



Středoškolská technika 2014

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

HODNOCENÍ REZIDUÍ CIZORODÝCH LÁTEK POMOCÍ GC/MS

Michaela Berková, Barbora Šmírová

**Střední průmyslová škola chemická,
Brno, Vranovská 65**

Anotace

Tato práce se zabývá zjišťováním obsahu perzistentních organických polutantů (PCB, HCH, HCB a DDT) v rybách odlovených z nádrže Nové Mlýny na řece Dyji. Vlastní stanovení indikátorových kongenerů PCB a organochlorových pesticidů a jejich metabolitů ve svalovině kapra obecného, cejna velkého a candáta obecného bylo provedeno metodou plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC/MS). Zjištěný obsah kongenerů PCB a OC pesticidů byl porovnán s nálezy publikovanými v předchozích studiích.

Klíčová slova: POPs, organochlorové pesticidy, polychlorované bifenyly, GC/MS, kapr, cejn, candát.

1 ÚVOD

Již po dlouhá tisíciletí člověk využívá ryby pro svoji potravu. Konzumace ryb a ostatních mořských plodů se výrazně regionálně liší. Vysokou spotřebu ryb vykazují všechny přímořské země. Česká republika se se svojí průměrnou spotřebou 5,5 kg ryb na člověka a rok řadí mezi státy s nízkou spotřebou, může za to také vysušování rybníků znečišťováním životního prostředí, to má za následek, že počet odlovených ryb výrazně klesl.

Čeho si na rybách určitě ceníme, jsou jejich bílkoviny. Ryby obsahují obvykle 15-20 g bílkovin, ve 100 g celkové hmoty. Mezi množstvím bílkovin a tuků panuje jako u ostatních druhů masa nepřímá úměra. Čím tučnější ryba je, tím méně bílkovin obsahuje. Bílkoviny ryb obsahují všechny esenciální aminokyseliny, a proto rybí maso známe jako zdroj plnohodnotných bílkovin nezbytných pro růst a vývoj organismu a obnovu tkání.

Jak jistě víme, rybí maso je lehce stravitelné. Je to díky nízkému obsahu vaziva a pojivových tkání. Lidský organismus dokáže rybí maso trávit mnohem snadněji a rychleji než maso drůbeže a savců.

Ryby jsou zdrojem purinů – látek nezbytných pro syntézu nukleových kyselin.

Obsah sacharidů je u většiny druhů ryb zanedbatelný. Zajímavou složkou je ale jejich tuk. Ten se od ostatních živočišných tuků výrazně liší. Tuk uměle chovaných hospodářských zvířat je charakterizován vysokým obsahem nasycených mastných kyselin. Vyšší příjem nasycených mastných kyselin u člověka je spojován s rizikem rozvoje srdečně cévních onemocnění. Naopak tuky rostlinného původu jsou tvořeny především nenasycenými mastnými kyselinami, které riziko oběhových chorob snižují.

Dle množství tuku kolísá v rybách zastoupení vody. Ryby s nižším podílem tukové tkáně jsou na vodu bohatší – jejich celková hmotnost je tvořena vodou až z 80 % a naopak tučnější druhy mívají vody jen kolem 60 %.

Ryby jsou výborným zdrojem vitamínů rozpustných v tucích, mezi které patří vitamín A, vitamín D, vitamín E a vitamín K.

V rybách se nachází celá řada minerálních látek a stopových prvků. Hlavními minerálními látkami jsou draslík, sodík, síra, fosfor, hořčík a vápník.

Kontaminace ryb může pocházet z vodního ekosystému, ve kterém ryby žijí. Jedním z možných kontaminantů jsou polychlorované bifenyly (PCB). Dříve byly prakticky využívány v oblastech lidských činností. Zastavení výroby PCB nastalo v roce 1989, přesto jsou ve formě reziduí přítomny prakticky ve všech složkách životního prostředí. Jejich

přetrvávání v prostředí je dáno vysokou stabilitou těchto látek, schopností bioakumulace a biokoncentrace. Možná cesta negativního působení na člověka je prostřednictvím potravinového řetězce a dále sekundární kontaminace prostřednictvím atmosférického přenosu vzdušnou cestou. Díky své perzistenci se v životním prostředí stále udržují také organochlorové pesticidy (OCP), přestože jsou již zakázány. Organochlorové sloučeniny se vyznačují vysokou lipofilitou a s tím souvisejícím značeným potenciálem kumulovat se v tukové složce živých organismů.

Tato práce se zabývá průkazem kontaminace tržních druhů ryb PCBs a OCPs pocházejícími ze znečištěného vodního ekosystému a srovnávání s již publikovanými studiiemi.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Perzistentní organické polutanty (POPs)

Perzistentní organické polutanty jsou látky, které vykazují toxické vlastnosti. Již v malých dávkách způsobují hormonální poruchy a ohrožují reprodukci živočichů včetně člověka. Mají na svědomí poškození imunitního systému a některé z nich způsobují rakovinu. Díky své chemické stabilitě setrvávají dlouho v prostředí, a proto u nich dochází k dálkovému přenosu v ovzduší přesahujícímu hranice států a k depozicím. Nerozpouštějí se ve vodě, ale v tucích, na které se vážou – jsou bioakumulativní. ^{[3][11]}

Některé POPs na Zemi vznikaly již dříve, ale za jejich nebezpečně vysoké koncentrace může člověk. Používáme je jako průmyslové látky, jako pesticidy nebo nepozorovaně vznikají v průmyslu (v chemických a spalovacích procesech). Řadí se sem dioxiny, PCB, DDT, a jiné. ^[11]

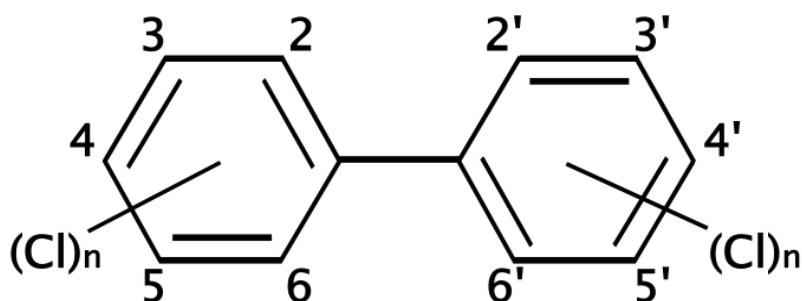
Chování POPs v prostředí a tím i jejich nebezpečnost lze charakterizovat zejména pěti environmentálně chemickými parametry:

1. Rozpustnost ve vodě. Čím je její hodnota nižší, tím je látka hydrofobnější a lipofilnější, a tím má větší tendenci kumulovat se v půdním prostředí a v živých organismech.
2. Těkání vyjádřené hodnotou Henryho konstanty (H). Čím je hodnota H vyšší, tím je látka těkavější, má vyšší tendenci přejít z půdního prostředí do atmosféry.
3. Rozdělovací koeficient n-oktanol-voda K_{ow} představující míru tendence látky kumulovat se v živých organismech. Hodnota $\log K_{ow}$ v rozmezí 3-6 představuje látky s vysokou tendencí k bioakumulaci.
4. Sorpce na organický uhlík (půdní organickou hmotu) vyjádřená pomocí rozdělovacího koeficientu organický uhlík (v tuhé fázi) – voda K_{oc} . Hodnoty $\log K_{oc}$ vyšší než 3 charakterizují látky silně se sorbující v půdním prostředí, dlouhodobě v něm přítomné, ovšem také méně biodostupné.
5. Environmentální persistence vyjádřená pomocí poločasu života ($t_{1/2}$). V případě půdního prostředí se používá například označení $t_{1/2}$ (S) (poločas života polutantu v půdním prostředí). ^[17]

2.2 Polychlorované bifenyly (PCBs)

Jednoduchost, ekonomická nenáročnost výroby, nízká akutní toxicita a vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti vedly k používání technických směsí polychlorovaných bifenyly prakticky ve všech oblastech lidské činnosti. Tyto sloučeniny našly použití např. jako dielektrická a teplotněstabilní média v průmyslových zařízeních, jako plastifikátory při výrobě barev a laků, jako hydraulické kapaliny, lubrikanty, přísady do pesticidních přípravků, složky brusných olejů či ohnivzdorných přípravků. ^{[17][13]}

V posledním desetiletí však PCB představují z pohledu problematiky kontaminace životního prostředí i v kontextu kontaminace potravin exogenními organickými kontaminanty jednu z celosvětově nejvíce diskutovaných skupin škodlivin. ^[17]



Obrázek 1. Strukturální vzorec PCB^[9]

2.2.1 Vlastnosti

Jednotlivé kongenery PCB se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi i osudem v živých organismech ve smyslu přeměn, kterým podléhají a pochopitelně i svými biologickými účinky. Uvést zde vlastnosti všech 209 kongenerů není možné. ^[17]

PCB jsou bezbarvé (průzračné) nebo žlutě zbarvené netěkavé kapaliny s různou viskozitou. Se vzrůstajícím počtem atomů chloru v molekule se zvyšuje viskozita, hustota a teplota varu. Výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti, které vedly k rozsáhlému používání PCB lze shrnout do následujících výčtu: ^{[13][17][1]}

- Termostabilita,
- fotostabilita (odolnost vůči slunečnímu záření),
- nevznětlivost a nehořlavost,
- chemická inertnost,
- nekorozivnost,
- nízká těkavost,
- vysoká permitivita (dielektrikum),

- výborné teplotnosné vlastnosti,
- výborná mísitelnost s organickými rozpouštědly,
- široký interval bodů tání (volitelná konzistence) a
- relativně vysoké body varu.^[17]

2.2.2 Kontaminace ŽP

Přibližně od začátku sedmdesátých let, v některých zemích až do konce let osmdesátých, bylo díky nízké akutní toxicitě na PCB pohlíženo jako na biologicky inaktivní látky a proto manipulaci s nimi nebyla věnována patřičná pozornost.^[19]

Odhaduje se, že do vnějšího prostředí proniklo asi 400 miliónu kilogramů technických směsí PCB, a to představuje zhruba 31 % celosvětově vyrobeného množství.^[4]

Vody oceánů obsahují pravděpodobně nejvýznamnější podíl celkového množství PCB přítomných ve vnějším prostředí. Ve vodním prostředí jsou PCB vázány především na sedimenty. S ohledem na nižší rozpustnost a vyšší afinitu k organické složce se zde kumulují především výše-chlorované PCB (>Cl₅). PCB lze ovšem nalézt prakticky ve všech složkách vodního ekosystému, tj. ve vodě, planktonu, členovcích a měkkýších, rybách, mořských savcích a ptácích.^[17]

Díky stabilitě PCB a jejich lipofilitě dochází k největšímu hromadění PCB v tukových složkách ryb. V potravním řetězci akumulace pokračuje směrem k vyšším patřům potravního řetězce; tento proces se nazývá biomagnifikace a dochází při ní k příjmu kontaminované potravy a následnému trávení. Souhrnný proces příjmu a hromadění kontaminantů se nazývá bioakumulace. Většina kongenerů PCB, které jsou u ryb detekovány, jsou penta a hexachlorbifenyly.^[10]

2.2.3 Toxicita

Toxikologické hodnocení PCB představuje mimořádně složitý problém, neboť uvažovaný organismus je vždy exponován směsí kongenerů lišících se fyzikálně-chemickými i biologickými vlastnostmi.^[17]

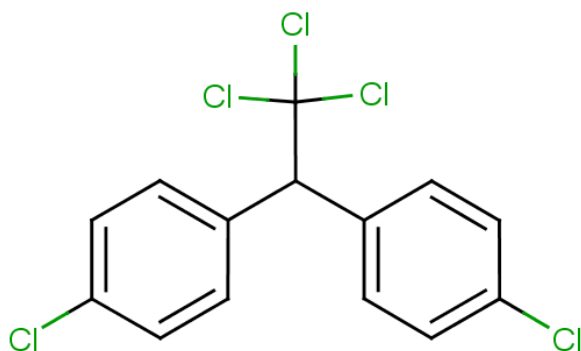
Prováděné toxikologické studie opakovaně potvrdily nízkou akutní toxicitu technických směsí PCB. Symptomy intoxikace zahrnují celou škálu různých patologických projevů. Obavy z toho, zda PCB představují karcinogenní riziko pro člověka a živočichy, se dosud nepodařilo objektivně potvrdit. Důkazy o tom, že PCB zvyšují genotoxicitu či mutagenitu řady dalších xenobiotik jsou v přímém kontrastu se studiemi, ve kterých byl jednoznačně prokázán inhibiční účinek na celou řadu genotoxických karcinogenů. Na PCB

tedy nelze univerzálně pohlížet jako na promotory jaterních tumorů, protože velmi silně potlačují biologické účinky jiných dietárních karcinogenů.^[17]

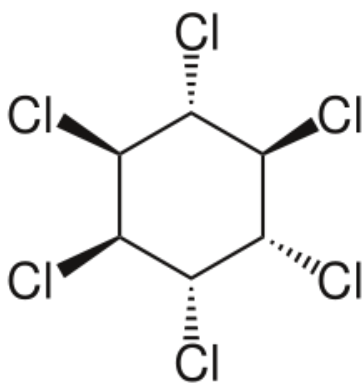
2.3 Organochlorové pesticidy (OCPs)

Organochlorové pesticidy jsou skupinou sloučenin, které jsou v prostředí charakterizovány neobyčejně dlouhými poločasy života. Ty se pohybují v řádu několika let až desetiletí. Do této třídy látek patří DDT, HCH a další. V období mezi 60. a 80. lety byly OCPs široce používány v zemědělství, i v domácnostech (trávníky, zahrady). Přestože jsou již po desetiletí zakázány, v prostředí se díky své persistenci udržují stále.^[16]

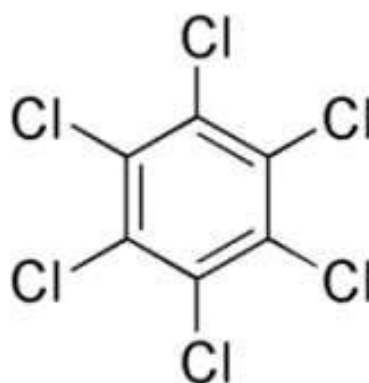
Organochlorové sloučeniny se vyznačují vysokou lipofilitou a s tím souvisejícím značným potenciálem kumulovat se v tukové složce živých organismů. Tyto vlastnosti jsou spolu s vysokou chemickou stabilitou a omezenou biodegradabilitou příčinou toho, že rezidua těchto látek, přes zákaz jejich používání v mnoha zemích světa, se stále v životním prostředí běžně vyskytují. Vedle mateřských sloučenin se vyskytují i některé jejich perzistentní metabolity.^[17]



Obrázek 2. Strukturální vzorec DDT^[9]



Obrázek 3. Strukturální vzorec HCH^[9]



Obrázek 4. Strukturální vzorec HCB^[9]

2.3.1 Vlastnosti

Pesticidy, které v praxi našly uplatnění, reprezentují mimořádně početné a pestré spektrum chemických sloučenin. To se samozřejmě promítá i v široké variabilitě jejich fyzikálně-chemických vlastností. ^[17]

- lipofilní
 - kumulují se v tuku živých organismů, odkud jsou velmi pomalu uvolňovány,
- vysoce perzistentní,
 - omezená biodegradabilita a dlouhodobě přetrvávají v životním prostředí,
 - vstupují do potravních řetězců,
 - rezidua těchto látek i jejich metabolity se v mnoha zemích v životním prostředí běžně vyskytují,
- narušují endokrinní vývoj obratlovců. ^{[16][17]}

2.3.2 Kontaminace ŽP

Pesticidy se mohou do vody dostávat především vymýváním z půdy a z ovzduší. Stejně jako v půdě, i zde probíhá, i když v menší míře a pomaleji, enantioselektivní mikrobiální degradace. Spíše než toto odbourávání, mají však na pesticidy vliv chemické reakce, jako je fotolýza nebo hydrolýza. Ty ale ovlivňují oba enantiomery stejně. Pesticidy hydrofobního charakteru se ve vodném prostředí spíše než rozptýlené vyskytují naadsorbované na sedimenty a organické částice. Ovšem i tato adsorpce je ovlivněna řadou faktorů. Závisí např. na teplotě, na obsahu kyslíku a dalších. ^{[16][17]}

Všechny chirální organochlorové pesticidy jsou přítomny v atmosféře především díky vytěkávání z půdy. Mohou být transportovány atmosférou do oblastí, které jsou vzdálené od jejich původních zdrojů. ^[16]

2.3.3 Toxicita

Pesticidy mohou být samozřejmě toxické i pro necílové organismy včetně člověka, a to zejména tehdy, když podstata jejich účinku spočívá v interferenci s obdobnými pochody, které probíhají v lidském organismu. Z hlediska možnosti intoxikace pesticidy jsou nejvíce diskutována rizika související s dlouhodobou expozicí jejich reziduí dietou. Obecně se výše těchto rizik, stejně jako u jiných skupin rizikových složek potravy, odvíjí nejenom od velikosti přijaté dávky, ale i od mechanismu absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece pesticidů z organismu. ^[17]

2.4 Stanovení perzistentních organických polutantů

2.4.1 SPE extrakce

Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction, SPE) je jednostupňová metoda rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je tuhá. Do tuhé fáze přechází analyt z plynné či kapalné fáze. ^{[14][6]}

Metoda SPE se používá k odběru a úpravě vzorku nejčastěji ve spojení se separačními metodami. Lze vzorkovat velké objemy materiálů selektivně pro určitý analyt, který je dále zakoncentrován. Analytický vzorek odebraný metodou SPE má proto jiné složení analytů z hlediska jejich kvality a kvantity než vzorkovaný celek. Proto při použití SPE v analytickém postupu je velmi kritickou fází kalibrace. ^{[16][18]}

Nejprve je třeba zvolit vlastnosti tuhé fáze, tj. její selektivitu a obohacovací faktor pro daný vzorkovaný celek. Ve druhém stupni postupu se analyt uvolní z tuhé fáze zvýšením teploty či extrakcí kapalnou nebo plynnou fází. Pak se desorbovaný analyt opět zakoncentruje. Děj desorpce a zakoncentrování se může opakovat podle potřeb vyplývajících z použité následné analytické metody.

Metoda SPE našla intenzivní použití v environmentální analýze stopových nečistot v ovzduší, vodě i půdě. Metoda se rovněž používá ve farmacii, klinické chemii, toxikologii i potravinářství. Technika SPE má řadu výhod, mezi něž patří rychlost, selektivita, citlivost, dobrá opakovatelnost, možnost automatizace, snadné spojení s řadou analytických metod a finanční dostupnost. ^{[14][6]}

2.4.2 Chromatografie

HISTORIE

Za zakladatele chromatografie je považován ruský botanik Michail Semjonovic Cvet. V roce 1901 uskutečnil pokus zaměřený na separaci listových pigmentů (karotenoidu a chlorofylu), které byly rozpouštědlem vyextrahovány z rostlin. Jako stacionární fázi použil mletý uhličitán vápenatý, kterým naplnil skleněnou kolonu. Do připravené kolony nalil připravený extrakt a zalil čistým rozpouštědlem. Po určitém čase, jak jednotlivé složky postupovaly, byla vidět jednotlivá barviva. Dalším promýváním byly postupně vyluhovány všechny složky obsažené ve směsi. Cvet vytvořil analytickou separaci složek založenou na chemické přilnavosti k částicám (stacionární fázi). Složky, které byly přitahovány k těmto částicám se zpomalily, zatímco další složky, které byly přitahovány k solventní (mobilní) fázi se pohybovaly rychleji. Cvet tento pokus nazval Chromatografie (z řeckých slov „chroma“, což znamená barva „graphy“, což znamená psaní).^[12]

PRINCIP

Chromatografie je separační metoda, tedy metoda, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Chromatografický proces může nabývat tolika forem a může mít tolik modifikací, že je obtížné navrhnout vhodné rozřídění, které by všechny tyto formy vystihovalo. ^{[18][6]}

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované. ^{[18][6]}

Tabulka 1. Přehled nejdůležitějších chromatografických technik^[6]

| Fáze mobilní | Fáze stacionární | Chromatografická technika | Užívaný symbol |
|---|-------------------------------------|--|----------------|
| Plyn (plynová chromatografie) | Kapalina na nosiči | Plynová rozdělovací chromatografie | GLC |
| | Tuhá látka | Plynová adsorpční chromatografie | GSC |
| Kapalina (kapalinová chromatografie) | Kapalina (polymer) vázaná na nosiči | Kapalinová rozdělovací chromatografie | LLC |
| | Kapalina v pórech sorbentu | Gelová permeační chromatografie | GPC |
| | Tuhá látka | Kapalinová adsorpční chromatografie | LSC |
| | | Iontově výměnná chromatografie | IEC |
| Tekutina v nadkritickém stavu | Kapalina (polymer) vázaná na nosiči | Chromatografie s mobilní fází v nadkritickém stavu | SFC |

Rozdělení chromatografických metod

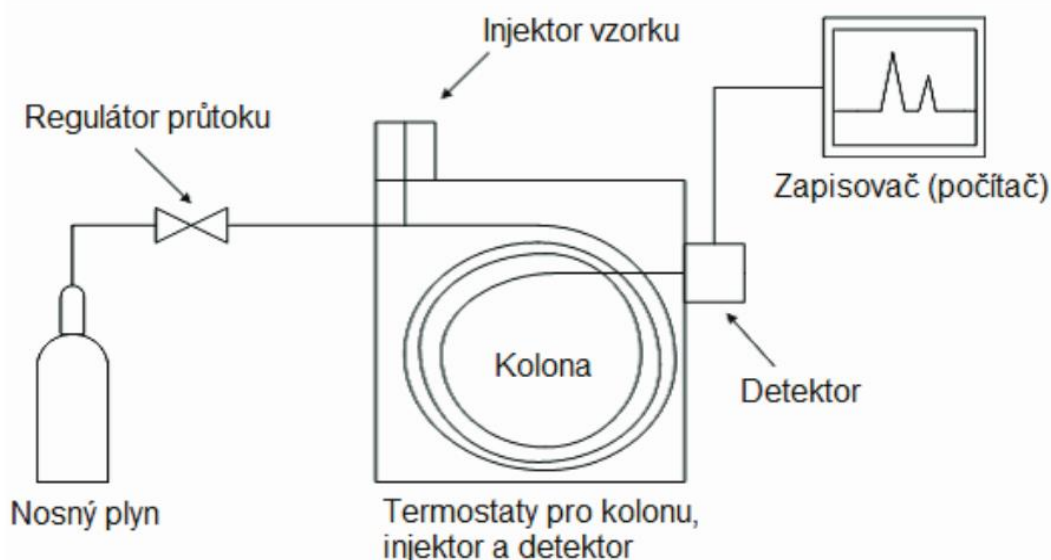
Chromatografických metod je velké množství. Proto je účelné jejich rozdělení do určitých skupin. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek:

- **Podle povahy mobilní fáze:**
 - Kapalinová chromatografie – mobilní fáze je kapalina.
 - Plynová chromatografie – mobilní fáze je plyn.
- **Podle uspořádání stacionární fáze:**
 - Kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně).
 - Plošné techniky.
 - *Papírová chromatografie* – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru.
 - *Tenkovrstvá chromatografie* – stacionární fáze je umístěna na skleněné desce, hliníkové fólii nebo plochem podkladu z jiného materiálu.
- **Podle povahy děje, který převládá při separaci:**
 - Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá.
 - *Rozdělovací chromatografie* – o separaci rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fázi (kapalina nebo plyn).
 - *Adsorpční chromatografie* – o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka).
 - *Iontově-výměnná chromatografie* – o separaci rozhodují různé velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku.
 - *Gelová chromatografie* – složky se separují podle velikosti na pórovitě stacionární fázi – gelu: menší molekuly vzorku se pórem gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt).

- *Afinitní chromatografie* – stacionární fáze je schopná vázat ve vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah – afinitu.^[6]

PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

Plynová chromatografie nese své označení podle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. Využívá rozdělení koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fází na základě absorpce a rozpouštění, přičemž se předpokládá, že toho rozdělení je rovnovážné. Jako zdroje pohybu mobilní fáze využívá tlakový spád a stacionární fáze je uspořádána v koloně. Analytická metoda plynové chromatografie využívá výše popsaný chromatografický děj ke kvalitativnímu a kvantitativnímu určení analytu, přičemž děj je sledován měřícím zařízením, jehož signál je funkcí množství analytu a citlivosti. Analytické určení analytu se řídí pravidly stanovení nejistoty měření a tato pravidla zpětně určují stav, použití a vývoj metody plynové chromatografie.^{[14][6]}



Obrázek 5. Zjednodušené schéma plynového chromatografu^[9]

- Nosný plyn – je tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon. Druh plynu je určen jeho úkolem unášet vzorek kolonou a potřebou inertního chování vůči jeho složkám. Proto nemá přímý vliv na separaci. Při volbě plynu také hraje roli potřeba netoxicity, bezpečnosti práce a nižší ceny.
- Regulátor průtoku – zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu. Elektronickou regulací lze docílit stanoveného průtoku i při změnách teploty během separace.

- Injektor vzorku – slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Technika dávkování musí zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase.
- Kolona – část chromatografu, ve které je umístěna stacionární fáze. V koloně nastává separace složek.
- Termostat – zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru, aby byl vzorek udržen v plynném stavu. Dávkovač a detektor mají zpravidla vlastní řízené zahřívání.
- Detektor – slouží k detekci látek v nosném plynu.
- Zapisovač – zpracovává signál z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku a provádí její vyhodnocení. ^[6]

2.4.3 Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometrie je velmi účinná identifikační technika, která je široce používána k řešení analytických problémů v organické chemii, biochemii i při analýze anorganických materiálů a povrchů tuhých látek. Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (dále jen GC-MS) přispělo podstatnou měrou k rozvoji hmotnostní spektrometrie a vytvořilo zatím nejefektivnější známou techniku pro analýzu složitých směsí organických látek. Technika GC-MS umožňuje i analýzu organokovových a anorganických směsí s tím omezením, že musí jít o látky, které jako páry projdou chromatografickou kolonou. Hmotnostní spektrometr nemusí být bezpodmínečně spojen s plynovým chromatografem. Některé spektrometry jsou opatřeny přímým vstupem, který je používán pro analýzu málo těkavých vzorků. Hmotnostní spektrometr může být také zařazen za kolonu kapalinového chromatografu. Spojení je převážně omezeno na rozdělovací kapalinovou chromatografii s obrácenými fázemi a zatím se příliš nerozšířilo. Jednodušší a tím i výhodnější se zdá spojení chromatografie s tekutinou v nadkritickém stavu a hmotnostní spektrometrie. I tato technika je vhodná k separaci a identifikaci málo těkavých látek. ^{[14][18]}

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a zařízení

Chemikálie a roztoky

n-Hexan (Chromservis) čistota 95 %

Diethylether (Lachner) čistota 99 %

Cyklohexan (Lachner) čistota p.a.

Síran sodný (Penta) čistota p.a.

Standard PCB mix 3 (Dr. Ehrenstorfer) c = 10 ng/ml

Standard pesticid Mix 11 (Dr. Ehrenstorfer) c = 10 ng/ml

Standard pesticid Mix 164 (Dr. Ehrenstorfer) c = 10 ng/ml

Přístroje a zařízení

Nožový mlýn Retsch - Grindomix GM200

Rotační vakuová odparka Buchi V-800 Vacuum Controller

[Digitální přímočará třepačka typ KS 501](#) digital

Varian 450-GC Ga Chromatograph with 220-MS Mass Spectrometer

Laboratorní váha KERN 440-43N

Analytické váhy and gr-200

Mikropipety

3.2 Odběr a zpracování vzorků

Vodní nádrž Nové Mlýny leží na jižní Moravě a tvoří kaskádu tří přehradních vodních nádrží pod Pálavou o rozloze 32,3 km² (Horní Mušovská, Střední Věstonická, Dolní Novomlýnská) na řece Dyje a do prostřední nádrže se společným ústím vlévají řeky Svratka a Jihlava. Díky své poloze jsou často sledovány z důvodu kontaminace vodního prostředí.

V rámci studie bylo analyzováno 10 vzorků svaloviny kapra obecného, 11 vzorků cejna velkého a 8 vzorků candáta obecného odebraných na podzim roku 2013.

3.2.1 Stanovení PCB a OCPs metodou plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Vlastní stanovení indikátorových kongenerů PCB a organochlorových pesticidů a jejich metabolitů ve svalovině bylo provedeno metodou plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC/MS).

Reprezentativní část svaloviny (± 50 g) byla v prvním kroku homogenizována a extrahována do diethyletheru, extrakt byl odvodněn bezvodým síranem sodným a následně odpařován do sucha na vakuové rotační odparce při teplotě 40 °C a co nejnižším tlaku (200 mbar). Získaný tukový podíl byl zvážen a použit k přečištění. Množství ($\pm 0,2$ g) bylo rozpouštěno v n-hexanu (2 x 4 ml) a extrahováno pomocí SPE florisilových kolonek 6 % diethyletherem v n-hexanu, odpařeno a zakoncentrováno do 3 ml cyklohexanu. Takto zakoncentrovaný roztok byl použit k separaci a identifikaci za použití plynového chromatografu Varian 450-GC spolu s hmotnostním spektrometrem Varian 220-MS a kolonou VF-5ms (30 m x 0,25mm) (Varian, Inc., USA).

Tabulka 2. Chromatografické podmínky

| | |
|------------------|--|
| Zařízení | Varian 450-GC s Varian 220-MS |
| Injektor | Splitless, teplota 250 °C |
| Nástřik | 1 μ l |
| Kolona | VF-5ms (60m x 0,25mm) |
| Nosný plyn | Helium, průtok 1 ml.min ⁻¹ |
| Teplotní program | 50 °C po dobu 1 min, zvýšení teploty rychlostí 10 °C.min ⁻¹ na 130 °C, zvýšení teploty rychlostí 40 °C.min ⁻¹ na 230 °C po dobu 3 minut, zvýšení teploty rychlostí 60 °C.min ⁻¹ na 280 °C po dobu 4 minut, zvýšení teploty rychlostí 60 °C.min ⁻¹ na 310 °C po dobu 1 minuty. Celkový čas analýzy 20,83 [min]. |

Tabulka 3. Charakteristika ryb

| Ryba | n | Věk Průměr \pm SD | Obsah tuku (%) Průměr \pm SD | Váha (g) Průměr \pm SD |
|--------|----|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Kapr | 10 | 6,6 \pm 0,8 | 1,0 \pm 0,9 | 2552,1 \pm 316,2 |
| Cejn | 11 | 6,2 \pm 1,7 | 6,6 \pm 4,6 | 1866,3 \pm 485,4 |
| Candát | 8 | 6,4 \pm 1,7 | 1,0 \pm 0,3 | 3392,9 \pm 1547,6 |

3.3 Mez detekce pro ECD

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. ^[18]

Tabulka 4. Detekční limity všech stanovených polutantů [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]

| Látka | DL | Látka | DL | Látka | DL |
|---------|------|------------------|------|---------------|------|
| PCB 28 | 0,06 | <i>p,p'</i> -DDT | 0,20 | α -HCH | 0,10 |
| PCB 52 | 0,03 | <i>o,p'</i> -DDT | 0,13 | β -HCH | 0,08 |
| PCB 101 | 0,05 | <i>p,p'</i> -DDE | 0,20 | γ -HCH | 0,08 |
| PCB 118 | 0,20 | <i>o,p'</i> -DDE | 0,15 | δ -HCH | 0,06 |
| PCB 138 | 0,06 | <i>p,p'</i> -DDD | 0,13 | HCB | 0,06 |
| PCB 153 | 0,07 | <i>o,p'</i> -DDD | 0,38 | | |
| PCB 180 | 0,04 | | | | |

3.4 Statistické pracování

Data byla statisticky zpracována pomocí programu MS Excel 2010 a Unistat 5.6 software (Spearmanova korelace – máme 2 náhodné veličiny, jejichž pravděpodobnostní rozdělení není známe). V případě, kde nebyly detekovány žádné koncentrace organických polutantů, byla pro statistickou analýzu použita polovina detekčního limitu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky obsahu organochlorových polutantů v tkáních ryb, zahrnující průměrné hodnoty, směrodatné odchylky (SD) a korelační koeficienty, jsou uvedeny v tabulce 5 a pro přehlednost jsou uvedeny i v grafu 1, 2 a 3. Významné korelace jsou v tabulce tučně zvýrazněné.

Tabulka 5. Obsah organochlorových polutantů

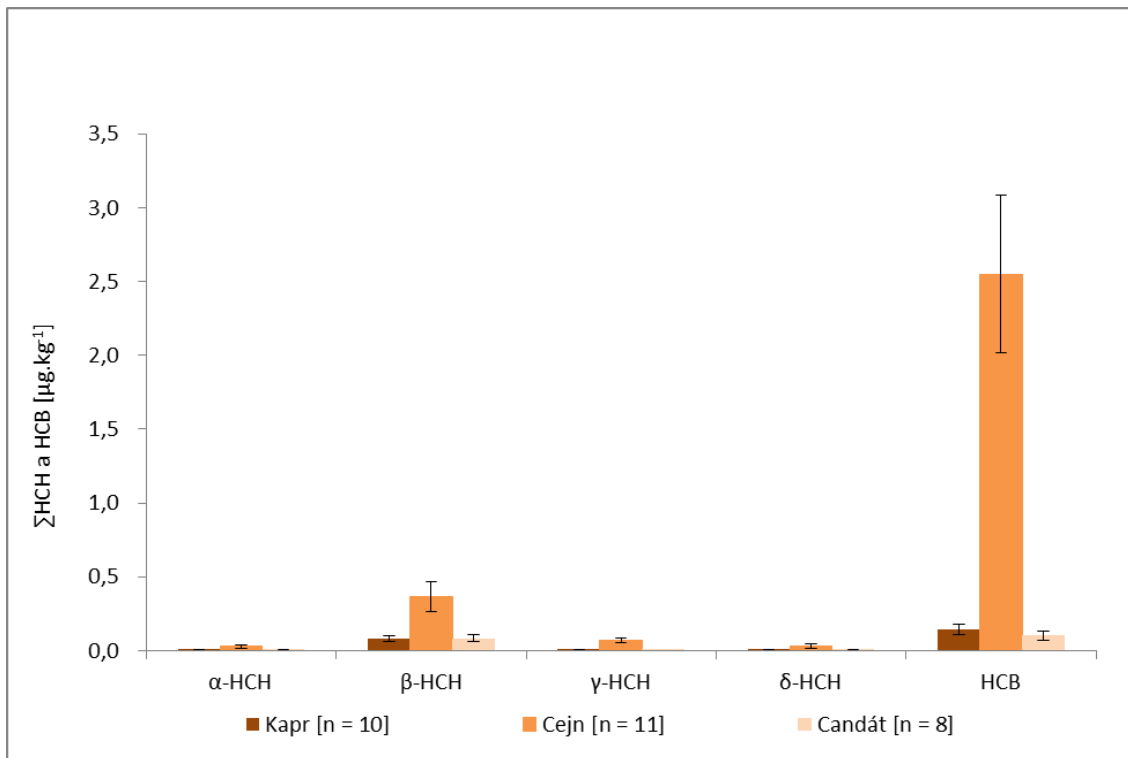
| Ryba | | ΣHCH | HCB | ΣPCB | ΣDDT |
|--------|---------------------------|-------------|-------------|---------------|----------------|
| Kapr | průměr ± SD* | 0,1 ± 0,06 | 0,1 ± 0,1 | 6,6 ± 3,7 | 32,1 ± 18,7 |
| | min – max* | 0,04 – 0,24 | 0,00 – 0,35 | 2,42 – 14,07 | 10,78 – 61,09 |
| | r _p obsah tuku | 0,78 | 0,56 | 0,99 | 0,66 |
| | r _p věk | 0,32 | -0,01 | 0,53 | 0,09 |
| | r _p hmotnost | 0,22 | 0,42 | 0,08 | 0,38 |
| Cejn | průměr ± SD* | 0,5 ± 0,5 | 2,6 ± 1,8 | 70,3 ± 60,1 | 373,9 ± 258,6 |
| | min – max* | 0,08 – 1,51 | 0,28 – 6,00 | 8,01 – 210,33 | 53,89 – 790,03 |
| | r _p obsah tuku | 0,92 | 0,96 | 0,99 | 0,89 |
| | r _p věk | 0,17 | 0,16 | 0,11 | 0,35 |
| | r _p hmotnost | 0,73 | 0,53 | 0,65 | 0,80 |
| Candát | průměr ± SD* | 0,09 ± 0,08 | 0,1 ± 0,08 | 8,8 ± 7,0 | 34,5 ± 33,2 |
| | min – max* | 0,05 – 0,28 | 0,04 – 0,29 | 3,18 – 24,84 | 16,04 – 115,19 |
| | r _p obsah tuku | 0,86 | 0,57 | 0,41 | 0,74 |
| | r _p věk | 0,11 | 0,52 | 0,35 | -0,19 |
| | r _p hmotnost | 0,07 | 0,48 | 0,33 | 0,24 |

r_p Spearmanova korelace

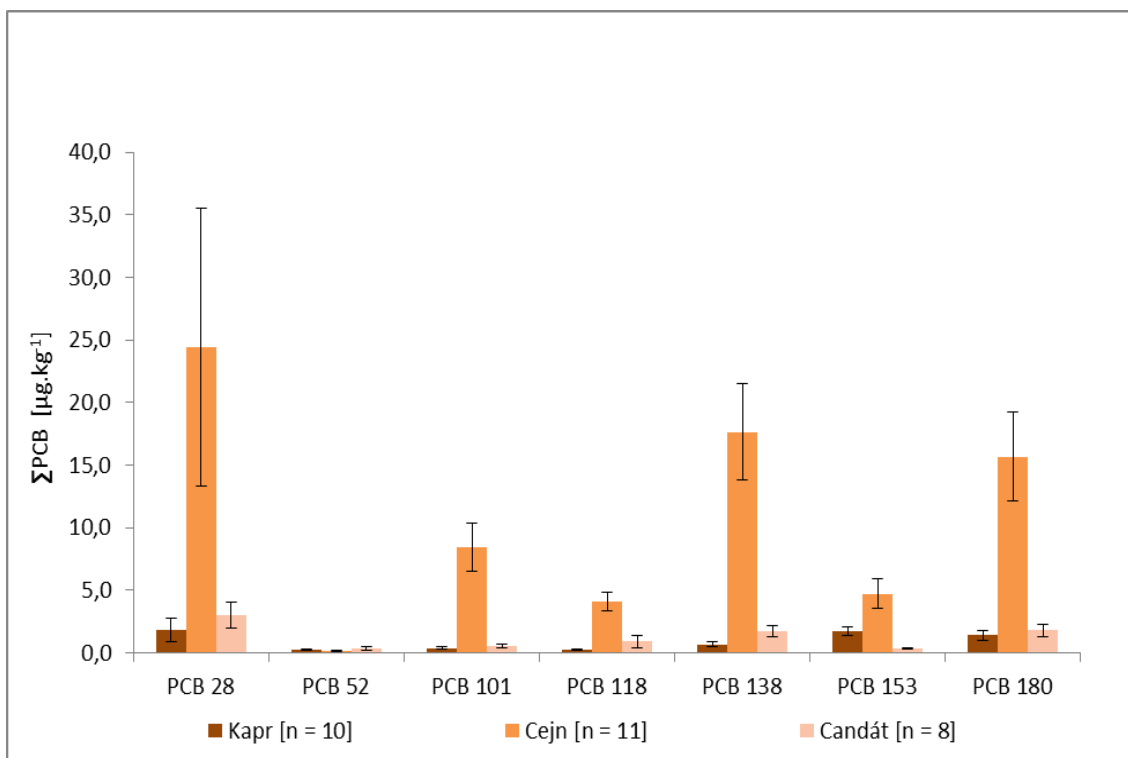
SD Směrodatná odchylka

* [μg.kg⁻¹]

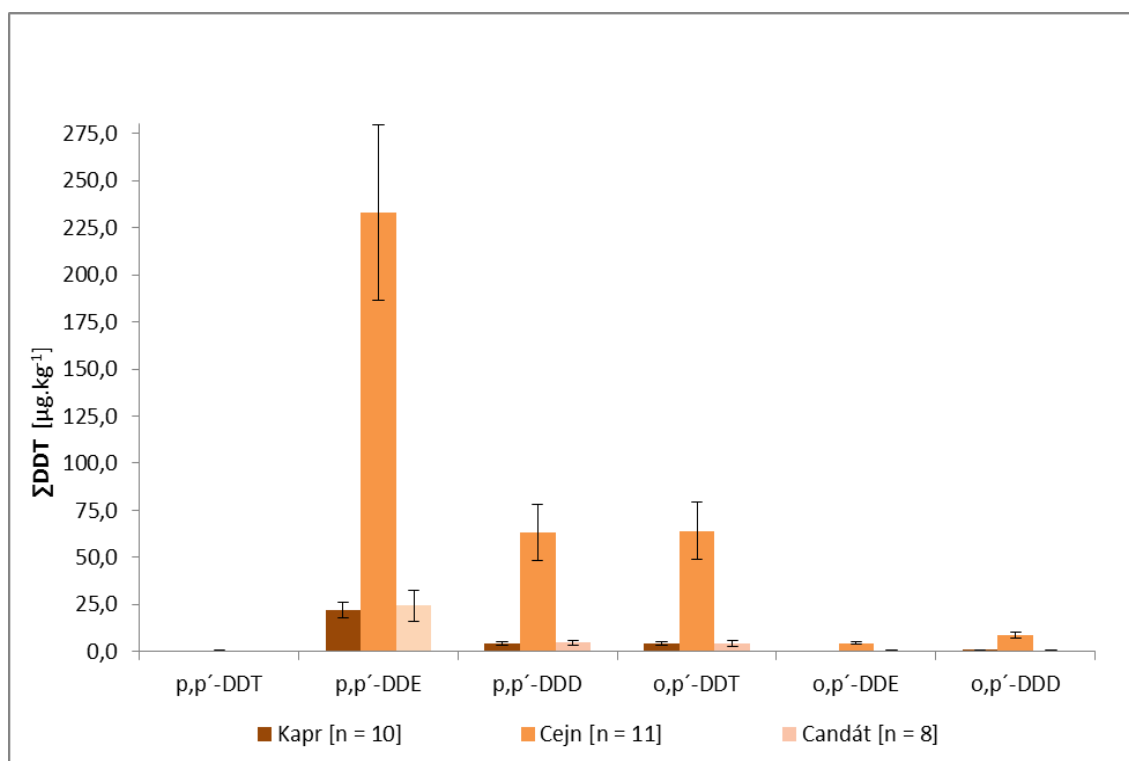
Jak je patrné z výsledků, nejvyšších hodnoty všech látek byly stanoveny v případě cejna. Poté následoval kapr a candát.



Graf 1. Obsah HCH a HCB isomerů ve svalovině různých druhů ryb



Graf 2. Obsah indikátorových kongenerů PCB ve svalovině různých druhů ryb



Graf 3. Obsah DDT a jejich metabolitů ve svalovině různých druhů ryb

Zjištěné korelace pro každou látku:

Byla zjištěna velmi významná korelace ($p < 0.01$) mezi tukem ve svalovině kapra a koncentracemi HCH a PCB, a významná korelace ($p < 0.05$) mezi tukem ve svalovině kapra a koncentracemi DDT a HCB.

U cejna byla zjištěna velmi významná korelace ($p < 0.01$) mezi tukem ve svalovině a koncentracemi HCH, HCB, PCB a DDT. Velmi významná korelace ($p < 0.01$) byla také objevena mezi hmotností cejna a koncentracemi HCH a DDT. Jen významná korelace ($p < 0.05$) byla u hmotnosti cejna a koncentracemi HCB a PCB.

V případě candáta byla zjištěna velmi významná korelace ($p < 0.01$) mezi tukem ve svalovině a koncentracemi HCH a významná korelace ($p < 0.05$) mezi koncentracemi DDT a tukem ve svalovině candáta.

Náš výzkum byl prováděn v roce 2013 na vodní nádrži Nové Mlýny. Tyto hodnoty jsme porovnávaly s koncentracemi kongenerů PCB v roce 2003. V roce 2003 byly zkoumány ryby z několika rybníků v ČR.^[14]

Kapr:

Průměr kongenerů PCB v roce 2003 byl $17.5 \mu\text{g.kg}^{-1}$, kde nejvyšší zastoupení měl kongener PCB 153. V roce 2013 byl průměrný obsah kongenerů PCB $6.6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ s nejzastoupenějším kongenerem PCB 28. Výsledky jsme porovnali a zjistily, že v rozmezí 10 let kongenery PCB v kaprovi klesají průměrně téměř o $10.7 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Cejn:

V roce 2003 byl celkový průměrný obsah kongenerů PCB $7.7 \mu\text{g.kg}^{-1}$, kde se objevil nejzastoupenější kongener PCB 153. V porovnání v roce 2013 byl celkový průměrný obsah kongenerů PCB $70.3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ s nejzastoupenějším kongenerem PCB 28. U této ryby jsme zaznamenaly velký nárůst za období 10 let.

Candát:

V roce 2003 byl zjištěn průměrný obsah kongenerů $10.4 \mu\text{g.kg}^{-1}$, kde nejzastoupenější kongener měl PCB 153. Průměrný obsah kongeneru v roce 2013 byl $8.8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ s nejzastoupenějším kongenerem PCB 28. Za období 10 let průměrný obsah kongenerů klesl skoro o $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

V tomto místě (Nové Mlýny a okolí) probíhal dlouhodobý výzkum v roce 2006, kde zjištění bylo takové, že rezidua DDT a PCB se nacházela ve všech vyšetřených vzorcích. Obsah DDT a jeho metabolitů ve svalovině ryb se pohyboval v rozmezí od 0,001 do $0,672 \text{ mg.kg}^{-1}$. Hodnoty DDT a PCB až na jeden případ nepřekročily hygienický limit stanovený vyhláškami ministerstva zdravotnictví, které v roce 2006 stanovovala směrnice ES č. 221/2002, Vyhláška č. 305/2004 Sb. (DDT do $0.5 \mu\text{g.kg}^{-1}$) a Vyhláška č. 158/2004 Sb. (PCB do $0.2 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Výsledky potvrdily převahu metabolitů p,p'-DDE a více kongenerů PCB 28.^{[9][8]}

Po shrnutí těchto výsledku můžeme jen souhlas a považovat za vážné, že i po tolika letech se v rybách našly sledované indikátorové kongenery, jelikož účinky PCB na zdraví nejsou zrovna příznivé.

Dne 2.prosince 2011 vyšlo nové nařízení komise (EU) č. 1259/2011, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity pro dioxiny, PCB s dioxinovým efektem a PCB bez dioxinového efektu v potravinách. Svalovina ulovených volně žijících sladkovodních ryb má maximální limity 125 ng/g hmotnosti v syrovém stavu. Hodnoty PCB, které jsme stanovovaly v roce 2013, nepřekročily maximální limity.^[15]

5 ZÁVĚR

- Na podzim roku 2013 byly zjišťovány hodnoty obsahu cizorodých látek v rybí svalovině. Ryby byly odloveny v Horní Novomlýnské nádrži. Byla stanovována koncentrace PCB, HCH, HCB a DDT. Hodnocení obsahu těchto látek se provádělo pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem.
- Během našeho stanovení jsme z výsledků zjistily, že nejvíce kontaminovaný z tří druhů ryb byl cejn s obsahem PCB $70.3 \mu\text{g.kg}^{-1}$, HCH $0.5 \mu\text{g.kg}^{-1}$, HCB $2.6 \mu\text{g.kg}^{-1}$, DDT $373.9 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Kapr s candátem byli kontaminováni v malých koncentracích. V případě cejna byl nejvíce zastoupen kongener PCB 28, β -HCH, *p.p'*-DDE.
- Byla zjištěna velmi významná korelace ($p < 0.01$) mezi tukem ve svalovině kapra, cejna, candáta a koncentracemi HCH, tukem ve svalovině kapra, cejna a koncentracemi PCB, tukem ve svalovině cejna a koncentracemi HCB, DDT, hmotnosti cejna a koncentracemi DDT, HCH. Dále jen významná korelace ($p < 0.05$) mezi tukem svaloviny kapra a koncentracemi HCB, DDT, hmotnosti cejna a koncentracemi PCB, HCB, tukem svaloviny candáta a koncentracemi DDT.
- Hodnoty, které byly stanoveny a vypočítány, byly porovnány se studii z předchozích let (v roce 2003 a 2006). Obsahy OCP a PCB byly nalezeny ve většině vyšetřovaných vzorků, ale byl zjištěn trend postupného poklesu těchto látek. Měřené hodnoty nepřekročily žádné stanovené limity. To je samozřejmě dobře, ale i tak některé koncentrace byly vysoké.

6 POUŽITÁ LITERATURA

1. BALLSCHMITTER K., ZELL M., (1980): Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. Composition of technical Aroclor and Clophen mixtures. Fresenius Z. Analyt. Chem.,302:20-21.
2. EBEL. KÜHNERT, W. MŮCK, (1987): Limits of determination and calibration in HPLC, Journal of Chromatography A. 23:934-938
3. HOLOUBEK, Ivan. Persistentní organické polutanty: POPs: [nová strategie EU v oblasti chemických látek]. Praha: Ministerstvo životního prostředí, 2001, 20 s.
4. HUTZINGER O., SAFE S., ZITKO V. (1974): The chemistry od PCBs. Cem. Rubber Co., Cleveland Oh. 269.
5. JURANOVÁ. STERZOVÁ. Stanovení PCB v rybách z vodních nádrží. SOČ. 2005, 28 s.
6. KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
7. MARŠÁLEK, P. WEISS, V. KOLEJKA, J. Chlorinated Hydrocarbon Residues in Fish from Nové Mlýny Reservoirs Along Dyje River, Czech Republic. ACTA VET. BRNO 2004, 73: 275-281
8. MINISTERSTVO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ. O nakládání s PCB. [online] Dostupné na www: www.mzp.cz
9. PAGE, L. BRIN, S. Google - Obrázky. [online]. 1998. Dostupné na www: www.google.com
10. PARTE, C.-ALBAIGES, J.: Biocumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves crustaceans and fishes. Archives. Environ. Contam. Toxicol. 26, 1994, 3, P. 273
11. PETRLÍK, Jindřich. Arnika. [online]. Dostupné na www: <http://arnika.org/pops>
12. POPL, M., KUBÁT, J. Základy chromatografie. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1981
13. REZKOVÁ, Ludmila. PCB: informační studie. Praha: Inorga, 1989,79 s.
14. ŠTULÍK, Karel. Analytické separační metody. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 263 s. ISBN 80-246-0852-9.
15. [ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÉ UNIE. Nařízení komise \(EU\). Dostupné na www: www.eurlex.europa.eu](http://www.eurlex.europa.eu)

16. VEČEŘA, Zdeněk. Pesticidy: Výroba, vlastnosti a použití. 1. Vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1964, 197 s.
17. VELIŠEK, Jan. Chemie potravin. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002, xii, 343 s. ISBN 80-86659-02-x.
18. VOLKA, Karel. Analytická chemie. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko technologická, 1995, 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
19. WHO (1993): Polychlorinated biphenyls and terphenyls. Geneva, World Health Organization, Environmental Health Criteria, 140pp.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| DDT | Dichlordifenyltrichlorethan |
| DL | Detekční limity |
| ECD | Detektor elektronového záchytu |
| ES | Evropské společenství |
| EU | Evropská unie |
| GC | Plynová chromatografie |
| GC/MS | Plynová chromatografie/hmotnostní spektrometr |
| GLC | Plynová rozdělovací chromatografie |
| GPC | Gelová permeační chromatografie |
| GSC | Plynová absorpční chromatografie |
| H | Henryho konstanta |
| HCB | Hexachlorbenzen |
| HCH | Hexachlorcyklohexan |
| IEC | Iontově výměnná chromatografie |
| K | Rozdělovací koeficient |
| LLS | Kapalinová rozdělovací chromatografie |
| LSC | Kapalinová absorpční chromatografie |
| MS | Hmotnostní spektrometr |
| OCP | Organochlorové pesticidy |
| PCB | Polychlorované bifenyly |
| POP | Perzistentní organické polutanty |
| r_p | Spearmanova korelace |
| R_p | Pearsonova korela |
| SD | Směrodatná odchylka |
| SFC | Chromatografie s mobilní fází v nadkritickém stavu |
| SPE | Extrakce tuhou fází |
| ŽP | Životní prostředí |

8 SLOVNÍK CIZÍCH POJMŮ

Adsorpce – hromadění plynné nebo rozpuštěné látky na povrchu jiné látky

Bioakumulace – růst koncentrace chemické látky v organismu

Biodegradace – rozklad látek působením biologických činitelů; biologický rozklad

Desorpce – uvolnění absorbátu z absorbentu

Detekce – zjišťování a odhalování něčeho skrytého

Detektor elektronového záhytu – je zařízení pro detekci molekul a atomů v plynu přes připojení elektronů pomocí elektronového záhytu ionizace

Endokrinní – týkající se žláz s vnitřní sekrecí, mající schopnost vnitřní sekrece

Environmentální – týkající se životního prostředí

Fotostabilita – odolnost vůči slunečnímu záření

Hydrofobní – schopnost navázat vodu nebo rozpouštět se v ní

Inertnost – odolnost vůči kyselinám, zásadám, oxidaci i redukci

Interference – vzájemné ovlivňování, prolínání, střetání

Kumulace – hromadění, nahromadění, nakupení

Kvalita – hodnota, jakost, stav věci

Kvantita – množství, počet, kvantum, četnost, mnohost

Lipofilní – schopnost rozpouštět se v tucích

Modifikace – obměna, úprava, změna takto vzniklá

Permitivita – veličina vyjadřující vliv látky na elektrické pole

Perzistentní – trvalý, vytrvalý, stály

Pesticidy – přípravky a prostředky, které jsou určeny k tlumení a hubení škůdce

Polutanty – znečišťující, odpadní látka

Selektivita – schopnost, citlivost výběru, ladění

Separace – oddělování, odlučování, izolace

Stacionární – neměnicí se s časem, nepohyblivý, stály, ustálený

Termostabilita – teplotní stabilita

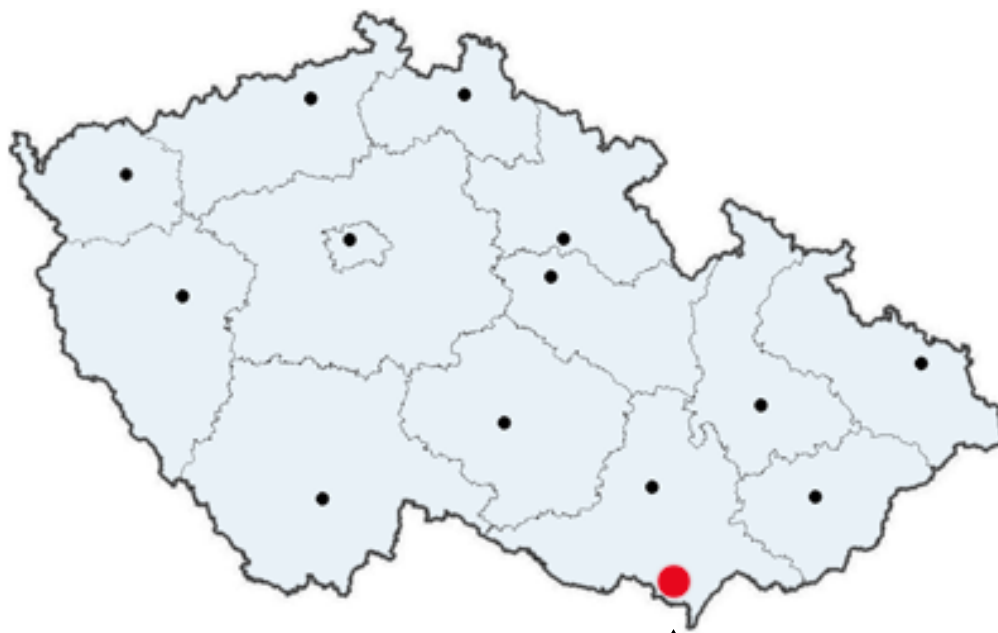
Viskozita – odpor tekutiny působící proti silám snažícím se vzájemně posunout její nejmenší částice, vnitřní tření

9 SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA 1. - Místo, odkud ryby pochází – vodní nádrže Nové Mlýny

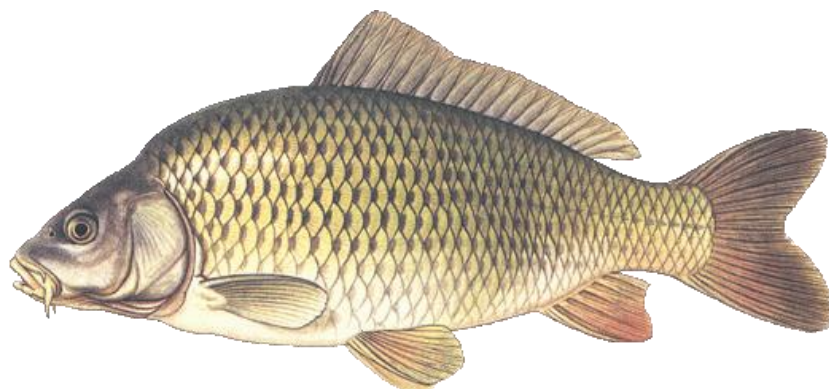
PŘÍLOHA 2. – Obrázky zkoumaných ryb: kapr obecný, cejn velký, candát obecný

PŘÍLOHA 1.

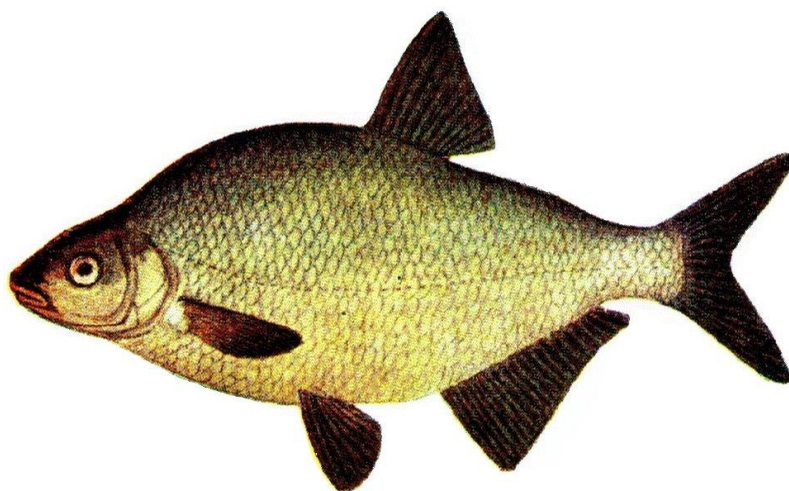


Obrázek 7. Vodní nádrže Nové Mlýny – Horní (Mušovská) nádrž

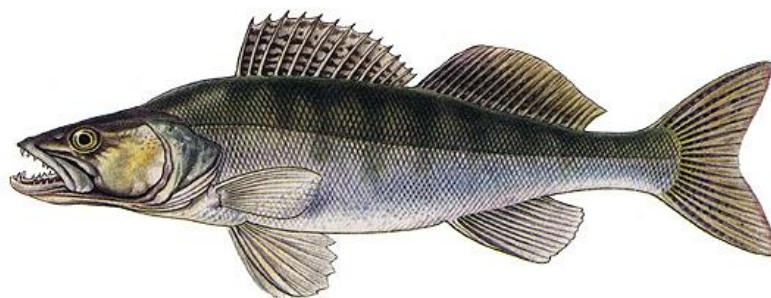
PŘÍLOHA 2.



Obrázek 8. Kapr obecný^[9]



Obrázek 9. Cejn velký^[9]



Obrázek 10. Candát obecný^[9]