MeHg a THg 34,5%



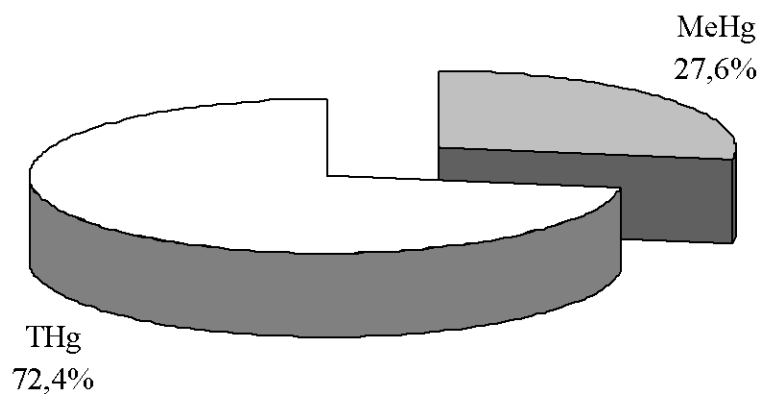
Obr. 4.21. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.3.

Vzorek 4
poměr obsahu MeHg a THg 39,4%



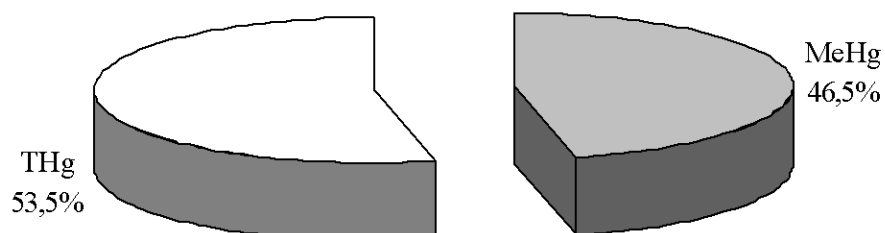
Obr. 4.22. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.4.

Vzorek 5
poměr obsahu MeHg a THg 27,6%



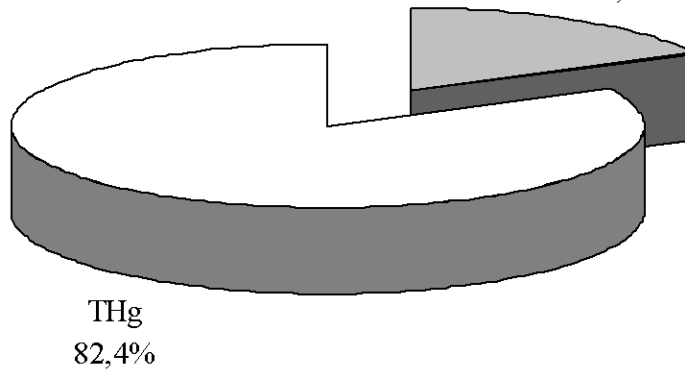
Obr. 4.23. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.5.

Vzorek 6
poměr obsahu MeHg a THg 46,5%



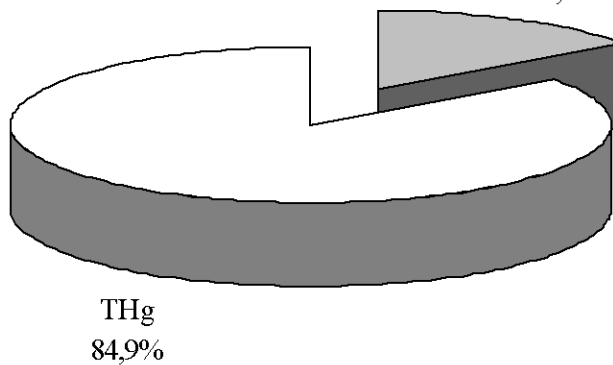
Obr. 4.24. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.6.

Vzorek 7
poměr obsahu MeHg a THg 17,6%
MeHg
17,6%



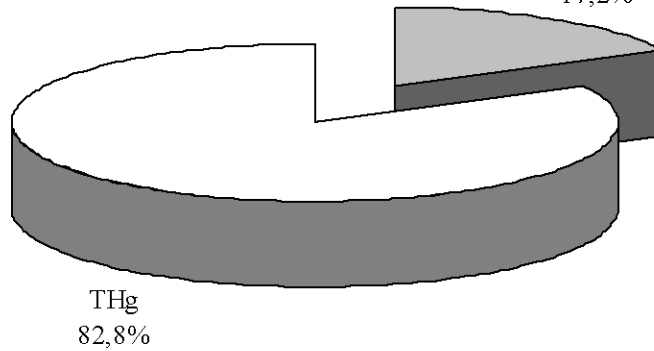
Obr. 4.25. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.7.

Vzorek 8
poměr obsahu MeHg a THg 15,1%
MeHg
15,1%



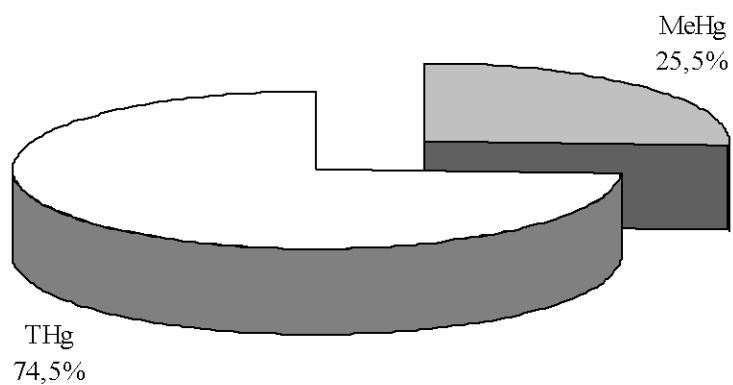
Obr. 4.26. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.8.

Vzorek 9
poměr obsahu MeHg a THg 17,2%
MeHg
17,2%



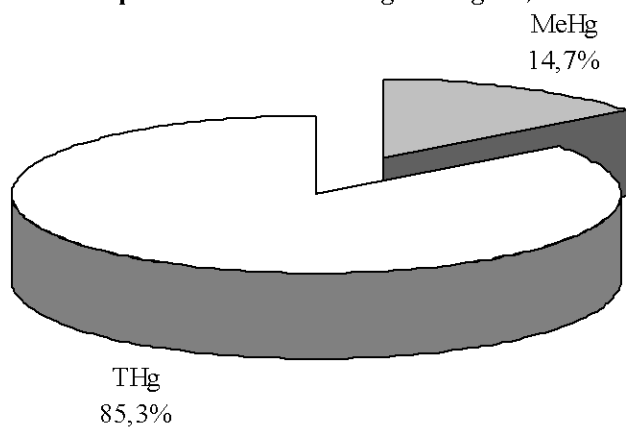
Obr. 4.27. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.9.

Vzorek 10
poměr obsahu MeHg a THg 25,5%



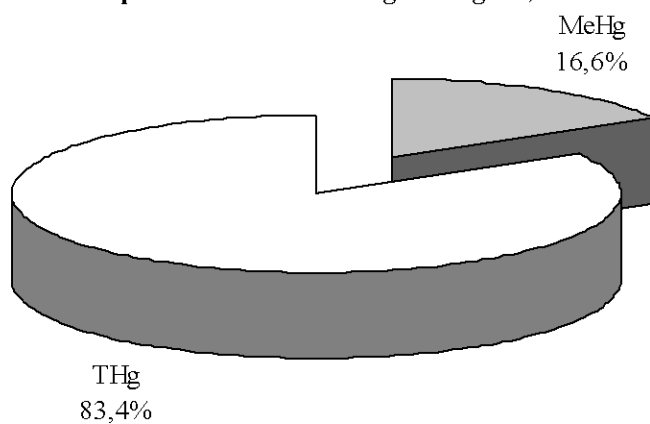
Obr. 4.28. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.10.

Vzorek 11
poměr obsahu MeHg a THg 14,7%



Obr. 4.29. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.11.

Vzorek 12
poměr obsahu MeHg a THg 16,6%



Obr. 4.30. Zastoupení MeHg ve vzorku ryby č.12.

5. ZÁVĚR

V diplomové práci byl stanoven obsah hlavního zástupce alkylderivátů rtuti – methylrtuti MeHg a také obsah celkové rtuti THg v reálných vzorcích ryb. Ty byly odloveny na Brněnské přehradě – Bažiny a zahrnovaly různé druhy ryb: lín obecný, plotice obecná, cejn velký a kapr obecný. Ke zjištění obsahu methylrtuti byl použit plynový chromatograf s mikrodetektořem elektronového záhytu GC/ μ ECD a ke stanovení celkového obsahu rtuti byl použit atomový absorpční spektrometr AMA 254. K vyhodnocení výsledků byly využity kalibrační závislosti, které byly u obou metod lineární. Mez detekce metody GC/ μ ECD byla stanovena na hodnotu 11 ng/g a mez stanovitelnosti na 36,69 ng/g.

K izolaci methylrtuti z matrice ryb byla použita metoda založená na vyluhování kyselinou chlorovodíkovou a následnou extrakcí do rozpouštědla toluenu. Pro stanovení výtěžku extrakce byl použit certifikovaný referenční materiál CRM 464 tuňáka s obsahem celkové rtuti THg = 5,24 μ g/g a methylrtuti MeHg = 5,5 μ g/g a vzorky s přidavkem standardu methylrtuti o koncentraci 10 a 20 ng/ml. Výtěžnost extrakce byla stanovena na hodnotu 64,9% \pm 2% podle CRM a na 53,4% \pm 6,8% podle vzorků se standardním přidavkem MeHg. Byla dosažena nižší výtěžnost než v publikaci, ze které byla použita metoda extrakce.

Analýza methylrtuti byla uskutečněna na GC/ μ ECD. Tento systém byl nejdříve optimalizován a poté používán k analýze. V reálných vzorcích ryb bylo nalezeno různé množství methylrtuti, to se pohybovalo v rozmezí 16,31 – 268,77 ng/g. Žádný vzorek nepřesáhl limit pro obsah methylrtuti stanovený Ministerstvem zdravotnictví ČR, který je stanoven na 0,5 mg/kg pro svalovinu ryb a 1 mg/kg pro štiku obecnou. Bylo také dokázáno, že množství methylrtuti jasně koreluje s velikostí ryb (čím větší ryba, tím vyšší množství MeHg). Toto dokazuje jev bioakumulace methylrtuti v biotických tkáních.

Množství methylrtuti bylo také srovnáno s celkovým množstvím rtuti, pohybovalo se v rozmezí 14,71% do 55,53% THg. Výsledek tedy nepotvrdil teorii, že většina rtuti obsažená v rybách je obsažena ve formě methylrtuti. Ale podle nízkého výtěžku extrakčního postupu můžeme soudit, že to bylo způsobeno právě tímto faktorem.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] DONG, Li-M., et al. On-line coupling of flow injection displacement sorption preconcentration to high-liquid chromatography for speciation analysis of mercury in seafood. *Journal of chromatography A*. 2004, no 1036, p. 119
- [2] NOVOTNÁ, J. *Speciace rtuti v sedimentech HPLC-AFS*. MASARYKOVA UNIVERZITA, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, 2006. 76 s. Vedoucí diplomové práce prof., RNDr. Josef Komárek, DrSc.
- [3] HOUSEROVÁ, P., et al. Chemické formy rtuti ve vodních ekosystémech - vlastnosti, úrovně, koloběh a stanovení. *Chem. Listy*. 2006, roč. 100, s. 862-876.
- [4] FARA, M. Problematika emisí rtuti. Rešeršní studie k zakázce Technických služeb ochrany ovzduší Praha, a.s. v rámci projektu MŽP *Omezování emisí znečišťujících látek do ovzduší*, VaV SM 9/14/04. 2004, s. 95.
- [5] PROUSEK, J. *Rizikové vlastnosti látek*. STU Bratislava, 2001. 247 s. ISBN 80-224-2001.
- [6] URBAN, P., Aktuální problémy neurotoxicity rtuti. *Neurologie pro praxi*. 2006, roč. 5, s. 251-253.
- [7] ŠIMEK, M. *Degradace půdy*. 2004. 252 s.
- [8] CIBULKA, J. a kolektiv. *Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře*. Praha : Academia, 1991. 432 s. ISBN 80-200-0401-7.
- [9] REMY, S., PRUDENT, P., PROBST, J.-L.. Mercury speciation in soils of the industrialised Thur River catchment (Alsace, France). *Applied geochemistry*. 2006, vol. 21, pp. 1855-1856.
- [10] ŠTEFANIDESOVÁ, V., et al. Vyluhovatelnost rtuti z kontaminovaných materiálů. In *Sborník vědeckých prací Vysoké školy báňské - Technické univerzity Ostrava*. [s.l.] : [s.n.], 2005. s. 89-116.
- [11] DUBOVÁ, Z. *Izolace specií rtuti ze sedimentů*. MASARYKOVA UNIVERZITA, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, 2006. 37 s. Vedoucí bakalářské práce Prof. RNDr. Josef KOMÁREK, DrSc.
- [12] LA BELLA, N., HILLIKER, A. Mercury in the environment. *The Traprock*. 2003, vol. 2, pp. 33-36.
- [13] PALENZUELA, B., et al. Monitoring inorganic mercury and methylmercury species with liquid chromatography - piezoelectric detection. *Analytica Chimica Acta*. 2004, vol. 511, pp. 289-294.
- [14] The mercury pollution cycle [online]. 2008-01-20 [cit. 2008-01-22]. Dostupný z WWW:< <http://www.wsn.org/issues/mercurypollutioncycle.html> >.
- [15] MARŠÁLEK, P. Methylrtuť se vodních ekosystémech . *Bulletin VÚRH Vodňany*. 2006, roč. 42, s. 117-121.
- [16] Ambient Air Pollution by Mercury (Hg). Position Paper prepared by the Working Group On Mercury. 2001, 235 s. ISBN 92-894-4260-3.
- [17] BULLETIN Odboru agrochemie, půdy a výživy rostlin. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský , 2005, roč. 8, č. 4, s. 1 – 67.
- [18] PITTER, P. *Hydrochemie*. 3. – přepracované vydání Praha, Vydavatelství VŠCHT. 1999. 568 s. ISBN 80-7080-340-1
- [19] FINK, L., RUMBOLD, D., RAWLIK, P. The Everglades Mercury Problem. Everglades Interim Report. Chapter 7, pp. 1-72.

- [20] *Thiomersal (thimerosal) v očkovacích látkách* [online]. 2006-08-31 [cit. 2008-01-17]. Dostupný z WWW: <<http://www.jitrnizeme.cz/view.php?navezclanku=thiomersal-thimerosal-v-ockovacich-latkach&cislocclanku=2006090101>>.
- [21] GIBIČAR, D., et al. Simultaneous determination of trace levels of ethylmercury and methylmercury in biological samples and vaccines using sodium(n.propyl)borate as derivatizing agent. *Anal Bioanal Chem.* 2007, vol. 388, pp. 329-340.
- [22] FARO, L.R.F., et al. Protection of methylmercury effects on the in vivo dopamine release by NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology.* 2002, vol. 42, pp. 612-618.
- [23] FARO, L.R.F., et. al. Effects of successive intrastriatal methylmercury administrations on dopaminergic system. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2003, vol. 55, pp. 173 – 177.
- [24] WRIGHT, D. A., WELBOURN, P. *Environmental toxicology.* Cambridge university Press. 2002. 630 s. ISBN 0-521-58151-6.
- [25] CARRO, A.M., MEJUTO, M.C. Application of chromatographic and electrophoretic methodology to the speciation of organomercury compounds in food analysis. *Journal of chromatography A.* 2000, vol. 882, pp. 283-307.
- [26] Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů. *Věstník MŽP, ročník. XVII, částka 4, duben 2007.*
- [27] HOUSEROVÁ, P., et. al. Utilize high-performance liquid chromatography - cold vapour atomic fluorescence spectrometry (HPLC/CV-AFS) for determination of mercury species in biological samples. GAČR 525/03/1367 a MSM 432100001. 2003
- [28] Canadian Tissue Residue Guidelines for protection of Consumers of Aquatic Life : Methylmercury. Report no. 1 – 4. Prepared and Published by National Guidelines and Standards Office Environmental Duality Branch Environment Canada. 2002. 202 s. ISSN 1497-2689. ISBN 0-662-29602-8.
- [29] ZALUPS, R.K., KOROPATNICK, J. *Molecular Biology and toxicology of metals.* Taylor & Francis Limited. 2000. 596 s. ISBN 0-7484-0798-7.
- [30] HOLOUBEK, I. Perzistentní, bioakumulativní a toxické látky v prostředí. *Recetox (Research centre for Environmental Chemistry and EcoToxicology).* Masarykova Univerzita v Brně. Klinická onkologie. Zvláštní číslo 2000, s. 21 – 24.
- [31] GOMÉZ – ARIZA, J.L., LORENZO, F., GARCIA – BARRERA, T. Guidelines for routine mercury speciation analysis in seafood by gas chromatography coupled to a home-modified AFS detektor. Application to the Andalusian coast (Spain). *Chemosphere.* 2005, vol. 61, pp. 1401 – 1409.
- [32] HIGHT, S.C., CHENG, J. Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS): Metod development and validation. *Analytica Chimica Acta.* 2006, vol. 567, pp. 160 – 172.
- [33] ČLENOVÉ VĚDECKÉHO VÝBORU PRO POTRAVINY. Methylrtuť v rybách a v rybích výrobcích. Státní zdravotní ústav Brno. 2004, s. 1 – 16. STAN/2004/5/deklas/Hg/rev1.
- [34] YAWEL, Wang, et al. Chemometrics methods for the investigation of methylmercury and total mercury contamination in mollusks samples collected from coastal sites along the Chinese Bohai Sea. *Environmental Pollution.* 2005, vol 135, pp. 457-467.

- [35] HOUSEROVÁ, P., et. al. Stanovení chemických forem rtuti kapalinovou chromatografií s detekcí atomovou fluorescenční spektrometrií technikou generace studených par. *Chem. listy*. 2007, roč. 101, s. 495 – 503.
- [36] YU, Li-P., YAN, Xiu-P. Factors affecting the stability of inorganic and methylmercury during sample storage. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003, vol. 22, no. 4, pp. 245-253.
- [37] ŠPIČKA, J., SVOBODA, L., JANOUŠKOVÁ, D. Stanovení CH₃Hg skupin v rybím mase metodou HPLC s UV detekcí. *Chem. listy*. 2003, roč. 97, s. 1024 – 1026.
- [38] LU-YANG, et. al. Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2003, vol. 1011, pp. 135 – 142.
- [39] HOUSEROVÁ, P., MATĚJČEK, D., KUBÁŇ, V. High-performance liquid chromatographic/ion-trap mass spectrometric speciation of aquatic mercury as its pyrrolidinedithiocarbamate complexes. *Analytica Chimica Acta*. 2007, vol. 596, pp. 242 – 250.
- [40] MUÑOZ, J., GALLEGO, M., VALCÁRCEL, M. Solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry using a fullerene sorbent for the determination of inorganic mercury (II), methylmercury (I) and ethylmercury (I) in surface waters at sub-ng/ml levels. *Journal of chromatography A*. 2004, vol. 1055, pp. 185 – 190.
- [41] MISHRA, S., et. al. Determination of methylmercury and mercury (II) in a marine ecosystem using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2005, vol. 551, pp. 192 – 198.
- [42] MALIK, A.K., KAUR, V., VERMA, N. A review of solid phase microextraction – High performance liquid chromatography as a novel tool for the analysis of toxic metals ions. *Talanta*. 2006, vol. 68, pp. 842 – 849.
- [43] POPL, Milan, FÄHNRIK, Jan. *Analytická chemie životního prostředí*. 4. přeprac. vyd. Praha VŠCHT. 1999. 218 s. ISBN 80-7080-336-3.
- [44] MORITA, M., YOSHINAGA, J., EDMONDS, J.S. The determination of mercury species in environmental and biological samples (Technical Report). *Pure & Appl. Chem* IUPAC. 1998, vol. 70, no. 8, pp. 1585 – 1615.
- [45] CASTILLO, A., ROIG-NAVARRO, A.F., POZO, O.J. Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*. 2006, vol. 577, pp. 18 – 25.
- [46] RIO-SEGADE, S., BENDICHO, C. On-line high-performance liquid-chromatographic separation and cold vapour atomic absorption spectrometric determination of methylmercury and inorganic mercury. *Talanta*. 1999, vol. 48, pp. 447 – 484.
- [47] RAMALHOSA, E., et al. Simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high-performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2001, vol. 448, pp. 135-143.
- [48] ŠTULÍK, K., et al. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum. 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [49] VOLKA, K., kol. *Analytická chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 1995, 236 s. ISBN 80-7080-227-8.

- [50] QUARNSTRÖRM, J. *On the reliability of methods for speciation of mercury based on chromatographic separation coupled to atomic spectrometric detection*. Department of chemistry, Analytical chemistry, Umeå University, Sweden. 2003. 41 ps. ISBN 91-7305-429-1.
- [51] CARRICCHIA, A.M., et al. GC – ECD Determination of Methylmercury in Sediment Samples Using a SPB-608 Capillary Column after Alkaline Digestion. *Microchemical journal*. 1997, vol. 55, pp. 44 – 55.
- [52] JAPAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Preventive Measures against Environmental Mercury Pollution and Its Health Effects. Chapter 1 Introduction. Japan 2004.
- [53] KOMÁREK J. *Atomová absorpční spektrometrie*. Masarykova univerzita v Brně, 2000. 85 s. ISBN 80-210-2500-X
- [54] *AMA 254 Advanced Mercury Analyser Návod na obsluhu Verze pro Windows*. Praha: Altec s. r. o. 2000. 125 s.
- [55] MARŠÁLEK P., SVOBODOVÁ Z. Rapid determination of methylmercury in Fish Tissues. *Czech J. Food Sci.* 2006, vol. 24, pp 138 – 142.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

UV/VIS	ultrafialová – viditelná oblast spektra (ultraviolet – visible)
HgS	rumělka, cinabarit
HgSe	tiemannit
HgTe	coloradoit
Hg ₂ Cl ₂	kalomel
Hg ₂ I ₂	coccinit
Hg ₂ ²⁺	rtuťné ionty (anorganická rtuť)
Hg ²⁺	rtuťnaté ionty (anorganická rtuť)
DOC	rozpuštěný organický uhlík (dissolved organic carbon)
DOM	rozpuštěná organická hmota (dissolved organic matter)
LOG	logaritmus
K	konstanta stability
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
Hg ⁰	elementární (atomární) rtuť
CNS	centrální nervová soustava
CH ₃ Hg ⁺	kation monomethylrtuti
K _{ow}	rozdělovací koeficient oktanol – voda
DDT	dichlordifenyltrichlorethan
CAS No.	číslo podle databáze chemických sloučenin (Chemical Abstracts Services numbers)
K _{oc}	rozdělovací koeficient organický uhlík – voda
K _{sed}	rozdělovací koeficient sediment – voda
K _{susp.č.}	rozdělovací koeficient suspendované částice – voda
CH ₃ B ₁₂	methylokobalamin
MZ ČR	Ministerstvo zdravotnictví České republiky
LoQ	mez stanovitelnosti (limit of quantitation)
PTWI	přechodný tolerovatelný týdenní příjem (provisional tolerable weekly intake)
JECFA	Společný výbor expertů pro potravinářská aditiva (Joint Expert Committee on Food Additives)
FAO	Potravinářská a Zemědělská Organizace Spojených Národů (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
WHO	Světová Zdravotní Organizace (World Health Organization)
GC	plynová chromatografie (gass chromatography)
HPLC	kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
CV AAS	atomová absorpční spektrometrie s metodou generování studených par rtuti (Cold Vapour Atomic Absorption Spektrometry)
CV AFS	atomová fluorescenční spektrometrie s metodou generování studených par rtuti (Cold Vapour Atomic Fluorescence Spektrometry)
ECD	detektor elektronového záchytu (elektron capture detector)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry)
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (inductively coupled plasma mass spektrometry)
ICP-OES	optická emisní spektrometrie indukčně vázanou plazmou (inductively coupled plasma optical emission spektrometry)

ICP-AES	atomová emisní spektrometrie indukčně vázanou plazmou (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)
MIP-AES	atomová emisní spektrometrie s mikrovlnně vázanou plazmou (microwave induced plasma atomic emission spectrometry)
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
UV	ultrafialový (ultraviolet)
MWE	mikrovlnná extrakce (microwave extraction)
ASE	zrychlená extrakce rozpouštědlem (accelerated solvent extraction)
PSE	extrakce rozpouštědlem za vysokých tlaků (pressurized solvent extraction)
SPE	extrakce tuhou fází (solid phase extraction)
SPME	mikroextrakce tuhou fází (solid phase microextraction)
SPME–HPLC	spojení kapalinové chromatografie s mikroextrakcí tuhou fází
DDTC	diethyldithiokarbamát
PDC	pyrrolidyndithiokarbamát
APDC	amonná sůl pyrrolidindithiokarbamátu
CH ₃ HgCl	chlorid methylrtuti
TBA	tetrabutylamonium
DL	detekční limit
DIN	přímo vstříkující rozprašovač (direct injection nebulizer)
USN	ultrazvukový rozprašovač (ultrasonic nebulizer)
PN	pneumatický (plněný vzduchem) rozprašovač (pneumatic nebulizer)
HPLC-AFS	spojení kapalinové chromatografie s atomovou fluorescenční spektrometrií
MeHg ⁺	kation methylrtuti
THg	celková rtuť
EtHg ⁺	kation ethylrtuti
PhHg ⁺	kation fenylrtuti
SnCl ₂	chlorid cínatý
NaBH ₄	tetrahydroboritan sodný
HCl	kyselina chlorovodíková
NaCl	chlorid sodný
MgO	oxid hořečnatý
CRM	certifikovaný referenční materiál