

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra analytické chemie



**Elementární nečistoty v doplňcích stravy**

**Bakalářská práce**

Autor: Tomáš Hanák

Studijní obor: Chemie

Vedoucí práce: doc. Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2020

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Tomáš Hanák

Název práce: Elementární nečistoty v doplňcích stravy

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. Ing. David Milde, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2020

Anotace: Bakalářská práce se věnuje stanovení vybraných těžkých kovů As, Cd, Hg a Pb ve 2 doplňcích stravy metodou ICP-MS. V teoretické části je popsána problematika doplňků stravy, jejich legislativa, metoda ICP-MS a způsob přípravy vzorků pro stanovení těžkých kovů. Experimentální část je zaměřená na validaci postupu měření těžkých kovů a samotné stanovení množství As, Cd, Hg a Pb v jednotlivých doplňcích stravy.

Klíčová slova: elementární nečistoty, těžké kovy, As, Cd, Hg, Pb, stanovení, ICP-MS, doplňky stravy.

Počet stran: 57

Počet příloh: 4

Jazyk: Čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Thomas Hanak

Title: Elemental impurities in food supplements

Type of thesis: Bachelor's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. Ing. David Milde, Ph.D.

The year of submission: 2020

Annotation: The bachelor thesis is dedicated to determination of selected heavy metals As, Cd, Hg and Pb in 2 food supplements with the help of ICP-MS method. The theoretical section describes the issue of food supplements and their legislation and ICP-MS method and methods of sample preparation for the determination of heavy metals. The experimental section is focused on the validation of measurement procedures for determination of heavy metals As, Cd, Hg and Pb in individual food supplements.

Key words: elemental impurities, heavy metals, As, Cd, Hg, Pb, determination, ICP-MS, food supplements

Number of pages: 57

Number of appendices: 4

Language: Czech

## **PROHLÁŠENÍ:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 5. 6. 2020

Podpis .....

## **PODĚKOVÁNÍ:**

V první řadě bych chtěl poděkovat svojí rodině za stálou podporu ve všech ohledech při mém studiu chemie i mimo něj.

V druhé řadě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu doc. Ing. Davidovi Mildemu, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, pomoc, trpělivost a plno cenných rad během psaní bakalářské práce.

Ve třetí řadě bych chtěl poděkovat svým dvěma kamarádům Ing. Petrovi Brzeznému a Ing. Břetislavu Crhovi za cenné připomínky při psaní bakalářské práce. Věřím, že díky těmto připomínkám má moje bakalářská práce zase o něco vyšší úroveň.

Dále bych chtěl poděkovat Univerzitě Palackého za finanční podporu v rámci projektu IGA\_PrF\_2020\_030.

# OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Teoretická část .....	2
2.1	Doplňky stravy .....	2
2.2	Rozdíl mezi doplňkem stravy a léčivem.....	3
2.3	Rozdělení doplňků stravy .....	5
2.4	Legislativa spojená s doplňky stravy.....	7
2.4.1	Zákon č. 110/1997 Sb. ....	7
2.4.2	Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES .....	7
2.4.3	Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 .....	8
2.4.4	Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 .....	8
2.4.5	Nařízení komise (ES) č. 629/2008, <2232> Elemental Contaminants in Dietary Supplements .....	9
2.4.6	Nařízení Komise č. 1170/2009 .....	9
2.4.7	Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 .....	9
2.4.8	Vyhláška č. 58/2018 Sb. ....	10
2.5	Těžké kovy (As, Cd, Hg, Pb).....	10
2.5.1	Arsen.....	10
2.5.2	Kadmium .....	11
2.5.3	Rtuť .....	12
2.5.4	Olovo .....	14
2.6	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) .....	15
2.6.1	Princip metody .....	16
2.6.2	Instrumentace.....	17
2.6.3	Rušivé vlivy (interference) .....	22
2.7	Další metody pro stanovení těžkých kovů.....	23
2.8	Literární rešerše .....	24

2.8.1	Příprava vzorku k analýze metodou ICP-MS .....	26
2.9	Validace postupu měření .....	26
2.9.1	Výkonnostní parametry.....	26
2.9.2	Detailnější postup validace .....	28
3	Experimentální část.....	30
3.1	Validační protokol .....	30
3.2	Chemikálie.....	32
3.3	Vzorky .....	33
3.4	Materiály a přístroje.....	34
3.5	Příprava a rozklad vzorku.....	34
3.6	Příprava směsných zásobního roztoku pro ověření pravdivosti a preciznosti a kalibrační řady .....	35
3.7	Stanovení As, Cd, Hg a Pb v doplňcích stravy pomocí ICP-MS .....	36
4	Výsledky a diskuze .....	37
4.1	Validační zpráva a výsledky pro doplněk stravy Hlíva ústříčná 100 %.....	37
4.2	Validační zpráva a výsledky pro doplněk stravy Ostropestřec mariánský .....	42
4.3	Diskuze výsledků.....	47
5	Závěr .....	50
6	Seznam použité literatury: .....	51
7	Přílohy .....	55

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CRM	Certifikovaný referenční materiál
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EFTA	Evropské sdružení volného obchodu
ETA-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
EU	Evropská unie
FA-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací
HG-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s generováním hydridů
HPLC-ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
L-L	Kapalina – kapalina
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MIP-OES	Optická emisní spektrometrie s mikrovlnně indukovaným plazmatem
MM	Mikrovlnný mineralizátor
MR	Mikrovlnný rozklad
PP	Polypropylen
PVG-AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie ve spojení s fotochemickým generováním těkavých sloučenin
QC	Řízení kvality (quality control)
RASFF	System rychlého varování pro potraviny a krmiva



RF	Radiová frekvence
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TDA-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s tepelným rozkladem a amalgamací
VIM	Mezinárodní slovník metrologie

# 1 Úvod

V moderní uspěchané době žijeme často nezdravým životním stylem s nadměrným stresem a nedostatkem pohybu. Všechny tyto vlivy znamenají pro naše tělo značnou zátěž a dlouhodobě mohou způsobovat nedostatek některých životně důležitých látek, což vede k vážným zdravotním problémům. Doplnky stravy zde hrají významnou roli, protože dokáží alespoň částečně vyvážit skryté i zjevné nedostatky naší stravy, a tak fungují jako určitá prevence proti onemocnění, dále mohou zpomalit proces stárnutí, zvýšit fyzickou i psychickou výkonnost, redukovat nepříznivé vlivy životního prostředí, zlepšovat celkovou regeneraci těla aj. [1]

Každý doplněk stravy může obsahovat určité množství těžkých kovů, ty se můžou do doplňku stravy dostat např. kontaminací životního prostředí (půdy, vody, ovzduší), nešetrným zpracováním rostlin a živočichů nebo nedostatečně propracovanou výrobní linkou. Protože se doplňky stravy přijímají v drtivé většině opakovaně každý den, nebezpečí z kontaminace těžkými kovy značně vzrůstá. Asi 20 % spotřebitelů v EU užívá alespoň 1 doplněk stravy denně. A počet uživatelů je na vzestupu [2]. Je proto třeba trh s doplňky stravy přísně kontrolovat a dbát na to, aby byly doplňky stravy vždy maximálně čisté.

Cílem mojí bakalářské práce bylo stanovit ve 2 doplňcích stravy těžké kovy, a to konkrétně As, Cd, Hg a Pb. Zaměřil jsem se na tyto 4 těžké kovy, protože se v léčivech stanovují nejčastěji a jsou pro lidský organismus extrémně nebezpečné. Stanovení bylo provedeno po validaci postupů měření, k níž bylo přistoupeno s využitím doporučení používaných při kontrole léků. Stanovení těžkých kovů bylo provedeno moderní instrumentální technikou, metodou ICP-MS, která je v současné době z pohledu multiprvkové analýzy vysoce univerzální a poskytuje nízké meze detekce a stanovitelnosti [3]. Z vědeckých článků o dané problematice byla vytvořena literární rešerše, které byla nápomocná při hledání optimálního postupu rozkladu vzorku pomocí mikrovlnného mineralizátoru. Jelikož problematika stanovení těžkých kovů v doplňcích stravy je relativně nová, další problém byl vyhledání legislativních limitů pro tyto 4 těžké kovy v doplňcích stravy, zejména pak As. Limitní hodnota pro As v doplňcích stravy byla dohledána v americkém lékopise.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Doplnky stravy

Doplňkem stravy se podle zákona č. 110/1997 Sb. rozumí potravina, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravině samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích. [4]

Problematiku doplňků stravy upravuje na národní úrovni vyhláška č. 58/2018 Sb. [5], o doplňcích stravy a složení potravin, která je transpozicí směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES [6] o sblížení právních předpisů členských států týkajících se doplňků stravy. Tato vyhláška upravuje: a) požadavky na složení doplňků stravy, jejich označování a způsob použití doplňků stravy, b) požadavky na složení potravin.

#### a) požadavky na složení doplňků stravy

(1) Vitamíny a minerální látky a jejich formy, které lze použít pro výrobu doplňků stravy, jsou stanoveny v přílohách č. I a II směrnice 2002/46/ES [6] o sblížení právních předpisů členských států týkajících se doplňků stravy, ve znění přímo použitelných předpisů Evropské unie.

(2) Některé další látky, které lze použít pro výrobu doplňků stravy, a podmínky, za kterých je lze použít, jsou uvedeny v příloze č. 1 k této vyhlášce.

Zajímavé informace, týkající se doplňků stravy, byly nedávno uveřejněny v časopise Téma [7-8]: V celé Evropě funguje systém RASFF. Slouží k oznamování přímého nebo nepřímého rizika pro lidské zdraví, toto riziko může pocházet z potraviny nebo krmiva. Umožňuje rychlé a účinné sdílení informací o nebezpečných potravinách nebo krmivech mezi členy systému: Evropskou komisí, členskými státy EU a EFTA a Evropským úřadem pro bezpečnost potravin. Za rok 2019 má Česká republika po Číně nejvíce zachycených potravin. Čína měla 27 oznámení, my 21, Polsko 20, Itálie 12, Německo 8. Kterých potravin se to týká? Kromě ovoce a zeleniny například také doplňků stravy, obilnin a pekařských výrobků, ořechů, masa, masných výrobků, ryb a rybích výrobků, hotových jídel... V těchto

potravinách se vyskytovaly třeba mykotoxiny, mikroorganismy, těžké kovy, rezidua pesticidů, alergenů a jiné škodliviny.

Lidé, kteří chtějí prožít aktivní a zdravý život nebo trvale podávat dobrý fyzický a duševní výkon, usilují o to, aby vypadali a cítili se dobře. Doplnky stravy po vlastních zkušenostech tedy upřímně vítají. [1]

## **2.2 Rozdíl mezi doplňkem stravy a léčivem**

Doplnky stravy nemohou dle platných právních předpisů [4-6] deklarovat vlastnosti prevence, léčby nebo vyléčení onemocnění nebo na tyto vlastnosti odkazovat.

Účinky deklarované výrobcem nejsou nikým ověřovány, protože u doplňků stravy není posuzována jejich účinnost. Pokud uváděné účinky výrobku nejsou v rozporu s právními předpisy pro označování potravin a doplňků stravy, je umožněno jejich uvádění na obalech a v dalších materiálech doprovázejících výrobek bez ohledu na jejich pravdivost. Provozovatel potravinářského podniku, který vyrábí nebo uvádí na trh doplnky stravy, je povinen před jejich prvním uvedením na trh zaslat Ministerstvu zemědělství český text označení, včetně povinných informací. Tento text bude uveden na obale výrobku (tzv. notifikační povinnost). Tato povinnost je v souladu s ustanovením zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů. [9]

Hlavní rozdíly mezi doplňkem stravy oproti léčivu jsou přehledně shrnuty v tabulce I.

**Tabulka I** Základní rozdíly mezi doplňkem stravy oproti léčivu [9-11]

	<b>Doplňěk stravy</b>	<b>Léčivo</b>
<b>Přehledné povinné označení na obalu</b>	Každý doplňěk stravy musí být označen slovy doplňěk stravy.	Každé léčivo musí být označeno registračním kódem SÚKL.
<b>Prodej prostřednictvím e-shopu</b>	Doplňky stravy se často prodávají prostřednictvím internetu. Internetový prodejce je také provozovatel potravinářského podniku.	Internetový prodej léčiv může provádět pouze schválená „kamenná“ lékárna. Prostřednictvím internetového prodeje lze prodávat pouze léky bez lékařského předpisu.
<b>Požadavky na prodávajícího</b>	Zákon nějak nevymezuje odbornou způsobilost personálu v prodejnách s doplňky stravy.	Léčiva smějí vydávat pouze osoby stanovené zákonem, tj. farmaceuti, farmaceutičtí asistenti, prodejci vyhrazených léčiv.
<b>Dostupnost</b>	Doplňky stravy lze zakoupit např. v lékárnách, běžných obchodech s potravinami, drogeriích.	Léčiva lze zakoupit pouze v lékárnách nebo u prodejců vyhrazených léčiv.
<b>Způsob prodeje</b>	Užívání doplňků stravy není vázáno na žádný lékařský předpis, tedy doplňky stravy jsou volně prodejné.	U léčiva je s ohledem na aktivní látky obsažené v přípravku jeho užívání vázáno na lékařský předpis, tedy pacient jej získá pouze na základě doporučení od svého lékaře.
<b>Schvalovací proces</b>	Výrobce či dovozce má pouze informační povinnost vůči Ministerstvu zemědělství České republiky, doplňky stravy samy o sobě nejsou schvalovány. Na Ministerstvo zemědělství musí výrobce před prvním uvedením na trh zaslat český text etikety pro daný doplňěk stravy, před uvedením na trh není výrobce povinen ověřovat účinnost doplňku stravy.	Léčiva musí před prvním uvedením na trh projít schvalovacím řízením, během tohoto procesu se hodnotí jeho účinnost, jakost a bezpečnost. Výrobce předkládá toxikologické a farmakologické zkoušky, klinická hodnocení, aj.
<b>Účel použití</b>	Doplňěk stravy je koncentrovaný zdroj živin nebo jiných látek, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu. Na obalu doplňku stravy nesmí být uvedena tvrzení o léčebných a preventivních vlastnostech doplňku.	Léčivo je látka nebo kombinace látek s léčebnými či preventivními vlastnostmi.

## 2.3 Rozdělení doplňků stravy

Podle kritérií, která vycházejí z historického vývoje v naší oblasti, ze širší dnešní tržní nabídky a oblastí určení určitých skupin doplňků stravy, můžeme doplňky rozdělit na [1]:

- **Vitamíny a minerální látky**

Na vitamíny obvykle hledíme jako na skupinu životně důležitých látek obvykle obsahující aminovou skupinu ( $-NH_2$ ), která se v lidském těle sama netvoří, a proto je třeba ji do něj dodávat. Na minerály jako na doplňky stravy však většinou nazíráme jednou jako na prvky (např. jód nebo selen) i když je téměř vždy užíváme ve vázané formě sloučenin, jindy na sloučeniny těchto prvků (např. minerál dolomit s obsahem hořčíku a vápníku). Vitamíny a minerální látky vnímáme jako mikroživiny. Chápeme je jako látky, při jejichž nedostatku hrozí nějaká porucha zdraví podobná těm, které vznikají při nedostatku živin (sacharidy, bílkoviny, tuky, voda).

Poněkud sporné je zařazení do této skupiny některých látek podobných vitamínům (např. koenzym Q10,  $\alpha$ -lipoová kyselina, aj.) nebo látek, které jsou prekurzory vitamínů (např.  $\beta$ -karoten je prekurzor vitamínu A) mezi vitamíny. Proto je vhodnější je označovat jako další aktivní látky.

- **Antioxidanty**

Jsou stále rostoucí skupinou minerálních látek, vitamínů, extraktů a dalších látek potlačující tzv. oxidační stres organismu vyplývající z toho, že výtěžky oxidačních reakcí spojených s uvolňováním volných radikálů jsou za podmínek jistého diskomfortu (např. stres, trénink, nemoc, překyselení, stárnutí atd.) vyšší než výtěžky samovolných zhašecích reakcí, při nichž volné radikály zase zanikají. Výsledkem této nerovnováhy je hromadění volných radikálů v těle. Lze je dostat pod kontrolu užíváním látek ze skupiny antioxidantů (např. minerální látky: Se, Zn aj., vitamíny: A, B<sub>6</sub>, C, E aj. extrakty: ginkgo biloba aj.).

- **Rostlinné extrakty**

Lze je využít v nejrůznějších formách (tablety, tinktury, čaje, nálevy, tobolky aj.) a očekáváme od nich podobné účinky jako od léčivých rostlin.

- **Doplňky stravy podporující hubnutí**

- **Doplňky na povzbuzení**

mohou znamenat přínos pro naši celkovou vitalitu, duševní kondici a fyzickou kondici.

- **Doplňky stravy na problémy s klouby**

- **Doplňky s mastnými kyselinami**

obvykle podporují hubnutí (snižují hladinu cholesterolu) nebo potlačují tvorbu tzv. prostaglandinů a leukotrienů, které mohou podporovat zánětlivé procesy.

- **Probiotika**

jsou velmi zajímavou a moderní skupinou doplňků stravy, které oživují mikrobiální přirozené střevní kultury v těle a mají řadu pozitivních účinků na zdraví. Zejména zvyšují imunitu a zbavují střevní obsah zdraví škodlivých látek.

- **Enzymy**

mohou být mezi doplňky stravy zastoupeny např. enzymem laktázou, bez které by neprobíhalo odbourávání mléčného cukru laktózy.

- **Hormony**

- **Doplňky sportovní výživy**

Podle formy, v jaké se doplňky stravy přijímají, můžeme doplňky stravy rozdělit na [1]:

- **Pevné látky**

- dražé (obalované, potahované, retardované),
- granulát (perorální, rozpustný, s řízeným uvolňováním),
- prášek (perorální, rozpustný),
- kapsle,
- pastilka,
- tableta (obalovaná, potahovaná, pro přípravu roztoku, s prodlouženým uvolňováním, šumivá, s řízeným uvolňováním, rozpouštějící se pod jazykem, žvýkací),
- žvýkací plátek.

- **Tekutiny**

- aerosol,

- gel,
- kapky (rostlinné tinktury),
- tobolka (tvrdá, měkká, s prodlouženým uvolňováním, s řízeným uvolňováním),
- roztok,
- sirup,
- olej (olejový rostlinný extrakt).

## **2.4 Legislativa spojená s doplňky stravy**

V této kapitole je uveden chronologicky seznam základních zákonů, které se vztahují k doplňkům stravy a obsahují informace o doplňcích stravy. [4-6,12-17]

### **2.4.1 Zákon č. 110/1997 Sb.**

Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů zpracovává příslušné předpisy Evropské unie a upravuje v návaznosti na přímo použitelné předpisy Evropské unie povinnosti provozovatele potravinářského podniku, výrobce, dovozce, maloobchodního prodejce a distributora. Mezi tyto povinnosti patří např. povinnost provozovatele, který dováží doplňky stravy ze třetí země zaslat Ministerstvu zdravotnictví český text označení, který má být uveden na obale výrobku před jejím prvním uvedením na trh, dodržovat smyslové, fyzikální, chemické a mikrobiologické požadavky na jakost potravin, dodržovat ve všech fázích výroby a uvádění potravin na trh technologické a hygienické požadavky, způsob a podmínky přepravy, uchování a manipulace s potravinami, používat jen takové obaly a obalové materiály, které chrání potravinu před znehodnocením, znemožňují změnu obsahu bez otevření a dodržovat požadavky pro druhy a přípustná množství toxikologicky významných látek. [4]

### **2.4.2 Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES**

Směrnice sblížuje právní předpisy, které se týkají doplňků stravy tím, že se pro společenství nastaví jednotná pravidla kvůli volnému pohybu doplňků stravy po Evropské unii. Pro výrobu doplňků stravy mohou být používány pouze vitamíny a minerální látky uvedené v příloze I, a to ve formách uvedených v příloze II. Stanoví se maximální množství vitaminů a minerálních látek obsažených v denní dávce doplňků stravy, jak je doporučena výrobcem, přičemž se zohlední: a) bezpečné nejvyšší množství vitaminů a minerálních látek, přičemž se podle potřeby zohlední různý stupeň citlivosti různých skupin spotřebitelů,



b) příjem vitaminů a minerálních látek z jiných zdrojů stravy. Pro zajištění přítomnosti významných množství vitaminů a minerálních látek v doplňcích stravy se stanoví minimální množství v denní dávce doporučené výrobcem.

Na etiketě příslušného doplňku stravy se povinně uvedou tyto údaje: názvy kategorií živin nebo látek, které charakterizují doplněk stravy, doporučená denní dávka, varování před překročením uvedené doporučené denní dávky, upozornění, že by doplňky stravy neměly být používány jako náhrada pestré stravy, upozornění, že by doplňky stravy měly být skladovány mimo dosah malých dětí. [6]

### **2.4.3 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002**

Nařízením se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin, ten stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin. Úřad přispívá k vysoké úrovni ochrany lidského života a zdraví. Bere v úvahu zdraví a ochranu životního prostředí v rámci fungování vnitřního trhu. Shromažďuje a analyzuje údaje umožňující charakterizovat a sledovat rizika, která mají přímý nebo nepřímý vliv na bezpečnost doplňků stravy. [12]

### **2.4.4 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006**

Nařízení se zabývá výživovými a zdravotními tvrzeními při označování potravin. Výživová a zdravotní tvrzení nesmějí:

a) být nepravdivá, dvojsmyslná nebo klamavá, b) vyvolávat pochybnosti o bezpečnosti nebo výživové přiměřenosti jiných potravin, c) nabádat k nadměrné konzumaci určité potraviny nebo nadměrnou konzumaci omlouvat; d) uvádět nebo naznačovat, že vyvážená a různorodá strava nemůže obecně zajistit přiměřené množství živin, e) odkazovat na změny tělesných funkcí, které by mohly u spotřebitelů vzbuzovat strach nebo by mohly zneužívat jejich strachu pomocí textu, obrazového, grafického či symbolického znázornění. [13]

## 2.4.5 Nařízení komise (ES) č. 629/2008, <2232> Elemental Contaminants in Dietary Supplements

V příloze k nařízení komise (ES) č. 629/2008 jsou stanovené limitní hodnoty pro těžké kovy (resp. pro Cd, Hg, Pb) v mg kg<sup>-1</sup>, které jsou obsažené v doplňcích stravy. V nařízení ale není stanovená limitní hodnota pro As v doplňcích stravy. Tuto hodnotu jsem následně dohledal v americkém lékopise „<2232> Elemental Contaminants in Dietary Supplements“. Limitní koncentrace těžkých kovů v doplňcích stravy jsou uvedeny v tabulce II. [14-15]

**Tabulka II** Legislativní limity pro těžké kovy v doplňcích stravy v mg kg<sup>-1</sup> [14-15]

Těžké kovy	Limity těžkých kovů v doplňcích stravy
As	1,5 <sup>c</sup>
Cd	3,0 <sup>a</sup> 1,0 <sup>b</sup>
Hg	0,1
Pb	3,0

a-doplňky stravy složené výhradně nebo zejména ze sušených mořských řas nebo z produktů získávaných z mořských řas, b – všechny doplňky stravy mimo a, c-limitní hodnota pouze pro anorganický arsen

## 2.4.6 Nařízení Komise č. 1170/2009

Nařízením se mění směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006, pokud jde o seznamy vitaminů a minerálních látek a jejich forem, které lze přidávat do potravin, včetně doplňků stravy. [16]

## 2.4.7 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011

Nařízení o poskytování informací o potravinách spotřebitelům. Zavádí seznam povinných údajů, které musí být přehledně uvedeny na etiketě: název potraviny, seznam složek, uvádět každou látku, která vyvolává alergie a je obsažena v konečném produktu, množství určitých složek, čisté množství potraviny, datum minimální trvanlivosti a použitelnosti, zvláštní podmínky pro uchovávání a použití, jméno nebo obchodní název a adresu provozovatele potravinářského podniku, zemi původu, návod k použití v případě potraviny, kterou by bez tohoto návodu bylo obtížné odpovídajícím způsobem použít, u nápojů s obsahem alkoholu vyšším než 1,2 % objemových skutečný obsah alkoholu v procentech objemových, výživové údaje. [17]

## 2.4.8 Vyhláška č. 58/2018 Sb.

Tato vyhláška upravuje požadavky na složení doplňků stravy, jejich označování, způsob použití doplňků stravy a požadavky na složení potravin. [5]

## 2.5 Těžké kovy (As, Cd, Hg, Pb)

Toxické kovy nebo také někdy těžké kovy jsou přírodní složkou zemské kůry. Nemohou být degradovány na jednodušší látky ani nemohou být zničeny. Pojem toxický kov můžeme vymezit snáze, často se název těžké kovy používá jako synonymum pro toxické kovy, což může vést k určitým nesrovnalostem (tak např. beryllium je sice toxický kov, ale nikoli těžký kov; železo a mangan patří mezi těžké kovy, ale nelze je řadit mezi toxické kovy). Proto se nedoporučuje používat název těžké kovy jako synonymum pro toxické kovy. [18]

Toxicita je vlastnost, která vyjadřuje míru škodlivosti dané látky na živý organismus, resp. na jeho části. Míra toxicity pro organismus závisí na dávce látky, velikosti organismu, na způsobu vstupu do organismu, délky expozice, metabolismu, aj. [19-20]

Termínem „těžké kovy“ se rozumí kovy nebo v jistých případech metaloidy, které jsou stabilní a mají měrnou hmotnost větší než  $4,5 \text{ g cm}^{-3}$ , společně s jejich sloučeninami. [21]

Těžké kovy jsou obecně charakteristické svou vysokou nebezpečností pro organismy a představují jednu z nejvýznamnějších skupin škodlivých látek. K obohacení vody o vysoké množství toxických kovů může docházet v okolí rudných nalezišť. Dalším přírodním zdrojem kovů a polokovů může být vulkanizační činnost. K nejznámějším těžkým kovům, které představují vážné nebezpečí pro člověka, patří: Cd, Hg a Pb. [18,21]

### 2.5.1 Arsen

V přírodě se As vyskytuje v mnoha minerálech (např. v arsenopyritu  $\text{FeAsS}$ , realgaru  $\text{As}_4\text{S}_4$ , auripigmentu  $\text{As}_2\text{S}_3$ ), z nich se arsen postupně uvolňuje do přírodních vod v podobě arseničnanů  $\text{AsO}_4^{3-}$ . V malém množství doprovází téměř všechny sulfidické rudy a je častou součástí různých hornin a půd, jejichž zvětráváním se dostává do podzemních a povrchových vod. Nejzávažnějšími zdroji znečištění arsenem jsou odpadní vody z průmyslu těžby a zpracování rud, výroby barviv, z koželužen, dále z tepelných elektráren, z aplikace některých insekticidů a herbicidů aj. Protože arsen doprovází fosfor, je obsažen i v odpadních vodách z praní prádla. Má značnou schopnost kumulovat se v sedimentech dna.

Arsen je extrémně toxický kov, podobně jako  $\text{Pb}^{2+}$  a  $\text{Hg}^{2+}$  je  $\text{As}^{3+}$  měkkým kovovým centrem a interaguje se zbytky v proteinech s postranními skupinami obsahujícími síru. Toxicita arsenu závisí na oxidačním stupni. Sloučeniny obsahující  $\text{As}^{3+}$  jsou mnohonásobně toxičtější než sloučeniny, které obsahují  $\text{As}^{5+}$ . Podobně jako u rtuti může arsen biochemickou cestou tvořit různé methylderiváty (např. methylarsen  $\text{CH}_3\text{AsH}_2$ , dimethylarsen  $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$  a trimethylarsen  $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ ).

Smrtelná dávka arsenu se pohybuje okolo 130 mg. Mnoho sloučenin arsenu jsou známé karcinogeny, teratogeny a mutageny. Jsou to např.  $\text{AsH}_3$ ,  $\text{As}_2\text{O}_3$ ,  $\text{K}_3\text{AsO}_3$  a  $\text{Na}_3\text{AsO}_4$ . Dlouhodobé pití vod s malými koncentracemi arsenu způsobuje chronické onemocnění. Ve třicátých a čtyřicátých létech minulého století byly popsány otravy arsenem způsobené pitím nevhodné vody, s koncentracemi až v jednotkách  $\text{mg l}^{-1}$ . Dnes je limitní koncentrace arsenu v pitné vodě podle vyhlášky č. 70/2018  $10 \mu\text{g l}^{-1}$ . [18,22-25]

## 2.5.2 Kadmium

V přírodě se kadmium vyskytuje jako vzácný minerál greenockit ( $\text{CdS}$ ), ale vzhledem ke své chemické podobnosti se zinkem doprovází kadmium zinek v zinkových rudách. Je odolný vůči korozi, takže se nanáší jako tenká ochranná vrstvička na jiné korozivní kovy. Při zpracování  $\text{CdS}$  a  $\text{ZnS}$  přechází kadmium jednak do odpadních vod, jednak do atmosféry. Významným antropogenním zdrojem kadmia jsou fosforečnanová hnojiva (mohou obsahovat až  $170 \text{ mg kg}^{-1}$  kadmia) oproti půdám ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$  kadmia) a aplikace čistírenských kalů v zemědělství. Dalším zdrojem jsou odpadní vody z galvanického pokovování a z výroby Ni-Cd baterií. Kadmium je součástí některých pigmentů a slouží jako stabilizátor některých termoplastů (např. PVC). Při spalování těchto plastových odpadů přechází kadmium do atmosféry a významně se podílí na její kontaminaci. Do atmosféry přechází kadmium také při spalování fosilních paliv, nafty a topných olejů. V životním prostředí se kadmium vyskytuje ve formě jednoduchého iontu  $\text{Cd}^{2+}$ , dále hydroxokomplexu, karnonátokomplexu, eventuálně i sulfátokomplexu  $[\text{CdSO}_4(\text{aq})]^0$ . V mořské vodě se vyskytují navíc i chlorokomplexy (převážně  $[\text{CdCl}_2(\text{aq})]^0$ ). Z organických komplexů se vyskytují především komplexy s huminovými látkami. Jednoduchý iont  $\text{Cd}^{2+}$  spolu s  $[\text{CdCO}_3(\text{aq})^0]$  a  $[\text{Cd}(\text{OH})_2(\text{aq})^0]$  patří mezi dominující formy výskytu kadmia ve vodě. Například Gardiner a Shephard vyhodnotili řadu vzorků

povrchových vod a dospěli k poměrnému zastoupení jednotlivých forem rozpuštěného kadmia, které je shrnuto v tabulce III. [18]

**Tabulka III** Poměrné zastoupení forem výskytu kadmia v povrchových vodách [18]

Forma výskytu	Gardiner [%]	Shephard [%]
$\text{Cd}^{2+}$	44,0 - 56,0	27,0 - 86,0
$[\text{CdSO}_4(\text{aq})]^0$	2,6 - 7,7	5,1 - 17,6
$[\text{CdOH}]^+$	2,6 - 6,5	2,0 - 11,3
$[\text{CdCl}]^+$	2,6 - 10,0	1,0 - 9,7
$[\text{CdCO}_3(\text{aq})]^0$	3,9 - 21,0	2,1 - 17,1
organokomplexy	10,0 - 24,0	1,8 - 53,0

Kadmium patří mezi velmi nebezpečné jedy, což bylo dříve podceňováno. Mezi kovy se v řadě podle klesající toxicity nachází na druhém místě hned po rtuti. Značně se kumuluje v biomase, sedimentech a plaveninách. Má dokonce jeden z nejvyšších akumulčních koeficientů vůbec a setrvává velmi dlouho v těle, protože na rozdíl od rtuti netvoří biochemickou cestou těkavé alkylderiváty. Detoxikace je proto pomalá a hrozí nebezpečí chronických otrav. Kromě toho zesiluje toxické účinky jiných kovů (synergický efekt) jako např. Zn a Cu.

Kadmium je neesenciální a jedovatý kov pro lidský organismus a legislativa Evropské unie v oblasti životního prostředí vede k omezování jeho používání. Kadmium z Ni-Cd baterií může být recyklováno, ale v ostatních oblastech lze očekávat pokles jeho využívání. Kadmium se váže na thiolovou funkční skupinu ( $-\text{SH}$ ) v enzymech. Do živého organismu se většinou dostává po požití, méně často pak vdechnutím. Akumuluje se v ledvinách a játrech. Sloučeniny kadmia jsou známé karcinogeny, které jsou nebezpečné pro životní prostředí. Z dlouhodobého hlediska se vystavení kadmiu např. v kontaminované potravě nebo vodě projevuje tvorbou rakoviny prsu, arteriosklerózou a zvýšeným krevním tlakem. To může vést ke kardiovaskulárním chorobám. Dnes je limitní koncentrace kadmia v pitné vodě podle vyhlášky č. 70/2018  $5 \mu\text{g l}^{-1}$ . [18,22-25]

### 2.5.3 Rtuť

Hlavním zdrojem rtuti je cinabarit ( $\text{HgS}$ ). Kromě toho rtuť také doprovází některé jiné sulfidické rudy a při jejich pražení se dostává do atmosféry. Díky své nízké teplotě tání ( $-39 \text{ }^\circ\text{C}$ ) je unikátním kovem v kapalném stavu. Vysoká teplotní roztažnost rtuti umožňuje její použití jako kapaliny do teploměrů, běžně se používá jako náplň do barometrů, difúzních

pump a rtuťových spínačů v elektrických zařízeních. Používání rtuti v amalgámové výrobě chloru elektrolýzou roztoku NaCl se postupně opouští. Amalgám stříbra (asi 50 % Hg, 35 % Ag, 13 % Sn, 2 % Cu) se používá jako výplň (plomba) v zubním lékařství. S ohledem na rozsáhlé používání představuje rtuť a její sloučeniny, např.  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ , vážné zdravotní riziko. Kapka kapalné rtuti se při teplotě 20 °C vypařuje rychlostí  $5,8 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$  a její koncentrace v okolním vzduchu (nasyčené páry) dosahuje hodnoty  $13 \text{ mg m}^{-3}$ , což je mnohem více než bezpečná koncentrace. Zdrojem par rtuti jsou i amalgamy a jsou-li používány jako zubní výplně, uvolňují tyto toxické páry přímo do lidského těla.

V současné době je toxicita rtuti velmi dobře popsána a v některých zemích jsou přijímána opatření k zamezení používání rtuti v zubním lékařství. Rtuť se do životního prostředí dostává z průmyslových i z přirozených zdrojů. Aktivní sopky jako Etna produkují značné množství Hg (množství úniku rtuti z Etny je asi 27 Mg za rok). Ve vodách najdeme anorganickou formu rtuti a organickou. Z anorganických rozpuštěných forem rtuti zde najdeme hlavně elementární rtuť ( $\text{Hg}^0$ ), dále  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $[\text{HgOH}]^+$ ,  $[\text{Hg}(\text{OH})_2(\text{aq})^0]$ ,  $[\text{Hg}(\text{OH})\text{Cl}]^0$ , chlorokomplexy  $[\text{HgCl}]^+$  až  $[\text{HgCl}_4]^{2-}$  a organokomplexy. Z organických forem je nutné uvést methylderiváty rtuti (např. methylmerkurichlorid- $[\text{CH}_3\text{HgCl}]$  a dimethylrtuť  $[(\text{CH}_3)_2\text{Hg}]$ ). Pokud se anorganicky vázaná rtuť dostane do vodních toků a jezer, pak se díky bakteriím, které normálně redukuje sírany, přeměňuje na  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ . V této formě postupuje  $\text{Hg}^{2+}$  potravním řetězcem nebo se akumuluje v rybách. K akumulaci dochází proto, že rychlost příjmu rtuti živočichy převyšuje rychlost vylučování. Organismy, které jsou v potravním řetězci výše (velké ryby, ptáci živící se rybami, savci včetně člověka), mohou postupně akumulovat potenciálně toxické množství rtuti. Methylrtuťnatý kation je lipofilní a může překonávat hematoencefalickou bariéru oddělující mozkovou tkáň a krevní řečiště. Páry rtuti  $\text{Hg}^0$  se po vniknutí do těla hromadí v ledvinách, mozku a varlatech. Po oxidaci na  $\text{Hg}^{2+}$  i methylrtuťnatý kation snadno koordinují s měkkými S-donory obsaženými v proteinech. Konečným důsledkem otravy rtutí je vážné poškození centrálního nervového systému. Jedním z důvodů vysoké toxicity rtuti je velmi dlouhá doba, po kterou je zadržována v tkáních, např. v ledvinách je asi 65 dnů. Methylrtuť patří mezi nejtoxičtější sloučeniny rtuti vůbec. Organické sloučeniny rtuti mají mimořádně velkou schopnost kumulovat se v organismech a postupovat dále potravním řetězcem, a tak jsou mnohem toxičtější než ty anorganické. Rtuť má jeden z nejvyšších akumulčních koeficientů, který u

některých organismů dosahuje hodnoty  $10^5$ - $10^6$ . Dnes je limitní koncentrace rtuti v pitné vodě podle vyhlášky č. 70/2018  $1 \mu\text{g l}^{-1}$ . [18,22-25]

## 2.5.4 Olovo

Bývalo běžným materiálem pro instalační rozvody. Po zjištění jeho jedovatosti se postupně od používání olova upouštělo. Podobně klesá použití olova v barvách a rovněž olovnatý benzín nahradily bezolovnaté pohonné hmoty. Nejrozšířenější olovněnou rudou je galenit ( $\text{PbS}$ ), méně rozšířenými rudami jsou anglesit ( $\text{PbSO}_4$ ), cerusit ( $\text{PbCO}_3$ ) a hydrocerusit [ $\text{Pb}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$ ]. Galenit nepodléhá na rozdíl od jiných sulfidických rud chemické a biochemické oxidaci, a proto se olovo poměrně málo hromadí v důlních vodách, pokud nejsou přítomné ještě jiné sulfidické rudy, jejichž oxidací vzniká kyselina sírová. V minulosti byly významným antropogenním zdrojem olova výfukové plyny motorových vozidel, obsahující rozkladné produkty  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ , které sloužily jako antidetonační prostředek. Důsledkem toho bylo hromadění olova ve vegetaci, v okolí komunikací a znečištění atmosférických vod a odtud i vod povrchových a podzemních. Při analýze vín z hroznů, které vyrostly mezi lety 1962 až 1991 na vinicích ležících blízko silnic se ukázala zřetelná korelace mezi poklesem obsahu olova ve vínech a zaváděním bezolovnatých benzinů. Dalším zdrojem může být koroze olovněných částí vodovodního potrubí, i tento zdroj přestal již být v našich podmínkách významný, protože vývoj směřuje k potrubí ocelovému, měděnému nebo plastovému. Ve vodě v olovném potrubí lze dokázat i přes  $100 \mu\text{g}$  olova v 1 litru. Dalším zdrojem olova mohou být odpadní vody ze zpracování rud, barevné metalurgie, z výroby akumulátorů a ze sklářského průmyslu, kde jsou sloučeniny olova součástí glazur. Oxidy olova mají velký technický význam, minium ( $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ) se používá jako pigment a korozivzdorný nátěr na ocel a železo. Zdaleka největší množství olova se spotřebuje na výrobu olovných akumulátorů. Olovné akumulátory se používají nejen v průmyslu, ale také jako zdroje energie pro průmyslové vysokozdvíhací vozíky, důlní tahače, vozidla letištních pozemních služeb a jako nezávislé zdroje elektrické energie například v nemocnicích.

Soli olova jsou extrémně toxické. Požití rozpustné soli olova způsobí akutní otravu, dlouhodobý styk s předměty, které obsahují olovo nebo jsou natřeny barvami obsahujícími olovo či např. pití vody ze starého olovného vodovodního potrubí může vést k chronické otravě. Olovo má vysoký akumulací koeficient a významně se proto hromadí nejenom v

plaveninách, sedimentech a kalech, ale i v biomase mikroorganismů rostlin. Pro svou toxicitu je ve vodě velmi závadné. Ve vodním prostředí se olovo hromadí především v sedimentech dna, kde je jeho obsah zhruba o 4 řády vyšší ve srovnání s koncentrací ve vodě. Organoolovičité sloučeniny používané jako antidetonační přísada do benzinů (např.  $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ ) poškozují nervový systém. Toxicita olova spočívá ve schopnosti tvořit velmi silnou vazbu se skupinou  $-\text{SH}$  v thiolech, které jsou součástí některých enzymů, v inhibici tvorby hemoglobinu, negativním působení na červené krvinky, nervový systém aj. Děti předškolního věku jsou citlivější než dospělí jedinci. Chronické onemocnění olovem má nejasné symptomy a obtížně se diagnostikuje. Olovo působí neurotoxicky a považuje se za potenciální karcinogen. Typickými příznaky otravy olovem jsou bledost obličeje a rtů, zácpa a nechut' k jídlu, kolika, anemie, bolesti hlavy, křeče, poškození mozku a poruchy centrálního mozkového systému. Hlavní problém olova spočívá v tom, že si ho organismus „plete“ s vápníkem a ukládá ho na stejná místa jako vápník, zejména do kostí. Léčení spočívá v tvorbě komplexu a maskování Pb silným chelatačním činidlem, např. maskovací činidlo jako je  $\text{EDTA}^{4-}$  se používá k vázání  $\text{Pb}^{2+}$  v těle do komplexu a k jeho následnému vyloučení. Dnes je limitní koncentrace olova v pitné vodě podle vyhlášky č. 70/2018  $10 \mu\text{g l}^{-1}$ . [18,22-25]



## 2.6 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

ICP-MS je víceprvková (pozn. dokáže analyzovat také jen jeden prvek) analytická metoda která má v současnosti pro většinu prvků nejnižší limity detekce ze všech běžných analytických metod (viz. tab. IV), navíc s velkým koncentračním rozsahem stanovení. Metodou se v současnosti stanovuje většina kovových prvků, ale metodou nelze stanovit F, He a Ne, tyto prvky se v plazmatu dostatečně neionizují, proto nemohou být analyzovány v hmotnostního spektrometru. ICP-MS je dnes nepochybně nejrychleji se rozvíjející metodou pro stanovení stopových prvků, která je na trhu k dispozici. Od zavedení metody na trh roku 1983 bylo nainstalováno něco přes 20 000 různých systémů ICP-MS po celém světě pro mnoho různých rozmanitých oborů (např. biomedicínu, analytickou chemii, environmentální obory, geologické obory, aj.). Od roku 2015 se metoda ICP-MS více rozšířila i ve farmaceutických oborech, protože se ve světě v posledních letech přijímají nové



předpisy k omezování těžkých kovů. Metoda se stále vyvíjí, díky její schopnosti provádět rychlá víceprvková stanovení při ultrastopových koncentracích (řádově  $\mu\text{g l}^{-1}$  až  $\text{ng l}^{-1}$ ). Metoda dokáže určit prakticky identické prvky jako jiné metody atomové spektrometrie (jako např. FA-AAS, ETA-AAS) a ICP-OES. ICP-MS má ovšem oproti těmto technikám jasné výhody ve víceprvkových charakteristikách, a to např. v rychlosti analýzy, detekčním limitu a izotopové analýze. [26-29]

**Tabulka IV** Srovnání mezi detekce ICP-MS oproti FA-AAS a ICP-OES v  $\mu\text{g l}^{-1}$  [28]

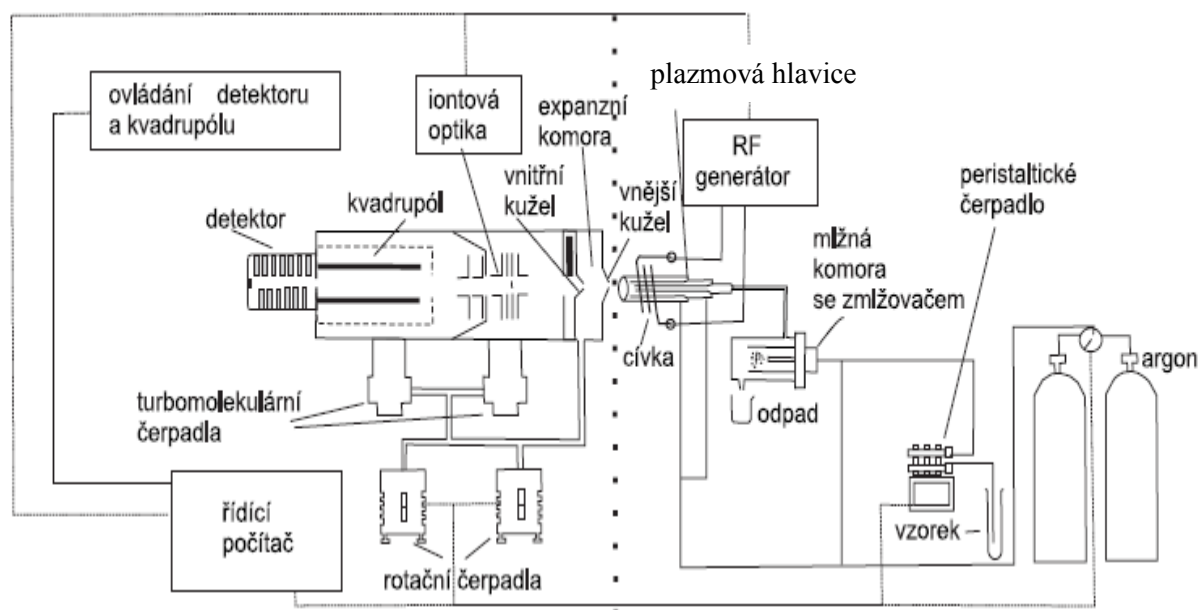
	<b>FA-AAS</b>	<b>ICP-OES</b>	<b>ICP-MS</b>
As	150	2	0,006
Cd	0,8	1	0,003
Hg	300	1	0,016
Pb	15	1	0,00004

### 2.6.1 Princip metody

Principem ICP-MS je vnášení analytického vzorku do plazmového hořáku, ve kterém je ve vysokofrekvenčním elektromagnetickém poli udržováno plazma o teplotě asi 6 000 až 10 000 K. Do analytického kanálu plazmatu je vnášen aerosol vzorku, který je vysušen, a následně vypařen, účinně atomizován a ionizován. Ionty z analytického kanálu vstupují malým otvorem ve vnějším kuželu (sampleru) do předvakua a z tohoto plazmového paprsku prochází část malým otvorem ve vnitřním kuželu (skimeru) do vakua hmotnostního spektrometru s elektromagnetickými čočkami, příp. i kolizní celou. Fokuzovaný svazek iontů z iontové optiky vstupuje do analyzátoru, který přefiltruje z iontového svazku pouze ionty o zvoleném poměru  $m/z$ . Po průchodu analyzátozem dopadají ionty na detektor, ten převádí proud iontů na elektrický signál (např. pomocí elektronového násobiče). [26-29]

## 2.6.2 Instrumentace

Základní schéma přístroje ICP-MS je na Obr. 1.



**Obrázek 1** Blokové schéma ICP-MS, upraveno z [30]

### ***Vnášení vzorku do ICP-MS***

Pevné látky jsou nejčastěji převáděny do roztoků přímo nebo po vytavení či mineralizaci. Kapalně vzorky jsou zmlžovány a vnášeny do plazmatu ve formě aerosolu, ten se tvoří v tzv. zmlžovači. Vzorek je načerpán do zmlžovače pomocí peristaltického čerpadla. Mlžná komora slouží k získání aerosolu, který má velmi malé částice. Mlžné komory se vyrábějí z odolného plastu nebo křemene, který je chemicky odolný i k silným kyselinám, jako je např.  $\text{HNO}_3$ . Vzorek dále vstupuje do plazmové hlavice, kde je odpařen. [26-29]

### ***Plazmová hlavice***

Plazmové hlavice pro klasické optické i hmotnostní spektrometry jsou v zásadě shodné, avšak na rozdíl od ICP-OES je plazmová hlavice u ICP-MS orientována vždy horizontálně v ose dalšího směru zpracování iontů. Teploty zde dosahují hodnot 6000 až 10 000 K. Vzorek je odpařen, disociován, atomizován a ionizován, takže z ústí plazmové hlavice vystupuje směs atomů a iontů spolu s fragmenty molekul, neodpařených částic vzorku a velkého množství argonu. Tato směs je dále vedena přes rozhraní do vlastního hmotnostního spektrometru. [26-29]

Definice plazmatu: Plazma je kvazineutrální plyn nabitých a neutrálních částic vykazující kolektivní chování. Kvazineutralita je stav blízký neutralitě-zvenku plyn vypadá jako elektroneutrální, celkový počet kladně a záporně nabitých částic je prakticky stejný. Kolektivní chování pak znamená, že nabité částice ovlivňují chování dalších nabitých částic na poměrně dlouhou vzdálenost. Někdy se o plazmatu mluví jako o čtvrtém stavu hmoty. [31]

### ***Rozhraní (interface)***

Rozhraní je umístěno mezi iontovým zdrojem a hmotnostním spektrometrem. Rozhraní je v přímém styku s plazmatem, a proto je jednou z nejdůležitějších a nejvíce namáhaných součástí ICP-MS přístroje. Zajišťuje efektivní oddělení hlavního toku argonu, toku atomů a iontů analyzovaného vzorku. Obvykle je tvořeno dvěma kužely, v jejichž vrcholech jsou malé otvory o průměru kolem 1 mm. Dvoustupňové rozhraní je pak tvořeno vnějším a vnitřním kuželem, vyrobených z tepelně vodivých materiálů (např. z Ni, Cu, Al, Pt) chlazených vodou. Kužely jsou demontovatelné kvůli snadnému čištění. Jejich životnost závisí především na matrici vzorku. [26-29]

### ***Iontová optika***

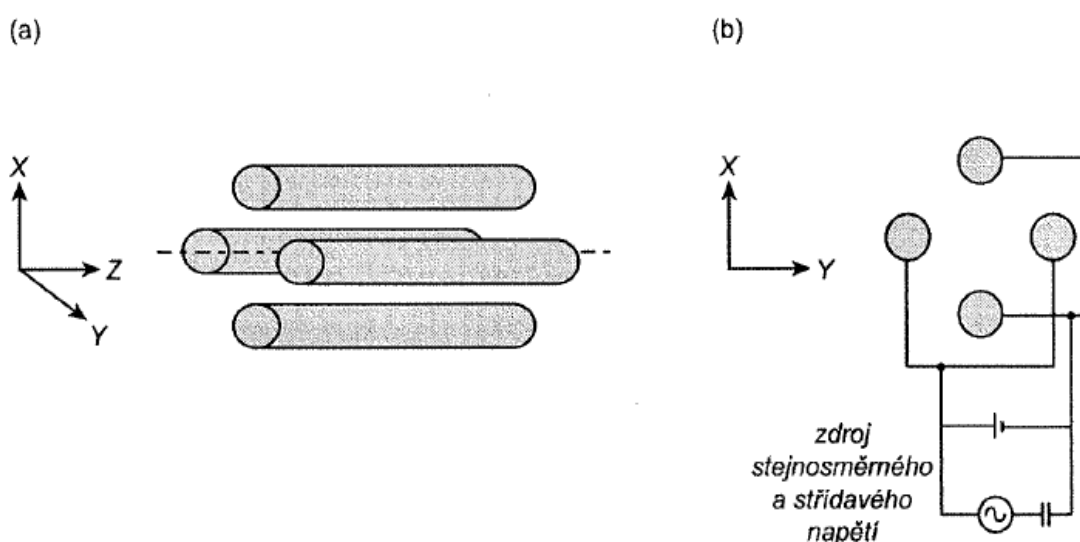
Po opuštění druhého kuželu je plynový paprsek silně divergentním proudem iontů, elektricky nenabitých atomů (Ar, O, H aj.) a fotonů. Před vstupem do analyzátoru iontů je nutno získat kolineární proud iontů, ze kterého jsou separovány fotony, elektroneutrální částice a část iontů, které by mohly zvyšovat pozadí (šum) detektoru iontů. Protože všechny elektricky neutrální částice neovlivňuje elektromagnetické pole, stačí k jejich odstranění umístit do dráhy mechanickou překážku (např. kovový terčik) a fotony i nenabitě částice se na ní zastaví. Analyzované ionty se pak vychýlí po přesně tvarovaném elektrickém poli (iontové čočky), které usměrňuje tok iontů tak, aby se vyhnuly této mechanické překážce a zároveň vytvořily kolineární proud iontů. [26-29]

### ***Analyzátor iontů***

Pro rozdělení jednotlivých iontů podle jejich relativní atomové hmotnosti, resp. poměru  $m/z$  slouží tzv. analyzátor iontů. Většina přístrojů ICP-MS využívá kvadrupólový (Q-MS) analyzátor. Dále se používá průletový analyzátor (TOF) či magnetický sektorový analyzátor. [26-29]

## 1) Kvadrupólový analyzátor (Q-MS)

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor je oblíbený pro svou jednoduchost a nízkou cenu. Většinou je složen ze 4 tyčí kruhového průřezu o délce 20 až 30 cm (viz Obr. 2). Analyzátor pracuje na principu filtru, podél jehož osy mohou projít jen ionty o určitém poměru  $m/z$ . Na dvě protilehlé elektrody je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na zbyvající dvě záporné stejnosměrné napětí. Ionty jsou v kvadrupólu rozkmitány tak, že při určitém napětí a frekvenci radiových vln na elektrodách kvadrupólu projdou pouze ionty o vybraném poměru  $m/z$ . Propouštěná hmotnost (resp. poměr  $m/z$ ) je lineárně závislá na elektrickém potenciálu elektrod. Tím je umožněno jednoduché a rychlé skenování přes celý používaný obor  $m/z$ , resp. vybraného rozsahu  $m/z$ . Střídavá složka se vkládá na všechny 4 tyče. [26-29]

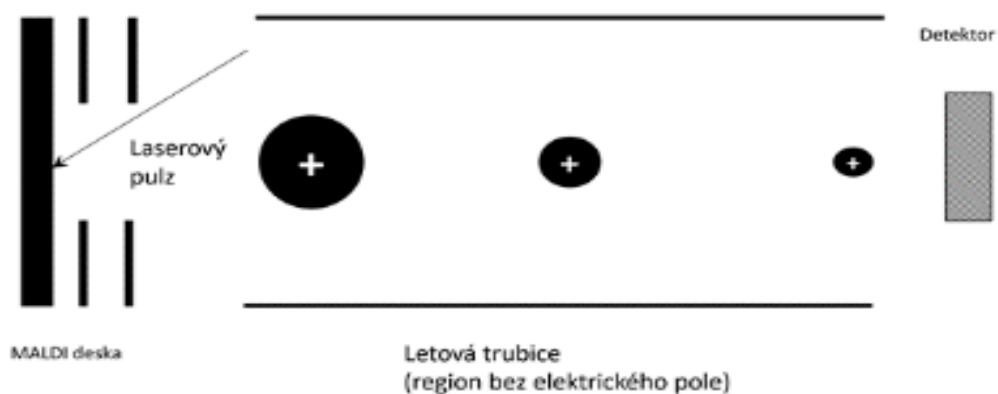


**Obrázek 2** Schéma uspořádání tyčí kvadrupólového analyzátoru: a) čerchovaně je vyznačena osa kvadrupólu a zároveň osa trajektorie letu iontů mezi iontovým zdrojem a detektorem, b) společné zapojení 2 protilehlých tyčí [32]

## 2) Průletový analyzátor (TOF)

Princip separace iontů v režimu doby doletu je následující. Ionty jsou po fokusaci iontovou optikou přiváděny do akcelérátoru. V akcelérátoru jsou ionty urychleny v elektrostatickém poli, přičemž okamžitá rychlost při výstupu z akceleračního pole je nepřímo úměrná hmotnosti iontů. Následně ionty vstupují do průletové části, ve které se pohybují přímo k detektoru částic (viz Obr. 3). Měření spekter je zde velice rychlé a

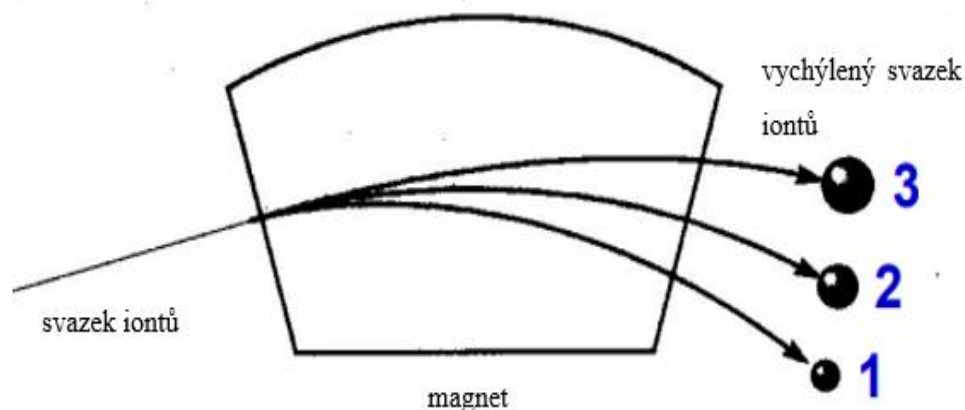
hmotnostní rozsah poměru  $m/z$  zde není teoreticky omezen, záleží pouze na době, po kterou budeme čekat na dopad iontů. Rozlišovací schopnost analyzátoru doby doletu není příliš vysoká. Můžeme ji zlepšit použitím např. iontového zrcadla nebo opožděné extrakce iontů. [26-29]



**Obrázek 3** Schéma analyzátoru doby doletu (TOF) [33]

### 3) Magnetický sektorový analyzátor

Z historického hlediska je magnetický sektorový analyzátor první široce používaný analyzátor. Dnes se používá pouze pro speciální aplikace. Ionty vytvořené v iontovém zdroji jsou urychlovány do magnetického pole analyzátoru. Zakřivení dráhy letu iontů s daným poměrem  $m/z$  souvisí s intenzitou magnetického pole. Ionty s odlišnými poměry  $m/z$  lze dělit a detekovat užitím změn magnetického pole. Popis zakřivení dráhy iontů je následující: Při průchodu iontů magnetickým polem se zakříví dráha letu iontů tak, že větší zakřivení má ten ion, který má nižší hodnotu poměru  $m/z$ . Pozn. dráhy těžších iontů se tak moc nezakříví, protože mají větší odstředivou sílu (viz Obr. 4). [26-29]

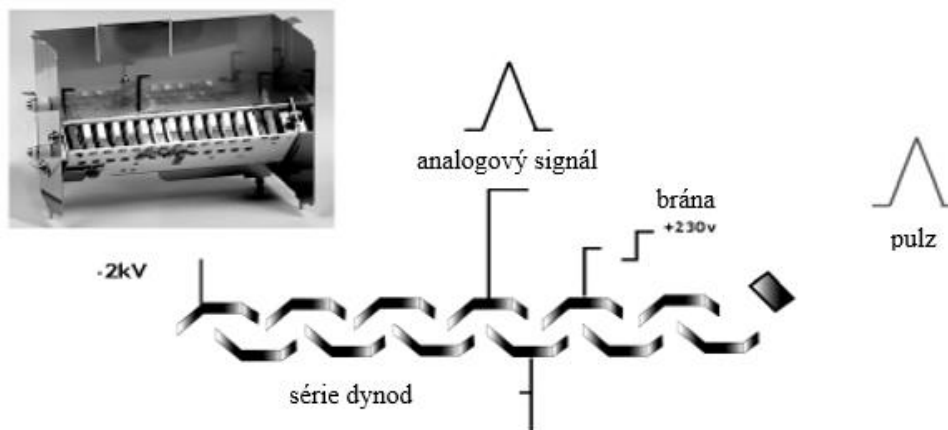


**Obrázek 4** Princip magnetického sektorového analyzátoru s jednoduchou fokusací, upraveno z [34]

V ICP-MS se používá sektorový analyzátor s dvojí fokusací. K magnetické fokusaci iontů je zde přidána ještě elektrostatická fokusace kvůli zaostření iontů. Díky elektrostatické fokusaci dojde ke značnému zvýšení rozlišovacích schopností přístroje. Princip analyzátoru je následující: Pokud do elektrického pole vstoupí ionty s různou kinetickou energií a poměrem  $m/z$ , dojde k zakřivení jejich dráhy v závislosti na jejich kinetické energii, bez ohledu na hodnotu  $m/z$ . Zakřivení dráhy značně zlepšuje mez detekce, rozlišení a preciznost přístroje.

### **Detektory**

Detektor je zařízení, které u iontů zachycených na hmotnostním analyzátoru převádí signál do digitální podoby. U hmotnostního spektrometru se používají různé druhy detektorů, jako je např. Faradayův kelímek, elektronový násobič s kontinuální dynodou, elektronový násobič s diskrétními dynodami, kombinace scintilátoru a fotonásobiče. Dnes je nejběžnějším detektorem elektronový násobič s diskrétními dynodami. Elektronový násobič je prakticky fotonásobič bez ochranné baňky. Ionty dopadají na povrch první dynody, ze které uvolní 1 až 2 elektrony. Ty jsou urychleny k další dynodě, zde se proces opakuje. Elektrony mohou být zesíleny až  $10^8$ krát (viz Obr. 5).



**Obrázek 5** Elektronový násobič, upraveno z [3]

### 2.6.3 Rušivé vlivy (interference)

U ICP-MS rozlišujeme 2 druhy interferencí, za prvé to jsou spektrální interference a za druhé nespektrální interference. Každá interference má potenciál být sama o sobě problematická, ale při použití moderního vybavení a dobrého softwaru v kombinaci s optimalizovaným postupem práce můžeme minimalizovat jejich negativní dopad na výsledek dané analýzy. Spektrální interference jsou z těchto interferencí ty nejzávažnější. Nejběžnější spektrální interference jsou tzv. polyatomické a molekulární spektrální interference, ty jsou způsobeny reakcí různých iontů mezi sebou, např. reakcí inertního plynu (Ar) s kyslíkem (O<sub>2</sub>) v rozpouštědle vzorku vzniká interference  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ . Tyto interference můžeme kompenzovat použitím např. tzv. chladného plazmatu, kolizní cely nebo trojitého kvadrupólu. Nespektrální interference můžeme kompenzovat použitím vnitřních standardů. [26-29]

### Chladné plazma

Jedním z přístupů, který pomohl omezit některé z těžkých polyatomických překryvů, je použití chladného plazmatu. Chladné plazma je vlastně nastavení nízkoteplotních podmínek pro plazma, ty mají za následek minimalizaci tvorby určitých polyatomických sloučenin, založených na Ar. Použitím chladných podmínek pro plazma (nižší příkon do cívky a vyšší průtokové rychlosti ve zmlžovači) se ionizační podmínky v plazmatu mění tak, že velké množství interferencí se dramaticky sníží. Výsledkem je, že meze detekce jsou výrazně vylepšeny. [26-29]

## **Kolizní cela**

Kolizní cely využívají kolize a reakce ion-molekula k očištění iontového paprsku od škodlivých polyatomických a molekulárních interferencí před vstupem do hmotnostního analyzátoru. Kvadrupólové hmotnostní analyzátory vybavené kolizní celou vykazují enormní potenciál k eliminaci mnoha spektrálních interferencí. [26-29]

## **Trojité kvadrupólový analyzátor (QqQ)**

V porovnání s klasickou sestavou ICP-MS spektrometru (kolizní cela, kvadrupólový analyzátor) má trojitý kvadrupólový analyzátor navíc ještě jeden kvadrupól. Tyto 3 kvadrupóly jsou řazeny za sebou. Prostřední kvadrupólový analyzátor (q) slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem (např. O<sub>2</sub>) a tedy pomáhá eliminovat spektrální interference. [26-29]

## **2.7 Další metody pro stanovení těžkých kovů**

V dnešní době se v analytické praxi využívá mnoho metod pro stanovení těžkých kovů od spektrálních až po elektrochemické. Metody atomové absorpční spektrometrie (FA-AAS a ETA-AAS) se využívají pro široké spektrum vzorků, od biologických až po environmentální. Další metoda je pak ICP-OES. Výhoda AAS je v jednoduchosti metody, vysoké selektivitě, dobré provozní a cenové dostupnosti. Na druhou stranu nevýhody jsou vyšší meze detekce. Mez detekce pro metodu ETA-AAS je asi o 2-3 řády nižší, vyžaduje ale zkušenost obsluhy. U AAS se provádí tzv. sekvenční analýza, při níž se každý prvek analyzuje zvlášť. Výhodou ICP-OES a FA-AAS je především jejich automatizace, takže instrument může být obsluhován méně zkušeným pracovníkem, metody jsou velice jednoduché. Další výhodou ICP-OES a ICP-MS je možnost tzv. simultánní analýzy, při níž se analyzuje více prvků najednou a vynikající metrologické parametry: mez detekce, preciznost, stabilita a dynamický rozsah (zejména ICP-MS). Nevýhodou jsou vysoké provozní a pořizovací náklady. [35]

Mimo spektrální metody je dnes snaha i nadále využívat metody elektrochemické, které detekují anorganické i organické látky. Jsou rychlé, levné a mají nízké meze detekce. Jednou z nejcitlivějších analytických metod pro analýzu kovů je diferenční pulzní anodická rozpouštěcí voltametrie (DPASV). Podstatou elektrochemických metod je sledování závislosti elektrochemického chování roztoku na jeho složení či koncentraci. Sleduje se



elektrochemický článek, což je soustava, v níž je analyzovaný roztok v kontaktu s elektrodami. Prostřednictvím elektrod se zprostředkuje spojení mezi roztokem a měřícím přístrojem, který sleduje některé z elektrických veličin (proud  $I$ , potenciál  $E$ , vodivost  $G$ , elektrický náboj  $Q$ , kapacitu  $C$ , aj.). Ve vědeckém článku [37] bylo autory stanoveno ve 4 doplňcích stravy na bázi hub množství Zn, Cd, Pb a Cu. Autoři využívali ke stanovení kovů metodu DPASV. Meze detekce a stanovitelnosti byly pro Cd  $0,24 \mu\text{g l}^{-1}$  a  $0,72 \mu\text{g l}^{-1}$  a pro Pb  $3,17 \mu\text{g l}^{-1}$  a  $9,54 \mu\text{g l}^{-1}$ . [27,36]

## **2.8 Literární rešerše**

V rámci této kapitoly byly vyhledány některé novější vědecké články, které souvisí s problematikou stanovení množství kovů v doplňcích stravy. Do tabulky V byly přehledně uvedeny a porovnány základní informace, které jsem z těchto vědeckých článků vypsál. Byly to např. tyto informace: metoda stanovení, stanovené prvky, počet analyzovaných doplňků stravy a další.

**Tabulka V** Porovnání informací z vědeckých článků, které se zabývají stanovením kovů v doplňcích stravy (zkratka d.s.) [37-43]

Metoda stanovení	Analyzované prvky	Informace o doplňcích stravy	Příprava vzorku	Zhodnocení	Článek
ETA-AAS, HG-AAS	As, Cd, Hg, Pb	30 d.s. (Chorvatsko), různý původ a forma	MR - 1g vz. + HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	u Hg 16 z 30 d.s. překročilo limit 0,03 mg kg <sup>-1</sup>	2003 [37]
TDA-AAS, ICP-MS	As, Cd, Cr, Hg, Pb	12 d.s. (Itálie), rostlinný původ ve formě tablet a sušených rostlin	MR - vz. + HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HF	1 d.s. překročil limit 3 mg kg <sup>-1</sup> pro Pb (3,92 mg kg <sup>-1</sup> )	2013 [38]
HPLC-ICP-MS	As – celkový a anorganický (aAs)	16 d.s. (Dánsko), rostlinný původ, různá forma	MR - 0,5g vz. + HNO <sub>3</sub>	LOD = 0,006 mg kg <sup>-1</sup> pro celkový As, 9 z 9 d.s. překročovalo český limit pro aAs 0,3 mg kg <sup>-1</sup>	2013 [39]
ICP-MS	As – celkový	21 d.s. (Španělsko), z hub ve formě kapslí	MR - 0,1g vz. + HNO <sub>3</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	LOD = 20 ng l <sup>-1</sup> pro As koncentrace As bezpečná, bez toxikol. rizik	2014 [40]
ICP-MS	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb a Zn	20 d.s. (Rumunsko), zvířecí, rostlinný a minerální původ	MR - vz. + HNO <sub>3</sub> + HCl	14 d.s. překročilo limity pro Cd viz. tab. II, Cd stanovené v rybím tuku překročilo limit 166krát	2017 [41]
MIP-OES, FA-AAS	Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na a Zn Cd, Cr <sup>6+</sup> , Ni a Pb	168 vícesložkových d.s. (EU), různé druhy a formy	Rozpouštění v HCl, HNO <sub>3</sub> a fosfátovém pufu (podmínky v žaludku)	všechny d.s. obsahující Pb (11) překročily limit 3 mg kg <sup>-1</sup> , z toho 2 d.s. překročily limit několikanásobně	2018 [42]
PVG-AFS, ICP-MS,	Hg – celková a její sloučeniny	38 d.s., rybí tuk ve formě tobolek a roztoku	Extrakce L-L, MR - 0,5ml vz. + HNO <sub>3</sub>	pro Hg <sup>2+</sup> a CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup> LOD = 0,50-0,63 ng ml <sup>-1</sup> (ICP-MS), dle obsahu Hg jsou d.s. s rybím tukem bezpečnější než samotné ryby	2018 [43]

### 2.8.1 Příprava vzorku k analýze metodou ICP-MS

Při přípravě vzorku k analýze pomocí metody ICP-MS se využívají různé přístupy k rozložení doplňku stravy. Doplněk stravy ve formě např. tablety se musí nejprve zvážit, potom rozdrtit a znovu zvážit. U drcení se může použít buď 1 tableta nebo se k analýze odebere zlomek tablet ze zakoupeného produktu (např. 10 tablet ze 100). Tablety se rozdrť v třecí misce s pomocí tloučku, homogenizují se a vysuší v sušárně. Vzorek se nejprve naváží do speciálních teflonových kelímků, následně se musí rozložit pomocí MM. Ke vzorku se přidá obecně ultračistá anorganická koncentrovaná kyselina nebo směs kyselin (nejčastěji to jsou např.  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HF}$ ), v některých případech se ke vzorku přidává ještě oxidační činidlo, např. peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Teflonový kelímek s roztokem analytu se vloží do MM a vzorek se za přednastavených podmínek rozloží. Po dokončení rozkladu se vzorek vytáhne z MM a nechá se vychladnout. Vzorek se kvantitativně převede z teflonového kelímku do odměrné baňky a doplní se po rysku ultračistou demineralizovanou vodou. Vzorek je připraven k analýze. [37-43]

## 2.9 Validace postupu měření

Koncept ověřování (verifikace) je úzce spjat s konceptem validace. Validace je ověření nebo kontrola, že daná „položka“, např. postup měření nebo měřidlo, je vhodná pro zamýšlený účel. Analytik tedy získá data, jež dokazují, že výkonnost postupu měření odpovídá účelu určenému zákazníkem. To se posuzuje určením, zda jsou „specifikované požadavky“-výkonnostní kritéria, jako jsou např. měřicí interval, selektivita, pravdivost, preciznost a nejistota měření, splněny. [44]

### 2.9.1 Výkonnostní parametry

#### *Měřicí interval*

Je soubor hodnot veličin stejného druhu, které mohou být měřeny daným měřidlem nebo měřicím systémem se specifikovanou přístrojovou nejistotou za definovaných podmínek. Uvnitř měřicího intervalu lze veličiny (např. hmotnostní koncentraci) uvedeným postupem měření měřit se stanovenou nejistotou. Dalšími výrazy používanými pro tento pojem jsou „pracovní rozsah“, „měřicí rozsah“ a „rozsah“. Za dolní mez měřicího interval se často považuje mez stanovitelnosti (LOQ). Horní mez se obvykle určí podle nepřijatelné změny nejistoty měření nebo citlivosti. [44]

### ***Linearita***

Je to schopnost analytické metody poskytovat výsledky, které jsou úměrné koncentraci (množství) analytu ve vzorku. [45]

### ***Mez detekce (LOD)***

LOD je naměřená hodnota veličiny získaná daným postupem měření, pro kterou je pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o nepřítomnosti složky v materiálu  $\beta$ , přičemž pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o její přítomnosti je  $\alpha$ . LOD pro postup měření se dá vypočítat násobením směrodatné odchylky (získané z výsledků analýzy slepého vzorku nebo vzorku obsahujícího nízkou koncentraci analytu) s příslušným faktorem (typicky 3 a 5). Násobící faktor má svůj statistický základ. Typickým záměrem při určování LOD je stanovení nejnižší koncentrace analytu přítomného ve vzorku, kterou lze pro daný postup měření detekovat s předepsanou spolehlivostí. Definování LOD je proces sestávající ze dvou kroků. Nejprve sestavíme „kritickou úroveň“. Ta je nastavená tak, že v případě, kdy vzorek neobsahuje žádný analyt, není pravděpodobnost získání výsledku měření převyšujícího kritickou úroveň větší než  $\alpha$ . Kritická úroveň nastavuje kritérium pro tvrzení, že vzorek je „pozitivní“. Běžně se používá pravděpodobnost falešného pozitivního výsledku  $\alpha = 0,05$ , což vede ke kritické hodnotě přibližně  $1,65s$  (kde  $s$  je směrodatná odchylka velkého množství výsledků slepého vzorku nebo vzorku obsahujícího nízkou koncentraci analytu a  $1,65$  je jednostranná kritická hodnota). [44]

### ***Mez stanovitelnosti (LOQ)***

LOQ je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze s přijatelnou nejistotou určit na základě stanovených podmínek testu. Mez stanovitelnosti se často považuje za dolní mez měřicího intervalu.[44]

### ***Pravdivost (přesnost) měření***

Ve VIM je pravdivost definována jako těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnoty veličiny. Pravdivost měření vyjadřuje hypotetickou schopnost postupu měření dosáhnout výsledky blízko očekávané referenční hodnoty veličiny, jako je hodnota certifikovaného referenčního materiálu. Pravdivost není veličina, a proto nemůže být vyjádřena číselně. Pravdivost je však nepřímo úměrná systematické chybě měření, která může být odhadnuta vychýlením měření. Vychýlení lze také uvádět jako poměr naměřené a referenční hodnoty

veličiny. Vychýlení měření může být např. důsledkem nevhodné kalibrace nebo nedostatečné selektivity. [44]

### ***Preciznost měření***

Je těsnost shody mezi indikacemi nebo naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo podobných objektech za specifikovaných podmínek.

Preciznost měření se vztahuje na náhodnou chybu měření a je mírou blízkosti výsledků. Výsledek měření nelze opravit tak, aby se odstranil vliv náhodné chyby, lze ale snížit velikost náhodné chyby opakovaným měřením a výpočtem průměrné hodnoty. Preciznost měření se číselně vyjadřuje mírami nepřeciznosti, jako je směrodatná odchylka vypočtená z výsledků opakovanými měřeními vhodného materiálu za specifikovaných podmínek. Jsou definovány tři podmínky měření: podmínka opakovatelnosti, podmínka mezilehlé preciznosti a podmínka reprodukovatelnosti. Odhady opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti měření lze získat v jediné laboratoři. Podmínka opakovatelnosti měření se vztahuje na měření uskutečněné na stejném materiálu jedním analytikem s použitím stejného postupu za stejných podmínek v krátkém časovém období. Za podmínky mezilehlé preciznosti se měření provádí na stejném materiálu s použitím stejného postupu, ale po delší dobu s různými analytiky, kteří mohou používat různé vybavení. Podmínka reprodukovatelnosti měření se vztahuje na měření uskutečněná na stejném materiálu různými analytiky pracujícími na různých místech. [44]

### **2.9.2 Detailnější postup validace**

Při validaci metody zaměřené na stanovení těžkých kovů v doplňcích stravy se jako vhodný přístup jeví návod v dokumentu ICH-Q2(R1) [45]. Předmětem validace bude analytická metoda ICP-MS, kterou budou stanovovány těžké kovy As, Cd, Hg a Pb ve dvou doplňcích stravy (Hlíva ústříčná 100 % a Ostropestřec mariánský). Metoda stanovení obsahu těžkých kovů se řadí mezi kvantitativní metody stanovení nečistot. V souladu s dokumentem ICH Q2(R1) (Validation of analytical procedures) byly pro ověření vhodnosti dané metody vybrány následující validační parametry:

### ***Linearita***

Pro stanovení linearity se proměří roztoky kalibračních standardů (CRM As, Cd, Hg, Pb) o 7 koncentrací spolu se slepým pokusem. Korelační koeficient musí být větší nebo roven 0,99. [45]

### ***LOD, LOQ***

Stanovení LOD a LOQ záleží na tom, jestli se ke stanovení nečistot použije instrumentální metoda nebo ne. LOD a LOQ se vypočítají z analýzy vzorků se známými koncentracemi analytu a stanovením minimální úrovně, na které může být analyt spolehlivě detekován. Ještě před samotnou analýzou doplňků stravy se rozloží směs HNO<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, která se bude metodou ICP-MS analyzovat na přítomnost těžkých kovů As, Cd, Hg a Pb. Z těchto 6 slepých pokusů se budou určovat LOD a LOQ pro každý těžký kov. [44-45]

### ***Pravdivost (přesnost)***

Analýzou 12 vzorků s přidavkem směsného roztoku standardů (CRM As, Cd, Hg, Pb) na třech koncentračních hladinách, 3 vzorků s přidavkem směsného roztoku na hladině 0,5J, 6 vzorků na hladině 1,0J a 3 vzorků na hladině 1,5J se stanoví průměrné hodnoty měření. Z průměrných hodnot měření vzorků s přidavkem směsného roztoku standardů a limitních hodnot pro těžké kovy na dané koncentrační hladině se vypočítá výtěžek, který představuje pravdivost. [44-45]

### ***Preciznost***

Analýzou 6 vzorků, do kterých se přidá známý objem směsného roztoku standardů (CRM As, Cd, Hg, Pb) na koncentrační hladině 1,0J, se stanoví průměrná hodnota a směrodatná odchylka (SD) pro hladinu 1,0J. Ze SD a průměrné hodnoty měření pro hladinu 1,0J se následně vypočítá relativní směrodatná odchylka (RSD). Z RSD se stanoví preciznost. [44-45]

### ***Vzorek***

Těžké kovy As, Cd, Hg, Pb v doplňcích stravy Hlíva ústřičná 100 % a Ostropestřec mariánský se budou měřit pro 6 vzorků. Vhodné množství vzorku se zředí v odměrné baňce, pokud to je nutné, nejprve se ke vzorku přidá směs HNO<sub>3</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a pak se vzorek rozloží v MM. Následně se roztok analytu kvantitativně převede do odměrné baňky a zředí se. Vzorek je připraven k analýze. [45]

## 3 Experimentální část

### 3.1 Validační protokol

Validační protokol, který obsahuje podrobný popis postupu validace jednotlivých validačních parametrů, se připravuje před samotnou validací. Podle validačního protokolu se potom provádí samotná validace v laboratoři. Výkonnostní parametry budou validovány tímto způsobem:

#### *Měřicí interval*

Měřicí interval je rozsah analytického postupu mezi horní a dolní koncentrací analytu ve vzorku, a to včetně těchto koncentrací. Stanovený rozsah měřicího intervalu bude u naší analýzy konkrétně od LOQ do 500  $\mu\text{g l}^{-1}$  s využitím 7 kalibračních standardů o hmotnostních koncentracích: 0,5 1,0 5,0 10,0 50,0 100,0 500,0  $\mu\text{g l}^{-1}$  a slepého pokusu. Kalibrační standardy budou připraveny postupným ředěním CRM do 25 ml baněk a z důvodu přiblížení se k matici vzorků budou okyseleny pomocí přídatku 69 %  $\text{HNO}_3$ . [44-45]

#### *Linearita*

Linearita bude vyhodnocena jednak vizuální kontrolou grafu jako funkce koncentrace a jednak pomocí hodnot korelačního koeficientu. Pokud existuje lineární vztah, měly by být výsledky testů vyhodnoceny vhodnými statistickými metodami (např. výpočtem regresní přímky metodou nejmenších čtverců). V našem případě se stanoví linearita tak, že se proměří roztoky kalibračních standardů pro As, Cd, Hg, Pb o 7 koncentrací (0,5 1,0 5,0 10,0 50,0 100,0 500,0  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) spolu se slepým pokusem. Korelační koeficient zde musí být pro každou přímku  $\geq 0,99$ . [45]

#### *Mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ)*

LOD a LOQ se stanoví analýzou vzorků se známými koncentracemi analytu a stanovením minimální úrovně, na které může být analyt spolehlivě detekován. Ještě před samotnou analýzou doplňků stravy Hlíva ústříčná 100 % a Ostropestřec mariánský se proměří 6 slepých vzorků (rozloží se směs  $\text{HNO}_3$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pro každý doplněk stravy. Z těchto 6 slepých pokusů se budou určovat LOD a LOQ pomocí následujících vzorců [44-45]:

$$LOD = \frac{3 \cdot s}{k} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s}{k} \quad (3)$$

kde  $s$  ... směrodatná odchylka z opakovaných analýz slepého pokusu,  $k$  ... směrnice kalibrační přímky ( $y = k \cdot x + q$ )

### ***Pravdivost (přesnost)***

Analýzou 12 vzorků daného doplňku stravy, 3 vzorků s přidavkem směsného roztoku standardů (CRM As, Cd, Hg, Pb) na hladině 0,5J, 6 vzorků na hladině 1,0J a 3 vzorků na hladině 1,5J se stanoví průměrné hodnoty obsahu těžkých kovů v doplňku stravy. Z průměrných hodnot obsahu těžkých kovů čistých vzorků, vzorků s přidavkem těžkých kovů a limitních hodnot pro těžké kovy (viz tab. VI) na dané koncentrační hladině se vypočítá výtěžek, který představuje pravdivost. Výtěžek musí být v intervalu 70–150 %. [44-45]

### ***Preciznost***

Opakovatelnost je preciznost výsledků analýz provedených za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost bude hodnocena na základě minimálně 6 stanovení při 100% testované koncentraci (hladina 1,0J). Analýzou 6 vzorků, do kterých se přidá známý objem směsného roztoku standardů (CRM As, Cd, Hg, Pb) na koncentrační hladině 1,0J, se stanoví průměrná hodnota a směrodatná odchylka (SD) pro hladinu 1,0J. Ze SD a průměrné hodnoty měření obsahu těžkých kovů ve vzorku pro hladinu 1,0J se následně vypočítá relativní směrodatná odchylka (RSD). Akceptačním kritériem preciznosti je hodnota  $RSD \leq 20 \%$ . [44-45]



**Tabulka VI** Znárodnění přepočtu legislativních limitů pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb v doplňcích stravy (zkratka d.s.) na objem odměrného roztoku k analýze [14-15]

	<b>Limitní hodnoty pro těžké kovy v doplňcích stravy</b> [mg kg <sup>-1</sup> ]	<b>J pro d. s. s hlívou ústřičnou</b> [μg l <sup>-1</sup> ]	<b>J pro d. s. s ostropestřcem mariánským</b> [μg l <sup>-1</sup> ]
As	1,5 <sup>c</sup>	15,0	60,0
Cd	3,0 <sup>a</sup>	30,0	120
	1,0 <sup>b</sup>	1,0	40
Hg	0,1	10,0	4
Pb	3,0	30,0	120

a-doplňky stravy složené výhradně nebo zejména ze sušených mořských řas nebo z produktů získávaných z mořských řas, b – všechny doplňky stravy mimo a, c-limitní hodnota pouze pro anorganický arsen

$$J = \frac{L \cdot m}{V} \quad (4)$$

Kde J je cílový limit pro těžké kovy v doplňcích stravy [μg l<sup>-1</sup>], L je legislativní limit pro těžké kovy v doplňcích stravy [mg kg<sup>-1</sup>], m je navážka doplňku stravy, V je objem roztoku.

např.

$$J_{As} = \frac{L_{As} \cdot m}{V} = \frac{1,5 \cdot 0,25}{0,025} = 15 \mu\text{g l}^{-1} \quad (5)$$

pozn. pro doplněk stravy Hlíva ústřičná 100 % bude použita navážka 0,250 g, pro doplněk stravy Ostropestřec mariánský (tinktura) bude odměřen objem 1,000ml. Roztoky se budou převádět do 25 ml odměrných baněk.

## 3.2 Chemikálie

- HNO<sub>3</sub> (Suprapur) 69 %, Merck, Německo,
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p.a.+) 30 %, Analytika spol. s.r.o., Česká republika,
- demineralizovaná voda, čistota 18,2 MΩ·cm,
- certifikovaný referenční materiál Astasol (As ve 2 % HNO<sub>3</sub>), o hmotnostní koncentraci 1,000 ± 0,002 g l<sup>-1</sup>, Analytika spol. s.r.o., Česká republika,
- certifikovaný referenční materiál Astasol (Cd ve 2 % HNO<sub>3</sub>), o hmotnostní koncentraci 1,000 ± 0,002 g l<sup>-1</sup>, Analytika spol. s.r.o., Česká republika,
- certifikovaný referenční materiál Astasol (Pb ve 2 % HNO<sub>3</sub>), o hmotnostní koncentraci 1,000 ± 0,002 g l<sup>-1</sup>, Analytika spol. s.r.o., Česká republika,

- certifikovaný referenční materiál Certipur (Hg v 10 % HNO<sub>3</sub>), o hmotnostní koncentraci 1000 mg l<sup>-1</sup> (947 mg kg<sup>-1</sup> Hg ± 7 mg kg<sup>-1</sup> Hg), Merck, Německo,
- certifikovaný referenční materiál TMDA-64.3 (filtrovaná a zředěná voda z jezera Ontario (trvanlivost byla zachována přidáním 0,2 % HNO<sub>3</sub>), využit pro kontrolu hmotnostní koncentrace As, Cd a Pb v µg l<sup>-1</sup>,
- víceprvkový kalibrační roztok ASTASOL – MIX; Bi, In, Sc, Tb, Y; c = 10 ± 0,1 mg/l Analytika spol. s.r.o., Česká republika (interní standard),
- ladící roztok pro ICP-MS, o hmotnostní koncentraci Li, Ce, Co, Y, Tl 1 µg l<sup>-1</sup>, Agilent Technologies, Japonsko.

### 3.3 Vzorky

V laboratoři byly analyzované 2 níže uvedené doplňky stravy, které byly zakoupeny v lékárně v Ostravě dne 8. května 2020.

U prvního doplňku stravy se konkrétně jednalo o čistou hlívu ústřičnou (název: Hlíva ústřičná 100 %, výrobce: Terezia, číslo šarže: KUK3200120), balení doplňku obsahovalo 60 kapslí. V kapslích byla rozdrčená vysušená hlíva ústřičná, hmotnost jedné kapsle byla 250 mg. Hlíva ústřičná je jedlá dřevokazná houba s 5 až 25 cm kloboukem, který tvarem připomíná ústřici. Obsahuje β-glukany, houbovou vlákninu, vitamíny (např. listovou kyselinu, vitamín C a D), minerály a stopové prvky (např. Se, Mg, Fe aj.). Hlíva ústřičná se vyskytuje v trsech, nejčastěji na starých kmenech listnatých stromů, od léta do zimy, a to po celém světě, od Ameriky, přes Evropu až po Asii. [46-47]

U druhého doplňku stravy se konkrétně jednalo o 100 ml tinkturu (název: Ostropestřec mariánský, výrobce: TOPVET, číslo šarže: L20-838-31.01.), do které byl extrahován ostropestřec mariánský o hmotnosti 4 g. Ostropestřec mariánský je bylina podobná bodláku, která se užívá hlavně pro podporu správné funkce jater. Při krátkodobém či dlouhodobém vlivu toxických látek na organismus fungují játra jako filtr těchto škodlivých látek (např. se může jednat o alkohol, konzervanty či barviva). Ostropestřec dokáže podpořit regeneraci jaterních buněk, dále pomáhá při stimulaci biliární sekrece, chrání buňky před oxidativním stresem a pomáhá udržovat normální funkci srdce. Ostropestřec mariánský se vyskytuje ve Středomoří, Malé Asii, jihozápadní Asii nebo na Kanárských ostrovech. [48-49]

### 3.4 Materiály a přístroje

- teflonové mineralizační kelímky (12 kusů) s víčky, ochranným pouzdrům a pojistkou
- 25 ml odměrné baňky ze skla (třída A)
- materiály z plastu: 15 ml zkumavky, nálevka, rotor, stříčka na destilovanou vodu, Pasteurova pipeta, víčka na zkumavky, kelímky, špičky různého druhu k automatickým pipetám, pozn. veškeré laboratorní nádobí vyrobené z plastu je z polypropylenu (pp),
- pipety FINNPIPETTE F2 100-1000  $\mu$ l, Thermo Scientific, Spojené státy americké,
- pipety FINNPIPETTE F2 0,5-5 ml, Thermo Scientific, Spojené státy americké,
- mikrovlnný mineralizátor MLS 1200 MEGA, MILESTONE, Itálie,
- přístroj Milli-Q, který slouží k demineralizaci vody, Merck, Německo,
- Přístroj ICP-MS, typ 7700x, výrobce Agilent Technologies, Japonsko,
- analytické váhy KERN, typ ABJ 220-4 M, KERN & SOHN GmbH, Německo.

### 3.5 Příprava a rozklad vzorku

Před samotnou analýzou doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 % byl vzorek navážen do teflonových kelímků. Obsah asi 20 kapslí s čistou hlívou ústřičnou byl vysypán do plastového kelímku, následně byl podíl navažován na analytických váhách KERN. Do 6 teflonových kelímků byl navážen vzorek hlívy ústřičné o hmotnosti asi 250 mg. Následně byla do každého kelímku pomocí 2 pipet (FINNPIPETTE F2 0,5-5 ml a 100-1000  $\mu$ l) odpipetována mineralizační směs 3 ml 69 %  $\text{HNO}_3$  a 1 ml 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Kelímky byly upevněny v plastovém rotoru, který byl umístěn do mikrovlnného mineralizátoru MLS 1200 MEGA (nastavení MM: 1. fáze - čas 2 minuty, příkon 250 W 2. fáze - čas 2 minuty, příkon 0 W 3. fáze - čas 5 minut, příkon 400 W 4. fáze - čas 2 minuty, příkon 0 W 5. fáze - čas 2 minuty, příkon 500 W 6. fáze - čas 2 minuty, příkon 0 W), kde byly vzorky rozloženy. Obsah kelímků (nahnědlý roztok) byl kvantitativně převeden do 25 ml odměrných baněk. Obsah baněk byl převeden do 15 ml zkumavek, všechny tyto zkumavky byly uzavřeny víčkem a uschovány do stojanu v ledničce (při 4 °C) pro pozdější analýzu. Mezi jednotlivými kroky byly teflonové kelímky čištěny pomocí 3 ml 69 %  $\text{HNO}_3$  v MM.

U druhého doplňku stravy, což byla 100 ml tinktura, nebylo nutné vzorek rozkládat. Pomocí automatických pipet byl odměřen 1 ml vzorku tinktury do 25 ml odměrné baňky a odměřené množství vzorku bylo zváženo. Po zvážení bylo do baňky odpipetováno 0,5 ml 69 %  $\text{HNO}_3$  a baňka byla po rysku doplněna demineralizovanou vodou. Část objemu z baňky

byla převedena do 15 ml zkumavky, která byla uzavřena víčkem. Takto bylo připraveno 6 vzorků k analýze.

### **3.6 Příprava směsných zásobního roztoku pro ověření pravdivosti a preciznosti a kalibrační řady**

Postupným ředěním certifikovaných referenčních materiálů uvedených v kapitole 3.2 byl připraven směsný zásobní roztok pro analýzu doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 %. Tento směsný zásobní roztok byl namíchán o následujících koncentracích těžkých kovů: As ( $750 \mu\text{g l}^{-1}$ ), Cd ( $500 \mu\text{g l}^{-1}$ ), Hg ( $50 \mu\text{g l}^{-1}$ ) a Pb ( $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ ). Připravený směsný zásobní roztok byl použit k přidávkům ke vzorkům hlívy ústřičné na třech koncentračních hladinách (0,5J, 1,0J a 1,5J). Do prvních 3 teflonových kelímků jsem přidal objem 0,25 ml směsného zásobního roztoku (hladina 0,5J), do dalších 6 kelímků 0,50 ml (hladina 1,0J) a do posledních 3 kelímků 0,75 ml (hladina 1,5J). Kalibrační řada byla připravena postupným ředěním směsného zásobního roztoku. Bylo připraveno 7 kalibračních roztoků o koncentracích As, Cd, Hg a Pb: 0,5, 1, 5, 10, 50, 100,  $500 \mu\text{g l}^{-1}$  a jeden slepý pokus. Kalibrační série byla připravena do 25 ml odměrných baněk a z důvodu přiblížení se k matici vzorku byly kalibrační roztoky okyseleny pomocí přídatku 1 ml 69 %  $\text{HNO}_3$ . Baňky byly následně doplněny po rysku demineralizovanou vodou.

Postupným ředěním certifikovaných referenčních materiálů uvedených v kapitole 3.2 byl připraven směsný zásobní roztok pro analýzu doplňku stravy Ostropestřec mariánský, který obsahoval těžké kovy o následujících koncentracích: As ( $3 \text{ mg l}^{-1}$ ), Cd ( $2 \text{ mg l}^{-1}$ ), Hg ( $200 \mu\text{g l}^{-1}$ ) a Pb ( $6 \text{ mg l}^{-1}$ ). Vypočítaný objem směsného zásobního roztoku byl odpipetován do 25 ml odměrných baněk k 1 ml vzorku tinktury na třech koncentračních hladinách (0,5J, 1,0J a 1,5J). Do prvních 3 odměrných baněk byl odpipetován objem 0,25 ml směsného zásobního roztoku (hladina 0,5J), do dalších 6 baněk 0,50 ml (hladina 1,0J) a do posledních 3 baněk 0,75 ml (hladina 1,5J). Kalibrační řada 7 roztoků o hmotnostních koncentracích As, Cd, Hg a Pb: 0,5, 1, 5, 10, 50, 100,  $500 \mu\text{g l}^{-1}$  byla připravena postupným ředěním certifikovaných referenčních materiálů. Kalibrační série byla připravena do 25 ml odměrných baněk a z důvodu přiblížení se k matici vzorku byly kalibrační roztoky okyseleny pomocí přídatku 0,5 ml 69 %  $\text{HNO}_3$ . Baňky byly následně doplněny po rysku demineralizovanou vodou.

### 3.7 Stanovení As, Cd, Hg a Pb v doplňcích stravy pomocí ICP-MS

Metodou externí kalibrace na přístroji ICP-MS 7700x Agilent Technologies (opatřen zmlžovačem, kolizní celou, kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem a automatickým dávkovačem vzorků) byly stanoveny těžké kovy As, Cd, Hg, Pb ve dvou doplňcích stravy (Hlíva ústříčná 100 % a Ostropestřec mariánský). Přístroj byl před samotným měřením nastaven pomocí ladícího roztoku pro ICP-MS o koncentraci 1  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

Ke kompenzaci nespektrálních interferencí byl během každé analýzy (před, uprostřed a na konci analýzy) analyzován certifikovaný referenční materiál TMDA 64.3 s certifikovanými koncentracemi As, Cd a Pb (tzv. QC vzorek). Nastavení přístroje ICP-MS během analýzy doplňků stravy je uvedeno v tab. VII.

**Tabulka VII** Nastavení přístroje ICP-MS během analýzy doplňků stravy

Příkon generátoru	1550 W
Hloubka vzorku	8 mm
Pumpa zmlžovače	0,1 RPS
Teplota mlžné komory	2 °C
Průtok plazmového plynu	14,98 l min <sup>-1</sup>
Průtok nosného plynu	1,02 l min <sup>-1</sup>
Pomocný plyn	0,9 l min <sup>-1</sup>
Průtok He	5 ml min <sup>-1</sup>
Akviziční mód	SPECTRUM
Repliky měření	6

## 4 Výsledky a diskuze

Ve 2 doplňcích stravy Hlíva ústřičná 100 % a Ostropestřec mariánský byly stanoveny vybrané těžké kovy As, Cd, Hg a Pb metodou ICP-MS. V souladu s dokumentem ICH Q2(R1) [46] byla provedena validace postupů měření podle validačního protokolu v kapitole 3.1 pro ověření vhodnosti dané metody pro analýzu doplňků stravy.

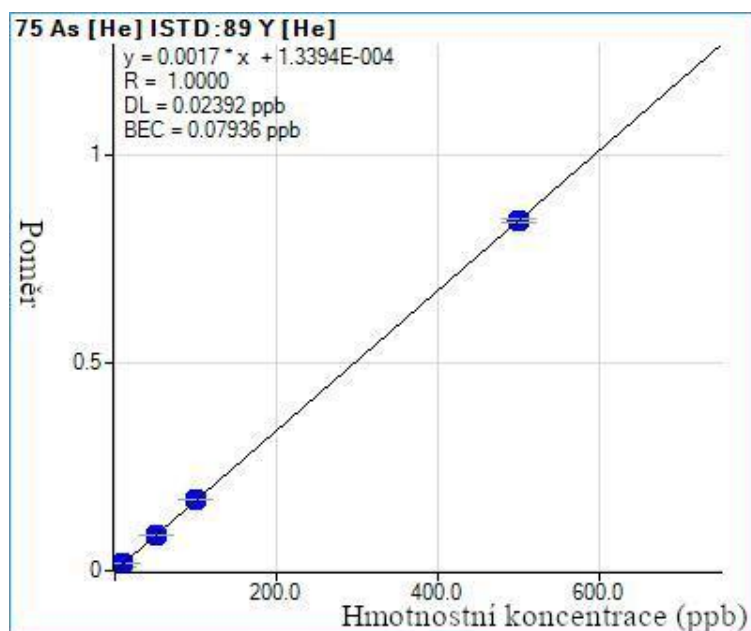
### 4.1 Validační zpráva a výsledky pro doplněk stravy Hlíva ústřičná 100 %

Výsledky validace postupu měření jsou shrnuty ve čtyřech samostatných částech:

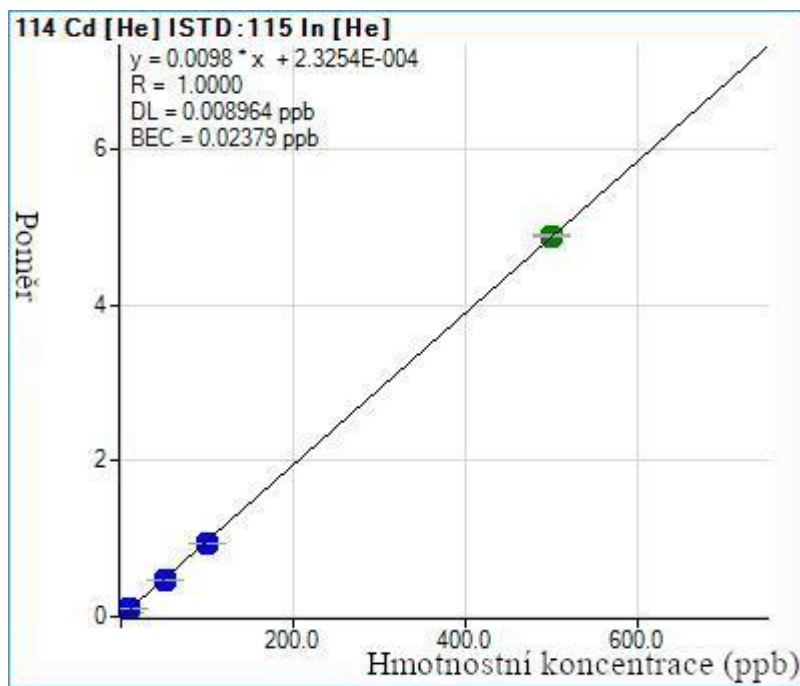
- Měřicí interval a linearita
- Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)
- Pravdivost (přesnost) a preciznost
- Výsledky

#### Měřicí interval a linearita

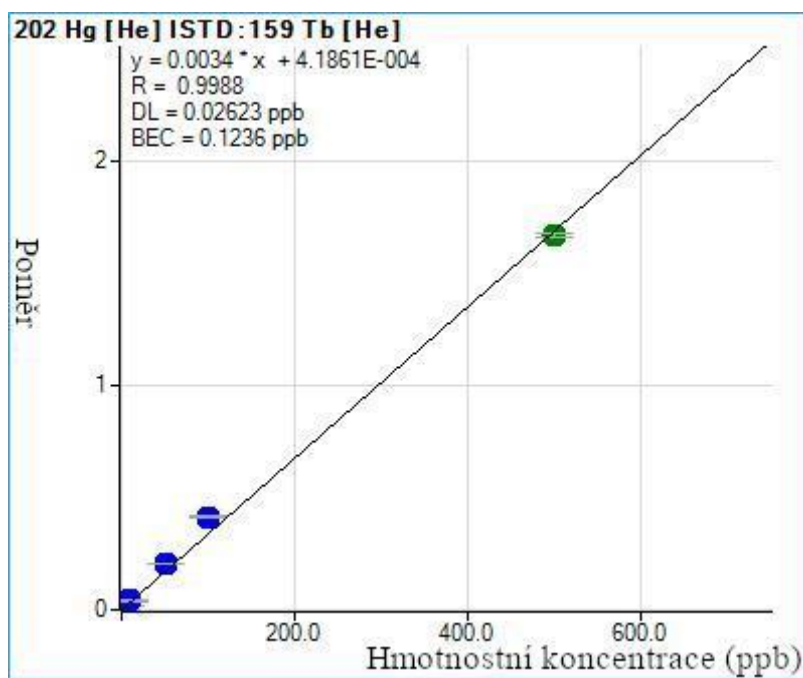
Během validace byl ověřován u 4 vybraných kalibračních přímek pro As, Cd, Hg a Pb (viz Obr. 6, 7, 8 a 9) k doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 % měřicí interval a linearita. U získaných závislostí byl vypočítán korelační koeficient (viz tab. VIII).



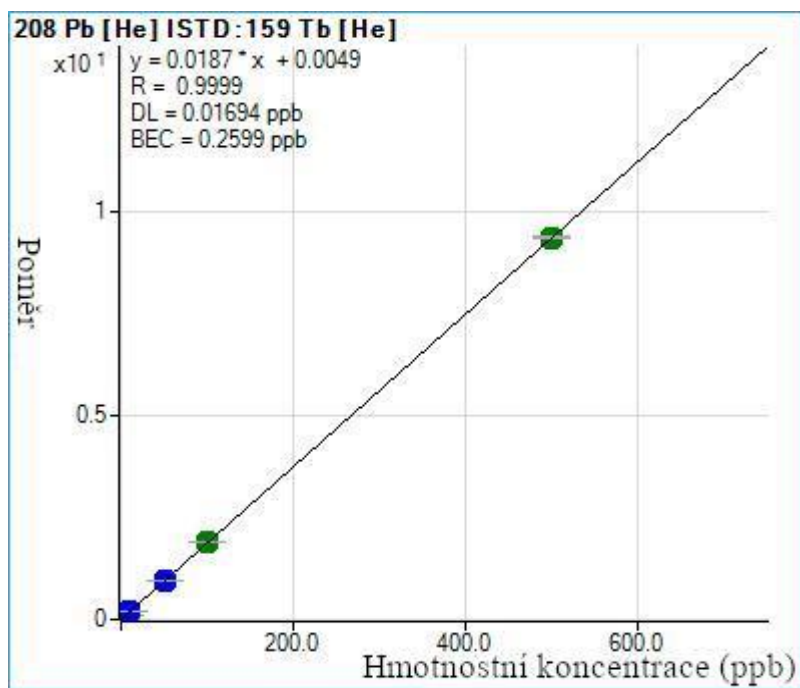
Obrázek 6 Kalibrační přímková grafika pro As v doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 %



**Obrázek 7** Kalibrační přímka pro Cd v doplňku stravy Hlíva ústříčná 100 %



**Obrázek 8** Kalibrační přímka pro Hg v doplňku stravy Hlíva ústříčná 100 %



Obrázek 9 Kalibrační přímka pro Pb v doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 %

Tabulka VIII Přehled dat z kalibračních přímek pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb v doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 %

Těžký kov	Rovnice kalibrační přímky	Korelační koeficient
As	$y = 0,0017 \cdot x + 1,3394 \cdot 10^{-4}$	R = 1,0000
Cd	$y = 0,0098 \cdot x + 2,3254 \cdot 10^{-4}$	R = 1,0000
Hg	$y = 0,0034 \cdot x + 4,1861 \cdot 10^{-4}$	R = 0,9988
Pb	$y = 0,0187 \cdot x + 0,0049$	R = 0,9999

Vizuální kontrolou kalibračních přímek byla ověřena linearita kalibračních přímek a bylo potvrzeno, že měřicí interval je v rozsahu LOQ - 500  $\mu\text{g l}^{-1}$  pro všechny 4 těžké kovy (As, Cd, Hg a Pb).

Kontrolou korelačních koeficientů v tab. VIII bylo ověřeno, že předdefinované akceptační kritérium pro linearitu ( $R \geq 0,99$ ) bylo pro všechny 4 těžké kovy splněno.



## Mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ)

Z 5 slepých pokusů (odchylka od validačního protokolu) byly vypočítány LOD a LOQ pro As, Cd, Hg a Pb. LOD a LOQ byly nejprve uvedeny v  $\mu\text{g l}^{-1}$  a následně přepočítány na  $\text{mg kg}^{-1}$  (viz tab. IX).

Ve validačním protokolu bylo uvedeno, že LOD a LOQ budou stanoveny ze 6 slepých pokusů pro daný doplněk stravy, ale jeden slepý pokus byl vyloučen jako odlehlý bod.

**Tabulka IX** LOD a LOQ pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb k doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 %

Těžký kov	LOD [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	LOD [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	LOQ [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]
As	0,3	1,1	0,03	0,1
Cd	0,02	0,06	0,002	0,01
Hg	4,5	14,9	0,5	1,5
Pb	0,9	2,8	0,09	0,3

## Pravdivost (přesnost) a preciznost

Dalšími posuzovanými validačními parametry byly pravdivost a preciznost.

**Tabulka X** Přehled výtěžků na hladinách 0,5J 1,0J a 1,5J pro As, Cd, Hg a Pb k doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 %

Těžký kov	Výtěžek na hladině 0,5J [%]	Výtěžek na hladině 1,0J [%]	Výtěžek na hladině 1,5J [%]
As	129,6	126,4	117,9
Cd	96,6	96,9	96,5
Hg	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Pb	92,0	90,4	91,3

**Tabulka XI** Přehled relativních směrodatných odchylek hladiny 1,0J pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb k doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 %

Těžký kov	RSD pro hladinu 1,0J [%]
As	0,9
Cd	1,0
Hg	-
Pb	1,8

Akceptační kritérium pravdivosti byl výtěžek pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb na hladině 0,5J 1,0J a 1,5J v rozmezí 70–150 %. Toto kritérium bylo splněno pro všechny těžké kovy až na Hg, u které byly všechny tři úrovně pod mezí stanovitelnosti.

Akceptační kritérium preciznosti bylo, že RSD pro hladinu 1,0J  $\leq 20$  %. Toto kritérium bylo splněno pro všechny těžké kovy až na Hg, u které byla analyzovaná koncentrace pod mezí stanovitelnosti.

RSD pro hladinu 1,0J a výtěžek na hladinách 0,5J, 1,0J a 1,5J pro Hg nesplňují akceptační kritéria, protože metoda ICP-MS není dostatečně citlivá na to, aby stanovila Hg při legislativním limitu 0,1 mg kg<sup>-1</sup>.

## Výsledky

V této kapitole bylo zhodnoceno, jaké množství těžkých kovů As, Cd, Hg a Pb bylo nalezeno v doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 % (viz tab. XII). Dále je zde v tabulce XIII uveden přehled z analýzy certifikovaného referenčního materiálu TMDA 64.3.

**Tabulka XII** Stanovené množství těžkých kovů As, Cd, Hg a Pb v doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 %

Těžký kov	Stanovené množství těžkého kovu v doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 % [mg kg <sup>-1</sup> ]
As	6,30 ± 0,08
Cd	0,300 ± 0,004
Hg	< LOQ
Pb	< LOQ

V doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 % bylo množství Hg a Pb pod mezí stanovitelnosti, ale byl stanoven As 6,30 mg kg<sup>-1</sup> a Cd 0,3 mg kg<sup>-1</sup>.

Výsledky z analýzy certifikovaného referenčního materiálu TMDA 64.3, který byl použit jako tzv. QC vzorek a během měření analyzován 3krát (na začátku, uprostřed a na konci analýzy), jsou uvedeny v tabulce XIII.

**Tabulka XIII** Přehled referenčních a průměrných stanovených koncentrací těžkých kovů As, Cd a Pb v referenčním materiálu TMDA 64.3 během analýzy doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 %

Těžký kov	Certifikovaná hodnota s rozšířenou nejistotou [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	Průměrná naměřená hodnota [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]
As	164 ± 15	182
Cd	258 ± 21	250
Pb	280 ± 22	269

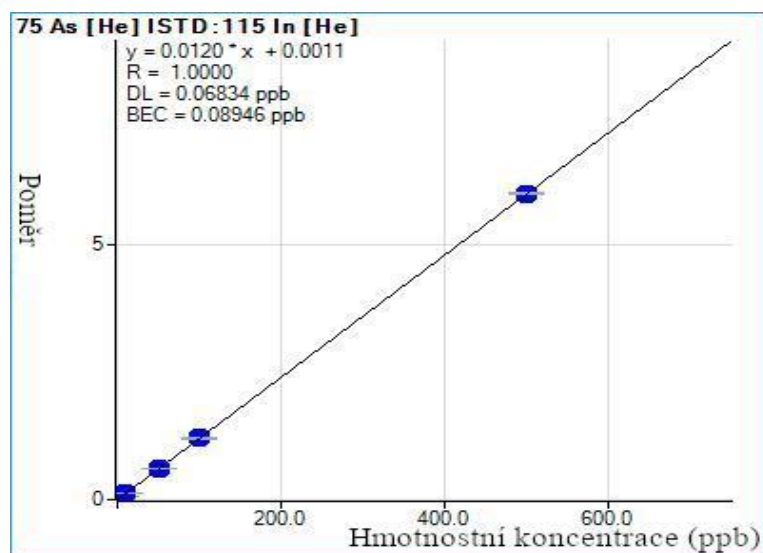
Stanovené průměrné koncentrace As, Cd a Pb leží v intervalu 80-120 % od certifikované hodnoty.

## 4.2 Validační zpráva a výsledky pro doplněk stravy Ostropestřec mariánský

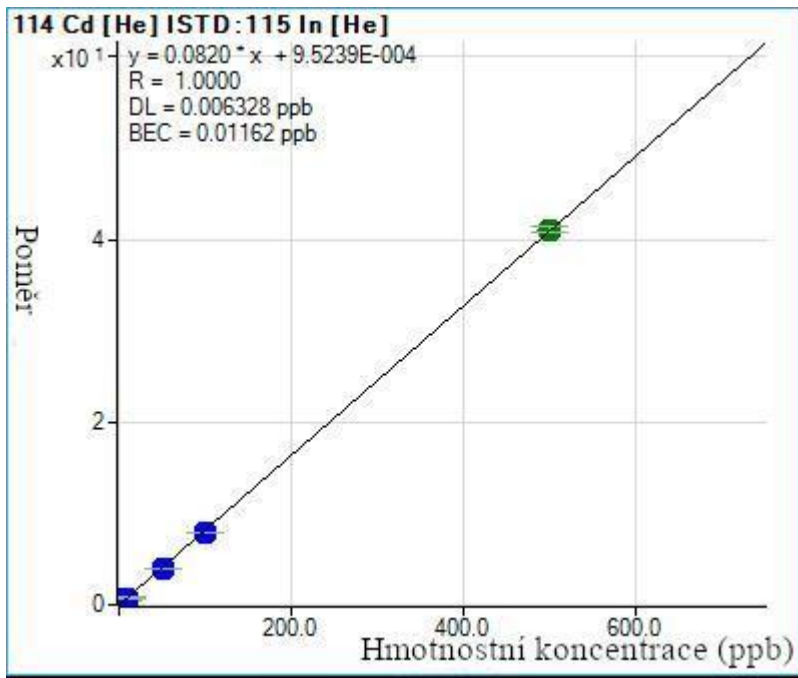
Výsledky validace stanovení vybraných těžkých kovů (As, Cd, Hg a Pb) v doplňku stravy Ostropestřec mariánský jsou shrnuty v této kapitole, která je členěna do čtyř samostatných částí stejně jako kapitola 4.1.

### Měřicí interval a linearita

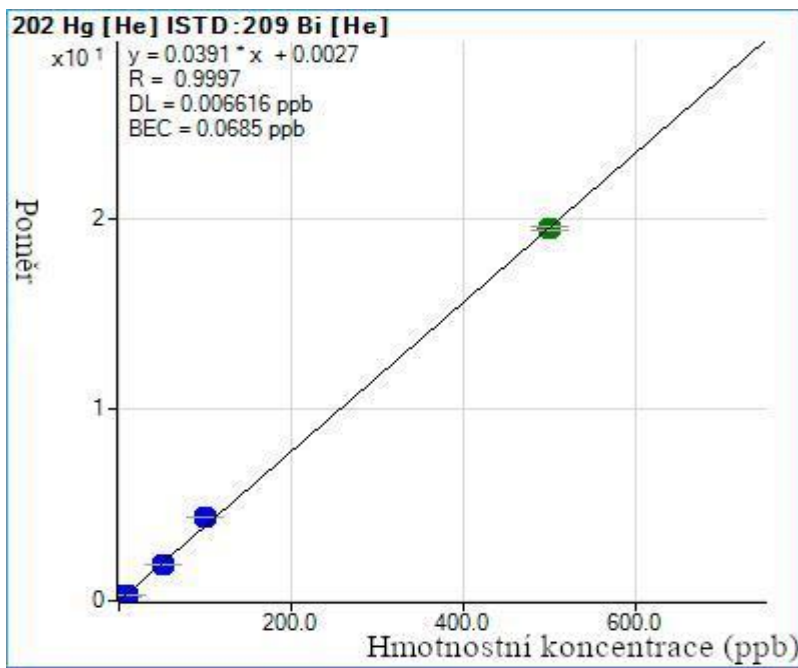
Z kalibračních přímků pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb (viz Obr. 10, 11, 12 a 13) k doplňku stravy Ostropestřec mariánský byl vyhodnocen měřicí interval a linearita.



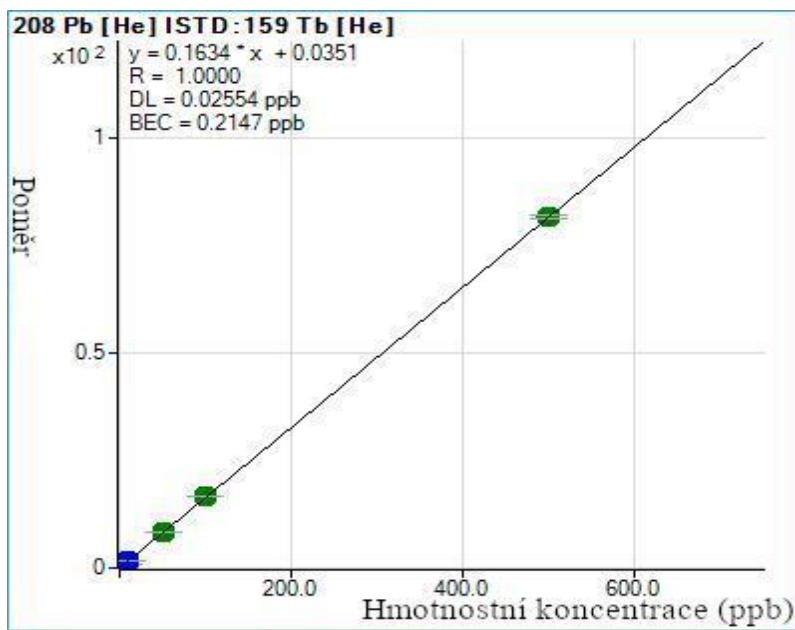
**Obrázek 10** Kalibrační přímka pro As u doplňku stravy Ostropestřec mariánský



Obrázek 11 Kalibrační přímka pro Cd u doplňku stravy Ostropestřec mariánský



Obrázek 12 Kalibrační přímka pro Hg u doplňku stravy Ostropestřec mariánský



**Obrázek 13** Kalibrační přímka pro Pb u doplňku stravy Ostropestřec mariánský

**Tabulka XIV** Přehled dat z kalibračních přímek pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb v doplňku stravy Ostropestřec mariánský

Těžký kov	Rovnice kalibrační přímky	Korelační koeficient
As	$y = 0,0120 \cdot x + 0,0011$	$R = 1,0000$
Cd	$y = 0,0820 \cdot x + 9,5239 \cdot 10^{-4}$	$R = 1,0000$
Hg	$y = 0,0391 \cdot x + 0,0027$	$R = 0,9997$
Pb	$y = 0,1634 \cdot x + 0,0351$	$R = 1,0000$

Vizuální kontrolou kalibračních přímek byla ověřena linearita a bylo potvrzeno, že měřicí interval je od LOQ do 500  $\mu\text{g l}^{-1}$  pro všechny 4 těžké kovy (As, Cd, Hg a Pb).

Kontrolou korelačních koeficientů v tab. XIV bylo ověřeno, že předdefinované akceptační kritérium pro linearitu ( $R \geq 0,99$ ) bylo pro všechny 4 těžké kovy splněno.

## Mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ)

Z 5 slepých pokusů pro daný doplněk stravy byly vypočítány LOD a LOQ pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb. LOD a LOQ byly nejprve uvedeny v  $\mu\text{g l}^{-1}$  a následně přepočítány na  $\text{mg kg}^{-1}$  (viz tab. XV). I v tomto případě byl vyloučen jeden slepý pokus jako odlehlý bod a došlo tím k odchýlení se od validačního protokolu.

**Tabulka XV** LOD a LOQ pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb k doplňku stravy *Ostropestřec mariánský*

Těžký kov	LOD [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	LOD [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	LOQ [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]
As	0,5	1,6	0,01	0,04
Cd	0,01	0,02	0,0002	0,001
Hg	1,1	3,7	0,03	0,09
Pb	0,04	0,1	0,001	0,003

## Pravdivost (přesnost) a preciznost

Jako další validační parametry postupu měření byly posuzovány pravdivost a preciznost. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách XVI a XVII.

**Tabulka XVI** Přehled výtěžků na hladinách 0,5J, 1,0J a 1,5J pro As, Cd, Hg a Pb k doplňku stravy *Ostropestřec mariánský*

Těžký kov	Výtěžek na hladině 0,5J [%]	Výtěžek na hladině 1,0J [%]	Výtěžek na hladině 1,5J [%]
As	176,5	176,7	178,4
Cd	107,4	105,7	106,0
Hg	84,4	94,8	97,2
Pb	124,5	127,2	126,8

**Tabulka XVII** Přehled relativních směrodatných odchylek na hladině 1,0J pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb k doplňku stravy *Ostropestřec mariánský*

Těžký kov	RSD na hladině 1,0J [%]
As	0,9
Cd	0,7
Hg	7,0
Pb	0,8

Akceptační kritérium pravdivosti bylo, že výtěžek na hladinách 0,5J, 1,0J a 1,5J musí být v rozmezí 70–150 %. Akceptační kritérium pravdivosti bylo splněno u všech těžkých kovů kromě As, který měl výtěžek na všech třech hladinách vyšší.

Akceptační kritérium preciznosti bylo, že RSD na hladině  $1,0J \leq 20 \%$ . Toto kritérium bylo splněno pro všechny těžké kovy.

Výtěžek pro As na hladině 0,5J 1,0J a 1,5J nebyl v rozmezí 70–150 % kvůli interferencím způsobeným přítomností organických látek ve vzorku (doplňk stravy je extrahován v 35 % ethanolu) [50]. Výsledky stanovení As v tomto doplňku stravy nad LOQ je nezbytné přepočítat pomocí korekčního faktoru  $k = 1,0/1,7$ .

## Výsledky

V této části bylo zhodnoceno, jaké množství těžkých kovů As, Cd, Hg a Pb bylo nalezeno v doplňku stravy Ostropestřec mariánský. Výsledky jsou uvedeny v tabulce XVIII.

**Tabulka XVIII** Stanovené množství těžkých kovů As, Cd, Hg a Pb v doplňku stravy Ostropestřec mariánský

Těžký kov	Stanovené množství těžkého kovu v Ostropestřci mariánském [mg kg <sup>-1</sup> ]
As	< LOQ
Cd	< LOQ
Hg	< LOQ
Pb	0,005

V doplňku stravy Ostropestřec mariánský bylo stanoveno pouze množství Pb, hladiny zbývajících těžkých kovů byly nižší než LOQ.

Výsledky z analýzy certifikovaného referenčního materiálu TMDA 64.3, který byl použit jako tzv. QC vzorek a během měření analyzován 3krát (na začátku, uprostřed a na konci analýzy), jsou uvedeny v tabulce XIX.

**Tabulka XIX** Přehled referenčních a průměrných stanovených koncentrací těžkých kovů As, Cd a Pb v referenčním materiálu TMDA 64.3 během analýzy doplňku stravy *Ostropestřec mariánský*

Těžký kov	Certifikovaná hodnota s rozšířenou nejistotou [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	Průměrná naměřená hodnota [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]
As	164 ± 15	166
Cd	258 ± 21	271
Pb	280 ± 22	269

Stanovené koncentrace As, Cd a Pb leží v intervalu 80-120 % od certifikované hodnoty.

### 4.3 Diskuze výsledků

V kapitole diskuze výsledků byly porovnány výsledky analýz doplňků stravy (viz tab. XX) s legislativními limity pro těžké kovy v doplňcích stravy. Dále jsou dosažené výsledky diskutovány s údaji z odborné literatury uvedenými v kap. 2.8.

**Tabulka XX** Výsledné srovnání stanoveného množství těžkých kovů As, Cd, Hg a Pb v obou doplňcích stravy k legislativním limitům pro tyto 4 těžké kovy v doplňcích stravy

Těžký kov	Legislativní limity pro těžké kovy v doplňcích stravy [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	Stanovené množství těžkých kovů v doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 % [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]	Stanovené množství těžkých kovů v doplňku stravy <i>Ostropestřec mariánský</i> [ $\text{mg kg}^{-1}$ ]
As	1,5 <sup>c</sup>	6,30 ± 0,08	< LOQ
Cd	1,0 <sup>b</sup> 3,0 <sup>a</sup>	0,300 ± 0,004	< LOQ
Hg	0,1	< LOQ	< LOQ
Pb	3,0	< LOQ	0,005 ± 0,008

a-doplňky stravy složené výhradně nebo zejména ze sušených mořských řas nebo z produktů získávaných z mořských řas, b – všechny doplňky stravy mimo a, c-limitní hodnota pouze pro anorganický As, údaj za znaménkem ± je směrodatná odchylka (SD)

Z tab. XX je jasně vidět, že legislativní limity vztažené na doplňky stravy Hlívu ústřičnou 100 % a *Ostropestřec mariánský* (tinktura) nebyly v případě Cd, Hg a Pb překročeny.

Jediný těžký kov, u kterého byl zdánlivě překročen legislativní limit v doplňcích stravy, byl As a to v doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 %. Limitní hodnota je však uvedena pro anorganický As. Pomocí postupu měření použitého v této práci bylo provedeno



stanovení celkového množství As. Lze však předpokládat, že As byl v hlívě ústřičné vázán ve formě organických sloučenin, a proto není tento doplněk stravy pro člověka nebezpečný. Pro potvrzení tohoto předpokladu by bylo nutné provést speciální analýzu pro As.

Následně byly srovnány stanovené množství těžkých kovů s výsledky ve vědeckých člancích [37-43].

As byl stanovován jako elementární nečistota v doplňcích stravy v 5 ze 7 vědeckých článků [37-41]. V prvním vědeckém článku [39] bylo analyzováno 16 doplňků stravy, které byly zakoupeny na dánském trhu. V 1 ze 16 doplňků stravy (z Číny) byl stanoven anorganický As v množství  $3,2 \text{ mg kg}^{-1}$ , přesahující limitní hodnotu pro As ( $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) v doplňcích stravy asi 2,13krát. Ve druhém vědeckém článku [40] byl stanoven As ve 104 vzorcích rozmanitého původu (houby, doplňky stravy na bázi hub a vzorky půdy). Ze 104 vzorků bylo analyzováno 21 doplňků stravy na bázi hub. Jeden doplněk stravy obsahoval množství As  $1,50 \text{ mg kg}^{-1}$  (vztaženo na sušinu) přesahující legislativní limit  $1,00 \text{ mg kg}^{-1}$  (vztaženo na sušinu).

Cd bylo stanoveno jako elementární nečistota v doplňcích stravy ve 4 ze 7 vědeckých článků [37-38,41-42]. Z toho ve dvou vědeckých pracích [37,41] byly analyzovány doplňky stravy, které obsahovaly množství Cd, přesahující limitní hodnoty. V prvním vědeckém [37] článku bylo autory analyzováno 30 doplňků stravy, 2 doplňky stravy překročily povolenou limitní hodnotu  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  pro Cd. U prvního doplňku stravy se jednalo o bylinný doplněk stravy, který obsahoval  $0,124 \text{ mg kg}^{-1}$ . Druhý doplněk stravy byl ze skupiny vitamínů a minerálních látek a obsahoval  $0,418 \text{ mg kg}^{-1}$  Cd. Autoři neměli v roce 2003 na národní úrovni legislativu, kde by byla uvedena limitní hodnota pro Cd v doplňcích stravy, takže se řídili limitní hodnotou pro Cd v kukuřici. Ve druhém vědeckém článku [41] bylo autory analyzováno 20 doplňků stravy, 14 z 20 doplňků stravy obsahovalo množství Cd, přesahující limitní hodnoty  $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$  pro doplňky stravy z mořských řas a  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  pro všechny ostatní doplňky stravy. Doplňky stravy s nejvyšším množstvím Cd byly původem z moře(oceánu). Autoři vyhodnotili, že bylo kontaminováno životní prostředí.

Hg byla stanovována jako elementární nečistota v doplňcích stravy ve 4 ze 7 vědeckých článků [37-38,41,43]. V prvním vědeckém článku [37] byl legislativní limit pro Hg ( $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$ ) překročen u 16 z 20 doplňků stravy. Autoři neměli v roce 2003 legislativu, kde by byla uvedena limitní hodnota pro Hg v doplňcích stravy, takže se řídili limitní

hodnotou pro Hg v kukuřici. V druhém vědeckém článku [38] bylo stanovené množství Hg u všech doplňků stravy pod LOQ. Ve třetím vědeckém článku [41] nebylo množství Hg v žádném doplňku stravy překročeno. Ve čtvrtém vědeckém článku [43] bylo autory stanoveno množství  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  v rybím tuku. Ve všech doplňcích stravy bylo množství  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  asi o 3 řády nižší ( $\text{ng l}^{-1}$ ) než legislativní limit pro Hg v doplňcích stravy. Autoři dokonce usoudili, že konzumace doplňků stravy s rybím tukem je mnohem bezpečnější než konzumace samotných ryb, co se týče stanoveného množství  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  v těchto produktech.

Pb bylo stanoveno jako elementární nečistota v doplňcích stravy ve 4 ze 7 vědeckých článků [37-38,41-42]. V prvním vědeckém článku [37] byl legislativní limit pro Pb ( $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) překročen u 5 z 30 doplňků stravy v množstvích 0,400 0,432 0,606 0,630 1,061 a 6,074  $\text{mg kg}^{-1}$ . U posledního doplňku stravy se jednalo o přípravek ze skupiny vitamínů a minerálů. Ani v tomto případě autoři neměli v roce 2003 na národní úrovni legislativu, kde by byla uvedena limitní hodnota pro Pb v doplňcích stravy, takže se řídili limitní hodnotou pro Pb v kukuřici. V druhém vědeckém článku [38] bylo stanovené množství všech těžkých kovů pod legislativními limity EU až na Pb ( $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ). To bylo autory stanoveno v 1 z 12 doplňků stravy (směs bylin) v množství  $3,92 \text{ mg kg}^{-1}$ . Ve třetím vědeckém článku [41] nebylo množství Pb překročeno v žádném doplňku stravy. Ve čtvrtém vědeckém článku [42] bylo autory stanoveno Pb v 17 ze 168 doplňků stravy. Z toho v každém případě byl překročen legislativní limit pro Pb ( $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), dokonce ve 2 případech 11,1krát a 16,9krát. Autory bylo usouzeno, že je zapotřebí zpřísnit kontrolu doplňků stravy, protože příznivé předpisy EU umožňují širokou dostupnost těchto výrobků na trhu. [42]

## 5 Závěr

V této bakalářské práci byly optimalizovány a validovány postupy měření pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb v doplňcích stravy Hlívu ústřičnou 100 % a Ostropestřec mariánský v souladu s mezinárodními postupy doporučenými pro analýzu léčiv. Následně byly shrnuty výsledky stanovení těžkých kovů v těchto doplňcích stravy.

U doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 % byla zjištěná hodnota LOQ pro Hg výrazně vyšší ( $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) než její legislativní limit ( $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) v doplňcích stravy. Pro Hg v doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 % není možné pomocí vyvinuté metody stanovit Hg na požadované úrovni. Legislativní limit je na hranici možností použité instrumentální metody (ICP-MS). Aby se v budoucích experimentech dalo množství Hg v doplňcích stravy stanovit nad LOQ, bude třeba zvýšit navážku vzorku z původní hodnoty 250 mg a pracovat v čistějších laboratorním prostředí.

Ani v jednom doplňku stravy nebyly překročeny legislativní limity pro těžké kovy As, Cd, Hg a Pb. V doplňku stravy Hlíva ústřičná 100 % byla stanovena vyšší koncentrace arsenu, ten je pravděpodobně vázán ve formě organických sloučenin. Je tedy nepravděpodobné, že by byla překročena limitní hodnota pro anorganický arsen. Stanovení množství anorganického As z celkového As by se dalo řešit speciální analýzou, což by znamenalo vyvinutí a validaci HPLC-ICP-MS postupu měření [39] nebo upravení vzorku před samotnou analýzou např. využitím selektivní extrakce anorganického As a jeho následné stanovení.

Oba analyzované doplňky stravy jsou tedy z hlediska obsahu těžkých kovů naprosto bezpečné a nehrozí zdravotní riziko při jejich užívání.

## 6 Seznam použité literatury

1. I. Mach, Doplnky stravy jaké si vybrat při sportu i v každodenním životě, Grada Publishing, Praha 2012.
2. I. Passarani, Food supplements Challenges & risks for consumers, BEUC, Brusel 2016.
3. V. Otruba, Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, 8. kurz ICP-MS/OES 2015, Brno-Bohunice, 25.-28. května 2015. Univerzitní kampus MU Brno-Bohunice, Spektroskopická společnost Jana Marka Marci (2015) 106-120.
4. Zákon č. 110/1997 Sb., ze dne 19. května 1997 o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, dostupný také z <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110>, staženo 15. prosince 2019.
5. Vyhláška č. 58/2018 Sb., ze dne 1. listopadu 2018, o doplňcích stravy a složení potravin, dostupná také z <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-58>, staženo 15. prosince 2019.
6. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES, ze dne 10. června 2002 o sbližování právních předpisů členských států týkajících se doplňků stravy, dostupná také z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32002L0046>, staženo 15. prosince 2019.
7. M. Eisenhammer, O chemoterapii potravin (rozhovor), Téma 3 (2020) 12-19.
8. <http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/bezpecnost-potravin/system-rychleho-varovani-pro-potraviny/>, staženo 17. ledna 2020.
9. <http://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplunku-stravy-od-lecivych-pripravku>, staženo 15. února 2020.
10. <http://www.sukl.cz/leciva/jaky-je-rozdil-mezi-doplunky-stravy-a-volne-prodejnymi>, staženo 30. března 2020.
11. <http://www.olecich.cz/encyklopedie/jaky-je-rozdil-mezi-lekem-a-doplnkem-stravy>, staženo 30. března 2020.
12. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002, ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin, dostupné také z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32002R0178>, staženo 17. ledna 2020.

13. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006, ze dne 20. prosince 2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin, dostupné také z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A32006R1924>, staženo 17. ledna 2020.
14. Nařízení komise (ES) č. 629/2008, ze dne 2. července 2008, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, dostupné také z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32008R0629>, staženo 18. ledna 2020.
15. <2232> Elemental Contaminants in Dietary Supplements, ze dne 27. dubna 2020, který stanovuje limitní hodnoty pro As, Cd, Hg, Pb v doplňcích stravy, dostupný také z [https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/elemental\\_contaminants\\_in\\_dietary\\_supplements\\_m5291\\_3-26-2012.pdf](https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/elemental_contaminants_in_dietary_supplements_m5291_3-26-2012.pdf), staženo 20. dubna 2020.
16. Nařízení Komise č. 1170/2009, ze dne 30. listopadu 2009, kterým se mění směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006, pokud jde o seznamy vitaminů a minerálních látek a jejich forem, které lze přidávat do potravin, včetně doplňků stravy, dostupné také z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32009R1170>, staženo 18. ledna 2020.
17. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011, ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnic Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004, dostupné také z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32011R1169>, staženo 18. ledna 2020.
18. P. Pitter, Hydrochemie, 5. vydání, VŠCHT, Praha 2015.
19. I. Linhart, Toxikologie, 2. vydání, VŠCHT, Praha 2014.
20. <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=10>, staženo 25. února 2020.
21. Sdělení č. 79/2010 Sb. m. s., ze dne 24. června 1998 o sjednání Protokolu o těžkých kovech k Úmluvě o dálkovém znečišťování ovzduší přesahujícím hranice států z roku 1979, dostupné z <https://www.zakonyprolidi.cz/ms/2010-79>, staženo 25. února 2020.

22. C. E. Housecroft, A. G. Sharpe, Inorganic chemistry, fourth ed., Pearson, Harlow 2012.
23. E. Grzesik-Bobrowska, J. Ciba, A. Grossman, J. Kluczka, J. Trojanowska, M. Zolotajkin, Chemical Elements Compendium, 2 THETA, Český Těšín 2013.
24. H. Matusiewicz, E. Bulska, Inorganic Trace Analytics: Trace Element Analysis and Speciation, De Gruyter, Berlin/Boston 2018.
25. F. Březina, F. Kašpárek, R. Pastorek, Z. Šindelář, Anorganická chemie, Univerzita Palackého, Olomouc 2006.
26. R. Thomas, Measuring elemental impurities in pharmaceuticals a practical guide, CRC Press, Boca Raton 2018.
27. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Analytická chemie, 9. vydání, VŠCHT, Praha 2019.
28. R. Thomas, Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, third ed., CRC Press, Boca Raton 2013.
29. J. S. Hill, Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications, second ed., Blackwell publishing, Plymouth 2007.
30. M. Mihaljevič, L. Strnad, O. Šebek, Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii, Chem. Listy 98 (2004) 123-130.
31. V. Martišoviš, Základy fyziky plazmatu, Univerzita Komenského, Bratislava 2004.
32. K. Záruba a kolektiv, Analytická chemie 1. díl, VŠCHT, Praha 2016.
33. V. Havlíček, F. Tureček, Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti, Chem. Listy 114 (2020) 106-112.
34. [http://holcapek.upce.cz/teaching/03\\_MS\\_analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf), staženo 27. dubna 2020.
35. <https://docplayer.cz/89059833-Porovnani-metod-atomove-spektrometrie.html>, staženo 20. února. 2020.
36. E. Covaci, E. Darvasi, M. Ponta, Simultaneous determination of Zn, Cd, Pb and Cu in mushrooms by differential pulse anodic stripping voltammetry, Studia Ubb Chemia 62(3) (2017) 133-144.
37. Z. Dragun, D. Puntarić, D. Prpić-Majić, J. Bošnić, R. Gmajnić, M. Klarić, Toxic Metals and Metalloids in Dietetic Products, CMJ 44 (2003) 214-218.
38. P. Brizio, A. Benedetto, S. Squadrone, R. Tarasco, S. Gavinelli, M. Pellegrino, M. C. Abete, Heavy metals occurrence in Italian food supplements, E3S Web of Conferences 1 (2013) 15006.

39. R. V. Hedegaard, I. Rokkjaer, J. J. Sloth, Total and inorganic arsenic in dietary supplements based on herbs, other botanicals and algae—a possible contributor to inorganic arsenic exposure, *Anal Bioanal Chem.* (2013) 4429–4435.
40. M. J. Melgar, J. Alonso, M.A. García, Total contents of arsenic and associated health risks in edible mushrooms, mushroom supplements and growth substrates from Galicia (NW Spain), *Food and Chemical Toxicology* 73 (2014) 44–50.
41. S. Amariei, G. Gutt, M. Oroian, Study on Toxic Metal Levels in Food Supplements, *REV.CHIM.* 68 (2017) 1298-1301.
42. B. Poniedziałek, P. Niedzielski, L. Kozak, P. Rzymiski, M. Wachelka, I. Rzymaska, J. Karczewski, P. Rzymiski, Monitoring of essential and toxic elements in multi-ingredient food supplements produced in European Union, *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 13 (2018) 41–48.
43. N. Mei, B. Lai, J. Liu, X. Mao, G. Chen, Speciation of trace mercury impurities in fish oil supplements, *Food Control* 84 (2018) 221-225.
44. M. Suchánek, D. Milde, *Kvalimetrie* 18, EURACHEM ČR, Praha 2013.
45. International Conference on Harmonisation ICH Q2(R1) Step 4 Validation of analytical procedures: Text and methodology. ICH, Geneva, Switzerland 2009.
46. <https://www.terezia.eu/100-hliva-ustricna-v-kapslich/> , staženo 15. května 2020.
47. <https://bylinkopedie.cz/hliva-ustricna/> , staženo 15. května 2020.
48. <https://www.topvet.cz/doplňky-stravy/bylinne-extrakty-lihove-tinkury/838-ostropestrec-tinkura-kapky>, staženo 15, května 2020.
49. <https://www.mojemedicina.cz/pruvodce-pacienta/zivotni-styl/bylinky-ve-vasi-lekarnicce/ostropestrec-mariansky-ucinny-pomocnik-v-boji-proti-jaternim-nemocem.html>, staženo 15. května 2020.
50. G. Grindlay, J. Mora, M. Loos-Vollebregt, F. Vanhaecke: A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard to ionize elements in inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 86 (2013) 42-49.

## 7 Přílohy

### 7.1 Obrázky analyzovaných doplňků stravy



**Příloha I** Analyzovaný doplněk stravy č.1 Hlíva ústříčná 100 % [47]



**Příloha II** Analyzovaný doplněk stravy č.2 Ostropestřec mariánský [49]



## 7.2 Data z měření doplňků stravy

Příloha III Data z analýzy doplňku stravy Hlíva ústříčná 100 %

Vzorek	<sup>75</sup> As [He]		<sup>111</sup> Cd [He]		<sup>202</sup> Hg [He]		<sup>208</sup> Pb [He]	
	Konc. [ppb]	Konc. RSD	Konc. [ppb]	Konc. RSD	Konc. [ppb]	Konc. RSD	Konc. [ppb]	Konc. RSD
0	0,00	N/A	0,00	N/A	0,00	N/A	0,00	N/A
0.5	0,77	1,54	1,29	4,89	0,90	1,88	6,50	1,99
5	5,06	1,01	5,03	1,48	5,74	0,66	5,08	0,48
10	10,22	2,20	10,23	1,95	11,79	0,87	9,94	0,68
50	50,35	0,43	50,18	0,76	60,40	2,00	49,60	1,78
100	101,16	0,35	101,04	0,53	122,08	1,31	101,27	1,48
500	499,73	0,90	499,77	0,55	494,50	0,97	499,78	0,62
voda	0,71	25,25	0,18	23,00	5,66	35,87	0,15	49,18
TM 25.6	31,06	0,85	23,92	0,30	3,03	19,42	26,35	1,12
TMDA 64.3	185,82	1,02	259,80	0,37	1,09	4,61	289,12	1,03
Blk D	2,25	10,44	0,07	37,70	13,10	10,80	0,22	19,49
Blk E	0,48	6,31	0,01	80,38	2,62	5,56	0,09	5,48
Blk F	0,25	7,76	0,00	88,32	0,97	4,41	0,07	3,62
Blk 4	0,19	13,93	0,01	52,48	0,46	3,02	0,75	2,83
Blk 5	0,08	27,69	<0.000	N/A	0,27	3,47	0,06	7,86
Blk 6	0,07	10,64	<0.000	N/A	0,16	10,30	0,11	12,84
Vz A	62,56	1,23	3,37	1,86	0,27	6,69	1,24	1,72
Vz B	63,54	0,89	3,41	1,03	0,22	2,01	1,02	1,26
Vz C	61,83	1,22	3,40	2,64	0,21	0,93	1,05	2,70
Vz 1	61,66	2,46	3,49	1,00	0,18	10,60	1,09	2,93
Vz 2	63,37	0,78	3,37	2,98	0,17	4,38	1,24	1,74
Vz 3	63,34	2,08	3,39	0,95	0,18	3,16	1,03	1,45
TMDA 64.3	179,78	1,08	246,92	1,15	<0.000	N/A	276,76	0,91
0.5 J 1	71,63	0,52	8,25	0,46	0,49	1,86	15,29	0,94
0.5 J 2	72,85	0,80	8,17	0,67	0,53	3,30	14,70	0,57
0.5 J 3	72,74	0,87	8,27	0,69	0,52	4,68	14,71	1,62
1,0 J 1	82,97	1,62	13,27	0,51	0,86	1,22	27,82	0,17
1,0 J 2	81,22	1,25	13,06	1,62	0,84	2,51	29,26	1,96
1,0 J 3	82,07	0,69	12,91	1,01	0,84	1,59	27,94	1,62
1,0 J 4	81,13	0,44	13,18	1,17	0,74	2,17	28,31	0,23
1,0 J 5	82,01	0,72	13,15	0,72	0,75	4,53	28,23	1,41
1,0 J 6	81,29	0,35	13,09	0,43	0,72	4,16	27,99	1,82
1.5 J 1	89,52	0,55	17,77	1,65	1,03	1,65	42,39	3,45
1.5 J 2	88,35	0,66	18,02	0,62	1,02	2,17	41,93	1,79
1.5 J 3	89,85	0,38	17,84	1,03	1,04	0,31	42,21	2,08
TMDA 64.3	179,80	1,87	242,80	1,39	<0.000	N/A	268,46	1,17

**Příloha IV** Data z analýzy doplňku stravy *Ostropestřec mariánský*

Vzorek	<sup>75</sup> As [He]		<sup>111</sup> Cd [He]		<sup>202</sup> Hg [He]		<sup>208</sup> Pb [He]	
	Konc. [ppb]	Konc. RSD	Konc. [ppb]	Konc. RSD	Konc. [ppb]	Konc. RSD	Konc. [ppb]	Konc. RSD
0	0,00	N/A	0,00	N/A	0,00	N/A	0,00	N/A
0.5	0,61	5,23	0,53	4,94	0,40	3,09	0,52	2,36
1	1,36	4,51	0,99	2,04	0,64	3,49	1,11	1,22
5	5,02	2,19	5,05	0,38	4,19	1,17	4,94	0,71
10	10,11	3,13	10,15	1,14	7,79	0,94	9,98	0,59
50	50,51	1,32	50,76	1,59	48,32	1,31	50,19	1,37
100	101,87	1,83	102,25	1,02	106,65	0,77	103,02	0,90
500	499,57	0,90	499,47	1,01	498,89	1,37	499,38	1,06
voda	0,44	26,35	0,10	41,97	2,58	35,12	0,08	88,76
TMDA 64.3	165,77	1,50	255,21	0,87	2,24	14,67	270,81	1,05
Blk D	1,44	29,63	0,05	13,27	16,91	21,26	0,32	7,40
Blk E	0,32	5,21	0,01	48,40	4,56	3,70	0,20	6,02
Blk F	0,14	14,27	0,01	41,67	2,42	6,04	0,17	6,03
Blk 4	0,12	15,58	0,02	23,60	1,56	2,72	0,82	1,37
Blk 5	0,04	18,05	0,00	87,02	1,03	2,15	0,13	3,66
Blk 6	0,05	21,28	0,01	47,57	0,76	1,80	0,17	3,79
Vz A	52,14	3,64	3,16	3,42	0,84	4,26	1,40	4,70
Vz B	54,20	4,01	3,33	5,30	0,75	3,78	1,20	5,19
Vz C	53,50	2,42	3,43	0,91	0,70	2,79	1,26	2,17
Vz 1	53,48	3,66	3,47	4,51	0,61	3,41	1,30	5,68
Vz 2	54,22	2,66	3,43	2,65	0,56	3,64	1,40	3,94
Vz 3	54,75	1,70	3,41	2,24	0,53	2,13	1,24	1,65
TMDA 64.3	166,66	4,20	276,67	3,26	0,16	3,11	272,50	3,01
0.5 J 1	62,12	1,83	8,76	3,08	0,83	2,51	15,36	3,08
0.5 J 2	62,62	1,67	8,63	1,31	0,80	1,35	14,52	0,63
0.5 J 3	63,05	4,69	8,69	5,33	0,79	5,61	14,48	5,12
1,0 J 1	70,23	3,33	13,80	3,30	1,07	3,43	26,64	3,31
1,0 J 2	69,68	0,70	13,64	1,20	1,06	2,20	28,15	0,98
1,0 J 3	70,64	2,86	13,96	2,27	1,06	3,32	27,44	2,95
1,0 J 4	69,53	0,74	14,00	1,67	0,96	1,05	27,78	1,09
1,0 J 5	71,17	2,13	13,93	1,32	0,96	1,45	27,46	1,18
1,0 J 6	69,75	1,23	14,01	1,82	0,94	2,46	27,39	1,55
1.5 J 1	77,42	1,44	19,34	1,45	1,21	2,07	40,50	1,25
1.5 J 2	76,82	2,74	19,44	2,20	1,21	2,47	40,26	2,01
1.5 J 3	78,14	1,31	19,45	1,02	1,21	1,63	40,29	1,26
TMDA 64.3	164,78	1,06	282,55	0,31	0,05	3,39	265,01	0,75