

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

**Prvková analýza vzorků se složitou maticí
metodou ICP-*oa*-TOF-MS**

Ing. Tereza Šídová

**Disertační práce
2017**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Všechny literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsem uvedla v seznamu použité literatury.

Byla jsem obeznána s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o použití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že když dojde k použití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o použití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mě požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výšky.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním svojí práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 17.7. 2017

.....
Tereza Šídová

Velmi děkuji vedoucí své disertační práce doc. Ing. Jitce Šrámkové, CSc., za odborné vedení a pomoc, kterou mi v průběhu mého studia poskytla. Velký dík patří také Ing. Lence Husákové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a podporu jak, při experimentální práci, tak při zpracování disertace.

Děkuji svým rodičům a příteli za veškerou jejich podporu a trpělivost.

ANOTACE

Disertační práce byla zaměřena na vývoj a optimalizaci nových postupů pro potřeby multielementární analýzy reálných vzorků metodou ICP-*oa*-TOF-MS. Možné interference byly vytipovány na základě interferenčních křivek, ty však neodhalovaly vliv celé matrice reálných vzorků, proto pro každý typ vzorku byly řešeny individuálně. Navržené metody byly úspěšně aplikovány při analýze uhelných popílků, vydřích tkání, krmiv pro domácí zvířata a kojeneckého sušeného mléka. Pro přípravu vzorků byly zkoumány možnosti použití ekologicky šetrných a časově úsporných metod. Optimální podmínky metody byly určeny za využití postupů plánování experimentů a výsledná data byla zhodnocena nástroji statistické analýzy dat. Přesnost navržených postupů byla ověřena analýzou referenčních materiálů či pomocí analytické návratnosti.

Klíčová slova:

ICP-*oa*-TOF-MS, multielementární analýza, interference matrice, mikrovlnná mineralizace, mikrovlnná extrakce, analýza uhelných popílků, analýza vydřích tkání, analýza sušeného kojeneckého mléka, analýza krmiv pro domácí zvířata

Multielement analysis of samples with complex matrix by ICP-*oa*-TOF-MS

ANNOTATION

Thesis was focused on the development and optimization of new procedures for multielemental analysis of real samples by ICP-*oa*-TOF-MS. The influence of matrix elements was studied and possible approaches solving problematic interference in the analysis of elements of interest. The proposed methods were successfully applied in the analysis of coal ash, otter tissues, pet food and infant formula. Design of experiments was used to find optimal conditions for preparing various types of samples. In accordance with the principles of green chemistry the possibility of replacing highly toxic acids less toxic agents were examined for the preparation of samples. The accuracy of the proposed methods were validated on reference standard materials or using analytical recoveries.

Key words:

ICP-*oa*-TOF-MS, multielemental analysis, matrix interference, microwave digestion, microwave-assisted extraction, analysis of fly coal ash, analysis of otter tissue, analysis of infant milk, analysis of pet food

Obsah

1. Úvod	9
2. Teoretická část	11
2.1. Spektrální interference a jejich rozdělení	11
2.1.1. Monoizotopické interference	11
2.1.2. Dvojnásobně nabité ionty	11
2.1.3. Oxidové a hydroxidové ionty	12
2.1.4. Polyatomické interference	12
2.2. Nespektrální interference.....	14
2.2.1. Fyzikální interference	14
2.2.2. Chemické interference	15
2.3. Identifikace interferencí.....	15
2.4. Eliminace spektrálních a nespektrálních interferencí.....	16
2.4.1. Matematická korekce.....	16
2.4.2. Kolizně reakční cely	18
2.4.3. Spektrometry s vysokým rozlišením	20
2.4.4. Studené plazma.....	21
2.4.5. Separace matrice.....	22
2.4.6. Metoda porovnávacího prvku.....	25
2.4.7. Kalibrace s maticí.....	25
2.4.8. Metoda přidavku standardu	26
2.4.9. Metoda izotopového ředění	26
2.5. Problematika analýzy reálných vzorků.....	26
2.5.1. Analýza uhelných popílků	26
2.5.2. Analýza kojenecké výživy a mléka	29
2.5.3. Analýza tkání biologického a živočišného původu	32
2.5.4. Analýza krmiv pro domácí zvířata (kočky a psy)	36
3. Experimentální část	39
3.1. Použité chemikálie.....	39
3.2. Příprava roztoků	39
3.2.1. Příprava 2 mol L ⁻¹ kyseliny dusičné	39
3.2.2. Příprava zásobních roztoků	39
3.2.3. Kalibrační roztoky	40
3.3. Seznam analyzovaných vzorků	41
3.4. Příprava vzorků k analýze	48
3.4.1. Optimalizace MAE vzorků s proměnným množstvím křemičitanové matrice	48
3.4.2. Extrakce uhelného popílku	48
3.4.3. Kojenecké sušené mléko	49
3.4.4. Vzorky tkání vydry říční.....	49
3.4.5. Krmiva pro domácí zvířata	50
3.5. Instrumentace.....	51
3.5.1. Mikrovlnné zařízení Speedwave MWS-3 ⁺	51

3.5.2.	Spektrometr ICP- <i>oa</i> -TOF-MS	52
3.5.3.	Atomový absorpční spektrometr SensAA	55
3.5.4.	Spektrometr AMA 254	56
3.5.5.	ICP-OES spektrometr Integra XL	57
3.5.6.	Podvarové destilační zařízení	58
3.5.7.	Lyofilizátor ScanVac CoolSafe	58
3.5.8.	Ostatní laboratorní přístroje a pomůcky	59
4.	Výsledky a diskuze	60
4.1.	Studium vlivu matričních prvků na stanovení vybraných analytů	60
4.2.	Analýza uhelných popílků	62
4.2.1.	Extrakce křemičitanové matrice	62
4.2.2.	Optimalizace MAE pro potřeby multielementární analýzy uhelných popílků	67
4.2.3.	Studium interferencí	69
4.2.4.	Přesnost stanovení	70
4.2.5.	Detekční limity, citlivost metody a vliv interference matrice	72
4.2.6.	Časová náročnost analytického postupu	73
4.3.	Analýza kojeneckého sušeného mléka	74
4.3.1.	Volba porovnávacího prvku	74
4.3.2.	Přesnost analýzy	75
4.3.3.	Detekční limity a mez stanovitelnosti	77
4.3.4.	Aplikace pro analýzu reálných vzorků kojeneckých mlék	78
4.3.5.	Porovnání výsledků s hodnotami deklarovanými výrobcem a s legislativou.. ..	89
4.4.	Analýza tkání vydry říční	92
4.4.1.	Optimalizace podmínek lyofilizace a MWD, vliv homogenizace a velikosti navážky	93
4.4.2.	Přesnost stanovení	99
4.4.3.	Detekční limity a mez stanovitelnosti	100
4.4.4.	Aplikace pro analýzu reálných vzorků	101
4.4.5.	Porovnání naměřených výsledků s dostupnou literaturou	109
4.5.	Analýza krmiv pro domácí zvířata	111
4.5.1.	Optimalizace lyofilizace, parametrů ICP-OES a ICP-MS	112
4.5.2.	Přesnost stanovení	113
4.5.3.	Detekční limity a mez stanovitelnosti	115
4.5.4.	Aplikace pro analýzu reálných vzorků	115
4.5.5.	Porovnání naměřených výsledků s limity danými legislativou	134
5.	Závěr	136
6.	Literatura	141
	Seznam publikací a odborných příspěvků	150
	Přílohy	153

Seznam zkratek

CRC	Kolizně-reakční cela
CRM	Certifikovaný referenční materiál
HR-CS-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s kontinuálním zdrojem záření a s vysokým rozlišením
DOE	Plánování experimentu
DRC	Dynamická reakční cela
EDX	Energiově-disperzní spektrometrie
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ETAAS	Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
ETV	Elektrotermické vypařování
FI	Průtoková analýza
FAES	Plamenová atomová emisní spektrometrie
FAAS	Plamenová atomová absorpční spektrometrie
HG	Generování hydridů
HR	Hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu
<i>icp</i> TOF	Průletový analyzátor s ortogonální akcelerací iontů a kvadrupólovým filtrem
IP	Ionizační potenciál
LA	Laserová ablace
LIBS	Spektrometrie laserem indukovaného plazmatu
LOD	Detekční limit
LOQ	Mez stanovitelnosti

Seznam zkratek

m/z	Poměr mezi hmotností iontu a jeho nábojem
MWD	Mikrovlnný rozklad
MAE	Mikrovlnným polem asistované extrakce
NAA	Neutronová aktivační analýza
oa-TOF	Průletový analyzátor s ortogonální akcelerací iontů
ORC	Oktapólová kolizně-reakční cela
PP	Polypropylen
PFA	Perfluoroalkoxy
PTFE	Polytetrafluoroetylen
TMAH	Hydroxid tetrametylamonný
Q	Kvadrupólový analyzátor
XRF	Rentgenová fluorescenční spektrometrie

1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS) je jednou z nejpoužívanějších metod ultrastopové anorganické prvkové analýzy. Mezi nejrozšířenější ICP-MS instrumentaci patří v současné analytické praxi spektrometry s kvadrupólovým analyzátozem (Q-ICP-MS), významný podíl zaujímají i spektrometry s vysokým rozlišením (HR-ICP-MS). S tímto souvisí i počet publikovaných prací zabývajících se praktickými aplikacemi realizovanými na těchto spektrometrech. Spektrometry s průletovým analyzátozem a ortogonální akcelerací iontů (ICP-oa-TOF-MS) byly ve srovnání s výše zmíněnými typy spektrometrů uvedeny do rutinní praxe později, jsou zde tak zastoupeny v menším počtu a v současné době pak celá řada metod a aplikací pro potřeby reálné analýzy schází.

Zatímco u HR-ICP-MS spektrometrů je rozlišovací schopnost dostatečná pro odlišení většiny spektrálních interferencí polyatomických iontů a pro kvadrupólové analyzátozem s nízkým rozlišením nabízí řešení kolizně reakční cely, pro ICP-oa-TOF-MS instrumentaci je situace složitější. Ačkoliv spektrometry s průletovým analyzátozem dosahují oproti konvenčním kvadrupólovým analyzátozem vyšší rozlišovací schopnosti, pro potřeby reálné praxe stále chybí řešení celé řady praktických problémů. Z dostupných metodik vypracovaných pro eliminaci interferencí lze pro ICP-oa-TOF-MS uplatnit matematické korekce [1] a nově i kolizně reakční cely [2, 3]. V případě matematických korekcí je velkou výhodou simultánní záznam spektra poskytovaný průletovým analyzátozem, díky čemuž nedochází ke zkreslení jako u skenovacích spektrometrů a korekce může být uplatněna i retrospektivně. Spojení průletového analyzátozem s kvadrupólovým filtrem spektrometru *icpTOF* (TOFWERK AG, Švýcarsko) [2] či oktapólovou kolizní celou přístroje GBC OptiMass 9600 [3] (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie) bylo realizováno v posledních letech a uvedená instrumentace není v analytických laboratořích rozšířena. V případě *icpTOF* může být překážkou/nevýhodou vyšší pořizovací cena.

Předložená práce byla zaměřena na vývoj nových metod analýzy reálných vzorků pomocí spektrometru GBC OptiMass 8000, který využívá technologie time-of-flight s ortogonálním urychlováním iontů a společně s druhou generací GBC OptiMass 9500 je nejrozšířenějším uvedeným typem. Pozornost byla věnována problematice analýzy uhelných popílků, tkání biologického a živočišného původu, kojeneckého sušeného mléka a krmiv pro domácí zvířata. Všechny postupy byly navrženy nebo vyvíjeny s ohledem na požadavky současné zelené

chemie [4], důraz byl kladen na ekologickou šetrnost a finanční úspornost. Pro nalezení optimálních podmínek metod bylo využito postupů plánování experimentu (DOE), a to buď uplatněním plného nebo frakcionálního faktorového plánu. Pro posouzení vlivu sledovaných faktorů a jejich vzájemných interferencí byly sestaveny Paretovy grafy standardizovaných efektů a responzní plochy. Experimentální výsledky byly zpracovány za využití dostupných nástrojů jednorozměrné a vícerozměrné statistické analýzy dat. Navržené analytické postupy byly validovány prostřednictvím certifikovaných referenčních materiálů a analytických návratností.

2. Teoretická část

2.1. Spektrální interference a jejich rozdělení

Interference v ICP-MS analýze jsou klasifikovány na spektrální a nespektrální. Spektrální interference jsou způsobeny atomovými a molekulovými ionty, které mají téměř stejnou hmotnost jako analyt. U nespektrálních interferencí je signál analytu ovlivněn přítomností matrice vzorku, ve většině případů dochází ke snížení intenzity signálu. Přestože převážná část interferencí je dobře popsána, odstranění jejich vlivu na analýzu je obtížné a časově náročné.

2.1.1. Monoizotopické interference

Monoizotopické interference jsou způsobeny existencí dvou izotopů různých prvků o téměř stejné m/z . Ve skutečnosti neexistují dva izotopy s úplně stejnou m/z , avšak rozdíly jsou mezi jednotlivými hmotami velmi malé. Například izotop Ar^+ na hmotě 39,948 interferuje s iontem Ca^+ ($m/z = 40,08$) [5]. Rozlišení potřebné k odlišení dvou takto blízkých prvků leží v rozmezí mezi 10^4 až 10^8 , ani u komerčních spektrometrů HR-ICP-MS není dosaženo potřebného rozlišení [6]. Pro většinu prvků lze nalézt izotop nezatížený izobarickou interferencí, ne vždy se však jedná o nejvíce zastoupený izotop [5-10]. Tyto interference jsou dobře popsány a snadno předvídatelné, pro jejich odstranění lze v některých případech úspěšně použít i matematické korekce [6, 11, 12].

2.1.2. Dvojnásobně nabitě ionty

Druhým typem spektrálních interferencí vyskytujících se při reálné analýze jsou dvojnásobně nabitě ionty M^{2+} . Jednotlivé izotopy jsou od sebe odlišeny na základě poměrů hmotnosti a náboje, pík dvojnásobně nabitého iontu M^{2+} je patrný na poloviční nominální hodnotě mateřského iontu. Dvojnásobná ionizace nastává u prvků, které mají nízkou hodnotu druhého ionizačního potenciálu [11, 13, 14], nízkou hodnotu součtu druhého a prvního ionizačního potenciálu [15] nebo jejich rozdílu [13, 16]. Nejčastěji uváděnými příklady jsou prvky barya, stroncia a prvky vzácných zemin. Prvky s IP větším než 15,76 eV tvoří dvojnásobně nabitě ionty pouze pod 0,1 % a pravděpodobně nebudou v hmotnostním spektru

pozorovatelné, záleží to však i na koncentraci daného prvku [13]. Argon ($IP(II) = 27,63\text{eV}$) by neměl tvořit M^{2+} , ale díky jeho vysoké koncentraci je pozorován pík $m/z = 20$ [13, 14]. Vhodným nastavením parametrů přístroje lze tvorbu M^{2+} snížit [9, 14, 16].

2.1.3. Oxidové a hydroxidové ionty

Některé prvky, pokud jsou disociovány v přítomnosti kyslíku a vodíku, tvoří oxidové MO^+ a hydroxidové MOH^+ ionty projevující se na $m/z + 16$ a $m/z + 17$. Rozhodujícím faktorem pro formování MO^+ je síla vazby [6, 16], mezi prvky formující silné oxidy jsou řazeny prvky vzácných zemin. Výsledná koncentrace těchto oxidů je ovlivněna množstvím vody vnášené do plazmatu se vzorkem [14], odstraněním vody (např. pomocí mlžné komory či ETV) lze tuto koncentraci snížit na 1–2 % [8, 11].

Tyto interference jsou problematické v případě vyšší koncentrace prvku tvořícího MO^+ nebo MOH^+ oproti koncentraci stanovovaného prvku. Příkladem může být stanovení stříbra v půdách, kde množství prvků Zr, Y a Nb je o mnoho řádů větší než koncentrace samotného stříbra. Stanovení nejzastoupenějšího (51,8 %) izotopu stříbra $^{107}\text{Ag}^+$ je rušeno polyatomickými ionty $^{91}\text{Zr}^{16}\text{O}^+$, $^{90}\text{Zr}^{16}\text{OH}^+$, $^{89}\text{Y}^{18}\text{O}^+$ a stanovení $^{109}\text{Ag}^+$ (48,2 %) je ovlivněno $^{93}\text{Nb}^{16}\text{O}^+$, $^{92}\text{Zr}^{16}\text{OH}^+$, $^{92}\text{Mo}^{16}\text{OH}^+$ [17].

2.1.4. Polyatomické interference

Vznik polyatomických interferencí je hůře předvídatelný a závisí na složení matrice a na nastavení parametrů přístroje. Vznikají kombinací dvou a více atomů z plazmového plynu (Ar), komponent matrice (O, C, N, H, Cl, S, Na, Ca, Mg, P atd.) a přítomného rozpouštědla. Převážně jsou pozorovány v oblasti do m/z 80. Existují pravděpodobně tři příčiny a místa vzniku polyatomických interferencí: kondenzační reakce v expanzním prostoru, kolizní reakce v okrajové vrstvě kolem vnějšího povrchu sampleru a přímo v plazmě [8].

Příklady polyatomických iontů interferujících při reálné analýze vybraných prvků jsou uvedeny v tabulce 1. Polyatomické asociáty chloru s argonem nebo kyslíkem tvoří řadu interferencí na izotopech $^{75}\text{As}^+$, $^{52}\text{Cr}^+$, $^{51}\text{V}^+$, $^{54}\text{Fe}^+$ a $^{77}\text{Se}^+$ [1, 18-20]. Další významnou skupinou jsou polyatomické asociáty obsahující vápník [21, 22], ty komplikují například stanovení $^{57}\text{Fe}^+$, $^{58}\text{Ni}^+$ a $^{59}\text{Co}^+$.

V přítomnosti fosforu byly pozorovány interference na $^{47}\text{Ti}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$ a $^{64}\text{Zn}^+$ [8, 23, 24] díky polyatomickým iontům $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$ a $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$. Síra tvoří $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{32}\text{S}^{32}\text{S}^+$ a další polyatomické asociáty, které interferují na hmotách 48, 49, 50, 52, 53, 64, 65, 67 a 68 a znemožňují stanovení Ti, Cu a Zn [25]. Dalším významným interferentem je uhlík, polyatomický asociát $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ [26] ovlivňuje stanovení Cr na $m/z = 52$, což je nejvíce přirozeně zastoupený izotop (83,3 %), druhý izotop $^{53}\text{Cr}^+$ (9,5 %) je také ovlivněn interferencí od $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$.

Tabulka 1: Interference vybraných polyatomických iontů pozorovaných při analýze reálných vzorků

Matriční prvek	Analyt	Polyatomický iont	Matrice	Typ analyzátoru	Lit.
Cl	$^{75}\text{As}^+$	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$	Moč	Q	[19]
	$^{52}\text{Cr}^+$	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$	Mořská voda	Q	[20]
	$^{51}\text{V}^+$	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$	Mořská voda	Q	[18]
	$^{54}\text{Fe}^+$	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$	Moč	TOF	[1]
	$^{77}\text{Se}^+$	$^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$	Krevní sérum	Q	[27]
Ca	$^{57}\text{Fe}^+$	$^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$	Krevní sérum	HR	[21]
	$^{58}\text{Ni}^+$	$^{40}\text{Ca}^{18}\text{O}^+$	Mořská voda	Q	[22]
	$^{59}\text{Co}^+$	$^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$	Mořská voda	Q	[22]
Mg	$^{65}\text{Cu}^+$	$^{40}\text{Ar}^{25}\text{Mg}^+$	Rostliny	Q	[28]
	$^{59}\text{Co}^+$	$^{24}\text{Mg}^{35}\text{Cl}^+$	Moč	TOF	[1]
P	$^{47}\text{Ti}^+$	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$	Moč	Q	[23]
	$^{63}\text{Cu}^+$	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$	Moč	HR	[24]
	$^{64}\text{Zn}^+$	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$	Biologické vzorky	Q	[8]
S	$^{64}\text{Zn}^+$	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$	Vzorky krve	Q	[29]
	$^{48}\text{Ti}^+$	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$	Mořská voda	Q, HR	[25]
C	$^{52}\text{Cr}^+$	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	Kal a sediment	Q	[26]

2.2. Nespektrální interference

Během analýzy se vedle spektrálních interferencí mohou uplatňovat i nespektrální interference. Díky extrakci iontů a jejich zaostření v hmotnostním spektrometru má povaha a koncentrace matričních prvků větší vliv na analýzu u ICP-MS oproti ICP-OES [9].

Matriční prvky mohou ovlivnit výsledky zvýšením nebo snížením signálu hledaného analytu. Čím větší je variabilita matrice, tím obtížněji se odstraňují rušivé vlivy. Hlavními faktory, které určují rozsah vlivu matrice na analýzu, jsou: transport vzorku, ionizace, extrakce a fokusace iontů. Matriční prvky s nízkým ionizačním potenciálem a/nebo prvky těžší než zájmové izotopy mají největší vliv na analýzu ICP-MS. Důležitým faktorem je poměr mezi koncentrací analytu a koncentrací interferentu [19]. Velikost nespektrální interference během analýzy závisí na nastavení podmínek přístroje [30].

Nespektrální interference mohou být dále klasifikovány na fyzikální a chemické, ty budou rozebrány níže. Podle jiného zdroje [18] se tyto interference dělí na vratné a nevratné. Prvně jmenované jsou charakterizovány jako matricí způsobené změny v analytickém signálu (snížení/zvýšení), které přetrvávají tak dlouho, dokud je matrice zaváděna. Druhý jmenovaný je způsoben usazováním solí matrice nebo oxidů v hmotnostním interface, znamená to pozvolné ztráty signálu, které běžně přetrvávají, i když je zavádění vzorku ukončeno.

2.2.1. Fyzikální interference

Fyzikální vlivy souvisejí se změnami ve vnášení vzorku do plazmatu, týkají se tedy hustoty a viskozity, nebo povrchového napětí. Tyto změny mají za následek ovlivnění transportu vzorku do plazmatu, jeho zmlžování a extrakci iontů. Vyšší viskozita může být způsobena obsahem solí nebo kyselin a její vliv lze odstranit zředěním vzorku.

Faktory ovlivňující vznik, velikost a distribuci kapek aerosolu mohou způsobit změny v charakteristických vlastnostech plazmy. Na transport vzorku a jeho zmlžování má vliv konstrukce zmlžovače, průtok zmlžovacího plynu a viskozita, povrchové napětí, hustota, rychlost odpařování a tlak par vzorku [31]. Distribuce velikosti primárních kapek je ovlivněna konstrukcí zmlžovače, průtokem zmlžovacího plynu, viskozitou a povrchovým napětím

rozpouštědla. Rozpouštědla s nižším povrchovým napětím budou mít za následek menší kapičky.

2.2.2. Chemické interference

Chemický vliv na analýzu je spojen především se změnami v ionizační rovnováze způsobené matričními prvky. Matrice vzorku ovlivňuje teplotu v plazmě a tím i atomizaci a excitační a ionizační vlastnosti výboje [19]. Vnášení organických rozpouštědel do plazmatu snižuje teplotu excitace a elektronové hustoty. Pro prvky s první IP v rozmezí 9–12 eV lze zvýšit citlivost díky přenosu náboje přidáním sloučeniny obsahující uhlík. Tento nárůst je možný pozorovat pouze pro prvky, které nejsou 100% ionizovány v argonovém plazmatu a u těch, kde první ionizační potenciál je menší než ionizační potenciál uhlíku. Jedná se tedy o prvky As, Au, S, Te a Hg [31].

Vysoká koncentrace rozpuštěných solí ve vzorku může vést k depozici na kónusy v ICP-MS. Ve většině případů dochází ke změnám rozložení prvků v iontovém paprsku [9]. V některých případech lze záměrně nechat kónusy částečně zanést, dojde k ustálení stavu, kde rychlost depozice koresponduje s rychlostí odstraňování z kónusů [31].

2.3. Identifikace interferencí

Identifikace spektrálních interferencí může být provedena několika způsoby. V praxi nejpoužívanější je metoda standardního přídávku, která je založena na měření standardů bez přítomnosti matrice a pak s matricí. Liší-li se hodnota obou směrnic lineárních částí kalibrační křivky u obou měření, výsledek je ovlivněn interferencí matrice [32]. Další možností je měření poměrů mezi jednotlivými izotopy daného prvku ve vodném standardu a ve vzorku. Získáním rozdílných hodnot lze usuzovat na přítomnost rušících složek. Tento postup nelze aplikovat na monoizotopické prvky, jako je Mn a As nebo prvky, kde přirozené zastoupení jednoho izotopu výrazně převyšuje přítomnost druhého [11]. Poslední možností odhalení interference je použití HR-ICP-MS, který je schopen od sebe odlišit interferent a stanovený izotop.

2.4. Eliminace spektrálních a nespektrálních interferencí

Ačkoliv většina interferencí je dobře popsána a zdokumentována, v současné době nebyla vyvinuta univerzální metoda pro jejich kompletní odstranění, proto jsou stále hledány nové možnosti. Zkoušejí se odlišné způsoby vnášení vzorku do plazmatu pomocí různých typů zmlžovačů. Nejjednodušším způsobem, jak eliminovat vliv interference, je zvolit vhodný izotop tak, aby jeho stanovení nebylo interferencí zatíženo. Řešení pro spektrometry s kadrupólovým analyzátozem jsou kolizně reakční cely. Využívají se matematické korekce, spektrometry s vysokým rozlišením (HR-ICP-MS), metoda studeného plazmatu, vymražování vody, separace matrice a další. Nejvýznamnější postupy pro odstranění interferencí budou popsány níže.

2.4.1. Matematická korekce

Většina prvků v hmotnostním spektru je zastoupena více než jedním izotopem, toho je využito pro matematické korekce jak izobarických, tak polyatomických interferencí. Nárůst intenzity vlivem interference na dané hmotě je vypočítáván prostřednictvím přirozeného izotopového zastoupení a měřením intenzity interferujícího prvku na jiné m/z. Příkladem korekce izobarické interference je stanovení kadmia, kde na hmotě 114 se vyskytuje nejzastoupenější izotop Cd (28,73 %). Rovněž se zde nalézá i izotop Sn (0,65 %) a přispívá k celkovému výsledku [29]. Další izotop Sn (24,23 %) na 118 m/z není zatížen interferencí. Lze tedy monitorovat intenzitu signálu Sn na m/z 118 a tuto hodnotu použít pro určení příspěvku na m/z 114. Tuto korekci lze zadat přímo do softwaru přístroje, a to ve formě rovnice (1):

$$I(^{114}\text{Cd}) = I(114) - \frac{^{114}\text{Sn}}{^{118}\text{Sn}} \cdot I^{118}\text{Sn} = I(114) - \frac{0,65}{24,23} \cdot I^{118}\text{Sn} \quad (1)$$

Složitější korekce založené na korekčních faktorech jsou vhodné pro polyatomické interference. Velikost interference je odhadnuta dvěma způsoby: pomocí roztoku shodného složení s matricí vzorku, nebo je stejná interference pozorována i na jiné hmotě a je použita pro další korekci [6].

Příkladem je stanovení $^{75}\text{As}^+$ zatížené chloridovou interferencí $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$. Signál polyatomického iontu $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ je měřen zároveň se signálem $^{35}\text{Cl}^+$ v roztocích obsahujícím pouze matici a chloridy s rostoucí koncentrací ale bez As. Pomocí těchto roztoků je vypočítán poměr $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+ / ^{35}\text{Cl}^+$ a aplikován jako korekční faktor. Signál izotopu arzeniu na 75 m/z je měřen spolu se signálem $^{35}\text{Cl}^+$ v roztoku vzorku, vynásobení signálu $^{35}\text{Cl}^+$ korekčním faktorem a odečtením od signálu na 75 m/z je dosaženo korigovaného signálu As [6]. Tato korekce je popsána rovnicí (2):

$$I(^{75}\text{As}) = I(^{75}\text{As}) - I(^{35}\text{Cl}) \frac{I(^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl})}{I(^{35}\text{Cl})} \quad (2)$$

Další možností je měření signálu $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ na 77 m/z. Pomocí izotopového zastoupení chloridů velikost interference $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ může být vypočítána prostřednictvím $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ viz rovnice (3), nebo lze kvantifikovat přírůstek $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ díky jinému chloridovému asociátu $^{16}\text{O}^{35}\text{Cl}^+$ [6, 11, 19, 33].

$$I(^{75}\text{As}) = I(^{75}\text{As}) - \frac{I(^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl})}{I(^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl})} I(77) \quad (3)$$

Přesnost a správnost výsledků získaných matematickou korekcí závisí na velikosti interference a koncentraci analytu, v případě vysoké koncentrace interferentu rovnice nemusí adekvátně kompenzovat vysoké hodnoty [11]. Pokud se jedná o komplexní matici, může zvolený alternativní izotop (pomocí kterého odhadujeme velikost interference) mít také interferenci. Pak se rovnice komplikuje a je rozšířena o další členy, například v případě rovnice číslo 2 a 3 za přítomnosti V a Se ovlivňujícího signál na m/z 51 a 77. S každým dalším členem matematické rovnice dochází ke zhoršení přesnosti stanovení. Matematické korekce je využito v případě, že se jedná o jednoduchou korekci nebo pokud ostatní korekční metody selhávají.

2.4.2. Kolizně reakční cely

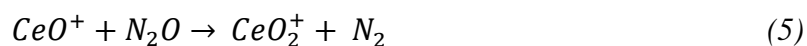
Spektrometry Q-ICP-MS nemají dostatečné rozlišení pro odlišení většiny interferencí, proto jsou umístěny mezi iontovou optiku a hmotnostní analyzátor kolizně reakční cely. Kolizně reakční cely jsou konstruovány z kvadrupólu, hexapólu či oktapólu. V cele se nachází plyn, který se v závislosti na přítomném iontu chová buď jako reakční plyn, nebo kolizní plyn [12]. Typickým plynem použitým pro kolizní mód je He, jako reakčních plynů je využito O₂, H₂, NH₃, nebo CH₄. Jednotlivé interference, pro jejichž odstranění se daný plyn používá, jsou uvedeny v tabulce 2. Množství používaného plynu zaváděného do cely se může pohybovat v rozmezí od jednotek po desítky mL min⁻¹ v závislosti na geometrii cely a na požadovaných podmínkách. Tlak v cele je vyšší než tlak v ostatních částech přístroje a bývá kolem 0,1–3 kPa [12].

Kolizní reakce jsou založeny na fyzikálních procesech (kinetická energie a fragmentace) [12]. Díky kolizi mezi ionty vzniklými v plazmě a atomy nebo molekulami kolizního plynu je kinetická energie iontů nižší, což vede ke zlepšení citlivosti. Diskriminace kinetickou energií je dosaženo nastavením negativnějšího potenciálu multipólu/cely oproti potenciálu hmotnostního filtru. Z proudu iontů jsou pak odstraněny nežádoucí ionty, zatímco ionty analytu jsou vpuštěny do analyzátoru [34].

V reakční cele pak nastávají reakce založené na iontově molekulárních reakcích, dochází k přenosu náboje a/nebo k chemické reakci zahrnující dva děje přenos atomu a reakce molekul plynu za vzniku klastru [35, 36]. Nejčastější iontově-molekulární reakcí nastávající v cele je přenos náboje [12]. Tímto způsobem lze úspěšně řešit interference plazmového plynu argonu pomocí NH₃, kde nastává reakce (4):



Reakce využívající přenos atomu našly uplatnění například u eliminace oxidových interferencí [12] viz rovnice (5):



Přestože tímto způsobem můžeme získat analyt nezatížený interferencí, musíme také vzít do úvahy možný vznik jiných polyatomických asociátů z kolizního/reakčního plynu a jejich interference na některém jiném izotopu. Také ztráty vlivem rozptylu, pokud je hmotnost reakčního plynu větší oproti hmotnosti analytu iontu, mohou být značné. Přispívat k formování nových interferencí mohou i nečistoty plynu. Produkty sekundárních reakcí lze omezit diskriminací pomocí kinetické energie nebo pomocí diskriminací hmoty [37]. Zde je kvadrupól použit jako selektivní filtr („bandpass filter“), kdy ionty mimo nastavenou oblast jsou okamžitě vypuzeny, toto umožňuje použití vysoce reaktivních plynů. Takovéto uspořádání je známé jako dynamická reakční cela (DRC) [29, 38]. V případě použití hexapólu a oktapólu se jedná o kolizně reakční celu (CRC).

Novým přístupem řešení interferencí pro kvadrupólové spektrometry je využití tzv. trojitého kvadrupólu ICP-QQQ či tandemové ICP-MS/MS. První systém vyvinula firma Agilent Technologies r. 2012. Před kolizně reakční celu je přidán další kvadrupól, ten funguje jako filtr a dovoluje vstupu pouze iontům o jedné m/z do cely, tím je zlepšena kontrola nad reakcemi probíhajícími v reakční cele [39]. Takto byly například řešeny interference oxidů Mo při stanovení Cd v referenčním materiálu mléka, kde mezi oba kvadrupóly byla umístěna ORC s kyslíkem jako reakčním plynem [40].

Tabulka 2: Reakční a kolizní plyny použité pro eliminaci některých interferencí [12]

Analyt	Polyatomický iont	Plyn	Analyt	Polyatomický iont	Plyn
Fe	ArO ⁺ CaO ⁺	H ₂ , NH ₃ , CH ₄ CO	REEs, Au, Platinové kovy	MeO ⁺	O ₂
V	ClO ⁺	NH ₃ O ₂ (VO)	S	O ₂ ⁺	Xe O ₂ (SO)
As	ArCl ⁺	H ₂ NH ₃ (AsNH ₂)	Cr	ArC ⁺	H ₂ , NH ₃
Ca	Ar ⁺	H ₂ , NH ₃ , CH ₄	⁸⁷Sr, ⁹⁰Sr	⁸⁷ Rb ⁺ , ⁹⁰ Y ⁺ , ⁹⁰ Zr ⁺	O ₂
K	ArH ⁺	H ₂ , NH ₃	¹²⁹I	¹²⁹ Xe ⁺	
Se	Ar ₂ ⁺	H ₂ , CH ₄ O ₂ , N ₂ O	⁷⁹Se	⁷⁹ Br ⁺	NH ₃

2.4.3. Spektrometry s vysokým rozlišením

Spektrometry s vysokým rozlišením dosahují oproti klasickým kvadrupólovým spektrometrům přibližně 30-krát lepšího rozlišení a s jejich pomocí je možné charakterizovat řadu polyatomických iontů. V tabulce 3 jsou uvedeny příklady jednotlivých izotopů a rozlišení potřebné pro jejich separaci od interferentů. Komerčně vyráběné přístroje dosahují rozlišení přes 10000, ale jak již bylo zmíněno výše, ani toto rozlišení nemusí být postačující pro některé izobarické interference [41], polyatomické asociáty obsahující Ar, hydridy a oxidy [7].

U spektrometrů s dvojitou fokusací jsou ionty rozlišeny na základě magnetického a elektrického pole. V magnetickém úseku jsou ionty separovány díky Lorenzově síle magnetického pole, kde dojde na základě jejich m/z k různému zakřivení dráhy letu. V elektrostatickém úseku jsou pak ionty odděleny na základě kinetické energie [42]. Existují různé kombinace v závislosti na vzájemné geometrii obou analyzátorů. Jedná se o geometrie podle Mattauch-Herzoga, Nier-Johnsona, Bainbridge-Jordana, Hintergerg-Koniga, Takeshita, Matsuda [6]. Hlavní výhodou využití obou analyzátorů je vysoká rozlišovací schopnost, přičemž rychlost skenování je stále relativně vysoká. U spektrometrů s dvojitou fokusací iontů jsou pozorovány různé šířky píků vzhledem k m/z , zatímco rozlišení zůstává konstantní v celém spektru. Oproti tomu u kvadrupólových analyzátorů se liší rozlišení a šířka píků zůstává stejná [7].

Spektrometry lze používat jak v sekvenčním, tak v simultánním módu [43], rozdíl je v počtu detektorů. Pro sekvenční mód je využíván pouze jeden detektor (elektronový násobič). Pro simultánní měření je použito řady detektorů (Faradayových detektorů), které jsou schopny sledovat více iontových paprsků [6]. V závislosti na nastavení šířky vstupní štěrbině pak pracuje spektrometr v nízkém, středním a vysokém rozlišovacím módu.

Tento analyzátor byl využit k identifikaci a eliminaci interferencí u vzorků se složitou maticí jako jsou biologické vzorky [44-46], půdy a sedimenty [47-49]. Hlavní nevýhodou tohoto spektrometru je dozajista vysoká pořizovací cena. Při použití vysokého rozlišovacího módu dojde ke zhoršení citlivosti způsobené sníženou propustností iontů [50].

Tabulka 3: Rozlišení potřebné pro separaci vybraných interferentů a izotopů [43]

Interferent	Izotop	Rozlišení
		< 3000
$^{12}\text{C}_2^+$	$^{24}\text{Mg}^+$	1605
$^{14}\text{N}_2^+$	$^{28}\text{Si}^+$	958
$^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$	$^{28}\text{Si}^+$	1557
$^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$	$^{31}\text{P}^+$	968
$^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$	$^{31}\text{P}^+$	1458
$^{16}\text{O}_2^+$	$^{32}\text{S}^+$	1801
$^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$	$^{44}\text{Ca}^+$	1281
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$	$^{51}\text{V}^+$	2572
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$	$^{52}\text{Cr}^+$	1671
$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	$^{52}\text{Cr}^+$	2375
$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$	$^{54}\text{Fe}^+$	2088
$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$	$^{56}\text{Fe}^+$	2502
$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$	$^{63}\text{Cu}^+$	2790
$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$	$^{64}\text{Zn}^+$	1952
		3000–7500
$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$	$^{48}\text{Ti}^+$	2519
$^{32}\text{S}_2^+$	$^{64}\text{Zn}^+$	4261
		7500–10000
$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$	$^{75}\text{As}^+$	7775
$^{40}\text{Ar}_2^+$	$^{80}\text{Se}^+$	9688

2.4.4. Studené plazma

Řada interferujících polyatomických iontů je tvořena přímo v plazmatu, z tohoto důvodu byla zavedena technologie studeného plazmatu („cold/cool plasma“). Vzniku studeného plazmatu je dosaženo snížením výkonu radiofrekvenčního generátoru (600–800W) a relativně vysokým průtokem zmlžovacího plynu ($> 1 \text{ L min}^{-1}$). Za těchto podmínek dojde ke zvýšení signálu prvků s nízkým ionizačním potenciálem. Snížení teplot plazmatu vede k redukci interferencí od iontů Ar. Optimalizace podmínek plazmatu je poměrně náročná a vede k eliminaci pouze některých interferencí [51], naopak použití studeného plazmatu může způsobovat zvýšenou tvorbu polyatomických iontů pocházejících z matrice [52]. Pro prvky s vysokým ionizačním potenciálem vede použití studeného plazmatu ke snížení citlivosti, a proto pro rutinní analýzu je vhodnější využití obou nastavení plazmatu, tedy studeného i horkého nebo ve spojení s dalšími technikami jako jsou kolizně reakční cely [28]. Spojení ICP-MS a studené plazmy je především využito pro analýzu vysoce čistých chemikálií v polovodičovém průmyslu [52].

2.4.5. *Separace matrice*

Dalším postupem, jak předejít interferencím, je separací matrice od sledovaného analytu. Mezi tyto postupy patří precipitace, koprecipitace, elektrotermické odpařování (ETV) a průtoková analýza (FI).

Během precipitace dochází k vysrážení interferujících či hlavních matričních složek, například při analýze stříbra o vysoké čistotě bylo stříbro vysráženo pomocí kyseliny chlorovodíkové, to umožnilo provést analýzu 11 prvků [53]. Alternativním přístupem je naopak vysrážení zájmového analytu. Koprecipitace nebo-li spolusrážení je stav, kdy je analyt včleněn do sraženiny nebo se adsorbuje na povrch sraženiny. Takto byly stanoveny prvky Cr, Fe, Mn, Pb a Zn v mořské vodě po spolusrážení s $Mg(OH)_2$ [54, 55]. Použití ETV a průtokové analýzy ve spojení s ICP-MS bude popsáno v následujících kapitolách.

2.4.5.1. *ETV-ICP-MS*

Volbou vhodného teplotního programu elektrotermického odpařování (ETV) lze odstranit ze vzorku rozpouštědlo a některé komponenty matrice, tím je možnost vzniku spektrálních a nespektrálních interferencí významně snížena [56, 57]. Během počátečního kroku sušení se voda ze vzorku odpaří, to vede k redukci tvorby hydroxidových a oxidových interferencí. Díky menšímu objemu rozpouštědla se mění podmínky plazmy. V plazmě dojde ke snížení elektronové hustoty, ale teplota excitace je zvýšena, tím je množství energie potřebné k disociaci vody sníženo a ionizační charakteristiky plazmy jsou zlepšeny [57]. Odstranění vody vede ke zmírnění interference mezi ArO^+ a Fe^+ na m/z 56 [58]. Při použití kvadrupólového analyzátoru pracujícího za atmosférického tlaku se však některé interference vzniklé přítomností kyslíku a dusíku přesto stále uplatňují [59].

Příkladem využití elektrotermického odpařování pro rozlišení izobarických interferencí je analýza Ru v přítomnosti Pd, signál $^{102}Pd^+$ se shoduje s nejvíce zastoupeným izotopem Ru. Tento problém řeší ETV, kde Pd s teplotou vypařování 1555 °C je těkavější oproti Ru (2334 °C) a je odpařeno dříve. Podobně je tomu i u Te a Ba. Baryum se vyskytuje u většiny vzorků ve vyšších koncentracích oproti Te. Telur je ale odpařován při 450 °C, zatímco baryum ve formě BaO až při teplotě 1973 °C. Vhodnou volbou podmínek ETV lze tak od sebe oddělit dva navzájem se překrývající izotopy [59].

Dosažení efektivního odpaření prvku při analýze vyžaduje ve většině případů vyšší odpařovací teploty, tím však vzrůstá i míra odpařování uhlíku z grafitu [57, 60]. Zahřátím kyvety nad 2700 °C dochází k sublimaci uhlíku, jedná se z 98,9 % o $^{12}\text{C}^+$. Polyatomické asociáty $^{12}\text{C}^{12}\text{C}^+$ a $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+$ interferují při stanovení hořčíku na m/z 24 a 26, křemík je ovlivněn vznikem $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^+$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$, ruší stanovení vápníku a chrom je ovlivněn $^{12}\text{C}^{36}\text{Ar}^+$, $^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}^+$, $^{13}\text{C}^{40}\text{Ar}^+$ [61]. Tyto interference byly pozorovány při stanovení chromu a křemíku pomocí ETV-Q-MS. Tento problém lze řešit kolizně reakční celou a amoniakem jako reakčním plynem [59]. Množství odpařeného uhlíku závisí na typu grafitové kyvety a na podmínkách působících na jejím povrchu [61]. Problematické je oddělení analytů s podobnou těkavostí. Při stanovení zinku a kadmia v mořské vodě jsou oba prvky uvolňovány z ETV ve stejný okamžik, navíc velké množství solí odpařených spolu s těmito prvky tvoří prostorový náboj [57].

Elektrotermické odpařování může mít funkci dynamického termochemického reaktoru, kdy kombinací vzorku s vhodnými činidly (modifikátory) lze separovat analyt od komponent matrice [57, 62]. Reakcí s analytem nebo komponenty matrice mění jejich chemické vlastnosti a tím zlepšuje citlivost a umožňuje přímou analýzu složitých vzorků, modifikátor může sloužit i jako nosič analytu [61]. Řada modifikátorů byla popsána již pro ETAAS. Použití modifikátoru má i své nevýhody, lze jím zanést nežádoucí kontaminace, zvýšit analytický blank, zhoršit detekční limity [57]. Modifikátor může tvořit spektrální interference díky reakci relativně velkého množství modifikátoru (μg) s plazmovým plynem. Nejčastěji používané modifikátory pro ETV-ICP-MS jsou uvedeny v tabulce 4 [63]. Využití modifikátoru lze ukázat na příkladu separace Os a Pt, kde nejvíce zastoupené izotopy Os jsou ovlivněny přítomností Pt. Izotopy Os jsou překryty ^{192}Pt a ^{190}Pt . Oba prvky jsou však poměrně žáruvzdorné. Pro jejich separaci v ETV lze použít modifikátor NH_4F , ten převede Os na těkavější formu OsF_4 a OsF_6 , ty jsou pak odpařeny z grafitové kyvety dříve než Pt [59].

Tabulka 4: Nejpoužívanější modifikátory ETV-ICP-MS [63]

Modifikátor	Použití/ efekt
Halogenující modifikátory: - Plynné (CHF ₃ , CCl ₄ , CCl ₂ F ₂ , HCl, Cl ₂) - Pevné (PTFE prášek) - Kapalné (HF, HCl, NH ₄ F.HF, NH ₄ F, NH ₄ Cl)	- Podpora odpaření termicky stabilních prvků a/nebo prvků tvořících karbidy - Zlepšení transportu pro tyto prvky, nižší LOD - Usnadnění čištění, nižší paměťový efekt - Halogenové uhlovodíky mohou zlepšit podmínky plazmy
Kovy platinové skupiny a další kovy: - Přidané jako dusičnany, chloridy,... - Pd, Rh, Ir, Au, Mg(NO ₃) ₂ +Pd(NO ₃) ₂ , Ni(NO ₃) ₂	- Stabilizace těkavých analytů - Zlepšení efektivity transportu (modifikátor = nosič)
Mořská voda (NASS-3 CRM)	- Vícesložkový nosič
Chelatující činidla: - EDTA, organické kyseliny, polyhydroxy sloučeniny,...	- Podpora odpaření komplexních prvků za nižší teploty - Selektivní reakce/odpaření, potenciál použití pro speciace
Organické kyseliny: - Kyselina askorbová, citrónová, CCl ₄ , ...	- Zlepšení efektivity transportu - Zlepšení energetických podmínek plazmy
Specifická činidla pro rozklad matrice: - NH ₄ NO ₃ - O ₂ smíchaný s Ar během pyrolýzy	- Eliminace Cl z matrice - Zlepšení odstranění organické matrice při nižší teplotě, uvolnění částic uhlíku z grafitové pece

2.4.5.2. Průtoková analýza

Při průtokové analýze je přístroj vystaven minimálnímu množství roztoku vzorku s vysokým obsahem rozpuštěných solí potřebného pro analýzu [64]. Výhodou oproti konvenčnímu zavádění vzorků je minimální blokáce kónusů, snížení nespektrálních interferencí vznikajících díky obsahu přítomných solí, zavádění nezředěného vzorku a možnost rychlého zpracování vzorku [65, 66].

Jednoduché spojení mezi ICP-MS a průtokovou analýzou FI nabízí efektivní cestu řešící problémy analýzy komplexní matrice a výskytu spektrálních a nespektrálních interferencí u ICP-MS [66, 67]. Spojení vzniká mezi výstupem z FI a přívodem do zmlžovače pomocí krátkého kusu rovné trubičky z polyethylenu nebo jiného inertního materiálu [67]. Malý objem vzorku, nejčastěji pár stovek mikrolitrů, je vložen do nosného roztoku, který je kontinuálně zaváděn do zmlžovače [68, 69].

Průtokový systém se skládá z peristaltických pump, rotačního ventilu a kolony. Nejprve dochází k vypláchnutí trubiček nosným roztokem (nejčastěji HNO_3), pak je ventil v plnicí pozici naplněn vzorkem. Následně nastává dávkování vzorku, kdy vzorek je zaváděn na kolonu a analyt je prekoncentrován. Následuje promývání kolony promývacím roztokem za účelem odstranění matrice. V injekční pozici ventilu nosný roztok eluuje analyt z kolony do ICP-MS a následuje promytí [70, 71]. Metody jsou rozděleny na off-line a on-line. Off-line metody zpracovávají po dávkách a vyžadují větší objemy vzorku. Jsou časově náročné a je zde vyšší riziko kontaminace a ztrát analytu [72]. Užitím on-line FI se tak můžeme vyhnout řadě nevýhod [66, 67].

2.4.6. Metoda porovnávacího prvku

Tato metoda patří mezi nejpoužívanější techniky pro korekci nespektrálních interferencí. Je zde využito nejméně jednoho prvku pro korekci nespektrální interference projevující se při stanovení druhého. Prvek o známé koncentraci je přidán k roztokům, včetně blanků, standardů a vzorků. Během analýzy zůstává poměr mezi analytem a porovnávacím prvkem stejný. Výsledný analytický signál je tedy normalizován k signálu interního standardu a umožňuje reagovat systém na vzniklé změny ve stabilitě signálu přístroje a vlivů matrice [10, 11, 19, 73]. Požadavky, které by měl splňovat porovnávací prvek, jsou následující: podobná hmotnost a hodnota prvního ionizačního potenciálu jako analytu [74], dobrá ionizovatelnost a absence jeho výskytu v měřeném vzorku. Nejčastěji bývá interním standardem ^{115}In , ^{45}Sc , ^{209}Bi nebo ^{103}Rh [75].

2.4.7. Kalibrace s maticí

Matrice kalibračních roztoků není ve většině případů shodná s maticí vzorku, u některých analýz tento rozdíl nehraje roli, ale někdy dochází při reálné analýze k systematickým chybám vlivem matrice vzorku [76]. V tomto případě je vhodné volit kalibraci s maticí [77]. Omezení této metody je komplexnost matrice reálných vzorků [31]. Pokud je matrice vzorku jednoduchá, lze provést kalibraci s maticí, kde ke kalibračním roztokům jsou přidány hlavní složky matrice vzorku. U komplexnějších vzorků lze využít modelových matic, které jsou ale drahé a ne vždy je možné takovou maticí s ohledem na její

složitost vůbec připravit [78]. Dalším aspektem je pořizovací cena chemikálií v dostatečné čistotě.

2.4.8. Metoda přidavku standardu

Z dalších přístupů používaných k odstranění interference matrice je metoda přidavku standardu. Používá se v případě, kdy matrice vzorku je velmi komplexní a nelze provést kalibraci s matricí. K roztoku vzorku je přidáno známé množství stanoveného analytu, výsledný analytický signál je odezvou množství analytu přidaného do roztoku [78, 79]. Pokud se analytický signál mění proporcionálně vůči koncentraci analytu za přítomnosti matrice, lze sestavit kalibrační křivku například na základě jednoduché lineární regrese. Extrapolací této přímky je získána v průsečíku s osou x skutečná koncentrace analytu v původním vzorku [31]. Nevýhodou této metody je větší počet vzorků nutných k analýze, tím i větší objem matrice vnášené do přístroje [11, 80].

2.4.9. Metoda izotopového ředění

Zde se jedná v podstatě o metodu porovnávacího prvku, ale do roztoku není přidáván nezávislý analyt, pro dané měření je využito jednoho z izotopů analyzovaného prvku [52]. Výsledný signál je dán poměrem známého přidavku izotopu a jeho neznámou koncentrací v roztoku vzorku [11]. Tento postup je velmi pracný a náročný, ale vede k získání přesných výsledků [77, 81, 82]. Metoda izotopového ředění bývá používána pro analýzu referenčních materiálů a dalších vzorků vyžadujících vysokou přesnost stanovení [83, 84].

2.5. Problematika analýzy reálných vzorků

2.5.1. Analýza uhelných popílků

Uhelný popílek je vedlejším produktem vznikajícím při spalování uhlí. Jeho menší část z celosvětové produkce 750 miliónů tun ročně [85] je znovu využita pro stavbu silnic jako součást betonu (Portlandský cement), pro syntézu zeolitů, pro povrchové úpravy [85-91] atd. Uhelné popílků mohou být zdrojem toxických prvků, proto je důležitá jejich analýza

nejen kvůli environmentálních dopadům, ale i pro možnost jejich dalšího využití v průmyslu [92].

Přímou analýzu uhelných popílků lze provést energiově disperzní rentgenfluorescenční spektrometrií (EDXRF) [93], ICP-MS s laserovou ablací (LA-ICP-MS) [94], neutronovou aktivační analýzou (NAA) [95] nebo spektrometrií laserem indukovaného mikroplazmatu (LIBS) [96]. Mezi nejčastěji využívané metody pro stanovení prvků v uhelných popílcích patří atomová absorpční spektrometrie s atomizací v plameni (FAAS) [97, 98], atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETAAS) [99], optická emisní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (ICP-OES) [100] a ICP-MS [101, 102]. Tyto metody nicméně ve většině případů vyžadují pro vnášení vzorků roztoky.

Hlavní složkou uhelných popílků je křemičitanová matrice, pro její rozklad bývá nejčastěji použita buď samotná kyselina fluorovodíková HF [99, 100, 102], nebo kombinace kyseliny fluorovodíkové s dalšími silnými kyselinami jako je HNO₃, HCl, HClO₄. Tyto kyseliny spolu s matričními prvky uhelných popílků Si, P, S, K a Ca však mohou tvořit řadu polyatomických iontů interferujících na některých izotopech. Kyselina fluorovodíková nejenže je vysoce toxická, ale může způsobit poškození skleněných komponent spektrometru. Během přípravy vzorku hrozí ztráty některých analytů při vyšších teplotách vlivem tvorby těkavých fluoridů (SiF₄, SbF₃, MoF₆, SeF₄, WF₆, AsF₅ a další) [103-107], tento problém může nastat i v případě použití uzavřeného systému. Přídavek kyseliny borité H₃BO₃ [100, 101, 107] může některé nevýhody použití HF odstranit, ale zároveň tento přídavek zvyšuje salinitu vzorku, zvyšuje riziko kontaminace, komplikuje a prodražuje analýzu, navíc znemožní analýzu boru. Všechny výše zmíněné faktory pak ovlivňují přesnost a správnost analýzy.

Kromě mikrovlnného rozkladu [101, 108, 109] či mikrovlnné extrakce [102] v kombinaci s výše popsány kyselinami lze využít pro rozklady křemičitanových matic zpopelnění či klasické metody rozkladu jako je rozklad na mokré cestě či alkalické nebo boritanové tavení [104, 106, 110]. Tyto postupy jsou však časově náročné.

Analýza uhelných popílků byla provedena pomocí HR-ICP-MS [109] a Q-ICP-MS [101, 102] ve spojení s DRC [108] či CRC [111]. Analýza této matrice pro metodu ICP-oa-TOF-MS zatím nebyla publikována. Instrumentace ICP-MS použitá při analýze uhelných popílků a způsob úpravy vzorku jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Praktické aplikace metody ICP-MS pro potřeby prvkové analýzy uhelných popílků

Úprava vzorku (použitá činidla)	Instrumentace	Analyt	LOD (mg kg ⁻¹)	Lit.
<i>Mikrovlnná extrakce (HNO₃) / otevřený rozklad HF + HCl + HNO₃</i>	Q-ICP-MS	Be, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Mo, Cd, Sn, Sb, Ba, Pb	0,09 (Sb) – 6 (Zn)	[102]
<i>Mikrovlnný rozklad (HF + H₂O₂, přídavek H₃BO₃, zahřívání na vodní lázni)</i>	Q-ICP-MS	As, Ba, Be, Bi, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Ga, Gd, Ge, Hf, Hg, Ho, La, Li, Lu, Mn, Mo, Nb, Nd, Ni, Pb, Pr, Se, Sm, Sn, Sr, Ta, Tb, Th, Tl, Tm, U, W, Y, Yb, Zn, Zr	^a	[101]
<i>Mikrovlnný rozklad (HNO₃ + HCl)</i>	Q-ICP-MS	V, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Al, As, Pb, U	^a	[108]
<i>Mikrovlnný rozklad (HNO₃ + HClO₄ + HF, přídavek H₃BO₃)</i>	HR-ICP-MS	Cr, Cu, Ni, As, Cd, Pb	0,05 (Cd) – 0,21 (Ni)	[109]
<i>Mikrovlnný rozklad (HNO₃ + H₂O₂)</i>	Q-ICP-MS	Li, Be, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Rb, Sr, Cd, Cs, Ba, P	0,0012 (Rb) – 0,3 (Se)	[112]
<i>Mikrovlnný rozklad (HNO₃ + HF + HCl)</i>	Q-ICP-MS	As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Fe, Ga, Ge, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, Tl, V, Zn	^a	[113]

^a Neuvedeno.

2.5.2. Analýza kojenecké výživy a mléka

Mléko, ať už kojenecké nebo mateřské je v prvních měsících jediným zdrojem živin dítěte. V řadě případů dochází u matek k úplné nebo částečné ztrátě schopnosti produkovat mateřské mléko, nejčastější příčinou je stres vyvolaný porodem. Mateřské mléko pak bývá nahrazeno umělými kojeneckými mléky. Kvůli rychlému růstu kojenci absorbují více živin a prvků, a to včetně toxických. V porovnání s dospělým člověkem mají kojenci rychlejší metabolismus, vyšší obsah vody, vyšší potřebu energie na jednotku hmotnosti těla [114], nižší renální aktivitu [115] a sníženou schopnost vylučování odpadních látek žlučí. To vše vede k celkově nižší schopnosti těla zbavovat se škodlivých látek.

Kojenecké mléko, ať už sójové či kravské, by se mělo co nejvíce svým složením podobat mléku mateřskému [116, 117]. Do řady sušených mlék jsou proto některé prvky dodávány, aby splnily nutriční požadavky kojence [118]. Základní složení počáteční a pokračovací kojenecké výživy reguluje směrnice Komise EU 2006/141/ES a 1999/21/ES, v ČR tuto směrnici postihuje vyhláška č. 54/2004 Sb. Nadbytek i nedostatek některých prvků může způsobovat řadu klinických nemocí. Navíc v kojeneckém sušeném mléku mohou být přítomny toxické prvky z použitých vstupních surovin či vlivem technologického procesu [119]. Bylo prokázáno, že v sójovém kojeneckém sušeném mléku je koncentrace řady prvků vyšší v porovnání se sušeným mlékem kravského původu [117, 120].

Přímou analýzu mateřského mléka nebo kojeneckého sušeného mléka lze provést pomocí LIBS [121] a XRF [122], ve formě suspenze na ETAAS [123] nebo atomovou absorpční spektrometrií s kontinuálním zdrojem záření HR-CS-AAS [124]. Matriční prvky jsou stanoveny pomocí FAAS [125-127] a ICP-OES [116, 128-134]. Pro ultra stopovou analýzu kojenecké výživy a mléka lze využít ETAAS [117, 135-137], vhodnější metodou díky své efektivnosti a citlivosti je ICP-MS [138, 139].

Mléko tvoří komplexní matrice obsahující proteiny, cukry, tuky a esenciální prvky. Prvky jsou v jednotlivých frakcích mléka nerovnoměrně distribuovány [128]. Při analýze ICP-MS se kromě problémů spojených s vlivem matrice na vnášení vzorku [140] a možnou depozicí matrice na torč [141] mohou projevovat i polyatomické interference, zejména polyatomické ionty obsahující vápník ($^{40}\text{Ca}^{35}\text{Cl}^+$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ca}^{18}\text{O}^+$, $^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$) [142]. Přímá analýza mléka pomocí konvenčního pneumatického zmlžovače je možná pouze s nízkou citlivostí a malou přesností stanovení z důvodu přítomnosti tuků a velikosti kapiček neošetřeného mléka. Mezi další možnosti patří vnášení ve formě suspenzí či využití

precipitace. Precipitace kyselinou šťavelovou a dusičnou vysráží vápník a proteiny, po filtraci lze získat modifikovaný roztok vzorku vhodný pro analýzu, tento postup však není vhodný pro všechny prvky [142]. Ve většině případů však dochází k totálnímu rozkladu vzorku, tím jsou potíže spojené s vnášením vzorku do ICP-MS eliminovány.

Příprava vzorků mléka je nejčastěji provedena za využití mikrovlnné mineralizace, a to společně se směsí $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ [32, 40, 114, 118, 136, 143-147] nebo se samotnou HNO_3 [119, 130, 148-150]. V systému UltraWaveTM (Milestone Inc., Itálie) je vzorek mléka rozložen za vysoké teploty pouze s použitím samotného peroxidu vodíku. Tímto postupem došlo k omezení použití koncentrovaných kyselin nejčastěji HNO_3 a zvýšení celkového pH mineralizátu, což je vhodnější pro instrumentaci ve spojení s indukčně vázanou plazmou [140]. Rozklady na suché cestě [126, 151] a mokré cestě [117, 152, 153] mohou být použity, ale nejsou široce rozšířeny vzhledem k časové náročnosti obou procedur a možnosti ztrát některých prvků [138].

K analýze mléka určeného pro kojence pak bylo využito HR-ICP-MS [32, 150] a Q-ICP-MS [114, 140, 154] spolu s kolizně-reakční celou [119, 143, 147], oktapólovou reakční celou [139, 146, 155], dynamickou reakční celou [138, 141, 145, 148, 156] s NH_3 [145], Ar [141], He [139, 143, 155] a H_2 [118, 146] jako kolizně reakčním plynem. Tabulka 6 shrnuje využití postupů pro stopovou analýzu mléka pomocí ICP-MS.

Tabulka 6: Praktické aplikace metody ICP-MS pro stopovou analýzu mléka

Vzorek	Příprava vzorku	Instrumentace	Analyt	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Porov. prvek	Lit.
<i>Kojenecká strava a mléčné produkty</i>	MWD (HNO_3)	Q-ICP-MS (CRC)	Al, As, Cd, Co, Cr, Hg, Mo, Pb, Se, Sn	0,6 (Hg) – 30 (Al)	Te	[143]
<i>Mateřské mléko</i>	MWD ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$)	Q-ICP-MS	Ba, Bi, Cd, Cu, Li, Mg, Mn, Mo, Pb, Sr, Tl, Zn	10 (Tl) – 250 (Ba) ^a	Rh	[114]
<i>Mateřské mléko</i>	Centrifugace, rozklad (HNO_3)	Q-ICP-MS (DRC)	Ce	$3 \cdot 10^{-3}$ ^a	Ir	[148]
<i>Mateřské mléko</i>	Rozklad s TMAH při 90 °C	Q-ICP-MS	I	$13 \cdot 10^{-3}$ ^a	Sb	[154]
<i>Mateřské mléko</i>	Lyofilizace, MWD (HNO_3)	Q-ICP-MS	Ca, Fe, Cu, Zn, Se, Cd, Pb	^b	^b	[149]
<i>Kravské mléko, kojenecké sušené mléko, mateřské mléko</i>	MWD ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$)	HR-ICP-MS	Na, Ca, Mg, Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Sr, Cd, Hg, Pb	0,21 (Cr) – 33000 (Na) ^a	Ga, Y, Rh, In, Tl	[32]
<i>Kravské mléko pasterizované</i>	MWD ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$)	Q-ICP-MS (DRC)	As, Cd, Cr, Pb	0,08 (Cd) – 3,1 (As)	Rh	[145]
<i>Komerčně dostupná mléka (Argentina)</i>	Promíchání vzorku s dimethylamidem kyseliny mravenčí	Q-ICP-MS (DRC)	As, Cd, Co, Cu, Eu, Ga, Gd, Ge, Mn, Mo, Nb, Nd, Ni, Pb, Pr, Rb, Sm, S, Sr, Ta, Tb, V, Zn, Zr	0,68 (Tb) – 30 (Zn) ^a	Rh	[141]
<i>Kojenecké sušené mléko a příkrmy</i>	MWD (HNO_3)	Q-ICP-MS (CRC)	Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, As, Cd, Se, Sb, Pb, U	^b	^b	[119]
<i>Sušené mléko</i>	Rozklad s H_2O_2 za vysoké teploty v systému UltraWave TM , (Milestone, Itálie)	ICP-MS	B, Ba, Cd, Cu, Mn, Mo, Pb, Sr	0,1 (Cd) – 100 (Zn)	Y	[140]
<i>Kojenecké sušené mléko</i>	MWD ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$)	Q-ICPMS (DRC)	Cd, As, Pb	0,36 (Cd) – 1,86 (As)	Rh, Lu	[118]
<i>Mateřské mléko</i>	0,2mL + EDTA + NH_3 + isopropanol + Triton X-100	Q-ICP-MS (ORC)	Zn, Cu, Se, Mn, I, Fe, Mo, Br	0,01 (Tl, U) – 14,2 (Br)	Te	[139]

^a $\mu\text{g L}^{-1}$.

^b Neuvedeno.

^c mg kg^{-1} .

2.5.3. Analýza tkání biologického a živočišného původu

Správná a přesná prvková analýza tkání živočišného a biologického původu poskytuje informace nejen o stavu organismu jako takového [157], ale i o životním prostředí v jakém se daný subjekt během svého života vyskytoval. Nejčastěji je analýza zaměřena na stanovení prvků nepostradatelných pro život Fe, Cu, Zn, Mn Se či toxikologicky významných prvků Cd, Pb, Hg, As a dalších. Z tkání je pozornost zaměřena na játra a ledviny [158, 159], díky jejich schopnosti většinu těchto prvků v sobě akumulovat [160].

Postup přípravy vzorku patří u biologických materiálů mezi kritické faktory, které by měly zohlednit jak omezené množství vzorku, homogenitu, různý obsah vody v tkáních, nízkou koncentraci některých významných prvků, tak i unikátnost daného vzorku. Vzhledem k rozdílnému obsahu vody v tkáních je nejprve vhodné získat sušinu. K tomuto účelu lze využít u biologických a živočišných tkání buď sušení do konstantní hmotnosti [161-166], nebo lyofilizace [157, 167-175]. V případě analýzy rtuti je při sušení vzorku potřeba pečlivě regulovat teplotu, aby nedocházelo ke ztrátám analytu. Při lyofilizaci dochází k odstranění vody sublimací ledu za nízkého tlaku a teploty, umožňuje tak dlouhodobé uchování vzorku bez většího poškození [176, 177]. K odstranění vody a uchování řady biologických vzorků je aplikována lyofilizace na vzorky semen [178], bakterií [179], hovězího perikardu [180], ledvin krys [181], mozky myši [182], kvasinek [183] atd.

Mezi techniky používané k rozkladu vzorků patří: zpopelnění v muflové peci [167, 184] a rozklad v nízkotlakém kyslíkovém plazmatu [162, 167], extrakce ultrazvukem [169, 170, 172], mikrovlnné extrakce [175, 185], vysokotlaké zpopelnění (HPA) [171] a mikrovlnný rozklad (MWD) [158, 160, 168, 171, 174, 184, 186-190]. U rozkladů na mokré cestě převažuje jako rozkladné činidlo kyselina dusičná [157-161, 163-165, 168, 169, 184, 187, 191, 192].

Prvková analýza biologických a živočišných tkání je provedena pomocí ICP-OES [157, 158, 192-194], FAAS [162, 184], ETAAS [165, 166, 195, 196], rtuť se stanovuje prostřednictvím atomové absorpční spektrometrie s generováním těkavých par rtuti CVAAS [158, 159, 164]. Rychlou a přímou analýzu lidských jater lze realizovat energiově-disperzní rentgenfluorescenční spektrometrií (EDXRF) [197], neutronovou aktivační analýzou (NAA) [173] a LA-ICP-MS [197, 198].

Mezi nejčastěji používané metody ultrastopové analýzy patří ICP-MS [157, 158, 160, 161, 163, 168, 169, 171, 172, 174, 187, 190, 197, 199]. Při analýze biologických tkání lze očekávat tvorbu řady polyatomických iontů Ca, Mg, K, Na, P, S, Cl, N a C, konkrétní polyatomické ionty a izotopy, na kterých interferují, jsou uvedeny již v kapitole o polyatomických interferencích (2.1.4.). Řešením těchto interferencí je u Q-ICP-MS [157, 158, 160, 187] hexapólová kolizní cela s He [200] nebo He a H₂ [168] jako kolizním plynem či dynamická reakční cela s NH₃ [161]. Dále za účelem eliminace interferencí v různých tkáních je použito matematické korekce [163] a HR-ICP-MS, kde pro většinu prvků kromě K, Ge, As a Se postačuje nízké a střední rozlišení [190]. Spektrometr s průletovým analyzátozem je využit při analýze biologických vzorků ve spojení s laserovou ablací [201, 202]. Příklady analýz různých biologických a živočišných tkání jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7: Příklady ICP-MS analýzy živočišných a biologických tkání včetně přípravy vzorku, instrumentace a LOD

Vzorek	Úprava vzorku (použitá činidla)	Instrumentace	Analyty	LOD (mg kg ⁻¹)	Lit.
<i>Tkáně z biopsie lidských jater</i>	Sušení, MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	Q-ICP-MS (DRC)	Cu, Fe	0,002(Cu) – 0,02 (Fe) ^a	[161]
<i>Tkáň lidských jater (Maďarsko)</i>	Lyofilizace, MWD (HNO ₃)	Q-ICP-MS (CRC)	Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Rb, Pb		[168]
<i>CRM Hovězí játra</i>	Sušení při 55 °C, MWD (HNO ₃)	Q-ICP-MS	Li, Mg, Al, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cd, Zn, As, Se, Rb, Sr, Z, Mo, Cd, Sb, Cs, Ba, La, Ce, Tl	0,0005(Sr) – 11(Ca)	[163]
<i>Tkáň jater vlka šedého (Chorvatsko)</i>	Lyofilizace, MWD (HNO ₃)	Q-ICP-MS (CRC)	Cd, Pb	0,003 (Cd), 0,035 (Pb) ^b	[174]
<i>Játra, ledviny, plíce, mozek laboratorních krys</i>	Otevřený rozklad (HNO ₃ + HCl)	Q-ICP-MS	Pb, Al, Mn, Cu, As, Cd, Cr, Ni	^a	[160]
<i>Játra, srst laboratorních krys</i>	MWD (HNO ₃)	Q-ICP-MS (DRC)	Co, Cr, Cu, Fe, I, Li, Mn, Se, V, Zn, Al, As, Cd, Ni, Sr	^a	[203]
<i>Vydří játra, plíce, ledviny (Jižní Korea)</i>	Lyofilizace, MWD (HNO ₃)	Q-ICP-MS	As, Cd, Pb, Cu, Mn	0,002 (Mn) – 0,1 (Zn) ^b	[158]
<i>Játra laboratorních krys</i>	Lyofilizace + HNO ₃ + HF, záhřev na 80 °C poté MWD + odpaření do sucha přidavek HNO ₃ + HCl opět odpaření do sucha s HNO ₃ + HClO ₄	Q-ICP-MS	Al, Mn, Co, Cu, Zn, Rb, Sr, Mo, Cd, Cs, Pb	^b	[157]
<i>Lidská játra a ledviny (autopsie, Severní Čechy)</i>	MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	Q-ICP-MS	Al, As, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Hg, Se, Sb, Ni, Pb, Rb, Sr, Ti, Tl, V, Zn, Ag, Au, Ce, I, La, Mo, Pt, Th, W, Zr, Li, Mn	^b	[187]

^a Neuvedeno.

^b μg L⁻¹.

Tabulka 7: Pokračování

Vzorek	Úprava (použitá činidla)	Instrumentace	Analyty	LOD (mg kg ⁻¹)	Lit.
<i>Tkáně slávký jedlé, sardinek a kambaly průsvitné (Španělsko)</i>	Lyofilizace + extrakce v ultrazvukové lázni (HNO ₃ / HCl / HNO ₃ + HCl), centrifugace	Q-ICP-MS	Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu	0,0001 (Lu, Tm, Ho) – 0,0013 (La)	[169]
<i>Rybí játra a slávka jedlá</i>	Lyofilizace, MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	HR-ICP-MS	Pt	0,0002	[171]
<i>Rybí svalovina a játra, prasečí svaly, králičí játra, plíce, mozek, ledviny (Švédsko)</i>	Lyofilizace, MWD (HNO ₃)	HR-ICP-MS	P, K, Na, Cl, Mg, Ca, Fe, Zn, Br, Rb, Si, Ca, Al, Mn, Se, B, Mo, Sr, Ti, Cd, As, I, Ba, Co, Hg, Ce, Ni, V, Pb, Cr, Li, Ce, Tl, La, Sn, Nd, U, Sb, Zr, Y, Bi, Te, Ag, W, Pr, Sm, Nb, Ta, Ga, Au, Gd, Sc, Tb, Be, Dy, Ge, Hf, Er, Yb, Eu, Re, Tb, Ho, Lu, Pt, Tm, Ir	0,3.10 ⁻⁶ (Lu) – 0,2 (Si)	[190]
<i>Rybí svalovina (Argentina)</i>	Sušení při 40 °C, MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	Q-ICP-MS (CRC)	Al, V, Cr, Mn, Zn, Fe, Ni. Cu, As, Se, Sr, Mo, Ag, Cd, Hg, Pb	^a	[200]
<i>Hovězí játra a ledviny (Jamajka)</i>	Sušení 80 °C, rozklad zahřátím (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	Q-ICP-MS (CRC)	Pb, Cd, As, Zn, Cu, Se	0,01 (Cu) – 0,28 (Zn)	[204]
<i>Mozek laboratorních myší a krys</i>	Lyofilizace + HNO ₃ + HF, záhřev na 80 °C poté MWD + odpaření do sucha přidavek HNO ₃ + HCl opět odpaření do sucha s HNO ₃ + HClO ₄	Q-ICP-MS	Zn, Rb, Cu, Mn, Mo, Al, Co, Sr, Cs, Pb, and Cd	^a	[205]

^a Neuvedeno.

2.5.4. Analýza krmiv pro domácí zvířata (kočky a psy)

Existují dva typy krmiva pro kočky a psy, suchá krmiva (extrudovaná, granule, pochutiny) a tzv. “mokrý” krmiva (konzervy). Jsou rozděleny do kategorií podle různého věku zvířete a plemene (malá, střední, velká a obří). Ve většině případů mezi dvě nejzastoupenější ingredience patří: složka živočišného původu (maso, ryby) a složka rostlinného původu (rýže, obiloviny). Pro zlepšení nutričních parametrů daného krmiva mohou být přidávány vitamíny a některé minerály. Oproti potravinám určeným pro lidskou spotřebu nejsou krmiva pro domácí zvířata v takové míře regulována, naopak často jsou vstupní suroviny považovány za podřadné [206]. Důležitost analýzy krmiv ukázala kauza v USA v roce 2007 [207], kde onemocněla a zemřela řada koček a psů vlivem kontaminace krmiva melaminem. V Evropské unii reguluje koncentrace některých významných prvků v krmivech směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES (2002) a 2009/767/ES.

Minerály jsou do granulí přidávány ve formě solí, například Cu jako CuSO_4 , Se a Na jako Na_2SeO_3 apod. Analýza vzorků s vysokým obsahem solí je pomocí ICP-MS problematická, může docházet ke změně podmínek v plazmě, space charge efektu, blokaci kónusů, má vliv na vnášení vzorku, tvorbu polyatomických iontů a další. Pro vnášení mírně zasolených roztoků je možné použít Babingtonův zmlžovač či žlábkový (V-groove). Prostým naředěním vzorku omezíme množství vnášených solí, zhorší se tím však detekční limity metody. Další možností je úprava vzorku před samotnou analýzou vysrážením některých solí [208], separací na koloně [209] a další. Vzhledem ke složitosti matrice lze při analýze vzorků granulí očekávat tvorbu polyatomických asociátů s S, N, C, Cl, Na, K, Mg, Ca a P.

Studii zabývající se analýzou krmiv pro domácí zvířata není mnoho a týkají se pouze posledních několika let (2010–2016). K analýze vzorků krmiva bylo využito termooxidační stanovení rtuti [210] a FAAS, kde po analýze byly vzorky klasifikovány na základě typu krmiva, hlavní složky (hovězí, kuřecí, rybí atd.) a země původu [211]. Dále bylo analyzováno krmivo pomocí ICP-OES [212] a ICP-MS s dynamickou reakční celou [206, 213]. V tabulce 8 jsou uvedeny nejen analýzy krmiv, ale i masa a dalších možných ingrediencí za využití vybraných metod atomové spektrometrie. K rozkladům bylo ve většině případů použito mikrovlnné mineralizace se samotnou HNO_3 [206, 214-216] nebo v kombinaci s H_2O_2 [211-213, 217-219] a s HF [220].

Tabulka 8: Příklady prvkové analýzy krmiv, různých druhů masa a dalších potravin pomocí ICP-MS, ICP-OES a FAAS

Vzorek	Příprava vzorku	Instrumentace	Prvky	LOD (mg kg ⁻¹)	Porovnávací prvek	Ref.
<i>Rostliny a krmivo pro zvířata</i>	MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	Q-ICP-MS (DRC)	As, Cr, Fe, Ni, Se	0,031 (As) – 0,16 (Se) ^a	^b	[213]
<i>Krmivo pro kočky a psy</i>	MWD (HNO ₃)	Q-ICP-MS (DRC)	As, Be, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Hg, Ni, Mo, Pb, Sb, Se, Sn, Th, Tl, U, V		^b	[206]
<i>Krmivo</i>	MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂ + HF)	Q-ICP-MS (DRC)	Cd	0,3.10 ⁻³	Rh	[220]
<i>Krmivo pro kočky a psy</i>	MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	ICP-OES	Al, Ca, Cd, Cr, Cu, Ba, Fe, K, Mg, Mn, P, S, Sr, Zn	26 (Ca) – 0,058 (Ba)	^b	[212]
<i>Potraviny živočišného původu</i>	MWD (HNO ₃)	Q-ICP-MS (CRC)	Cr, Fe, Se	0,008 (Cr) – 0,03 (Fe)	Y, Ga, In	[221]
<i>CRM různých potravin</i>	MWD (HNO ₃)	Q-ICP-MS (CRC)	V, Cr, Fe, Co, Ni, As, Se	^b	In	[215]
<i>Maso, ryby, masné a rybí produkty</i>	MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	ICP-OES	Zn	0,002	^b	[217]
<i>Potraviny živočišného a rostlinného původu</i>	MWD (HNO ₃)	Q-ICP-MS (ORC)	Li, B, Ti, V, Cr, Co, Ni, Ga, Ge, Se, Sr, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Hg, Pb, U, Al, Mn, Fe, Cu, As, Zn, Na, Mg, K, Ca	0,002 (Cd) – 1,5 (Na, K, Ca)	Au, Bi, Sc, Y, In, Re	[216]

^a µg L⁻¹.

^b Neuveдено.

Tabulka 8: Pokračování

Vzorek	Příprava vzorku	Instrumentace	Prvky	LOD (mg kg ⁻¹)	Porovnávací prvek	Ref.
<i>Různé druhy krmiva a pochutin pro kočky a psy</i>	Sušení 105 °C, MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	FAAS (acetylen - vzduch)	Cu, Ni, Pb, Fe, Mn, Cd, Cr	^b	^b	[211]
<i>Pšeničná mouka a instantní práškové směsi</i>	MWD (HNO ₃) Suspenze: 0,1g vzorku + triton X + HNO ₃ ultrazvuková homogenizace	ICP-OES ICP-OES	Na, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu	0,9 (Mn) – 61 (K)	^b	[222]
<i>Koření a instantní polévky</i>	MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	ICP-OES	Ca, Mg, P, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn, Na, K	0,13 (Mg) – 12,2 (K)	Be, Y, Sc	[223]
<i>Rýže, fazole, vejce, cukr, chléb, maso, ryby, zelenina, sýr, mléko, máslo, pšenice, káva, čokoláda, oříšky, těstoviny</i>	MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	Q-ICP-MS	Se, Pb, Cd, Mn, Co, Zn, Cu, Sr, Mo, V, Mg, Hg, Al, As, Cr, Ni	0,0002 (Cd) – 0,06 (V)	Rh	[218]
<i>Krmivo kočičí a psí</i>	Lyofilizace, homogenizace	Spektrometr pro termooxidační stanovení Hg	Hg	1.10 ⁻³	^b	[210]
<i>Jehněčí maso, kravské mléko a sýry</i>	Homogenizace, MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	Q-ICP-MS (ORC)	Ca, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Na, P, Zn, Se, Ca, K, Mg, Na, P	^b	^b	[219]
<i>Šunka, masové koule, hovězí maso a játra</i>	Rozpuštění v TMAH	ICP-OES	Fe, Zn, Mg, Mn, P	0,08 (Mn) – 0,7 (Fe)	^b	[224]
<i>Maso hovězí, kuřecí, jehněčí, vepřové, koňské</i>	MWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂)	Q-ICP-MS (DRC)	Mn, Cu, Mo, Cd, Pb, Se, Fe,	^b	Rh, Lu	[225]

^b Neuvedeno.

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie

- **Jednoprvkové standardy:** Li, Be, B, Al, Na, Ca, Mg, P, Ti, V, Cr, Mn, Ni, Co, Zn, Cu, Ga, Ge, As, Se, Rb, Rh, Sr, Zr, Mo, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Ta, W, Re, Pt, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, Cs, Hf, Au, U, Mg, K, Ca, Na a Fe o koncentraci $1 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$ nebo $10 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$ (Analytika spol., s.r.o, ČR nebo SCP Science Ltd. Kanada)
- **Komerčně dostupný multiprvkový standard:** Ce, La, Nd, Pr o koncentraci 100 mg L^{-1} a Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Sc, Sm, Tb, Tm, Y, Yb o koncentraci 20 mg L^{-1} (SCP Science Ltd. Kanada)
- Kyselina dusičná 65% (m/m), p.p. (Penta spol., s.r.o., ČR); fluorid amonný, p.a. (Sigma-Aldrich spol., s.r.o., USA); Peroxid vodíku 30% (m/m), TraceSelect (Fluka spol., s. r. o., Švýcarsko); NaCl, TraceSelect (Fluka); KCl, TraceSelect (Fluka); CaCl₂, TraceSelect (Fluka); MgCl₂, TraceSelect (Fluka); HCl 36% (m/m), TraceSelect (Fluka); H₂SO₄ 96% (m/m), TraceSelect (Fluka); H₃PO₄ 85% (m/m), p.a. (Fluka)

3.2. Příprava roztoků

3.2.1. Příprava 2 mol L^{-1} kyseliny dusičné

Byl připraven roztok 2 mol L^{-1} z HNO₃ přečištěné podvarovou destilací. Tento roztok byl použit pro loužení chemického nádobí po dobu 24 hodin.

3.2.2. Příprava zásobních roztoků

Zásobní multiprvkový roztok „A“ obsahoval 10 mg L^{-1} Li, B, Be, Al, Ti, V, Cr, Mn, Ni, Co, Cu, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Zr, Mo, Ru, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, Ta, W, Re, Pt, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, Cs, Hf. Ředěním tohoto zásobního roztoku byl připraven roztok o koncentraci $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, ten byl použit pro přípravu kalibrace. Za účelem stabilizace iontů byla přidána podvarově přečištěná konc. HNO₃, a to v poměru 1:100.

Zásobní multiprvkový roztok „B“ obsahoval $500 \mu\text{g L}^{-1}$ Ce, La, Nd, Pr, U („B1“) a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Dy, Er, Eu, Gd, Ho, Lu, Sc, Sm, Tb, Tm, Y, Yb („B2“). Ředěním byl připraven roztok o koncentraci $50 + 10 \mu\text{g L}^{-1}$ „B1“ a „B2“, ten byl použit pro přípravu kalibrace. Pro stabilizaci iontů bylo do 50 mL odměrných baněk přidáno 0,5 mL konc. HNO_3 přečištěné podvarovou destilací.

Zásobní roztok porovnávacího prvku Rh o koncentraci 10mg L^{-1} byl postupně ředěn na $500 \mu\text{g L}^{-1}$ a $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Do všech kalibračních roztoků, slepých vzorků, modelových roztoků a vzorků měřených ICP-MS bylo přidáno rhodium na výslednou koncentraci $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Za účelem stabilizace iontů byla přidána podvarově přečištěná konc. HNO_3 , a to v poměru 1:100.

Zásobní roztok „A“ pro měření matričních prvků na ICP-OES obsahoval 2g L^{-1} K, 200mg L^{-1} Zn a Mg, 50mg L^{-1} Cu, Fe, Mn a Al a 10mg L^{-1} Ba. Pro stabilizaci iontů bylo do 50 mL odměrných baněk přidáno 0,5 mL konc. HNO_3 přečištěné podvarovou destilací.

Zásobní roztok „B“ pro měření matričních prvků na ICP-OES obsahoval 50mg L^{-1} Na, P a Ca. Za účelem stabilizace iontů byla přidána podvarově přečištěná konc. HNO_3 , a to v poměru 1:100.

Navážením odpovídajícího množství NH_4F byl připraven roztok o koncentraci 60, 100 a 140g L^{-1} NH_4F .

3.2.3. Kalibrační roztoky

- **Kalibrace pro ICP-aa-TOF-MS**

Z multiprvkových standardů „A“ ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) a „B“ ($50+10 \mu\text{g L}^{-1}$) byly připraveny roztoky kalibrační řady. Prvky multiprvkového standardu A měly koncentraci 0, 1, 2, 5, 10, 20 a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ a pro prvky multiprvkového standardu B byly koncentrace v kalibrační řadě: 0; 0,1+0,02; 0,2+0,04; 0,5+0,1; 1+0,2; 2+0,4 a $5+1 \mu\text{g L}^{-1}$.

- **Kalibrace pro FAAS, FAES**

Pro stanovení Ca, Na, K, Mg a Fe pomocí FAAS, FAES byla připravena kalibrační řada 0–0,4 mg L⁻¹ pro Mg a 0–20 mg L⁻¹ pro Na a K, 0–20 mg L⁻¹ pro Zn, 0–20 mg L⁻¹ pro Ca, 0–4 mg L⁻¹ pro Fe a 0–100 mg L⁻¹ pro Si.

- **Kalibrace pro ICP-OES**

Pro analýzu vzorků suchých krmiv byla připravena kalibrační řada ze zásobního roztoku „A“ a „B“ tak, aby výsledná koncentrace analyzovaných matričních prvků byla následující: 0–200 mg L⁻¹ K; 0–20 mg L⁻¹ Zn a Mg; 0–5 mg L⁻¹ Cu, Fe, Mn a Al; 0–1 mg L⁻¹ Ba a 0–10 mg L⁻¹ Ca, Na a P. Koncentrace kalibračních roztoků pro měření zbytkového uhlíku v mineralizátech vydřích tkání byly v rozsahu 0–50 mg L⁻¹.

3.3. Seznam analyzovaných vzorků

3.3.1. Referenční materiály

Constituent Elements in Coal Fly Ash SRM[®] 1633b (National Institute of Standards & Technology, USA), Fine fly Ash CTA-FFA-1 (Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Polsko), Bovine Liver SRM[®] 1577c (National Institute of Standards & Technology, USA), MilkPowder NCR ZC73015 (China National Analysis Center for Iron and Steel, Čína), Spiked Skim Milk Powder – Trace elements BCR RM No. 150 (Institute for Reference Materials and Measurements, Belgie), BCR[®]-032 Natural Moroccan Phosphate Rock (Institute of Reference Materials and Measurements IRMM, Belgie), Sludge from city water treatment WH-T No. 12-3-14 (Slovenský metrologický institut, Slovenská republika), BCR[®]-060 Aquatic Plant (Lagarosiphon major, IRMM, Belgie), Referenční materiál No. 12-2-03 P-Alfapa Essential and toxic elements in Lucerne (Slovenský metrologický institut, Slovenská republika), NCS DC 73350 Leaves of Poplar (China National Analysis Center for Iron and Steel, Čína), GBW 07603 a GBW 07602 Bush twigs and leaves (Institute of Geophysical and Geochemical Exploration, Langfang Čína), Constituent Elements in Coal Fly Ash SRM[®] 1633b (National Institute of Standards & Technology, USA) a Fly Ash CTA-FFA-1 (Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Polsko)

3.3.2. Reálné vzorky

Sušené kojenecké mléko

Devatenáct vzorků kojeneckého sušeného mléka na bázi kravského mléka a jeden vzorek kojeneckého mléka na sójové bázi (tabulka 9) byly získány v období 2015–2016. Většina těchto sušených mlék pochází od nadnárodních společností (Danone, Hipp, Nestlé atd.) a jsou dostupné celosvětově. Jedná se o mléka určená pro mléčnou výživu pro nedonošené děti (značené 0), počáteční výživu pro kojence (značené 1), po pokračovací mléka (značené 2) až po mléka pro kojence a batolata (značené 3).

Tabulka 9: Vzorky sušeného kojeneckého mléka

Číslo vzorku	Název	Typ	Výrobce	Země
1	Nutrilon ProExpert	0	Nutricia	Německo
2	Hami při zácpě a kolikách	1	Nutricia	ČR
3	Hipp Bio Combiotik	1	Hipp	Německo
4	Hipp Bio Combiotik	2	Hipp	Německo
5	Amilk Bifido	1	Dr. Max Pharma Ltd.	Francie
6	Nutrilon Pronutra	2	Nutricia,	Německo
7	Beba Comfort	1	Nestlé	ČR
8	PreBeba	0	Nestlé	Německo
9	Sunar Complex	1	Hero	Velká Británie
10	Sunar Premium	2	Hero	Velká Británie
11	Beba Pro	2	Nestlé	Francie
12	Sunar Complex	3	Hero	Velká Británie
13	Nutrilon ProExpert	1	Nutricia	Německo
14	Nutrilon Pronutra	1	Nutricia	Německo
15	Sunar Complex	2	Hero	Velká Británie
16	Babydream	3	Rossmann	Německo
17	Babylove	1	DM Drogerie Markt s.r.o.	Německo
18	Babylove	3	DM Drogerie Markt s.r.o.	Německo
19	Hipp HA Combiotik	2	Hipp	Německo
20	Nutrilon Soya	1	Nutricia	Německo
21	Beba Sensitive	1	Nestlé	ČR

Vydří tkáň

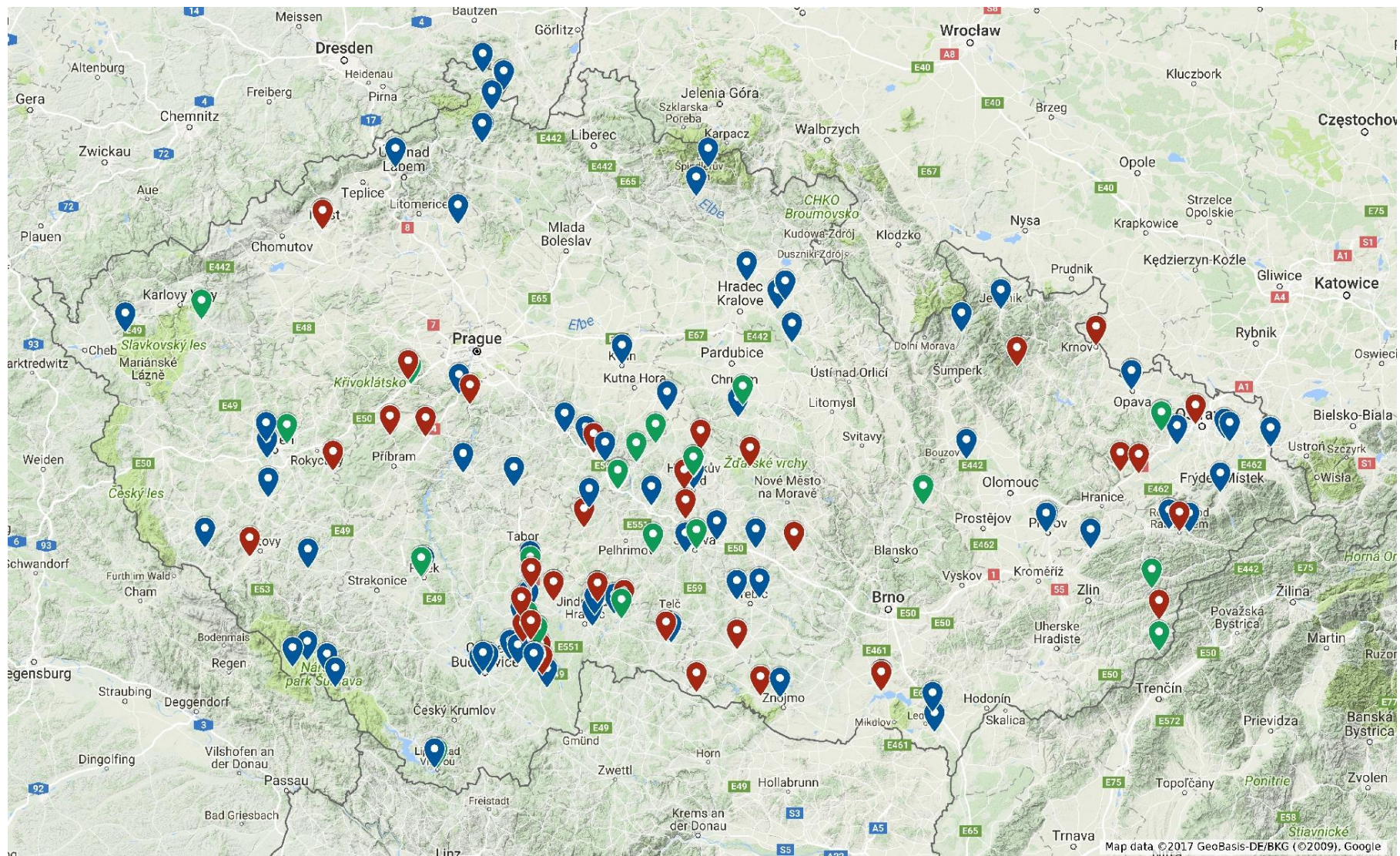
Celkově 149 vzorků jater, tuků a kostí vydry říční (*Lutra lutra*) byly poskytnuty společností ALKA Wildlife o.p.s. (ČR) [226]. Vzorky tkání byly získány z vyder uhynulých na území ČR v letech 2006–2015, o každém kadáveru byl proveden záznam s místem nálezu

(obr. 1), datem a podrobným popisem (věk, pohlaví, příčina úmrtí apod.). Po odběru byly tkáně jater uloženy v PE sáčku a uchovány v mrazničce při teplotě -18 °C.

Krmiva pro domácí zvířata

Vzorky suchých krmiv pro kočky a psy (tabulka 10) byly během roku 2016 obdrženy od různých chovatelů, vzorky zahrnovaly různé značky jak mezinárodních společností, tak místních výrobců suchých krmiv.

Obrázek 1: Místa nálezů kadáverů vydry říční



Tabulka 10: Vzorčky granulí určených pro kočky a psy

Číslo vzorku	Značka	Typ	Výrobce/Distributor
1	Pro Plan®	Sterillized Original Chicken with rice for adult neutered/spayed dogs	Purina® - Nestlé Česko s.r.o.
2	Friskies®	Active	Purina® - Nestlé Česko s.r.o.
3	Chappi®	Hovězí & Drůbeží 100% complete	Mars® Czech s.r.o.
4	Carnis	Granule s drůbežím a zeleninou	(vyrobena pro Mountfield v EU)
5	Nutrican	Senior & Light	Canvit s.r.o. (ČR)
6	Nutrican	Adult All breed	Canvit s.r.o. (ČR)
7	Nutrican	Adult Large Breed	Canvit s.r.o. (ČR)
8	Frolic®	S hovězím	Mars® Czech s.r.o.
9	Acana	Puppy Large Breed	Champion Pet Foods (Kanada)
10	Topstein	Fish Crunchies for Dogs	Superprémiová krmiva pro Psy - Topsteinpetfoods.cz (ČR)
11	Topstein	Farm Fresh Chicken & Turkey Active/Puppy Grain free	Superprémiová krmiva pro Psy - Topsteinpetfoods.cz (ČR)
12	Topstein	Farm Fresh Chicken Sensitive Grain Free	Superprémiová krmiva pro Psy - Topsteinpetfoods.cz (ČR)
13	Hill's™	Science Plan™ Canine Adult Advanced Fitness™ (Medium with Chicken, Adult 1–6)	Hill's Pet Nutrition™ Inc. (USA)
14	Friskies®	S lososem a přídánou zeleninou	Purina® - Nestlé Česko s.r.o.
15	Concept for life	Kitten 2–12 měsíců	Matina GmbH (Německo)
16	Royal Canin®	Mother & Babycat	Royal Canin® (USA)
17	Taste of the Wild®	High Prairie Puppy® Formula with Roasted Bison & Roasted Venison	Diamon Pet Foods (USA)
19	k-9	K-9 selection HI-PERFORMANCE formula	Candy, spol. s.r.o.
20	Royal Canin®	Maxi Adult	Royal Canin® (USA)
21	Josera.	Festival Adult (Ryba a rýže)	Josera GmbH & Co. KG (Německo)
22	Sam's Field	Fresh Chicken & Potatoe Adult Medium	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)

Tabulka 10: Pokračování

Číslo vzorku	Značka	Typ	Výrobce/Distributor
23	Pro Plan®	Adult Original	Purina® - Nestlé Česko s.r.o.
24	Hill's™	Prescription Diet™ j/d™ Canine Mobility	Hill's Pet Nutrition™ Inc. (USA)
25	Brit	Brit Care Puppy Lamb & Rice	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
26	Brit	Brit Care Salmon Salmon & Potato, All breed, Adult	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
27	Brit	Brit Care Grain-Free Salmon & Potato, Junior Large Breed	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
28	Arden Grange	puppy / junior (rich in fresh chicken)	Leander International Pet Foods Ltd. (UK) / NATURPET, s. r. o. (ČR)
29	Purina® Darling		Purina® - Nestlé Česko s.r.o.
30	Bozita	Original XL	Lantmännen Doggy AB (Švédsko)
31	Grand Vital	Care Snack Training + Ginseng (Doplňkové krmivo pro psy)	A L M I K A s.r.o. (ČR)
32	Sam's Field	Chicken&Potato Adult Large	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
33	Barking Heads®	"puppy days"	Pet Food Ltd. (UK)
34	Perfecto Cat	Gourmet Selection Kroketten Snack mit Inulin (Kroketový snack z atlantického lososa pro kočky)	Futternapf Tiernahrung Vertriebs GmbH (Německo)
35	Sam's Field	Lamb & Potato Light&Senior	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
36	Sam's Field	Salmon & Potato Adult	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
37	GranataPet	Leckerlies Kaninchen Waldbeeren	altina(Fushsenthaler & Diedrich GbR) (Německo)
38	Fitmin	Maintenance	Dibaq a.s.
40	Arden Grange	Adult Fresh salmon&rice	Leander International Pet Foods Ltd. (UK) / NATURPET, s. r. o. (ČR)
41	Fish4 dogs	Finest Ocean white fish adult	Fish4 dogs Ltd. (UK)
42	Royal Canin®	INDOOR ²⁷	Royal Canin® (USA)
45	Royal Canin®	Adult Mini	Royal Canin® (USA)
46	Brit	Brit Care Adult Medium breed Lamb & Rice	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
47	Annamaet	Lean	Annamaet Petfoods Inc. (USA)

Tabulka 10: Pokračování

Číslo vzorku	Značka	Typ	Výrobce/Distributor
48	Royal Canin®	Medium Adult	Royal Canin® (USA)
49	Brit	Brit Premium Puppies	VAFO PRAHA s.r.o (ČR)
52	Crockex Wellness	Kachna maxi ADULT MINI DUCK RICE LOW GRAIN	Mister Pet srl (Italy) / Pure 4U s.r.o. (ČR)
57	Taste of the Wild®	Canyon River Feline® Formula with Trout & Smoked Salmon	Diamon Pet Foods (USA)
58	Kasiks	Wild Pacific Ocean Fish Meal Formula	FirstMate/KASIKS Pet Foods (Canada)
59	Kitekat	S hovězím masem a zeleninou	Mars® Czech s.r.o.
60	Gemon cat	Light sterilized turkey	Monge&c.s.p.A (Italy)
63	Almo nature	Holistic Losos s rýží Adult	Almo nature Swiss GmbH

3.4. Příprava vzorků k analýze

3.4.1. *Optimalizace MAE vzorků s proměnným množstvím křemičitanové matrice*

Množství **50**, 100 nebo 150 mg vzorku bylo naváženo do teflonových zkumavek systému Multi Tube společně s 2, **5** nebo 7 mL NH_4F (100 g L^{-1}). Poté byly zkumavky umístěny do 100 mL teflonové nádoby DAC-100S s 20 mL NH_4F (100 g L^{-1}). Za použití následujícího programu byla ze vzorků vyextrahována křemičitanová matrice: 5, 10 nebo **15** minut při 140, 160, **180** °C, nárůst teploty probíhal při 50% výkonu po dobu 3 minuty. Vybrané hodnoty jednotlivých parametrů použité pro analýzu všech vzorků jsou zvýrazněny tučným písmem. Po ukončení mikrovlnné extrakce byly extrakty přefiltrovány přes stříkačkový injekční filtr a převedeny do 10 mL odměrných baněk a doplněny redestilovanou vodou. Křemík byl stanoven na atomovém absorpčním spektrometru s atomizací v plameni (viz kapitola 3.4.3.).

3.4.2. *Extrakce uhelného popílku*

Vzorky uhelných popílků byly nejprve pomlety v kulovém vibračním mlýnu po dobu 5 minut pro zajištění homogenity vzorků. K extrakci bylo využito systému Multi Tube, kde do 3 teflonových zkumavek bylo naváženo 10 ± 1 mg vzorku a přidáno 5 mL NH_4F p.a. o koncentraci 60, 100 anebo **140** g L^{-1} . Takto připravené zkumavky byly umístěny do 100 mL teflonové nádoby DAC-100S s 20 mL NH_4F o koncentraci 60, 100 či **140** g L^{-1} . Uspořádání Multi Tube pro DAC-100S je popsáno a znázorněno v kapitole 3.4.1. Následně byly nádoby podrobeny mikrovlnami asistované extrakci (MAE) po dobu 5, **10** a 15 minut a teplotě 160, 180 a **200** °C (50% výkon). Vybrané hodnoty jednotlivých parametrů použité pro analýzu všech vzorků jsou zvýrazněny tučným písmem. Po ukončení mikrovlnné extrakce byly extrakty přefiltrovány přes stříkačkový injekční filtr a převedeny do 10 mL odměrných baněk a doplněny redestilovanou vodou. Extrakty byly před ICP-MS analýzou 5x naředěny a bylo přidáno Rh na výslednou koncentraci $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Slepé pokusy byly připraveny stejným postupem jako vzorky.

3.4.3. Kojenecké sušené mléko

Vzorky sušeného mléka v množství 500 ± 5 mg byly naváženy do 100 mL teflonových rozkladných nádob. Rozklad vzorků byl uskutečněn v přítomnosti 5 mL HNO_3 (65%, m/m) a 2 mL H_2O_2 (30%, m/m). Po uzavření byly nádoby vloženy do mineralizátoru a rozklad probíhal podle teplotního programu uvedeného v tabulce 11. Po ukončení mikrovlnného rozkladu byly čiré mineralizáty převedeny do 25 mL odměrné baňky a doplněny redestilovanou vodou po rysku. Každý vzorek byl mineralizován třikrát. Pro potřeby analýzy ultrastopových prvků pomocí ICP-MS bylo k takto připraveným roztokům přidáno Rh na výslednou koncentraci $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Slepé pokusy skládající se z redestilované vody a mineralizačních činidel byly připraveny stejným postupem jako reálné vzorky.

Tabulka 11: Teplotní program pro mikrovlnný rozklad vzorků sušeného mléka

Parametry	1. krok	2. krok	3. krok	4. krok	5. krok
Teplota (°C)	170	220	100	100	100
Doba držení (min)	10	15	1	1	1
Doba nárůstu (min)	1	5	1	1	1
Výkon (%)	60	70	10	10	10

3.4.4. Vzorky tkání vydry říční

Vzorky vydřích jater, kostí a tuků byly uchovávány v mrazničce, po rozmražení byl povrch osušen a cca 0,5 g tkáně bylo naváženo do sterilních skleněných nádobek. Takto připravené vzorky byly nejprve hluboce zmrazeny na teplotu -80 °C po dobu 24 hodin a následně zlyofilizovány za využití následujícího teplotního programu: I. tlak 0 kPa po dobu 1 hodiny; II. tlak 0,1 kPa po dobu 24 hodin; III. tlak 0 kPa po dobu 4 hodin. Druhý krok byl optimalizován pro 3 doby (12, 24 a 48 hodin), jak bude diskutováno dále (viz kapitola 4.4.1.1.). Jako optimální čas byla vybrána doba 24 hodin.

Lyofilizované vzorky byly naváženy (50 nebo 200 mg) do jednotlivých nádobek systému Multi Tube, dále bylo přidáno **1 mL HNO_3 (65%, m/m) a 1 mL H_2O_2 (30%, m/m)** nebo 1 mL HNO_3 (65%, m/m) a 0,4 mL H_2O_2 . Do 100 mL teflonových rozkladných nádob bylo napipetováno 15 mL příslušné směsi připravené v poměru **1:1** nebo 1:0,4 (HNO_3 : H_2O_2), do těchto nádob pak byly umístěny vždy 3 teflonové zkumavky se vzorkem. Vybrané hodnoty jednotlivých parametrů použité pro analýzu všech vzorků jsou zvýrazněny tučným písmem.

Výsledný optimalizovaný postup mikrovlnného rozkladu je uveden v tabulce 12. Po ukončení rozkladu byl čirý mineralizát převeden do 10 mL odměrných baněk a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Pro potřeby analýzy pomocí ICP-MS bylo k takto připraveným roztokům přidáno Rh na výslednou koncentraci $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Slepé pokusy skládající se z redestilované vody a mineralizačních činidel byly připraveny stejným postupem jako reálné vzorky.

Tabulka 12: Teplotní program pro mikrovlnný rozklad vydřích jater v systému Multi Tube

Parametry	1. krok	2. krok	3. krok	4. krok	5. krok
Teplota (°C)	130	160	200	100	100
Doba držení (min)	10	10	15	1	1
Doba nárůstu (min)	5	5	5	1	1
Výkon (%)	20	40	60	10	10

3.4.5. Krmiva pro domácí zvířata

Vzorky granulí byly nejprve rozdrčeny a homogenizovány v hmoždíři, následně byl přibližně 1 g vzorku hluboce zmražen na teplotu $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin ve sterilních skleněných nádobkách. Lyofilizace byla provedena podle teplotního programu: I. tlak 0 kPa po dobu 1 hodiny; II. tlak 0,1 kPa po dobu 20 hodin; III. tlak 0 kPa po dobu 4 hodin. Druhý krok byl optimalizován pro 3 doby (12, 24 a 48 hodin), jak bude diskutováno dále (viz kapitola 4.5.1.). Optimální doba lyofilizace byla 24 hodin.

Vzorky lyofilizovaných kočičích a psích granulí v množství $400 (\pm 10)\text{mg}$ byly naváženy do 100 mL teflonových rozkladných nádob a ke vzorkům bylo napipetováno 2,5 mL HNO_3 (65%, m/m), 1 mL H_2O_2 (30%, m/m) a 3,5 mL redestilované vody. Po uzavření byly nádoby vloženy do mineralizátoru a rozklad probíhal na základě optimalizovaného teplotního programu uvedeného v tabulce 13. Výsledný čirý mineralizát byl převeden do 25 mL odměrné baňky a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Pro potřeby analýzy pomocí ICP-MS bylo k takto připraveným roztokům přidáno Rh na výslednou koncentraci $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Pro stanovení Sr pomocí ICP-MS byly vzorky 10x naředěny. Slepé pokusy skládající se z redestilované vody a mineralizačních činidel byly připraveny stejným postupem jako reálné vzorky.

Tabulka 13: Teplotní program pro mikrovlnný rozklad vzorků krmiv

Parametry	1. krok	2. krok	3. krok	4. krok	5. krok
Teplota (°C)	220	100	100	100	100
Doba držení (min)	25	1	1	1	1
Doba nárůstu (min)	3	1	1	1	1
Výkon (%)	60	10	10	10	10

3.5. Instrumentace

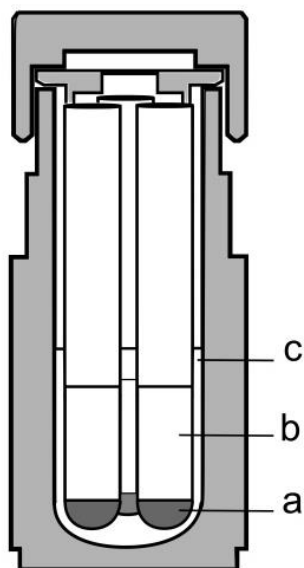
3.5.1. Mikrovlnné zařízení Speedwave MWS-3⁺

Mikrovlnné mineralizační zařízení Speedwave MWS-3⁺ od firmy (Berghof, Německo) bylo využito pro rozklady vybraných vzorků (obr. 2). Tento uzavřený systém pracuje s fokusovaným mikrovlnným polem [227]. V prostoru kruhové pece potažené PFA je umístěn karusel umožňující simultánní rozklad v 8 rozkladných nádobách. Do vnitřní 100 mL teflonové nádoby je umístěn vzorek a činidla, po uzavření jsou vloženy do keramického ochranného pouzdra a do vnější rozkladné teflonové nádoby. Teflonové nádoby odolají tlaku 15 MPa a teplotě 300 °C. Maximální výkon generátoru dosahuje 1450 W a je regulován podle nádoby s nejvyšší teplotou. Snímání teplot v rozsahu 100–300 °C umožňuje bezkontaktní infračervený teploměr přímo ve vnitřní rozkladné nádobě.



Obrázek 2: Mikrovlnné rozkladné zařízení Speedwave MWS-3⁺

Mikrovlnné zařízení je možné doplnit pro nádoby DAC-100S systémem Multi Tube od stejné společnosti [228]. Tento systém umožňuje v jedné rozkladné nádobě mineralizovat současně 3 vzorky (obr. 3). Vzorky jsou spolu s rozkladnými činidly umístěny do 10 mL PFA zkumavek, kolem nich je ve vnitřní rozkladné nádobě směs činidel použitých pro rozklad v takovém objemu, aby hladina v PFA zkumavkách byla nižší oproti vnitřní rozkladné nádobě. Tím je tlak par kompenzován a nedochází k odpařování činidel ze zkumavek.



Obrázek 3: Multi Tube systém pro DAC-100S, (a – vzorek, b – 10 mL zkumavky systému Multi Tube, c – 100 mL nádoby DAC-100S

3.5.2. Spektrometr ICP-*oa*-TOF-MS

Hmotnostní spektrometr s ionizací v indukčně vázaném plazmatu s průletovým analyzátozem s ortogonální akcelerací iontů GBC OptiMass 8000 (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie) [229] použitý v této práci (obr. 4).

Vzorek je nasáván peristaltickou pumpou do koncentrického zmlžovače, kde dochází ke vzniku aerosolu. Vzniklý aerosol vstupuje do dvouplášťové mlžné komory, která je chlazená na teplotu kolem 10 °C. Z mlžné komory vstupuje aerosol do plazmatu, kde dochází k atomizaci a následné ionizaci vzorku. Ionty jsou dále extrahovány z vysokoteplotního plazmatu přes interface do spektrometru. Prostředí mezi atmosférickým tlakem (plazma) a oblastí nízkého tlaku (spektrometr) zajišťuje tříkónusový systém, který snižuje tlak pomocí

kombinace rotační pumpy a tří výkonných turbomolekulárních pump. Ionty z interface jsou fokusovány k ortogonálnímu akceleratoru, zde jsou urychleny kolmo k jejich současnému směru pohybu. V první fokusační zóně spektrometru je instalována brána „Smart Gate“, která vyřezává všechny nežádoucí izotopy z analyzovaného spektra. Tím se výrazně snižuje pozadí hmotnostního spektra a prodlužuje se tak doba životnosti detektoru. Po průchodu filtrem prolétají ionty průletovou zónou, kde jsou otočeny iontovým reflektorem a dopadají na detektor.



Obrázek 4: ICP-MS spektrometr GBC 8000 OptiMass

Parametry nastavení přístroje jsou shrnuty v tabulce 14. Pro vnášení vzorku do přístroje je využita peristaltická pumpa nastavená na rychlost nasávání vzorku přibližně 1 mL min^{-1} , koncentrický zmlžovač MicroMist (Glass Expansion Pty. Ltd., Camberwell, Austrálie) o průtoku $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ a cyklonická mlžná komora o objemu 70 mL (Glass Expansion Pty. Ltd., Camberwell, Austrálie), která byla chlazená na teplotu $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Parametry nastavení SmartGate pro analýzu uhelných popílků, vydřích jater, kojeneckého sušeného mléka a krmiv pro domácí zvířata jsou uvedeny v tabulce 15–18.

Tabulka 14: Parametry nastavení ICP-oe-TOF-MS spektrometru GBC OptiMass 8000

ICP Source		
Rf power	1250 W	
Plasma gas flow rate	11,00 L min ⁻¹	
Auxiliary gas flow rate	0,80 L min ⁻¹	
Nebuliser gas flow rate	0,99 L min ⁻¹	
Mass Spectrometer		
Ion optics	Skimmer	-950 V
	Extraction	-1 200 V
	Z1 gain	-561 V
	Y mean	-400 V
	Y deflection	-1 V
	Z lens mean	-890 V
	Z lens deflection	-40 V
	Lens body	-128 V
Pulse shaping	Fill	-32 V
	Fill bias	1 V
	Fill grid	-0,6 V
	Pushout plate	560 V
	Pushout grid	-460 V
	Blanker	200 V
	Blanker spectral frequency	33 kHz
	Reflectron	610 V
Detection	Multiplier gain	2800 V
	Ion threshold	5,78 mV
	Integration Windows	Auto
	Measurement mode	Pulse counting/ analog

Tabulka 15: Nastavení brány „Smart Gate“ pro analýzu uhelných popílků

Rozsah m/z	Interferující ionty
11,5 – 57,4	¹² C ₂ ⁺ , ¹⁴ N ⁺ , ¹⁶ O ⁺ , ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ¹ H ₂ ¹⁶ O ⁺ , ^{24–26} Mg ⁺ , ²⁸ N ₂ ⁺ , ¹⁴ N ¹⁶ O ⁺ , ^{32–34} S, ^{35–37} Cl, ⁴⁰ Ar ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹⁶ O ⁺ , ³⁸ Ar ¹⁷ O ¹ H ⁺ , ⁵⁶ Fe ⁺
63,4 – 68,0	⁶³ Cu ⁺ , ⁶⁵ Cu ⁺ , ⁶⁴ Zn ⁺ , ⁶⁸ Zn ⁺
79,4 – 81,7	⁴⁰ Ar ₂ ⁺

Tabulka 16: Nastavení brány „Smart Gate“ pro analýzu lyofilizovaných vydřích jater

Rozsah m/z	Interferující ionty
11,5 – 48,2	¹² C ₂ ⁺ , ¹⁴ N ⁺ , ¹⁶ O ⁺ , ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ¹ H ₂ ¹⁶ O ⁺ , ^{24–26} Mg ⁺ , ²⁸ N ₂ ⁺ , ¹⁴ N ¹⁶ O ⁺ , ^{32–34} S, ^{35–37} Cl, ⁴⁰ Ar ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹ H ⁺
55,5 – 57,5	⁵⁶ ArO ⁺ , ⁵⁶ Fe ⁺
62,6 – 65,1	⁶³ Cu ⁺ , ⁶⁵ Cu ⁺
79,4 – 81,7	⁴⁰ Ar ₂ ⁺
84,5 – 85,3	⁸⁵ Rb ⁺

Tabulka 17: Nastavení brány „Smart Gate“ pro analýzu kojeneckého sušeného mléka

Rozsah m/z	Interferující ionty
11,5 – 57,4	$^{12}\text{C}_2^+$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{O}^+$, $^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^1\text{H}_2^{16}\text{O}^+$, $^{24-26}\text{Mg}^+$, $^{28}\text{N}_2^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{32-34}\text{S}$, $^{35-37}\text{Cl}$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{56}\text{Fe}^+$
63,4 – 68,0	$^{65}\text{Cu}^+$, $^{64}\text{Zn}^+$, $^{68}\text{Zn}^+$
79,4 – 81,7	$^{40}\text{Ar}_2^+$

Tabulka 18A: Nastavení brány „Smart Gate“ pro analýzu suchého krmiva pro neřaděné vzorky

Rozsah m/z	Interferující ionty
9,7 – 49,5	$^{12}\text{C}_2^+$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{O}^+$, $^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^1\text{H}_2^{16}\text{O}^+$, $^{24-26}\text{Mg}^+$, $^{28}\text{N}_2^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{32-34}\text{S}$, $^{35-37}\text{Cl}$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^1\text{H}^+$
53,4 – 57,1	$^{55}\text{Mn}^+$, $^{56}\text{ArO}^+$, ^{56}Fe
62,5 – 68,2	$^{63}\text{Cu}^+$, $^{65}\text{Cu}^+$, $^{64}\text{Zn}^+$, $^{68}\text{Zn}^+$
79,4 – 88,2	$^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{85}\text{Rb}^+$, $^{88}\text{Sr}^+$

Tabulka 18B: Nastavení brány „Smart Gate“ pro analýzu suchého krmiva pro řaděné vzorky

Rozsah m/z	Interferující ionty
11,5 – 49,5	$^{12}\text{C}_2^+$, $^{14}\text{N}^+$, $^{16}\text{O}^+$, $^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^1\text{H}_2^{16}\text{O}^+$, $^{24-26}\text{Mg}^+$, $^{28}\text{N}_2^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{32-34}\text{S}$, $^{35-37}\text{Cl}$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^1\text{H}^+$
53,5 – 57,5	$^{55}\text{Mn}^+$, $^{56}\text{ArO}^+$, ^{56}Fe
63,5 – 68,2	$^{64}\text{Zn}^+$, $^{68}\text{Zn}^+$
79,4 – 81,7	$^{40}\text{Ar}_2^+$

3.5.3. Atomový absorpční spektrometr SensAA

Ke stanovení Ca, Mg, K, Fe, Zn a Na v sušeném kojeneckém mléce a vydřích tkání byl použit atomový absorpční spektrometr SensAA (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie) [230]. Přístroj pracuje v dvoupaprskovém režimu, s hyperpulzní korekcí pozadí pomocí zdroje kontinuálního záření (deuteriové výbojky, korekční rozsah 175–423 nm). Tento přístroj má automatické nastavování vlnové délky, proudu HCL lamp a šířky šterbiny (kontinuálně s krokem 0,1 nm od 0,1 do 2 nm). Optický systém s Ebert-Fastie monochromátorem pracuje v rozsahu vlnových délek 175–900 nm (ohnisková vzdálenost 330 mm, mřížka 1800 vrypů/mm). Nastavení tohoto dvoupaprskového přístroje je

pro jednotlivé analyty uvedeno v tabulce 19. Zdrojem záření byly výbojky s dutou katodou firmy Photron Pty. (Austrálie).

Tabulka 19: Parametry nastavení spektrometru při stanovení Mg, Ca, K, Na, Fe a Zn.

Analyt	Mód	Vlnová délka (nm)	Žhavení výbojky (mA)	Šířka spektrální štěrbin (nm)	Plamen (Průtok plynu - L min ⁻¹)
Mg	Absorpce	285,2	5,0	0,2	C ₂ H ₂ (1,5) ^a / vzduch (10)
Ca	Absorpce	422,7	5,0	0,5	C ₂ H ₂ (1,5) ^a / vzduch (10)
K	Emise	766,5	6,0	0,5	C ₂ H ₂ (1,5) ^a / vzduch (10)
Na	Emise	589,0	5,0	0,5	C ₂ H ₂ (1,5) ^a / vzduch (10)
Zn	Absorpce	213,9	5,0	0,2	C ₂ H ₂ (1,5) ^a / vzduch (10)
Fe	Absorpce	248,3	7,0	0,2	C ₂ H ₂ (1,5) ^a / vzduch (10)
Si	Absorpce	251,6	15,0	0,2	C ₂ H ₂ (5,1) ^a / N ₂ O (10) ^b

^a C₂H₂ (99 %, Linde Gas a.s., ČR).

^b N₂O (99,5 %, Linde Gas a.s., ČR).

3.5.4. Spektrometr AMA 254

Přístroj AMA 254 (Advanced Mercury Analyser) od společnosti Altec spol., s.r.o. (ČR) je jednoúčelový atomový spektrometr se sériovým uspořádáním měřicích kyvet. Využívá se při stanovení obsahu rtuti v pevných nebo kapalných vzorcích bez nutnosti předchozí úpravy vzorku, což zamezuje kontaminaci vzorku nebo eventuálním ztrátám rtuti během přípravy vzorku. Princip přístroje spočívá v generování par kovové rtuti, kde dochází k jejich zachycení, zakoncentrování na zlatém amalgátoru a následné detekci. Páry rtuti jsou následně záhřevem uvolněny z amalgamátoru do dvou sériově uspořádaných kyvet, které umožňují stanovení rtuti v širokém rozmezí koncentrací. Detekce je založena na měření absorbance uvolněných par při vlnové délce 253,65 nm pomocí křemíkové UV diody. Zdrojem záření je nízkotlaká rtuťová výbojka. Instrumentace dosahuje mimořádně vysoké citlivosti, která se pohybuje okolo 0,1 ng rtuti. Vzorky sušeného kojeneckého mléka, zlyofilizovaných vydřích tkání a granulí byly analyzovány přímo, a to s navázkou 200 ± 10, 15–20 a 100 ± 5 mg.

3.5.5. ICP-OES spektrometr Integra XL

Stanovení matričních prvků u vzorků kočičích a psích granulí a analýza zbytkového uhlíku ve vzorcích vydřích tkání bylo provedeno na optickém emisním spektrometru s ionizací v indukčně vázaném plazmatu GBC Integra XL 2 (GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., Austrálie) [231]. Spektrometr je vybaven generátorem vysokofrekvenčního plazmatu (40,68 MHz), univerzálním termicky stabilizovaným monochromátorem Czerny-Turner (rozsah vlnových délek 160–800 nm, 1800 vrypů/mm⁻¹) a dvěma fotonásobiči [231]. Systém vnášení vzorku se skládá z peristaltické pumpy, skleněné cyklonické mlžné komory a zmlžovače V-groove (Glass Expansion Pty. Ltd., Camberwell, Austrálie). Parametry nastavení ICP-OES spektrometru jsou uvedeny v tabulce 20.

Tabulka 20: Parametry nastavení ICP-OES spektrometru GBC Intergra XL 2

RF frequency	40,68 MHz
RF power	1100 W
View height	6 mm
Gas	Argon 99,999%
Plasma gas	11 L min ⁻¹
Auxilliary gas	0,6 L min ⁻¹
Nebulizer gas	0,6 L min ⁻¹
Photomultiplier voltage	600 V
Read	On-peak, 1 s
Background correction	Fixed point
Number of replicates	3
View	Radial
Emission lines:	Cu (324,754 a 327,396 nm); Zn (213,586 a 202,548 nm); Mn (257,61 a 259,373 nm); Fe (259,94 a 238,204 nm); Mg (279,553 a 285,213 nm); K (769,896 nm); Na (588,995 a 589,592 nm); P (213,618 a 214,914 nm); Al (308,215 a 396,152 nm); Ba (455,403 a 493,409 nm); Ca (422,673 a 317,933 nm), C (247,856 nm)

3.5.6. *Podvarové destilační zařízení*

Podvarové destilační zařízení BSB 939IR (obr. 5, Berghof GmbH, Německo) bylo použito pro přípravu přečištěné HNO_3 . Zařízení se skládá z IR lampy, PTFE nádoby s odpařovací komorou a s PFA chladičem. Odpařená kyselina kondenzuje na stěnách chladiče a kondenzát je odváděn pomocí PFA trubice do průhledné PFA lahve. Vznikající kondenzát tak přichází do styku pouze s PFA, ohřev je bezkontaktní pomocí IR zářiče. Zařízení se může použít pro destilaci HNO_3 , H_2O_2 , HCl a HF .



Obrázek 5: Podvarové destilační zařízení BSB 939IR

3.5.7. *Lyofilizátor ScanVac CoolSafe*

Lyofilizátor ScanVac CoolSafe od firmy LaboGene ApS (Dánsko) je složen z kondenzoru ledu, vývěvy a komory, kde dochází k sublimaci (obr. 6). Nejdříve je vzorek zamražen v hlubokomrazicím boxu na teplotu -15 až -80 °C za atmosférického tlaku. Postupným snižováním tlaku nad vzorkem začnou krystalky ledu sublimovat. Páry jsou odváděny do kondenzátoru ledu. Zbytková vlhkost je odstraněna postupným zvyšováním teploty nad 0 °C při nízkém tlaku. Po odstranění zbytkové vlhkosti dochází k pozvolnému vyrovnání tlaků pomocí vakuového ventilu. Pracovní teplota kondenzoru je -110 °C, celkový objem kondenzoru jsou 4 L, chladičí spirála je umístěna mimo kondenzor, kapacita kondenzoru během 24 hodin je 2,5 kg.



Obrázek 6: Lyofilizátor Labogene CoolSafe

3.5.8. Ostatní laboratorní přístroje a pomůcky

- Laboratorní nádobí SIMAX (ČR)
- PP laboratorní nádobí (Brand GMBH + Co KG, Německo)
- Sada automatických pipet (Biohit, Finsko)
- Pipeta Distriman (Gilson, USA)
- Zařízení pro přípravu redestilované vody Milli-Q[®] Reference (vodivost $0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$) (Merc Millipore, Německo)
- Vibrační kulový mlýn Wig-L-Bug 30 (Crescent Dental)
- Analytické váhy KERN 870 (Kern, Německo)
- MS Office 2010 (Microsoft corporation, USA)
- Tabulkový editor Origin 8 (OriginLab corporation, USA)
- Software pro GBC OptiMass 8000 Ver. 1.9 (GBC Scientific Equipment, Austrálie)
- Software pro statistické zpracování dat Statistica 12 (StaSoft, USA)
- Software pro statistické zpracování dat QC ExpertTM (TriloByte Statistical Software, ČR)

4. Výsledky a diskuze

4.1. Studium vlivu matričních prvků na stanovení vybraných analytů

Za účelem zjištění příspěvku polyatomických interferencí na stanovení vybraných prvků při analýze na ICP-*oa*-TOF-MS spektrometru GBC OptiMass 8000 byly sestaveny modelové interferenční řady obsahující Na, K, Ca, Mg, Cl, C, S a P v rozsahu 0–1000 mg L⁻¹ [1, 232]. Naměřená data jsou shrnuta v příloze 1 (str. 153). Data dokumentují vliv vybraných matričních prvků na signál analytů Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Co, Cu, Zn, Ge, As, Se, Sr a Mo. Pro prvky *m/z* > 100 nebyly polyatomické interference od výše uvedených iontů pozorovány. Tyto modelové řady umožňují získat přehled možných interferencí, které by při analýze reálných vzorků na spektrometru ICP-*oa*-TOF-MS mohly být přítomny.

V přítomnosti Na se projevily interference způsobené pravděpodobně polyatomickými ionty ²³Na²³Na¹⁶O⁺ a ⁴⁰Ar²³Na⁺ na izotopech ⁶²Ni⁺ a ⁶³Cu⁺. V daném případě lze ke kvantifikaci Cu použít méně zastoupený izotop ⁶⁵Cu⁺. Bylo pozorováno, že polyatomické asociáty draslíku způsobují interference ³⁹K¹⁶O⁺, ³⁹K³⁵Cl⁺, ⁴¹K³⁷Cl⁺ a ⁴⁰Ar³⁹K¹⁶O⁺ na izotopech ⁵⁵Mn⁺, ⁷⁴Ge⁺, ⁷⁸Se⁺ a ⁹⁵Mo⁺. Signál druhého nejzastoupenějšího izotopu selenu ⁷⁸Se⁺ v přítomnosti 1 g L⁻¹ byl navýšen téměř desetkrát.

Stanovení Sr a Se na izotopech ^{84, 86, 88}Sr⁺ a ^{76,78}Se⁺ bylo ovlivněno polyatomickými asociáty Ca a plazmového plynu Ar. Interference polyatomických iontů ⁴⁴Ca¹⁶O¹H⁺, ⁴⁴Ca¹⁶O⁺ a ⁴³Ca¹⁶O¹H⁺ byla patrná při stanovení niklu na hmotách 60 a 61. Vliv falešně pozitivního signálu vyvolaného ⁴³Ca¹⁶O₂⁺ a ⁴³Ca¹⁸O⁺ na izotopy ⁵⁸Ni⁺ a ⁷⁵As⁺ nebyl ve studovaném rozsahu významný. Na rozdíl od Ca byly v přítomnosti Mg pozorovány interference pouze při stanovení Ni. Na izotopy ⁶¹Ni⁺ a ⁶²Ni⁺ měla vliv interference ³⁶Ar²⁵Mg⁺ a ³⁶Ar²⁶Mg⁺, tyto izotopy však nebyly použity ke kvantifikaci vzhledem k přirozenému malému zastoupení.

Chloridová matrice měla vliv na stanovení izotopů ⁵¹V⁺, ⁵³Cr⁺, ⁷⁵As⁺ a ⁷⁷Se⁺, záleželo však na formě, v jaké se chloridy vyskytovaly v roztoku. V literatuře byly v přítomnosti Cl⁻ ve formě HCl a NaCl [110, 233, 234] popisovány interference polyatomických iontů ⁴⁰Ar³⁵Cl⁺ a ⁴⁰Ar³⁷Cl⁺. Tyto interference se ve sledovaném rozsahu koncentrací na spektrometru GBC OptiMass 8000 neprojevily. Podobný jev byl pozorován i pro další chloridové soli KCl a MgCl₂. Naopak v přítomnosti CaCl₂ byla na izotopech ⁷⁵As⁺ a ⁷⁷Se⁺ pozorována významná interference ⁴⁰Ca³⁵Cl⁺ a ⁴⁰Ca³⁷Cl⁺. Chloridové asociáty ³⁷Cl¹⁶O⁺

a $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$ vznikající při vyšších koncentracích HCl (nad 400 mg L^{-1}) ovlivňovaly stanovení izotopů $^{53}\text{Cr}^+$ a $^{51}\text{V}^+$.

V celém studovaném rozsahu koncentrací síry byl pozorován nárůst falešně pozitivního signálu pro izotopy $^{48}\text{Ti}^+$, $^{49}\text{Ti}^+$, $^{50}\text{Ti}^+$, $^{64}\text{Ni}^+$, $^{64}\text{Zn}^+$, $^{65}\text{Cu}^+$, $^{66}\text{Zn}^+$, $^{68}\text{Zn}^+$ a $^{82}\text{Se}^+$. Analytický signál zinku byl ovlivněn na třech nejvíce přirozeně zastoupených izotopech $^{64}\text{Zn}^+$, $^{66}\text{Zn}^+$ a ^{67}Zn . Další významná interference byla pozorována pro izotop $^{48}\text{Ti}^+$, kde pro koncentraci $200\text{ mg L}^{-1}\text{ S}$ došlo k padesátinásobnému nárůstu signálu $^{48}\text{Ti}^+$ vlivem $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$. Mezi další prvky, jejichž analytický signál byl ovlivněn přítomností S, patřil izotop $^{65}\text{Cu}^+$ pravděpodobně díky polyatomickým iontům $^{32}\text{S}^{33}\text{S}^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$. V daném případě se nabízí možnost kvantifikace prostřednictvím izotopu $^{63}\text{Cu}^+$.

Polyatomické ionty $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$ a $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2^+$ rušily stanovení na hmotě 45, na které se vyskytuje monoizotopický iont Sc. Další pozorovaná interference $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ ovlivnila stanovení $^{52}\text{Cr}^+$. Nárůst falešně pozitivního signálu byl zaznamenán pro titan na hmotách 47, 48 a 49 v přítomnosti P. Interference polyatomických asociátů $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$ a $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$ se projeví na izotopech $^{64}\text{Zn}^+$ a $^{63}\text{Cu}^+$.

4.2. Analýza uhelných popílků

Jak vyplývá z literární rešerše (kapitola 2.5.1.), bylo možné v literatuře nalézt práce popisující multielementární analýzu uhelných popílků prostřednictvím HR-ICP-MS [109] nebo Q-MS [101, 102, 108, 111], pro ICP-oa-TOF-MS taková práce nebyla publikována. Uhelňý popílek je tvořen komplexní maticí skládající se především z Si a Al. Pro rozklady aluminosilikátové matrice, a tedy i pro rozklady uhelných popílků byla nejčastěji použita kyselina fluorovodíková samotná nebo ve směsi s dalšími kyselinami (HCl, HClO₄, HNO₃ atd.). Nevýhodou použití HF byla nejen vysoká toxicita, ale i tvorba těkavých fluoridů (např.: As, B, Se, Sb, Hg a Cr [235]), kdy ztráty těchto analytů během přípravy vzorků byly pozorovány i v uzavřeném systému rozkladu. Proto byly zkoumány nové možnosti rozkladu křemičitanové matrice, na základě literatury [236] bylo zjištěno, že fluorid amonný reaguje s různými sloučeninami Si za tvorby komplexních fluoridů typu (NH₄)₂SiF₆ [236]. Tyto produkty jsou tepelně stabilnější oproti fluoridům vznikajících při rozkladu s HF. Za předpokladu úplné extrakce křemičitanové matrice lze očekávat i uvolnění stopových prvků vázaných na aluminosilikátovou matici.

Fluorid amonný byl proto testován k vytvoření ekologicky šetrné a ekonomicky úsporné metody pro multielementární analýzu uhelných popílků pomocí ICP-oa-TOF-MS. Nahrazením klasické mikrovlnné mineralizace mikrovlnnou extrakcí (MAE) společně s využitím systému Multi Tube (viz kapitola 3.4.1.) byl celý proces přípravy vzorku zjednodušen a výrazně urychlen. Pro potřeby analýzy vzorků s různým obsahem křemičitanové matrice byla nejprve provedena optimalizace mikrovlnné extrakce pomocí NH₄F na referenčním materiálu BCR[®]-032, za optimalizovaných podmínek byla proměřena řada referenčních materiálů o různé koncentraci Si. Následně byla metoda aplikována pro multielementární analýzu uhelných popílků pomocí ICP-oa-TOF-MS.

4.2.1. Extrakce křemičitanové matrice

4.2.1.1. *Optimalizace MAE pro potřeby analýzy vzorků s křemičitanovou maticí*

Jak již bylo uvedeno, fluorid amonný reaguje se sloučeninami Si celou řadou různých mechanismů [236], proto přesné množství NH₄F ke kvantitativní extrakci Si nebylo možné

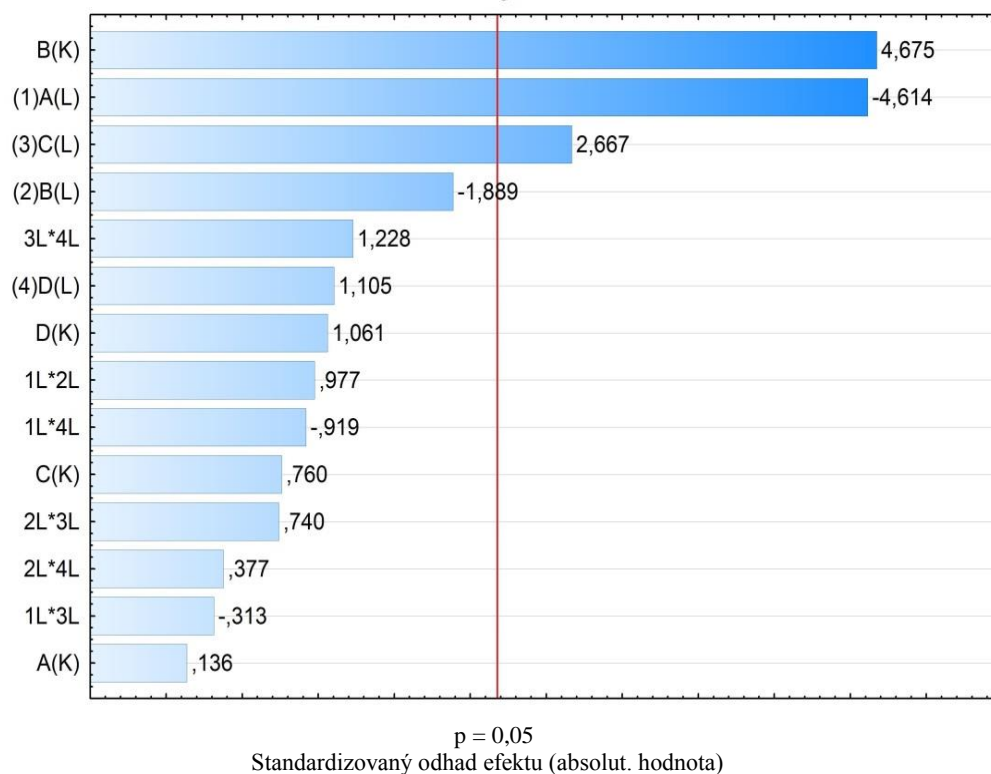
dopočítat a bylo stanoveno empiricky. Pro optimalizaci podmínek MAE bylo použito frakcionálního faktorového plánu, kde na rozdíl od plného faktorového plánu byly interakce vyššího řádu z pokusu vyloučeny a počet provedených pokusů byl snížen beze ztráty významné informace v datech [237]. Díky faktorovému plánu byl sledován vliv jednotlivých faktorů a jejich interakcí na výsledky experimentu, v našem případě na účinnost extrakce. Jako významné faktory ovlivňující účinnost extrakce byly vytipovány: navážka vzorku, objem fluoridu amonného, teplota a doba extrakce. Nastavení úrovní jednotlivých faktorů je shrnuto v tabulce 21, podrobný návrh experimentálního plánu je uveden v kapitole 3.3.1. Vlastní návrh byl vytvořen programem Statistica 12 (StaSoft, USA). Při návrhu optimalizace MAE plným faktorovým plánem by bylo zapotřebí pro 4 faktory se třemi úrovněmi provést 3^4 experimentů, u frakcionálního faktorového plánu byl počet realizovaných pokusů snížen na 3^{4-1} . Koncentrace Si byla měřena na atomovém absorpčním spektrometru SensAA, popis nastavení byl uveden v kapitole 3.4.3. Mikrovlnná extrakce byla provedena v systému Multi Tube prostřednictvím mikrovlnného zařízení Speedwave MWS³⁺ (kapitola 3.4.1.).

Tabulka 21: Zvolené úrovně sledovaných faktorů při MAE křemičitanové matrice

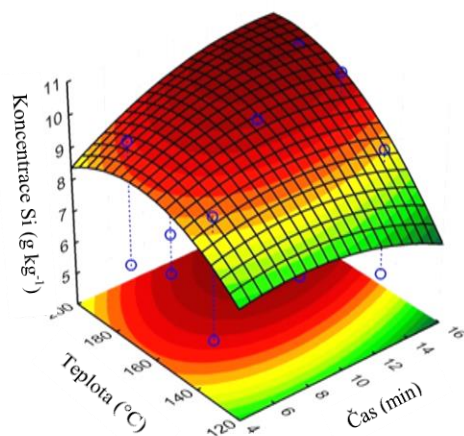
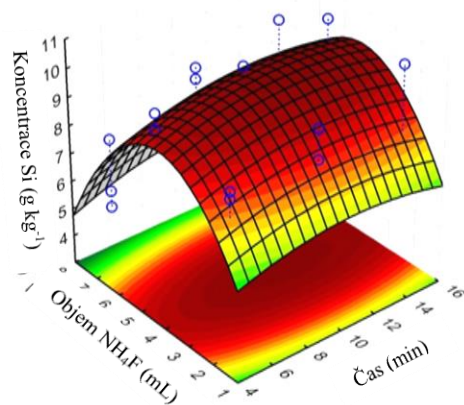
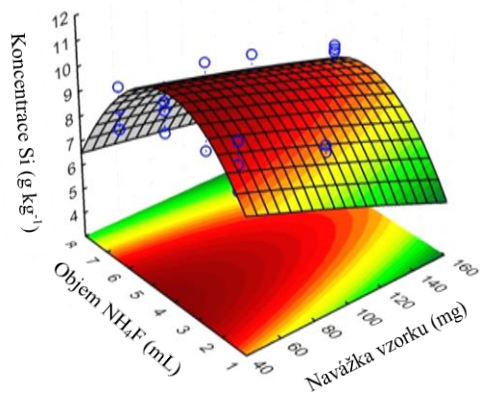
Proměnná		-1	0	+1
Navážka (mg)	A	50	100	150
Objem 100 g L ⁻¹ NH ₄ F (mL)	B	2	5	7
Teplota extrakce (°C)	C	140	160	180
Čas extrakce (min)	D	5	10	15

Ze získaných experimentálních dat (příloha 2, str. 155) byly sestrojeny Paretovy grafy standardizovaných efektů (obr. 7), s jejichž pomocí byl určen vliv a význam jednotlivých faktorů a jejich interakcí na extrakci Si. Pozitivní účinek na extrakci byl pozorován pro kladný efekt faktoru objemu extrakčního činidla (B) a teploty extrakce (C) a pro záporný efekt faktoru navážky (A). Výrazný pozitivní vliv kvadratického efektu faktoru objemu extrakčního činidla (B) patrný na obrázku 7 naznačuje, že účinek extrakce je s rostoucím objemem extrakčních činidel zlepšen. Responzní plochy závislosti koncentrace křemíku na objemu extrakčního činidla, navážce vzorku, času a teplotě extrakce jsou uvedeny na obrázku 8. Z obrázků je zřejmé, že pro CRM BCR[®]-032 bylo dosaženo nejlepší shody mezi certifikovanou ($9,8 \pm 0,56 \text{ mg kg}^{-1}$) a nalezenou hodnotou pro navážku vzorku 50 mg. Optimální hodnota objemu extrakčního činidla pak činila 5 mL NH₄F (100 g L⁻¹). Z důvodu

zajištění dostatečné robustnosti metody byly jako optimální zvoleny následující parametry: navážka vzorku 50 mg objem extrakčního činidla 5 mL a doba trvání extrakce 15 minut při teplotě 180 °C.



Obrázek 7: Paretův graf standardizovaných efektů získaný z frakcionálního faktorového plánu 3^{4-1} , K a L označují kvadratický a lineární efekt faktoru



Obrázek 8: Responzní plochy závislosti koncentrace křemíku stanovené pro CRM BCR[®]-032 v závislosti na objemu extrakčního činidla ($100 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{F}$), navážce vzorku, teplotě a času MAE

4.2.1.2. Přesnost stanovení Si ve vybraných referenčních materiálech

Optimalizovaný postup extrakce Si byl aplikován na referenční materiály hnojiva BCR[®]-032, kalu WT-H No. 12-3-14, vodní rostliny BCR[®]-060, vojtěšky P-ALFALFA, listy topolu NCS DC 73350, větvičky a listí GBW 07603 a GBW 07602 (tabulka 22). Pro referenční materiály uhelných popílků bylo použito menší navážky (10 mg), z důvodu vysoké koncentrace Si v těchto vzorcích. Využitím mikrovlnné extrakce místo konvenční mikrovlnné mineralizace byla zkrácena doba potřebná pro přípravu vzorku. Kromě referenčního materiálu vodní rostliny BCR[®]-060 bylo dosaženo návratností v rozmezí 93–103 %. Hodnota uvedená v tabulce 22 (28,5 g kg⁻¹) pro referenční materiál BCR[®]-060 poskytnutá výrobcem je pouze orientační, naměřená hodnota (24,0 ± 0,7 g kg⁻¹) byla blízká s hodnotou publikovanou dříve (24,9 ± 0,4 g kg⁻¹) [238]. Ve všech případech došlo tedy ke kvantitativní extrakci Si z matrice vzorků.

Tabulka 22: Výsledky stanovení Si ve vybraných referenčních materiálech

Referenční materiál	Křemík			
	Certifikováno ^a (g kg ⁻¹)	Nalezeno ^a (g kg ⁻¹)	R ^b (%)	RSD ^c (%)
Hnojivo BCR [®] -032	9,8 ± 0,56	9,9 ± 0,3	101	1,5
Kal WT-H No. 12-3-14	82 ^d	77,4 ± 1,3	94	1,0
Vodní rostlina BCR [®] -060	28,5 ^d	24,0 ± 0,7	84	1,5
Vojtěška P-ALFALFA	3 ^d	3,1 ± 0,3	103	4,8
Listy topolu NCS DC 73350	7,1 ± 0,8	6,6 ± 0,3	93	2,2
Větvičky a listí GBW 07603	5,8 ± 0,4	5,7 ± 0,2	98	1,8
Větvičky a listí GBW 07602	6,0 ± 0,7	5,8 ± 0,2	97	1,7
Poléťavý uhelný popílek CTA-FFA-I ^e	224,8 ± 9,2	216,3 ± 4,1	96	1,0
Poléťavý uhelný popílek NIST SRM 1633b ^e	230,2 ± 0,8	230 ± 18	100	3,9

^a Střední hodnota ± 2 SD (n = 3).

^b Návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr naměřené hodnoty ku certifikované) × 100.

^c Relativní směrodatná odchylka tří nezávislých stanovení.

^d Orientační hodnota.

^e Pro navážku vzorku 10 mg.

4.2.2. Optimalizace MAE pro potřeby multielementární analýzy uhelných popílků

V kapitole (4.2.1.2.) byla ověřena účinnost NH_4F pro kvantitativní extrakci Si z různých typů vzorků včetně uhelných popílků, metoda byla robustní pro extrakci Si v rozmezí $10\text{--}230\text{ g kg}^{-1}$. Pomocí NH_4F byl vyextrahován nejen Si, ale i další prvky. Využitím samotného NH_4F bez dalších kyselin (HCl , HNO_3 , HClO_4 atd.) byla omezena možnost tvorby polyatomických interferencí při analýze ICP-MS.

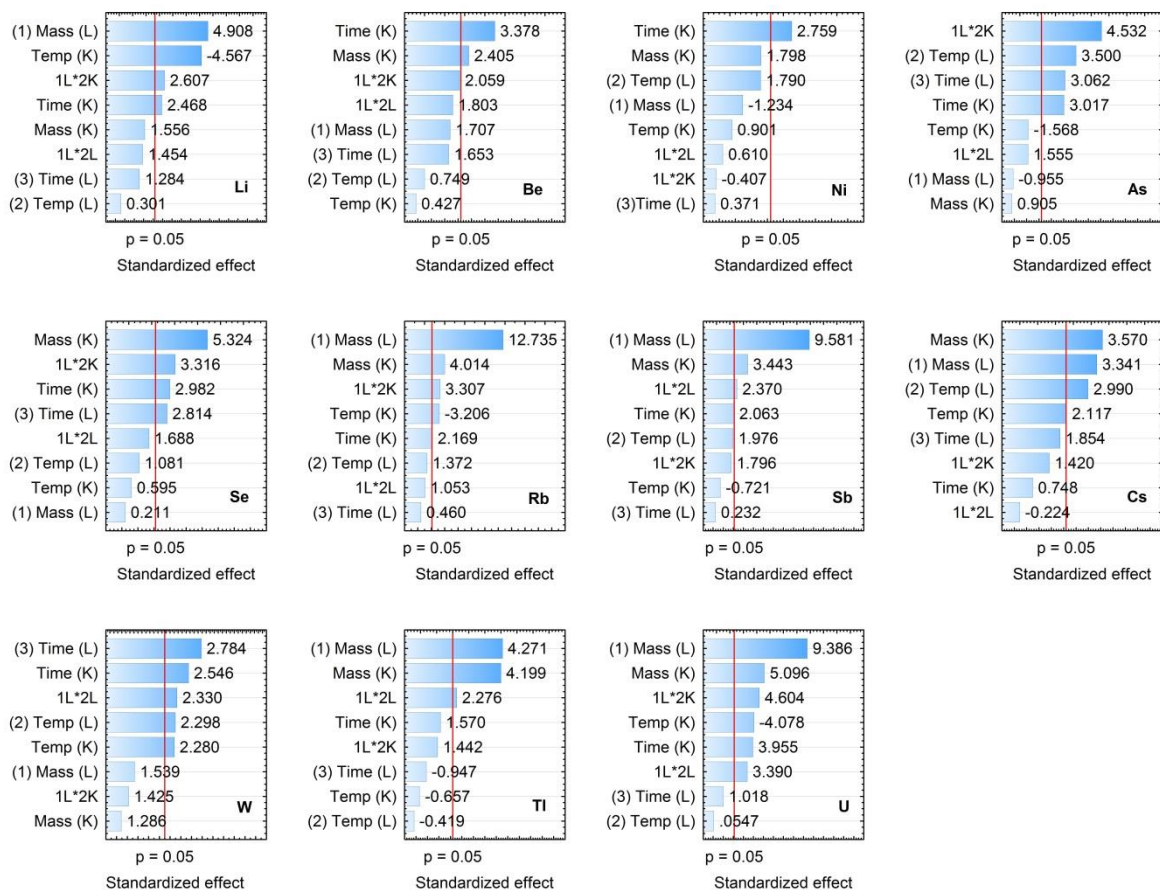
Pro potřeby multielementární analýzy uhelných popílků na ICP-*oa*-TOF-MS byla nejprve provedena optimalizace MAE s NH_4F jako extrakčním činidlem. Mikrovlákná extrakce uhelných popílků byla optimalizována pomocí tříúrovňového frakcionálního faktorového plánu (3^{3-1}) ve třech replikách ($n = 3$). Jako významné faktory ovlivňující účinnost extrakce byly vytipovány: množství NH_4F , teplota a čas extrakce. Ve všech experimentech byla navážka vzorku konstantní (10 mg). Minimální (-1), střední (0) a maximální (+1) úrovně těchto faktorů jsou zobrazeny v tabulce 23. Finální frakcionální faktorový plán a výsledky stanovení vybraných prvků jsou shrnuty v příloze 3 (str. 156).

Tabulka 23: Zvolené úrovně sledovaných faktorů pro potřeby optimalizace MAE uhelných popílků fluoridem amonným a následné multielementární analýzy na ICP-*oa*-TOF-MS

Proměnná	-1	0	1
Množství NH_4F (mg)	300	500	700
Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	160	180	200
Čas extrakce (min)	5	10	15

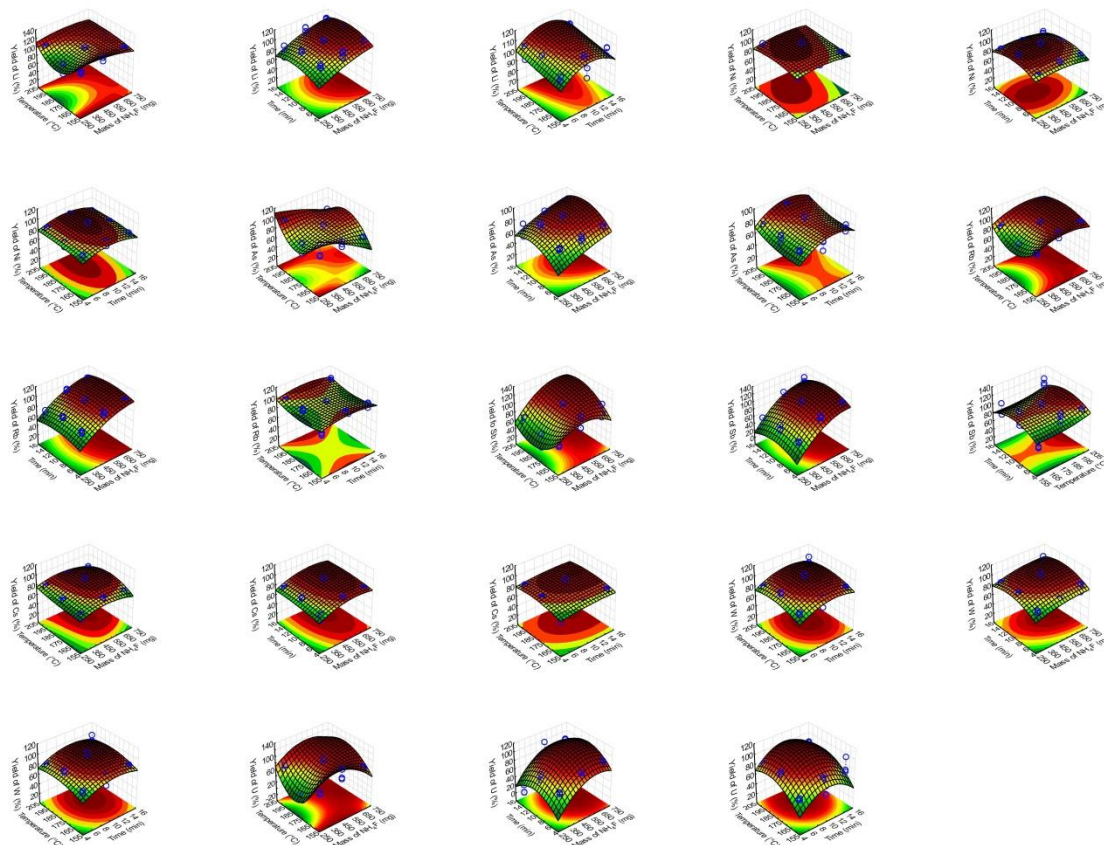
Vliv a význam jednotlivých proměnných na extrakci zvolených prvků byl vyhodnocen na základě Paretových grafů (obr. 9), svislá červená osa na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ reprezentuje hranici, nad níž byl faktor kvalifikován jako významný. Pro jednotlivé analyty byly pozorovány rozdíly v účinnosti MAE. Pro Li, Rb a U byly identifikovány jako významné faktory jak teplota a čas extrakce, tak množství extrakčního činidla. Pro prvky As a W byla účinnost extrakce ovlivněna teplotou a časem extrakce, pro Sb a Ni pak pouze množstvím extrakčního činidla. Čas extrakce a množství přidávaného fluoridu amonného byly významné pro prvky Be, Se, Cs, a Tl. Významná interakce byla odhalena mezi množstvím extrakčního činidla a teplotou extrakce pro Li, Be, Rb, U, Sb, W a Tl. Ze všech sledovaných analytů bylo

přesných výsledků dosaženo pro 11 prvků (Li, Be, Ni, As, Se, Rb, Sb, Cs, W, Tl a U) certifikovaných referenčních materiálů CTA-FFA-1 Fine Fly Ash a Constituent Elements in Coal Fly Ash SRM[®] 1633b.



Obrázek 9: Paretovy grafy standardizovaných efektů získaných z frakcionálního faktorového plánu 3^{3-1} pro studium vlivu jednotlivých proměnných na účinnost extrakce pro potřeby optimalizace MAE a následné multielementární analýzy na ICP-*oa*-TOF-MS, K a L označují kvadratický a lineární efekt faktoru

Vliv jednotlivých faktorů a jejich úrovní na koncentraci jednotlivých prvků ve vzorku znázorňují responzní plochy (obr. 10). Pro potřeby analýzy pak byly voleny výsledné podmínky s ohledem na možnost stanovení co největšího počtu prvků. Optimální podmínky pro extrakci výše zmíněných 11 prvků byly 700 mg NH_4F (5 mL 140 g L^{-1} NH_4F), 200 °C po dobu 10 min.



Obrázek 10: Responzní plochy sestavené na základě analýzy frakcionálního faktorového plánu 3^{3-1} pro potřeby optimalizace metody MAE a následné multielementární analýzy ICP-*oa*-TOF-MS

4.2.3. Studium interferencí

Výskyt spektrálních a nespektrálních interferencí během analýzy ICP-*oa*-TOF-MS byl ovlivněn koncentrací matričních prvků v analyzovaném roztoku vzorku. Za účelem zjištění možné přítomnosti polyatomických interferencí a jejich vlivu na stanovení vybraných analytů byly sestaveny modelové interferenční řady pro matriční prvky C, Ca, Mg, Na a K (viz příloha 1, str. 153). Tabulka 24 zobrazuje hodnoty koncentrací matričních prvků deklarovaných výrobcí referenčních materiálů (CTA-FFA-1 a NIST SRM 1633b) a koncentrací naměřených v analyzovaném roztoku extraktu. Z tabulky 24 je patrné, že byla nalezena velmi malá koncentrace Mg ($<2,3 \text{ mg kg}^{-1}$) a Ca ($<0,033 \text{ mg kg}^{-1}$), to může být připisováno vzniku nerozpustných fluoridů, které by byly před analýzou odfiltrovány společně se zbývajícím pevným podílem vzorku. Sodík byl kompletně vyextrahován pouze v referenčním materiálu NIST SRM 1633b, pro CTA-FFA-1 byla návratnost pouze 32 %,

pro K byla získána analytická návratnost v obou referenčních materiálech 60%. Přestože KF a NaF jsou dobře rozpustné ve vodě, reakcí s NH₄F mohou vznikat různé reakční produkty s rozdílnou rozpustností.

Vzhledem k tomu, že extrakce matričních prvků nebyla ve většině případů kvantitativní, stanovení problematických prvků nebylo ovlivněno vznikajícími polyatomickými interferencemi. Ze sestavených modelových interferenčních řad (viz příloha 1, str. 153) je patrné, že interference se významně uplatňují až při koncentraci matričních prvků nad 25 mg L⁻¹.

Tabulka 24: Porovnání certifikovaných nebo indikovaných a naměřených hodnot matričních prvků ve vybraných CRM uhelných popílků po MAE fluoridem amonným

	CTA-FFA-1				NIST SRM 1633b			
	Certifikováno ^a (mg kg ⁻¹)	Nalezeno ^a (mg kg ⁻¹)	R ^b (%)	RSD (%)	Certifikováno ^a (mg kg ⁻¹)	Nalezeno ^a (mg kg ⁻¹)	R ^b (%)	RSD (%)
Na	21,9 ± 0,8	7,1 ± 0,8	32	5,6	2,01 ± 0,03	2,09 ± 0,16	104	3,8
K	22,0	13,1 ± 0,8	60	3,1	19,5 ± 0,3	11,8 ± 0,8	61	3,4
Ca	22,9	<0,033			15,1 ± 0,6	<0,033		
Mg	15,15	2,3 ± 0,2	15	4,3	4,82 ± 0,08	1,43 ± 0,14	30	4,9
Fe	48,9 ± 1,4	5,6 ± 0,3	12	3,1	77,8 ± 2,3	29,3 ± 3,5	38	6,0
C	N/A	1,15 ± 0,15		6,5	N/A	2,7 ± 0,5		9,3

N/A hodnota není dostupná.

^a střední hodnota ± 2 SD (n = 3).

^b návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr naměřené hodnoty ku certifikované) × 100.

4.2.4. Přesnost stanovení

Přesnost stanovení na základě normy ČSN ISO 5725 byla vyjádřena pomocí správnosti a shodnosti za podmínek opakovatelnosti [239]. Metoda byla použita pro analýzu dvou komerčně dostupných referenčních materiálů uhelného popílku CTA-FFA-1 a NIST SRM 1633b. Z 21 sledovaných prvků (Li, Be, V, Cr, Mn, Ni, Co, Cu, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Ba, Cs, W, Pb, Tl a U) byla dobrá shoda mezi certifikovanými a naměřenými hodnotami nalezena pro 11 z nich, jednalo se o Li, Be, Ni, As, Se, Rb, Sb, Cs, W, Tl a U. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 25. Některé potenciálně toxické prvky jako je Cd, Pb, Ba, Cr, Hg atd. nebyly vyextrahovány kvantitativně. Možným důvodem byla vazba na zbyvající pevný podíl

vzorku (Pb, Cd, Zn, nebo Cu jsou vázány na uhličitanovou matici), tvorba nerozpustných fluoridů (např. PbF₂) nebo jejich koprecipitace s nerozpustnými fluoridy.

Jak je patrné z tabulky 25, byla ve všech případech relativní směrodatná odchylka pod 10 %, tím bylo potvrzeno, že analýza není ovlivněna nehomogenitou mletých vzorků. Správnost metody vyjádřená jako analytická návratnost R se pro všechny prvky pohybovala mezi 91 % až 106 %. Párový *t*-test neprokázal rozdíly mezi certifikovanými a nalezenými hodnotami na hladině významnosti 0,05 pro oba referenční materiály CTA-FFA-1 (*p* = 0,226) a NIST SRM 1633b (*p* = 0,482).

Tabulka 25: Porovnání naměřených a certifikovaných hodnot vybraných prvků v CRM CTA-FFA-1 a NIST SRM 1633b analyzovaných na ICP-*oa*-TOF-MS po MAE fluoridem amonným

Izotopy	CTA-FFA-1				NIST SRM 1633b			
	Certifikováno ^a (mg kg ⁻¹)	Nalezeno ^a (mg kg ⁻¹)	R ^b (%)	RSD (%)	Certifikováno ^a (mg kg ⁻¹)	Nalezeno ^a (mg kg ⁻¹)	R ^b (%)	RSD (%)
⁷ Li ⁺	128 ± 22	133 ± 4	104	1,6	N/A	187 ± 24	99 ^c	6,3
⁹ Be ⁺	27	28 ± 3	104	5,3	N/A	12,3 ± 1,7	104 ^c	7,0
⁶⁰ Ni ⁺	99 ± 6	95 ± 15	96	8,2	120,6 ± 1,8	121,9 ± 4,2	101	1,7
⁷⁵ As ⁺	53,6 ± 2,7	51,0 ± 2,9	95	2,9	136,2 ± 2,6	133,7 ± 1,4	98	2,3
⁷⁸ Se ⁺	4,6	4,7 ± 0,7	102	6,9	10,2 ± 0,2	10,2 ± 1,6	100	7,9
⁸⁵ Rb ⁺	185 ± 5	184 ± 11	99	3,0	140	143,1 ± 4,2	102	1,5
¹²¹ Sb ⁺	17,6 ± 2,5	16,8 ± 1,6	96	4,9	6	6,2 ± 0,6	103	4,5
¹³³ Cs ⁺	48,2 ± 2,3	45,6 ± 2,3	95	2,5	11	10,0 ± 0,9	91	4,7
¹⁸² W ⁺	10,5 ± 1,1	11,1 ± 0,7	106	2,9	5,6	5,6 ± 0,2	100	2,2
²⁰⁵ Tl ⁺	N/A	7,3 ± 0,2	104 ^c	0,2	5,9	5,5 ± 0,2	93	6,3
²³⁸ U ⁺	15,1 ± 0,8	14,3 ± 1,5	95	5,1	8,8 ± 0,4	8,4 ± 0,2	96	5,8

N/A Hodnota není dostupná.

^a Střední hodnota ± 2 SD (*n* = 3).

^b Návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr naměřené hodnoty ku certifikované) × 100.

^c Návratnost R (%) vyhodnocená pro prvky obohacené o 5 µg L⁻¹.

4.2.5. Detekční limity, citlivost metody a vliv interference matrice

Detekční limit (LOD) metody byl určen dle doporučení komise IUPAC jako koncentrace odpovídající trojnásobku směrodatné odchylky (σ) spočtené na základě opakovaného měření ($n = 10$) slepého vzorku. Při výpočtu byla zohledněna navážka 10 mg a objem vzorku 10 mL. Detekční limity (tabulka 26) byly pro všechny prvky s výjimkou Se nižší než $210 \mu\text{g kg}^{-1}$. V porovnání s literaturou byly LOD pro Ni, As [102, 109] a Se [112] srovnatelné. Naopak pro Li, Be a Rb byly LOD horší pravděpodobně z důvodu kontaminace pocházející z použitých činidel nebo systému vnášení vzorku. Byly porovnány směrnice vodné kalibrace a kalibrace s matricí, která obsahovala NH_4F ve stejném poměru jako ve vzorku. Směrnice byly vyjádřeny jako relativní citlivost daného analytu v analyzovaných extraktech vzorků s použitím Rh jako porovnávacího prvku, Studentův párový t -test na hladině významnosti 0,05 neprokázal mezi směnicemi ($p = 0,185$) významné rozdíly, pro potřeby analýzy bylo možné použít vodné kalibrace s Rh jako porovnávacím prvkem.

Tabulka 26: Detekční limity a citlivost ICP-*oa*-TOF-MS po MAE uhelných popílků s použitím fluoridu amonného jako extrakčního činidla

Izotopy	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Publikované LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) [citace]	Relativní citlivost ^a	
			Vodná	NH_4F
⁷ Li ⁺	37	15 [240]	0,1112	0,1298
⁹ Be ⁺	98	60 [102]	0,0437	0,0424
⁶⁰ Ni ⁺	314	720 [102], 210 [109]	0,1054	0,1207
⁷⁵ As ⁺	150	180 [102], 70 [109]	0,0609	0,0564
⁷⁸ Se ⁺	476	900 [102], 300 [112]	0,0106	0,0083
⁸⁵ Rb ⁺	209	40 [112]	0,4249	0,4663
¹²¹ Sb ⁺	31	30 [102]	0,2226	0,1958
¹³³ Cs ⁺	2,1	1,8 [112]	0,9086	0,9141
¹⁸² W ⁺	17		0,436	0,4367
²⁰⁵ Tl ⁺	1,6		1,2432	1,1742
²³⁸ U ⁺	0,09		2,2848	2,1722

^a Relativní citlivost vyjádřená jako odezva pro 1 ng L^{-1} daného prvku za jednu vteřinu s použitím Rh jako porovnávacího prvku.

4.2.6. Časová náročnost analytického postupu

Simultánní analýza pomocí ICP-*oa*-TOF-MS všech prvků trvala pro jeden vzorek přibližně tři minuty včetně deseti replik a následného promytí dávkovacího systému. Plně zaplněný 8 pozicový karusel mikrovlnného zařízení Speedwave MWS-3⁺ v kombinaci s Multi Tube systémem umožnil extrahovat 24 vzorků současně. Příprava 24 vzorků zahrnující mikrovlnnou extrakci společně s vážením, pipetováním extrakčních činidel, chlazením a doplněním vzorků na požadovaný objem trvala přibližně 90 minut. V průběhu 8-hodinového pracovního dne bylo tedy možné analyzovat 96 vzorků (přibližně 12 vzorků za hodinu).

4.3. Analýza kojeneckého sušeného mléka

Jak nadbytek, tak nedostatek esenciálních prvků či vyšší koncentrace toxických prvků může u kojence díky jejich odlišnému metabolismu a neúplnému vývinu některých orgánů způsobit závažné zdravotní problémy [114, 115]. Složení kojenecké stravy je pečlivě monitorováno. ICP-MS představuje jednu z nejvhodnějších a nejrychlejších metod ultrastopové analýzy. Hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem poskytuje plně simultánní záznam spektra, je možné tak s výhodou sledovat i prvky, které nejsou běžně stanoveny. V minulosti byl na našem pracovišti validován rychlý a levný postup pro přímou analýzu mléka metodou ICP-oa-TOF-MS, kde byl analyzován filtrát po precipitaci Ca a proteinů kyselinou šťavelovou a kyselinou dusičnou [142]. Tímto přístupem byla zároveň eliminována možnost vzniku polyatomických interferencí pocházejících z Ca (viz příloha 1, str. 153), které by jinak interferovaly při stanovení Ni, Co, As, Se a Sr. Stanovení některých prvků (Sr, Cu, Bi, Pb, Ag, Th nebo Hg) bylo ovlivněno vznikem ve vodě nerozpustných šťavelanů [241]. Nižší naměřená data oproti certifikované hodnotě byla pozorována i pro další prvky (např. Cd a Ba) pravděpodobně vlivem jejich koprecipitace a/nebo inkluze [142]. Proto v této práci byl zvolen postup totálního rozkladu vzorků směsí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku společně s mikrovlnnou mineralizací (podrobný optimalizovaný postup přípravy vzorků byl popsán v kapitole 3.3.3.). Ve výsledném čirém mineralizátu pak bylo stanoven 22 prvků. Matriční prvky Na, K, Mg, Fe, Ca a Zn byly analyzovány prostřednictvím AAS/AES (viz kapitola 3.4.3.), Hg na jednoúčelovém atomovém absorpčním spektrometru AMA254 (viz kapitola 3.4.4.) a Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, As, Se, Cd, Li, Pb, Sb, La, Ba a U metodou ICP-oa-TOF-MS, podrobný popis nastavení přístroje a brány „Smart Gate“ byl popsán v kapitole 3.4.2. Z důvodu ochrany detektoru byly z hmotnostního spektra vyřezávány některé ionty, konkrétně ionty Fe^+ , polyatomický iont $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ na $m/z = 56$ a izotopické ionty matričního prvku Zn. Monoizotopický iont $^{55}\text{Mn}^+$ byl ze spektra vyřezán spolu s Fe^+ a $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ a nemohl být stanoven (viz tabulka 17).

4.3.1. Volba porovnávacího prvku

Nespektrální interference způsobující změnu signálu byly kompenzovány pomocí porovnávacího prvku. K tomuto účelu byly testovány ionty $^{45}\text{Sc}^+$, $^{69}\text{Ga}^+$, $^{71}\text{Ga}^+$, $^{72}\text{Ge}^+$, $^{89}\text{Y}^+$, $^{103}\text{Rh}^+$ a $^{115}\text{In}^+$. Teoreticky bylo možné aplikovat při analýze ICP-oa-TOF-MS všechny

zmiňované ionty, ale vnášení většího množství standardů do vzorku znamená vyšší riziko kontaminace. Jednou z podmínek, aby byl daný iont použit jako porovnávací prvek, byla jeho nepřítomnost v analyzovaném vzorku a/nebo interference na dané hmotě. Rhodium bylo vybráno jako nejvhodnější prvek díky jeho nepřítomnosti v matrici, průměrné hodnotě ionizačního potenciálu a m/z uprostřed hmotnostního spektra.

4.3.2. Přesnost analýzy

Za účelem stanovení správnosti a shodnosti navržené metody byly analyzovány certifikované referenční materiály sušeného mléka NCS ZC73015 a BCR[®] 150, výsledky jsou uvedeny v tabulce 27, respektive 28. Pro analýzu referenčních materiálů a vzorků bylo využito vodné kalibrace s Rh jako porovnávacím prvkem. Z tabulky je patrné, že pro prvky pod m/z<100 nejčastěji zatížené interferencemi polyatomických iontů matričních prvků bylo dosaženo správných výsledků. Správnost byla určena na základě vyhodnocení analytických návratností stanovení. Jak je vidět z tabulky 27 a 28, bylo pro certifikované analyty dosaženo návratností v rozmezí 72–116^o%. Nízká hodnota oproti CRM byla získána pro Pb ($50,6 \pm 2,1 \mu\text{g kg}^{-1}$), tato hodnota však stále náleží do konfidenčního intervalu poskytnutého výrobcem referenčního materiálu ($70 \pm 20 \mu\text{g kg}^{-1}$). Shodnost metody [242] vyjádřená jako RSD byla vyhodnocena na základě analýzy obou referenčních materiálů a to třikrát během jednoho dne a byla menší než 12 %. Každý roztok byl analyzován v deseti replikách.

Tabulka 27: Výsledky stanovení koncentrací vybraných prvků v certifikovaném referenčním materiálu NCS ZC73015 Milk Powder

ICP- <i>oa</i> -TOF-MS	Koncentrace ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
⁷ Li ⁺	40 ^d	39,43 ± 0,85	99	1,08
⁵⁹ Co ⁺	30 ± 7	27,86 ± 1,24	93	2,23
⁶³ Cu ⁺	510 ± 130	430 ± 21	84	2,44
⁷⁵ As ⁺	31 ± 7	28,13 ± 3,41	91	6,06
⁷⁸ Se ⁺	110 ± 30	97,76 ± 7,45	89	3,81
⁸⁵ Rb ⁺	11600 ± 700	11999 ± 265	103	1,10
⁸⁸ Sr ⁺	5300 ± 600	4941 ± 137	93	1,39
⁹⁸ Mo ⁺	280 ± 30	297 ± 25	106	4,21
¹²¹ Sb ⁺	6 ^d	6,76 ± 0,68	113	5,03
¹³³ Cs ⁺	34 ± 5	31,5 ± 1,24	93	1,97
¹³⁸ Ba ⁺	1000 ± 300	956 ± 70	96	3,66
¹³⁹ La ⁺	2,5 ^d	2,73 ± 0,33	109	6,04
¹⁴⁰ Ce ⁺	4 ^d	3,35 ± 0,47	84	7,01
²⁰⁸ Pb ⁺	70 ± 20	50,6 ± 2,1	72	2,08
²³⁸ U ⁺	3 ^d	2,74 ± 0,15	91	2,74
Termooxidační metoda	Koncentrace ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
Hg	2,2 ^d	1,81 ± 0,28	82	7,73
FAAS/FAES	Koncentrace ^a (mg kg^{-1})		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
Na	4700 ± 300	4845 ± 350	103	3,61
K	12500 ± 500	12428 ± 1479	99	5,95
Ca	9400 ± 300	9603 ± 367	102	1,91
Mg	960 ± 70	908 ± 17	95	0,94
Fe	7,8 ± 1,3	7,1 ± 0,2	91	1,41
Zn	34 ± 2	27,9 ± 0,3	82	0,61

^a Střední hodnota ± 2 SD (n = 3).

^b Návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr naměřené hodnoty ku certifikované) × 100.

^c Relativní směrodatná odchylka (%) ze tří nezávislých stanovení.

^d Indikovaná hodnota.

Tabulka 28: Výsledky stanovení koncentrací vybraných prvků v certifikovaném referenčním materiálu BCR 150 Spiked Skimm Milk Powder

ICP- <i>oa</i> -TOF-MS	Koncentrace ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
⁵⁵ Mn ⁺	216 ± 10	220 ± 44	102	10,0
⁶³ Cu ⁺	2230 ± 80	2223 ± 253	99	5,69
⁷⁸ Se ⁺	127 ± 15	119,5 ± 12,7	94	5,31
¹¹⁴ Cd ⁺	21,8 ± 1,4	21,6 ± 1,9	99	4,40
²⁰⁸ Pb ⁺	1000 ± 40	1110 ± 36	111	1,62
Termooxidační metoda	Koncentrace ^a (mg kg^{-1})		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
Hg	9,4 ± 1,7	10,9 ± 0,8	116	3,36
FAAS/FAES	Koncentrace ^a (mg kg^{-1})		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
Fe	11,8 ± 0,6	11,7 ± 2,6	99	11,1
Zn	49,2 ± 1,2	42,1 ± 3,4	86	0,61

^a Střední hodnota ± 2 SD (n = 3).

^b Návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr naměřené hodnoty ku certifikované) × 100.

^c Relativní směrodatná odchylka (%) ze tří nezávislých stanovení.

4.3.3. Detekční limity a mez stanovitelnosti

Detekční limit (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly určeny dle doporučení komise IUPAC jako koncentrace odpovídající trojnásobku, resp. desetinásobku směrodatné odchylky (SD) spočtené na základě opakovaného měření (n = 10) slepého vzorku. Při výpočtu byla zohledněna navážka a ředění vzorku a doba akvizice byla 5 vteřin. Bylo dosaženo dostatečných detekčních limitů ke stanovení analytů v CRM (tabulka 29). Detekční limity byly pro prvky, jako jsou Mn, Co, Sr, Pb, U atd. srovnatelné s těmi, které byly dříve publikovány pro analýzu sušeného mléka použitím Q-ICP-MS [118, 139, 143, 145]. Naopak pro As bylo dosaženo horšího detekčního limitu.

Tabulka 29: Detekční limity a mez stanovitelnosti techniky a metody

ICP-oo-TOF-MS				
Analyt	LOD^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD^b ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ^b ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
⁷ Li ⁺	0,0091	0,0303	0,455	1,517
⁵⁵ Mn ⁺	0,0029	0,0097	0,145	0,483
⁵⁹ Co ⁺	0,0142	0,0473	0,710	2,367
⁶³ Cu ⁺	0,0103	0,0343	0,515	1,717
⁷⁵ As ⁺	0,2736	0,912	13,68	45,60
⁷⁸ Se ⁺	0,0081	0,027	0,405	1,35
⁸⁵ Rb ⁺	0,0022	0,0073	0,110	0,367
⁸⁸ Sr ⁺	0,0096	0,032	0,480	1,60
⁹⁸ Mo ⁺	0,0046	0,0153	0,230	0,767
¹²¹ Sb ⁺	0,0024	0,0080	0,120	0,40
¹³³ Cs ⁺	0,00093	0,0031	0,047	0,157
¹³⁸ Ba ⁺	0,0148	0,0493	0,740	2,467
¹³⁹ La ⁺	0,0016	0,0053	0,080	0,267
¹⁴⁰ Ce ⁺	0,0011	0,0037	0,055	0,183
²⁰⁸ Pb ⁺	0,0011	0,0037	0,055	0,183
²³⁸ U ⁺	0,00021	0,0007	0,011	0,037
Termooxidační metoda				
Analyt	LOD^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD^b ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ^b ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Hg	0,002	0,007	0,10	0,33
FAAS/FAES				
Analyt	LOD^a (mg L^{-1})	LOQ^a (mg L^{-1})	LOD^b (mg kg^{-1})	LOQ^b (mg kg^{-1})
Mg	0,009	0,03	0,45	1,5
Na	0,10	0,33	5,0	16,7
K	0,12	0,40	6,0	20,0
Ca	0,05	0,17	2,5	8,3
Fe	0,08	0,27	4,0	13,3

^aLOD, LOQ techniky.^bLOD, LOQ metody.

4.3.4. Aplikace pro analýzu reálných vzorků kojeneckých mlék

Metoda byla použita pro analýzu 21 sušených kojeneckých mlék, z nichž bylo 20 kravského původu a 1 mléko na sójové bázi. Analýze byly podrobeny vzorky z každé kategorie, do nichž je umělá výživa do jednoho roku dítěte rozdělena i v reálné praxi (0-mléčná výživa pro nedonošené děti, 1-počáteční mléčná výživa, 2-pokračovací mléčná výživa, 3-mléčná výživa batolat). Stanoveny byly elementy, pro něž byla na základě analýzy certifikovaných referenčních materiálů potvrzena správnost, pozornost byla soustředěna pouze na stanovení prvků, pro něž zvolené metody zajistily dostatečné detekční limity.

Získaná data (viz příloha 4, str. 157) byla podrobena klasifikaci a analýze pomocí jednorozměrných a vícerozměrných statistických metod.

4.3.4.1. *Exploratorní analýza dat*

Data byla nejprve podrobena exploratorní (průzkumové) analýze pro podrobné seznámení se strukturou dat, posouzení symetrie a špičatosti rozdělení, identifikaci odlehlých bodů, případných hrubých chyb a lokální koncentraci dat. K základním předpokladům o datech patří normalita, nezávislost, homogenita a i určení minimální četnosti analyzovaných dat. Pro zajištění nevychýlených a správných odhadů klasických výběrových parametrů je zapotřebí, aby data splňovala požadované vlastnosti. Pokud dojde k porušení některého z předpokladů o výběru, je nutná transformace dat [243, 244].

Tabulka 30 obsahuje vyčíslení odhadů vybraných výběrových parametrů pro původní data, data po exponenciální transformaci, odhady mediánu, šikmosti, špičatosti, kombinovaného testu normality a počtu odlehlých bodů nalezených v každém výběru. Z výsledků vyplynulo, že rozdělení některých ze studovaných výběrů se systematicky odlišují od rozdělení normálního, proto byla provedena exponenciální transformace dat, tím došlo k zesymetričtění rozdělení a stabilizaci výběru. Vzhledem k charakteru experimentu nelze asymetrii v datech eliminovat odstraněním odlehlých bodů. Tato data obsahují informace, jejichž ztráta by mohla vést ke zcela chybné interpretaci výsledků a ztrátě cenné informace.

Ze skupiny metod klasifikační analýzy byla vybrána diskriminační analýza, základním předpokladem diskriminační analýzy je platnost vícerozměrné normality, tedy normální rozdělení jednotlivých znaků v rámci jednotlivých tříd. V příloze 5 (str. 160) je pro každý prvek v rámci jednotlivých tříd vyčíslena hodnota šikmosti, špičatosti, průměru, směrodatné odchylky a kombinovaného testu normality. Podmínka normality nebyla splněna v případě koncentrace barya pro druhou třídu analyzovaných vzorků. Jak je diskutováno dále, baryum nebylo zvoleno jako vhodný diskriminátor a pro potřeby klasifikace v rámci diskriminační analýzy nebylo použito. Dalším předpokladem použití diskriminační analýzy je podobnost kovariančních matic jednotlivých tříd, na ně lze usuzovat na základě hodnot směrodatných odchylek (viz příloha 5, str. 160). Hodnoty celkové korelace a korelace v rámci jednotlivých tříd jsou uvedeny v tabulce 31, respektive v tabulce 32. Statisticky významné korelace jsou zobrazeny a zvýrazněny černě. Korelační matice je rovněž znázorněna graficky na obrázku 11.

Tabulka 30: Statistické charakteristiky stanovení obsahu Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn (mg kg^{-1}), Hg, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd, Li ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ve vzorcích náhradní mléčné kojenecké stravy ($n = 21$)

Analyt	Průměr	Spodní mez	Horní mez	Průměr ^a	Spodní IS ^a	Horní IS ^a	Rozptyl	Sm. Odch.	Šikmost	Špičatost p^b	Medián	IS spodní	IS horní	OB	
Hg	1,39	0,90	1,87	0,98	0,70	1,39	1,14	1,07	0,73	2,21	0,254	1,02	0,23	1,81	0
Mg	455,9	424,5	487,3	453,4	422,7	485,3	4760,2	69,0	0,2	2,5	0,898	452,2	397,9	506,5	0
Fe	46,1	39,7	52,6	42,7	38,0	48,8	200,7	14,2	1,0	3,6	0,126	44,8	35,2	54,4	0
Na	1583	1327	1840	1422	1294	1601	317820	564	2	7	0,009	1414	1221	1607	2
Ca	4950	4373	5527	4728	4261	5290	160691	1268	1	4	0,108	4946	4064	5828	0
K	4685	4468	4903	4550	4409	4741	228010	478	1	4	0,091	4578	4265	4891	1
Zn	40,7	36,7	44,7	40,3	36,4	44,3	76,8	8,8	0,1	1,7	0,934	39,4	31,0	47,7	0
Mo	154,9	124,0	185,7	141,2	116,6	171,5	4598,2	67,8	0,7	2,8	0,255	130,6	78,6	182,7	0
Co	23,0	20,6	25,3	22,5	20,3	24,9	26,8	5,2	0,2	1,8	0,847	23,4	18,5	28,2	0
Cu	3184	2833	3534	3058	2768	3401	592701	770	1	4	0,120	3142	2547	3738	0
Cs	9,9	7,7	12,1	8,6	7,2	10,6	22,9	4,8	1,0	3,3	0,116	8,4	5,0	11,7	1
Sr	2213	1846	2580	2044	1755	2404	650235	806	1	3	0,276	2051	1411	2692	0
Rb	2334	1636	3032	2080	1490	2779	235115	1533	1	3	0,295	1987	712	3263	0
U	5,7	3,9	7,5	4,7	3,4	6,4	15,7	4,0	0,7	2,3	0,267	4,6	1,8	7,4	0
As	9,9	7,7	12,2	9,7	7,5	12,0	23,9	4,9	0,1	1,8	0,932	9,2	5,0	13,4	0
Se	118,8	103,8	133,8	119,6	104,4	134,4	1089,7	33,0	-0,1	1,9	0,956	122,4	93,6	151,2	0
Pb	31,6	26,4	36,8	31,7	26,4	36,8	130,8	11,4	0,0	1,9	0,972	27,1	17,9	36,2	0
Sb	12,2	10,6	13,7	11,2	10,2	12,4	11,2	3,4	1,3	4,3	0,055	11,2	8,7	13,7	1
La	6,5	4,3	8,8	4,9	3,9	6,4	24,1	4,9	2,0	6,9	0,009	5,9	3,8	8,0	2
Ba	410,4	303,9	516,9	342,0	273,8	435,3	54744,2	234,0	1,1	3,7	0,087	355,5	201,2	509,8	0
Cd	7,3	6,2	8,4	8,0	6,9	8,8	6,1	2,5	-0,5	1,6	0,517	8,3	6,1	10,5	0
Li	14,3	9,6	19,1	12,0	8,4	16,5	108,8	10,4	0,8	2,6	0,237	10,8	2,7	18,9	0

^a Odhad parametru získaný po exponenciální transformaci dat.

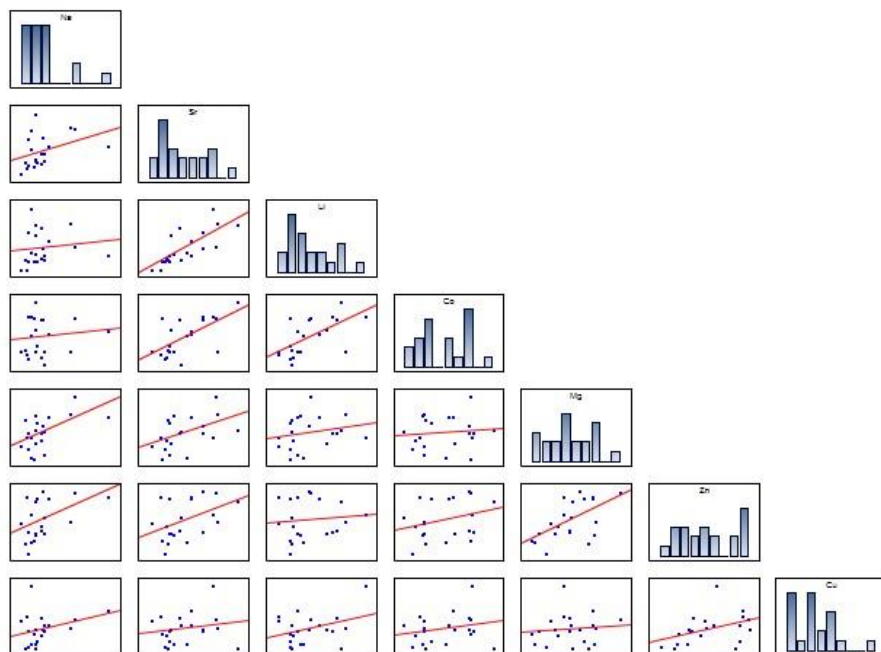
^b Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0,05; rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05, data nevykazují normální rozložení. IS interval spolehlivosti; OB odlehlý bod.

Tabulka 31: Celková korelace

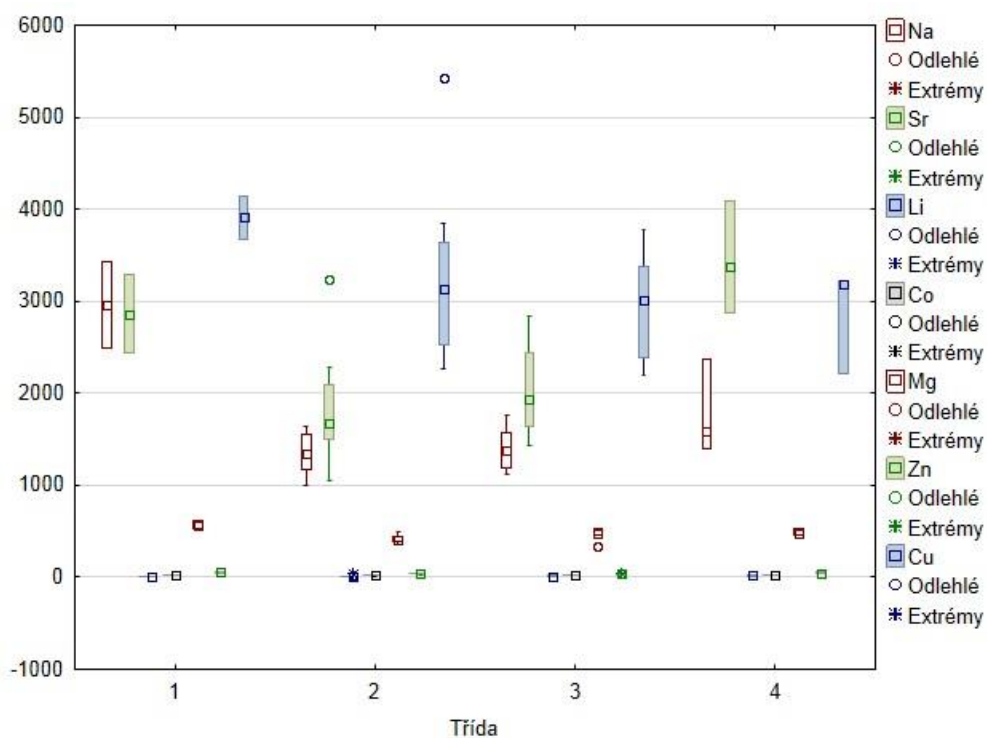
	Hg	Mg	Fe	Na	Ca	K	Zn	Mo	Co	Cu	Cs	Sr	Rb	U	As	Se	Pb	Sb	La	Ba	Cd	Li
Hg																						
Mg	0,09																					
Fe	0,05	0,37																				
Na	0,25	0,56	0,46																			
Ca	-0,05	0,48	0,32	0,19																		
K	-0,15	0,12	0,06	-0,02	0,57																	
Zn	-0,01	0,58	0,12	0,47	0,60	0,22																
Mo	0,47	0,06	0,39	0,49	0,27	0,03	0,00															
Co	0,27	0,10	0,26	0,13	0,71	0,46	0,29	0,40														
Cu	0,28	0,11	0,06	0,31	0,08	-0,10	0,41	0,02	0,23													
Cs	0,37	-0,34	-0,08	-0,27	0,11	0,35	-0,30	0,33	0,47	0,09												
Sr	0,00	0,47	0,27	0,38	0,69	0,66	0,44	0,20	0,64	0,19	0,04											
Rb	0,18	0,13	0,30	0,29	0,42	0,40	0,09	0,51	0,34	0,03	0,58	0,11										
U	0,02	0,10	0,08	0,01	0,42	0,41	0,31	0,15	0,52	0,06	-0,12	0,62	-0,37									
As	0,63	-0,20	0,03	0,15	0,08	-0,13	-0,15	0,61	0,53	0,18	0,57	0,06	0,33	0,04								
Se	-0,17	0,39	0,08	0,24	0,36	-0,02	0,48	0,04	-0,03	0,12	-0,48	0,18	-0,05	0,11	-0,14							
Pb	-0,01	-0,07	-0,20	-0,17	0,23	0,34	-0,06	0,05	0,33	-0,19	0,25	0,26	0,07	0,32	-0,02	-0,43						
Sb	0,42	-0,32	-0,23	-0,04	0,00	-0,08	-0,16	0,27	0,50	0,20	0,64	0,00	0,25	-0,05	0,69	-0,54	0,46					
La	0,41	0,50	0,02	0,32	0,06	-0,16	0,29	0,17	-0,03	0,05	-0,35	0,16	-0,35	0,45	-0,09	-0,02	0,29	-0,04				
Ba	0,27	0,16	0,29	0,13	0,38	0,39	0,09	0,48	0,22	-0,22	0,27	0,33	0,28	0,20	0,05	0,20	0,09	-0,13	0,13			
Cd	0,35	-0,24	0,28	0,15	-0,04	0,01	-0,13	0,45	0,45	0,20	0,33	0,14	-0,08	0,44	0,38	-0,46	0,07	0,38	0,22	0,12		
Li	0,15	0,21	0,18	0,12	0,47	0,66	0,11	0,05	0,62	0,36	0,45	0,77	0,27	0,32	0,21	-0,17	0,23	0,21	-0,13	0,16	0,24	

Tabulka 32: Korelace uvnitř tříd

	Hg	Mg	Fe	Na	Ca	K	Zn	Mo	Co	Cu	Cs	Sr	Rb	U	As	Se	Pb	Sb	La	Ba	Cd	Li
Hg																						
Mg	-0,14																					
Fe	-0,09	-0,09																				
Na	-0,17	0,10	0,33																			
Ca	0,01	0,17	-0,13	-0,37																		
K	0,31	0,08	-0,08	0,10	0,33																	
Zn	-0,20	0,48	-0,03	0,02	0,61	0,17																
Mo	0,37	-0,57	0,15	-0,03	0,00	0,10	-0,45															
Co	0,33	-0,40	-0,14	-0,38	0,59	0,51	0,16	0,24														
Cu	0,13	0,06	0,11	0,19	0,26	0,18	0,40	-0,14	0,33													
Cs	0,71	-0,39	-0,17	-0,04	0,08	0,33	-0,19	0,65	0,58	0,29												
Sr	0,05	0,17	-0,04	-0,07	0,39	0,57	0,14	-0,17	0,54	0,33	0,09											
Rb	0,35	-0,20	0,01	0,35	0,07	0,20	-0,02	0,54	0,10	0,16	0,62	-0,35										
U	-0,01	-0,08	0,02	-0,45	0,40	0,49	0,14	0,01	0,53	0,02	-0,06	0,62	-0,56									
As	0,54	-0,50	-0,09	-0,20	0,18	0,15	-0,33	0,60	0,63	0,06	0,83	0,12	0,47	0,02								
Se	-0,37	0,29	0,05	-0,37	0,24	-0,44	0,18	-0,31	-0,24	0,02	-0,45	-0,34	-0,17	-0,13	-0,26							
Pb	0,10	-0,15	-0,49	-0,13	0,20	0,42	0,05	0,11	0,31	-0,10	0,14	0,37	-0,08	0,42	0,05	-0,43						
Sb	0,41	-0,50	-0,44	-0,05	0,13	0,20	-0,08	0,34	0,63	0,21	0,74	0,21	0,34	0,03	0,71	-0,54	0,48					
La	0,16	0,43	-0,24	-0,18	0,10	0,25	0,21	-0,14	-0,17	-0,18	-0,23	0,24	-0,46	0,52	-0,39	-0,19	0,47	-0,17				
Ba	0,59	-0,13	0,18	-0,17	-0,09	-0,13	-0,25	0,52	-0,04	-0,19	0,31	-0,21	0,02	0,05	0,17	-0,09	0,05	0,01	0,33			
Cd	0,25	-0,48	0,25	0,06	0,00	0,38	-0,17	0,47	0,53	0,15	0,45	0,33	-0,08	0,52	0,32	-0,55	0,08	0,33	0,08	0,31		
Li	0,35	0,10	0,02	0,14	0,28	0,63	0,01	-0,02	0,58	0,56	0,44	0,82	0,07	0,29	0,35	-0,37	0,17	0,33	-0,05	-0,13	0,37	



Obrázek 11: Korelační matice



Obrázek 12: Krabicový graf proměnlivosti vybraných diskriminujících proměnných pro jednotlivé třídy

Obrázek 12 představuje krabicový graf, ten zobrazuje částečnou sumarizaci dat, umožňuje znázornění robustního odhadu polohy, mediánu, minima a maxima prvního a třetího kvartilu, odlehlých hodnot a extrémů pro jednotlivé prvky [243]. Odlehlé body identifikují vybočující koncentrace v rámci skupiny daného prvku, jejich význam bude diskutován v kapitole 4.3.5. Korelační matice i krabicový graf jsou vykresleny pouze pro prvky, které byly zvoleny jako nejvhodnější diskriminátory (viz následující kapitola).

4.3.4.2. Diskriminační analýza

Byly sledovány možnosti klasifikace podle země původu a kategorie (mléka určená pro výživu nedonošených dětí, počáteční výživu pro kojence, pokračovacího mléka a mléka pro kojence a batolata). Jelikož v rámci jednoho výrobního závodu v EU se obvykle zpracovává mléko z více zdrojů, není možné usuzovat na souvislost mezi zemí původu a obsahem analyzovaných prvků. Navíc je mléko upravováno výrobcem, aby splnilo nutriční požadavky kojence. Diskriminační analýza byla provedena s ohledem na všeobecně zavedené rozdělení mlék do jednotlivých kategorií. Nejlepší znaky pro klasifikaci z původních 21 proměnných byly určeny na základě krokové analýzy dopředné, kde ve 4 krocích byly nalezeny znaky s dostatečnou diskriminační silou, a to na základě Wilkova kritéria λ , kritéria F, kritéria síly testu a tolerance $1-R^2$ (tabulka 33 respektive 34). Prvky Li, Na, Sr, Co, Mg, Zn a Cu nejlépe rozdělují/diskriminují jednotlivé třídy, pro kanonickou korelační analýzu pak byla použita pouze tato podmnožina dat.

Tabulka 33: Výsledky diskriminační funkční analýzy po prvním kroku

	Wilk. (Lambda)	Parc. (Lambda)	F na vyj ((3,2))	p-hodn.	Toler.	1-toler. (R²)
Na	0,000127	0,003893	170,5661	0,005834	0,003128	0,996872
K	0,000008	0,063499	9,8322	0,093720	0,024198	0,975802
Se	0,000002	0,320769	1,4117	0,440209	0,049188	0,950813
Co	0,000091	0,005402	122,7533	0,008091	0,000559	0,999441
La	0,000001	0,799280	0,1674	0,910074	0,028177	0,971823
Mg	0,000020	0,024608	26,4248	0,036684	0,001926	0,998074
Ba	0,000007	0,067516	9,2075	0,099545	0,032690	0,967310
Hg	0,000016	0,031177	20,7167	0,046399	0,006428	0,993572
Cu	0,000018	0,027462	23,6092	0,040909	0,004311	0,995689
Fe	0,000001	0,401653	0,9931	0,537161	0,122212	0,877788
U	0,000001	0,343713	1,2729	0,468332	0,015815	0,984185
Zn	0,000066	0,007514	88,0512	0,011250	0,001709	0,998291
Li	0,000056	0,008843	74,7193	0,013236	0,000402	0,999598
Sr	0,000024	0,020519	31,8242	0,030619	0,002567	0,997433
Sb	0,000016	0,031476	20,5138	0,046840	0,003329	0,996671
Pb	0,000005	0,097932	6,1407	0,143241	0,020240	0,979761

Tabulka 34: Výsledky diskriminační funkční analýzy po čtvrtém kroku dokumentující diskriminátory zvolené pro tvorbu modelu

	Wilk. (Lambda)	Parc. (Lambda)	F na vyj ((3,11))	p-hodn.	Toler.	1-toler. (R²)
Na	0,030707	0,093027	35,74832	0,000006	0,188041	0,811959
Sr	0,006859	0,416474	5,13741	0,018348	0,157637	0,842363
Li	0,022767	0,125474	25,55598	0,000029	0,027910	0,972090
Co	0,043864	0,065125	52,63558	0,000001	0,044149	0,955851
Mg	0,032425	0,088099	37,95296	0,000004	0,073434	0,926566
Zn	0,019123	0,149382	20,87890	0,000076	0,075398	0,924602
Cu	0,008292	0,344510	6,97647	0,006763	0,177780	0,822221

Tabulka 35: Odhady parametrů klasifikační funkce pro jednotlivé třídy

	Třída 1 (p = 0,09524)	Třída 2 (p = 0,47619)	Třída 3 (p = 0,28571)	Třída 4 (p = 0,14286)
Na	0,48	0,30	0,35	0,35
Sr	0,20	0,12	0,14	0,15
Li	-39,14	-25,28	-28,75	-28,96
Co	68,90	44,81	51,51	51,26
Mg	4,59	3,01	3,46	3,42
Zn	-30,84	-20,07	-23,09	-22,75
Cu	0,17	0,11	0,13	0,12
Abs. člen	-2492,25	-1048,34	-1371,12	-1386,26

Tabulka 36: Klasifikační matice: řádky představují pozorované klasifikace a sloupce předpovězené klasifikace

	% (správných)	Třída 1 (p = 0,09524)	Třída 2 (p = 0,47619)	Třída 3 (p = 0,28571)	Třída 4 (p = 0,14286)
Třída 1	100	2	0	0	0
Třída 2	100	0	10	0	0
Třída 3	100	0	0	6	0
Třída 4	100	0	0	0	3
Celkem	100	2	10	6	3

Z tabulky 35 je patrné, že došlo k rozdělení objektů do 4 tříd, kde každá třída popisuje jednu diskriminační funkci. Pravděpodobnost zařazení daného prvku do konkrétní třídy udává veličina p (apriorní pravděpodobnost). V tabulce 36 klasifikační matice byly jednotlivé vzorky rozděleny do jednotlivých tříd, klasifikace proběhla na 100 %, žádný vzorek nebyl chybně zařazen. Pro zkoumání vztahů mezi dvěma skupinami proměnných (jednotlivými třídami) byla použita kanonická korelační analýza. Tabulka 37 zobrazuje 3 diskriminační funkce, na základě testu chí-kvadrát byly určeny první dva kořeny jako statisticky významné (nejvyšší chí-kvadrát, nejnižší p-hodnota).

Tabulka 37: Test chí-kvadrát po odstranění postupných kořenů

Kořeny odstraněny	Vlastní číslo	Kan. (R)	Wilk. (Lambda)	Chí-kv.	SV	p-hodn.
0	63,28586	0,992192	0,002857	84,94279	21	0,000000*
1	1,89365	0,808959	0,183639	24,57436	12	0,016974*
2	0,88187	0,684554	0,531386	9,16786	5	0,102553

* Parametr statisticky významný.

V tabulce 38 jsou shrnuty standardizované koeficienty pro kanonické proměnné. Hodnoty uvedené v tabulce 39 představují korelace mezi znaky a diskriminačními funkcemi. V tabulce 40 jsou uvedeny průměry kanonických proměnných pro jednotlivé třídy. Nejvyšší průměr oproti ostatním má první třída, první diskriminační funkce diskriminuje většinu mezi první třídou a ostatními. Menší diskriminace je pak patrná mezi čtvrtou třídou a ostatními třídami, to popisuje druhá diskriminační funkce.

Tabulka 38: Standardizované koeficienty pro kanonické proměnné

	Na	Sr	Li	Co	Mg	Zn	Cu	Vlastní	Kum. podíl
Kořen1	-2,2030	-1,6929	5,6068	-4,5493	-3,4235	3,2522	-1,7673	63,2859	0,9580
Kořen2	0,1581	1,1431	0,2530	-1,0431	-1,0890	1,1521	-0,6123	1,8936	0,9867
Kořen3	0,2495	0,2322	-0,8576	-0,4368	-0,4699	0,0414	0,8849	0,8819	1,0000

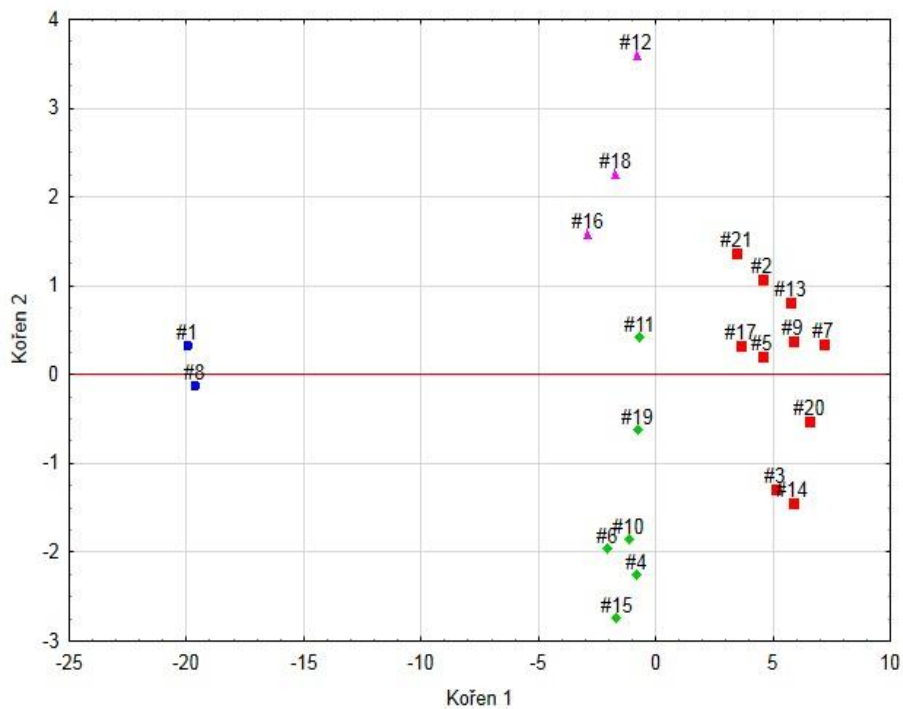
Tabulka 39: Faktorová strukturní matice

	Na	Sr	Li	Co	Mg	Zn	Cu
Kořen1	-0,19698	-0,08247	-0,01422	-0,06265	-0,11577	-0,06791	-0,02582
Kořen2	0,31097	0,55170	0,17640	0,07523	0,07775	0,38032	-0,00087

Tabulka 40: Průměry kanonických proměnných

	Třída 1	Třída 2	Třída 3	Třída 4
Kořen1	-19,799	5,227	-1,202	-1,820
Kořen2	0,109	0,135	-1,501	2,481

Rozdělení 21 vzorků do nalezených tříd zobrazuje obrázek 13 – graf kanonického skóre. Jak vyplývá i z předchozího textu, první třída je silně diskriminována od ostatních vzorků, což je patrné i z obrázku. Jedná se o mléka určená pro výživu nedonošených dětí, tedy vzorek č. 1 a 8. Čtvrtá třída odlišená druhou diskriminační funkcí od ostatních tříd zahrnuje vzorky č. 12, 16 a 18 jedná se o pokračovací mléka. Největší skupinu pak tvoří mléka určená pro počáteční výživu kojence (2. třída) a třetí třída, kde jsou mléka pro kojence a batolata. Z grafu je zřejmé, že získaný model je vhodný ke klasifikaci vzorků do jednotlivých tříd.



Obrázek 13: Graf kanonických skóre: (●) třída 1, (■) třída 2, (◆) třída 3, (▲) třída 4

V tabulce 41 jsou uvedeny hodnoty vypočtených aposteriorních pravděpodobností zařazení každého z objektů testovacího souboru do tříd. Nejvyšší hodnota pravděpodobnosti značí příslušnost objektu do dané třídy. Z hodnot uvedených v tabulce je zřejmé, že všechny objekty testovacího souboru byly zařazeny správně do jednotlivých tříd. Další možností je klasifikace na základě hodnot Mahalanobisových vzdáleností a klasifikační případů, ty zde nejsou zobrazeny.

Tabulka 41: Aposteriorní pravděpodobnost

Pozorovaná klasifikace	Třída 1 (p = 0,09524)	Třída 2 (p = 0,47619)	Třída 3 (p = 0,28571)	Třída 4 (p = 0,14286)
Třída 1	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Třída 2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000
Třída 2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000
Třída 3	0,000000	0,000000	0,999995	0,000005
Třída 2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000
Třída 3	0,000000	0,000000	0,999975	0,000025
Třída 2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000
Třída 1	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Třída 2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000
Třída 3	0,000000	0,000000	0,999962	0,000038
Třída 3	0,000000	0,000000	0,832132	0,167868
Třída 4	0,000000	0,000000	0,000008	0,999992
Třída 2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000
Třída 2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000
Třída 3	0,000000	0,000000	0,999998	0,000002
Třída 4	0,000000	0,000000	0,012775	0,987225
Třída 2	0,000000	0,999993	0,000006	0,000000
Třída 4	0,000000	0,000000	0,001830	0,998170
Třída 3	0,000000	0,000000	0,995464	0,004536
Třída 2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000
Třída 2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000

Nesprávná klasifikace je označena *.

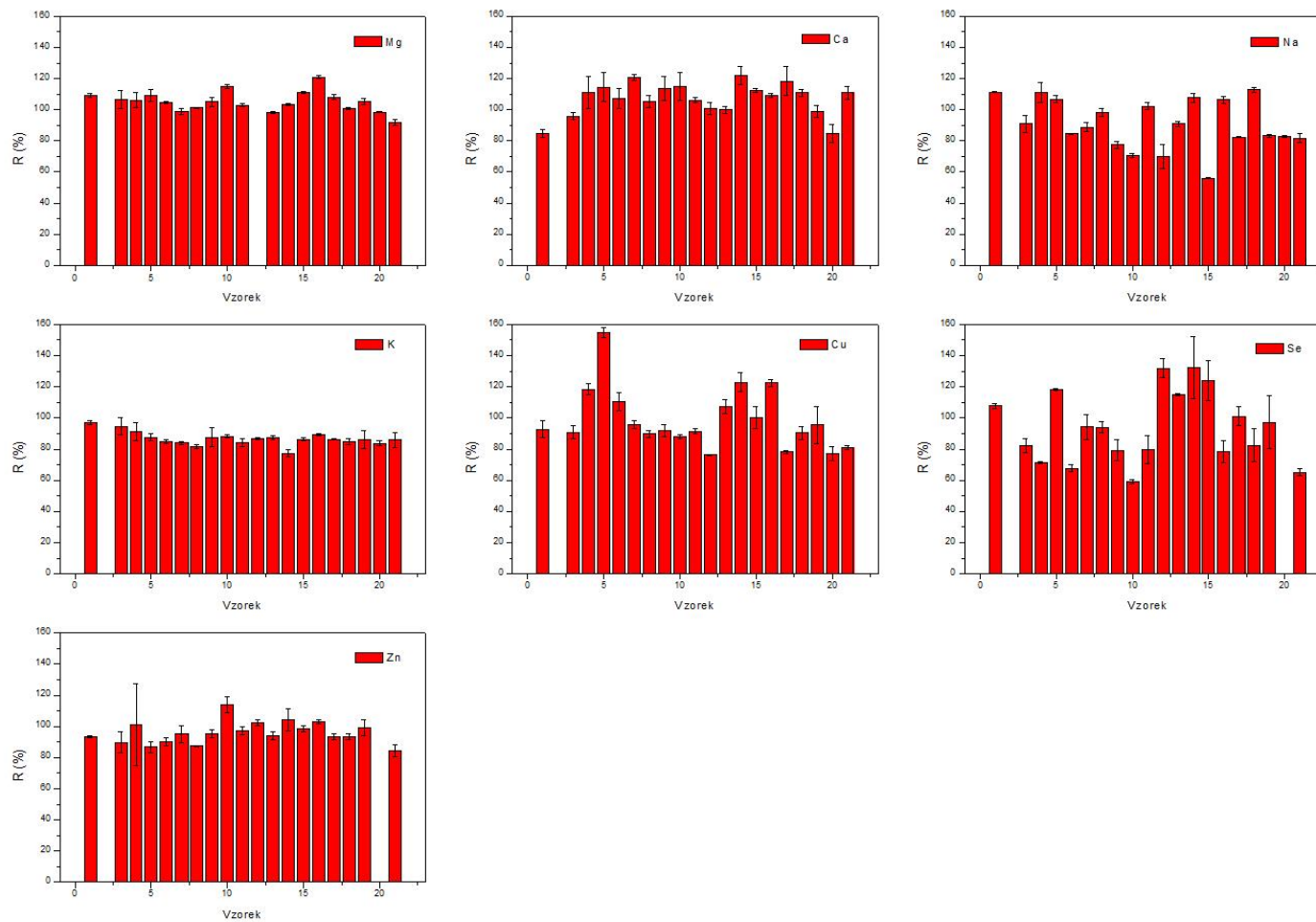
4.3.5. Porovnání výsledků s hodnotami deklarovanými výrobcem a s legislativou

V analyzovaných vzorcích sušeného kojeneckého mléka bylo celkově stanoveno 22 následujících prvků: Hg, Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd a Li. Naměřené hodnoty koncentrací vybraných prvků ve vzorcích kojenecké výživy jsou uvedeny v příloze 4 (str. 157). Získané výsledky byly porovnány s hodnotami uvedenými výrobcem a s limity danými legislativou.

Vyšší koncentrace Fe, Zn, Se, Cu, Mo a Sr oproti mediánu daného souboru koncentrací jednotlivých prvků byla nalezena ve vzorcích č. 1 a 8 určených pro nedonošené děti, novorozenci v prvních dnech života čerpají Fe, Se a Zn ze zásob nejčastěji uložených v játrech, u nedonošených dětí lze předpokládat jejich deficit. Oproti literatuře [117, 120] nebyly nalezeny u sójového kojeneckého mléka významně vyšší koncentrace prvků.

Ve vzorcích byla stanovena rovněž koncentrace některých toxikologicky významných prvků (Pb, Hg, As, Sn atd.), kdy výsledné hodnoty byly porovnány s limity danými legislativou. Koncentrace Hg se pohybovala v rozmezí 0,35–3,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (medián 1,02 $\mu\text{g kg}^{-1}$), nejvyšší koncentrace Hg byla nalezena u vzorku č. 8 (3,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$), avšak ani tato hodnota nepřekročila nejvyšší povolené množství Hg v dětské a kojenecké stravě, který činí 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [245]. Naměřené koncentrace Pb byly v rozmezí 10,2–49,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (medián 27,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$), ve vzorcích č. 9 a 12 byly nalezeny koncentrace olova (49,2 resp. 49,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$), jež se blížily limitu danými legislativou (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) [246]. Koncentrace kadmia se pohybovala 3,0–10,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (medián 8,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$), ze stanovených prvků se medián koncentrace kadmia nejvíce blížil limitu určenému legislativou (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) [247], přičemž nejvyšší koncentrace byla nalezena pro vzorek č. 2 (9,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Výsledky analýzy vybraných prvků byly rovněž porovnány s hodnotami uvedenými výrobcem (obr. 14). Nalezené koncentrace pro Ca, Zn, Mg a K byly v dobré shodě s hodnotami uvedeným výrobcem. Větší rozdíly mezi deklarovanými a nalezenými koncentracemi u Na, Cu a Se byly způsobeny nejspíše vlivem variability vstupních surovin používaných při výrobě. Zmiňované rozdíly se pohybovaly typicky do 20 %. Výjimku představoval vzorek č. 5, kde byla nalezena o 50 % vyšší hodnota Cu oproti koncentraci uvedené výrobcem a vzorek č. 15, kde byla naopak zjištěna koncentrace Na o 45 % nižší. Koncentrace vzorků č. 4, 6, 12 a 21 byly oproti hodnotám deklarovaných na obale o 30 % menší, resp. pro vzorek č. 10 nižší o 40 %, jednalo se v daném případě o stanovení Se.



Obrázek 14: Míra shody (R , %) mezi hodnotami deklarovanými výrobcí a naměřenými koncentracemi prvků. Rozšířené nejistoty výsledků byly určeny jako součin směrodatné odchylky opakovatelnosti ($n = 3$) a koeficientu rozšíření ($k = 2$), což pro normální rozdělení odpovídá pravděpodobnosti pokrytí 95%.

4.4. Analýza tkání vydry říční

Analýza vydřích tkání byla provedena ve spolupráci s neziskovou společností ALKA Wildlife, o.p.s. [226], která s pověřením Ministerstva životního prostředí koordinuje sběr a analýzy uhynulých vyder v rámci Programu péče pro vydra říční v ČR. Vydra říční je řazena mezi dravé savce stravující se hlavně rybami, vyskytuje se v Africe, Evropě a Asii. Od 50. let minulého století byl zaznamenán významný pokles evropské populace [248]. Podle Mezinárodního svazu ochrany přírody (International Union for Conservation of Nature, IUCN) patří vydra říční mezi tzv. „téměř ohrožené druhy“ (druhy, které mohou být v blízké budoucnosti ohroženy vyhynutím) [249]. V mnoha zemích je dále vydra chráněna zákony daného státu či společenství (v ČR vyhláška č. 166/2005 Sb. a 395/1992 Sb. a v rámci EU Směrnice 92/43/EEC). Vzhledem ke zvyšující se intenzitě dopravy a časté migraci vyder právě přes pozemní komunikace dochází nejčastěji k úhynu vyder po střetu s dopravními prostředky. Vydra může způsobit značné škody v rybničním hospodaření, proto není vzácností ani úmyslné usmrcení rybáři [250]. V některých zemích je vydra lovena pro svoji velmi ceněnou kožešinu (Irán) [251]. Mezi další faktory přispívající k úhynu vyder říčních patří regulace toků a smrt vlivem znečištění životního prostředí perzistentními polutanty (např. polychlorované bifenylly, DDT, dioxiny a další) a toxickými stopovými prvky [158, 165, 252-257]. Díky vysokému postavení vyder v potravním řetězci a citlivosti vyder na přítomnost kontaminantů v životním prostředí je vydra vhodná pro indikaci stavu znečištění životního prostředí v dané zemi [159, 256]. Alarmující koncentrace PBC a rtuti byly zjištěny již v 90. letech, kdy byly provedeny první analýzy vydřích tkání v ČR. Přestože použití některých kontaminantů bylo eliminováno a z prostředí postupně mizí, některé stále přetrvávají a objevují se nové (antibiotika a antikoncepční hormony), jejichž vliv není znám [258].

Vzhledem k jedinečnosti a v některých případech omezenému množství vzorku byla pozornost zaměřena především na pečlivou optimalizaci přípravy vzorku zahrnující lyofilizaci a mikrovlnnou mineralizaci. K rozkladům organické matrice byla nejčastěji použita HNO_3 společně s H_2O_2 (viz kapitola 2.5.3.). Při rozkladu bylo snahou docílit použití minimálního množství činidel nutných pro mineralizaci vzorku, díky tomu by bylo sníženo riziko kontaminace a došlo by ke zlepšení LOD. Mikrovlnné mineralizace probíhaly v systému Multi Tube, který umožňuje navýšení kapacity rozkladných nádob, tím zvyšuje průchodnost vzorků oproti konvenční mikrovlnné mineralizaci. Postup přípravy vzorků byl podrobně popsán v kapitole 3.3.4. Z dříve publikovaných porovnávacích prvků pro analýzu

biologických vzorků byly sledovány izotopy ^{89}Y , ^{103}Rh , ^{115}In , a ^{209}Bi [157, 160, 163, 168, 174, 175, 190]). Na základě měření skupiny vzorků, kde byla sledována jejich přítomnost či interference na dané hmotě, bylo vybráno Rh.

Celkově bylo ve vzorcích vydřích tkání stanovováno 32 prvků (Mg, Na, Hg, Li, Ti, V, Mn, Ni, Co, Cu, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Zr, Ru, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Cs, Hf, Ta, W, Pt, Tl, Pb, Bi, Th a U). Koncentrace matričních prvků byly získány pomocí AAS/AES, ultrastopových prvků ICP-oe-TOF-MS a rtuť byla analyzována termooxidační metodou.

4.4.1. Optimalizace podmínek lyofilizace a MWD, vliv homogenizace a velikosti navážky

4.4.1.1. Optimalizace lyofilizace

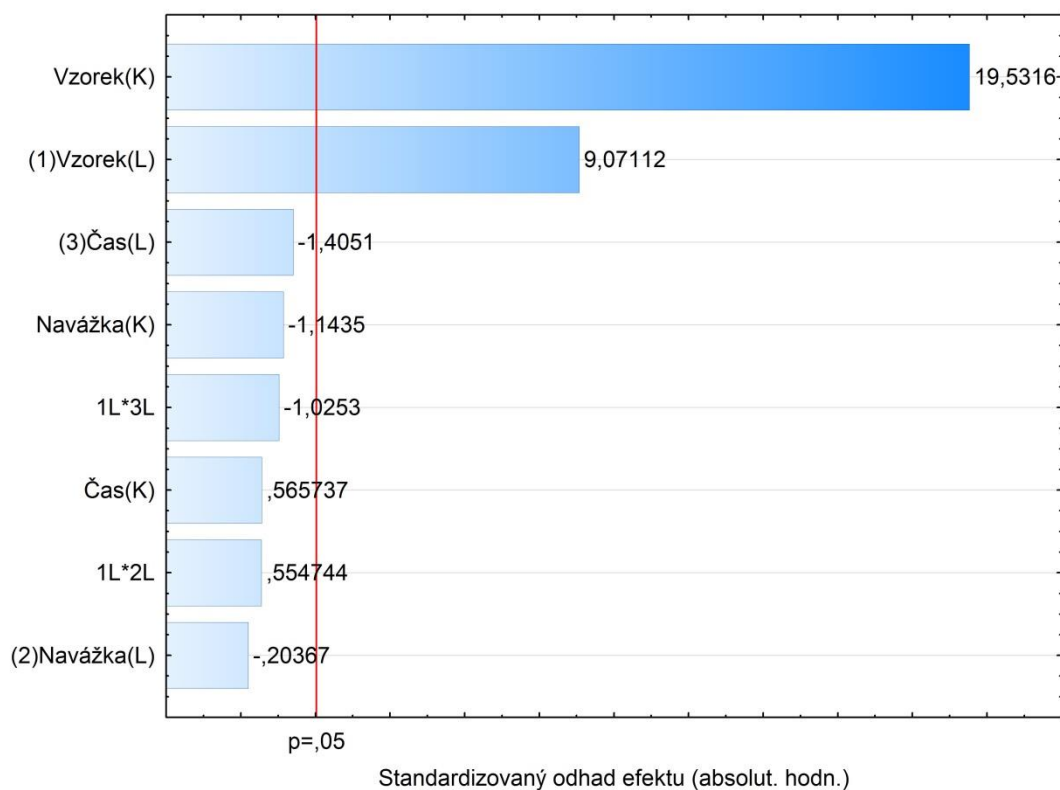
Pro získání sušiny vydřích jater, kostí a tuku byla využita lyofilizace. Podmínky lyofilizace byly nejprve zoptimalizovány prostřednictvím tříúrovňového frakcionálního faktorového plánu 3^{3-1} , kde byl sledován vliv typu vzorku (A), navážky vzorku (B) a doby lyofilizace (C) na obsah sušiny ve výsledném lyofilizátu. Pro každý faktor byly vybrány tři úrovně (tabulka 42): minimální (-1), střední (0) a maximální (+1).

Tabulka 42: Volba proměnných a jejich úrovní pro optimalizaci lyofilizace vzorku za využití frakcionálního faktorového plánu 3^{3-1}

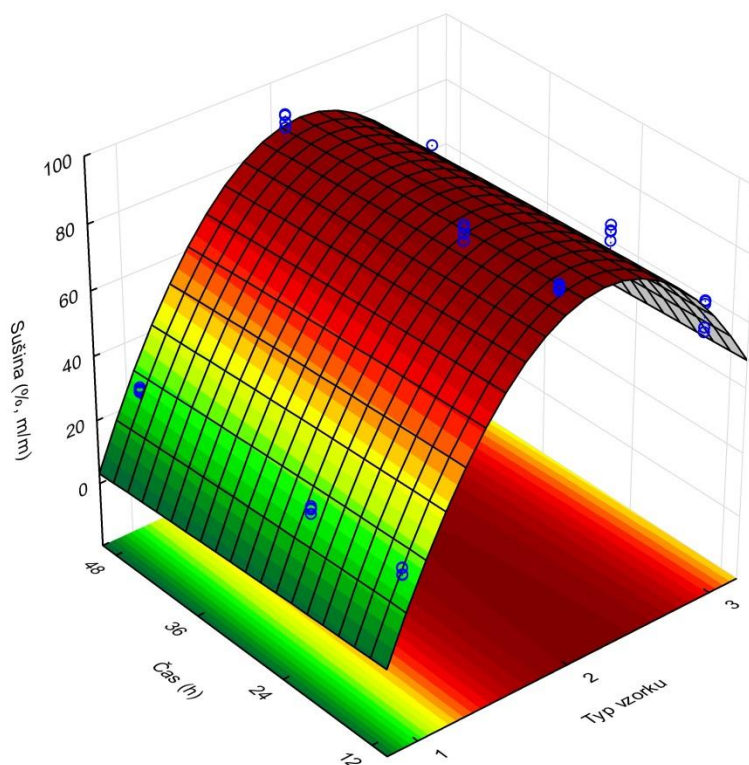
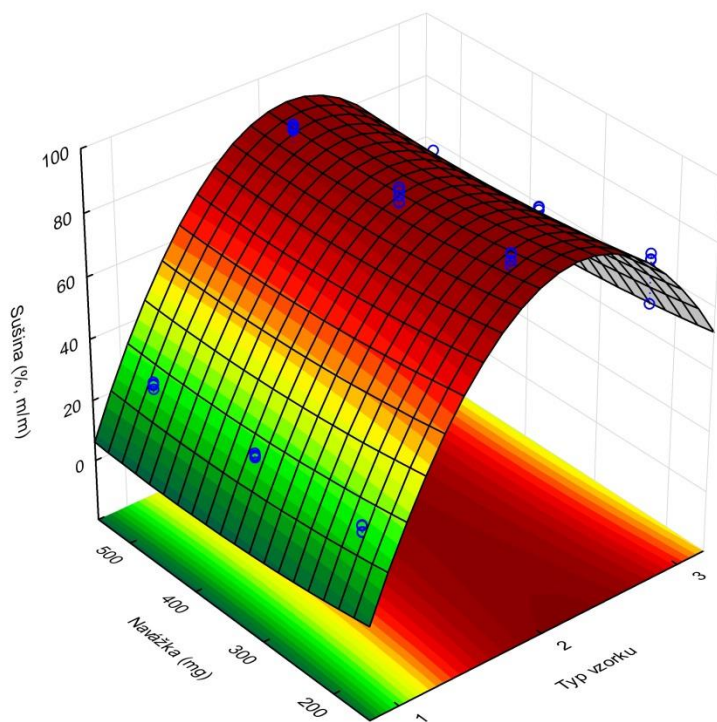
Proměnná	Označení	-1	0	+1
Typ vzorku	A	játra	tuk	žebro
Navážka vzorku (mg)	B	200	350	500
Doba lyofilizace (hodin)	C	12	24	48

Ze získaných dat (podrobný plán rozvržení experimentu s výsledky stanovení sušiny zde nejsou uvedeny) byly sestaveny Paretovy grafy standardizovaných efektů a responzní plochy v programu Statistica 12. Z Paretova grafu (obr. 15) je patrný vliv lineárního a kvadratického efektu faktoru (A), tedy typu vzorku, navážka vzorku ani doba lyofilizace nebyly v daném intervalu na hladině významnosti 0,05 shledány jako statisticky významné. Mezi faktory nebyla nalezena významná interakce. Rozdíly v obsahu sušiny jsou dány pouze

typem vzorku. Responzní plochy (obr. 16) znázorňují vliv jednotlivých faktorů a jejich úrovní na obsah sušiny (m/m, %) ve vzorku. Doba lyofilizace 12 hodin byla dostatečná k lyofilizaci pro sledované rozmezí navážky vzorku 200 – 500 mg. Optimální podmínky lyofilizace (24 hodin při 0,1 kPa, pro 500 mg vzorku) byly voleny s ohledem na zajištění robustnosti metody a dostatečné množství vzorku pro další analýzy.



Obrázek 15: Paretův graf standardizovaných efektů získaný z frakcionálního faktorového plánu 3^{3-1} pro pozorování významných faktorů a jejich interakcí, K a L označují kvadratický a lineární efekt faktoru



Obrázek 16: Povrchové grafy závislosti obsahu sušiny (% m/m) na typu vzorku (1-játro, 2-tuk, 3-žebra), návážce (mg) a době lyofilizace (hod.)

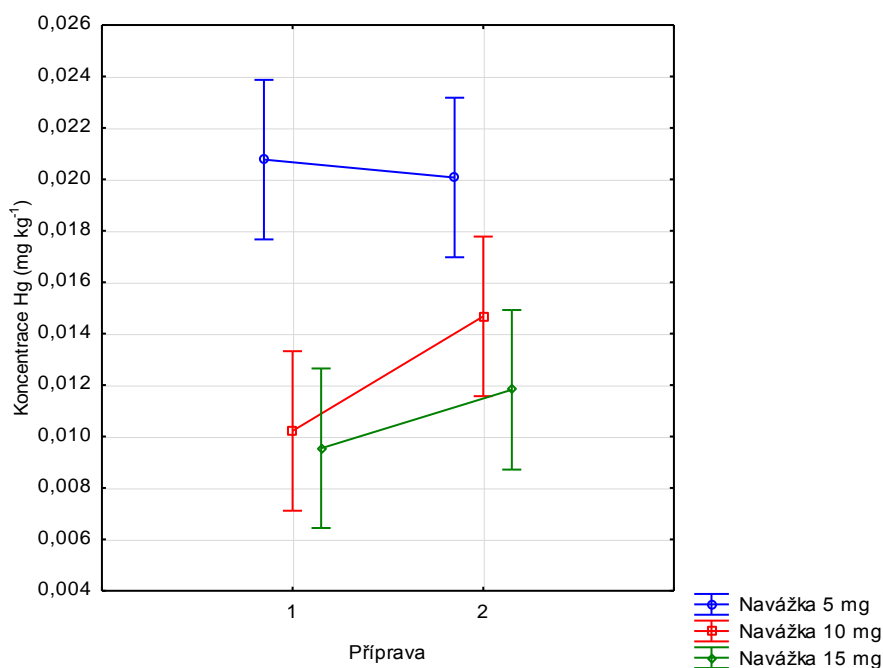
4.4.1.2. Vliv homogenizace a velikosti navážky na výsledky stanovení

Vliv homogenizace vzorku byl sledován prostřednictvím výsledků stanovení Hg. Ze stanovených prvků byla zvolena pro svoji nenáročnost a rychlost analýza rtuti na jednoúčelovém spektrometru AMA 254 (viz kapitola 3.4.4.). K optimalizaci byla použita vepřová játra zakoupená v místním supermarketu. Vzorky byly analyzovány jako mleté či nemleté, a to pro navážky vzorku 5, 10 a 15 mg. Výsledky stanovení pro jednotlivé úrovně zvolených faktorů jsou shrnuty v tabulce 43 nebo zobrazeny na obrázku 17.

Tabulka 43: Vybrané statistické charakteristiky obsahu Hg (mg kg^{-1}) ve vzorcích lyofilizovaných vepřových jater v závislosti na sledovaném faktoru a jeho úrovni

Faktor	Úroveň faktoru	Označení	Počet hodnot	Průměr	Sm. odchylka
Příprava	1	nemleto	24	0,0135	0,0065
	2	mleto	24	0,0155	0,0057
Navážka	1	5 mg	16	0,0204	0,0055
	2	10 mg	16	0,0124	0,0041
	3	15 mg	16	0,0107	0,0035

Výsledky byly podrobeny analýze pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). Způsob přípravy vzorku byl shledán na hladině významnosti 0,05 jako statisticky nevýznamný ($p = 0,26$). Oproti tomu navážka vzorku měla významný vliv na výsledky stanovení Hg ($p = 2,61 \cdot 10^{-7}$). Statisticky významný rozdíl mezi dvojicemi 1–2 ($p = 4 \times 10^{-5}$) a 1–3 ($p = 1 \times 10^{-6}$) byl diagnostikován na základě párového porovnání dvojic úrovní Scheffého metodou. Výsledky stanovení z první navážky byly odlišné od druhé a třetí, mezi výsledky pro druhou a třetí navážku již nebyl pozorován významný rozdíl ($p = 0,54$). S ohledem na výsledky statistické analýzy nebylo nutné vzorky homogenizovat a pro potřeby stanovení Hg termooxidační metodou byla volena navážka lyofilizovaných jater minimálně 10 mg.



Obrázek 17: Vliv způsobu přípravy vzorku (1.-nemleto, 2.-mleto) na naměřené průměrné koncentraci Hg ($\pm 2SD$) (mg kg^{-1})

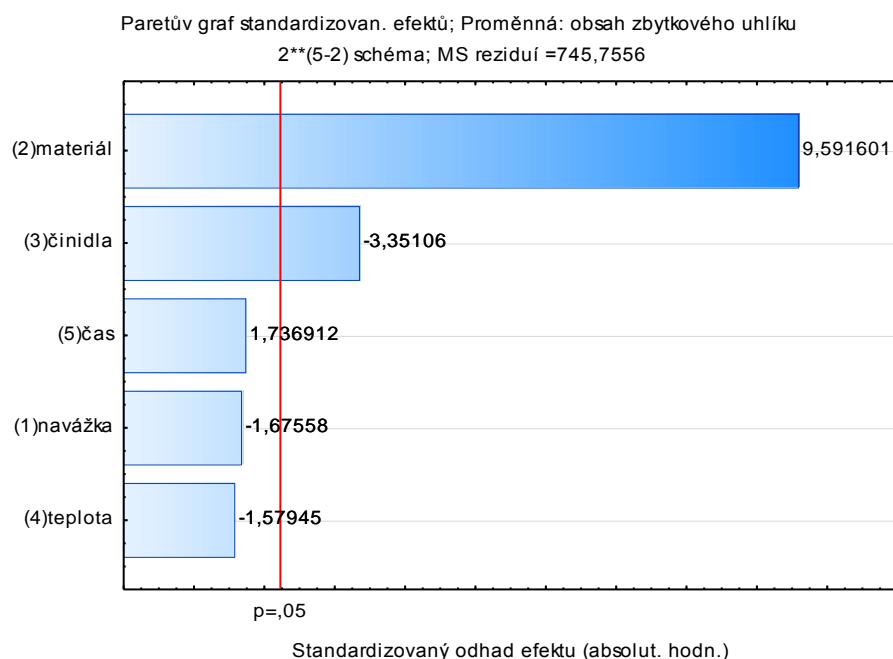
4.4.1.3. *Optimalizace mineralizace*

Prostřednictvím frakcionálního faktorového plánu byl sledován vliv vybraných faktorů (navážka vzorku, typ materiálu, činidla použitá pro mikrovlnný rozklad, teplota a čas mineralizace) na výsledky stanovení zbytkového uhlíku v získaných mineralizátech. Mineralizace lyofilizovaných vzorků probíhala v systému Multi Tube (3.4.1.), zbytkový uhlík byl měřen metodou ICP-OES (viz kapitola 3.4.5.). Byl zvolen dvouúrovňový faktorový plán o dvou opakováních 2^{5-2} , kde horní hranice (+1) faktoru navážky a teploty jsou dány parametry systému Multi Tubes, tedy 250 mg organické matrice a teplota 230 °C. Úrovně jednotlivých faktorů jsou shrnuty v tabulce 44. Výsledný plán navržený programem Statistica 12 je uveden v příloze 6 (str. 162) společně s výsledky stanovení zbytkového C v mineralizátech. Na základě těchto dat byla hodnocena účinnost mikrovlnného rozkladu.

Tabulka 44: Proměnné a jejich úrovně využité při optimalizaci MWD mineralizace za využití 2^{5-2} plánu

Proměnná	-1	1
Navážka (mg)	50	200
Materiál	Játra	Tuk
Činidla	HNO ₃ : H ₂ O ₂ (1 mL + 0,4 mL)	HNO ₃ : H ₂ O ₂ (1 mL + 1 mL)
Teplota (°C)	180	220
Doba (min)	5	20

Typ vzorku a množství použitých činidel byly identifikovány na základě Paretova grafu jako statisticky významné faktory (viz obrázek 18). Tuk má v porovnání s játry vyšší obsah uhlíku, proto oproti vzorkům jater byla mineralizace tuků méně účinná a bylo naměřeno vyšší množství zbytkového uhlíku. Záporná hodnota u parametru činidel naznačuje, že s větším množstvím rozkladných činidel byla naměřena nižší hodnota zbytkového uhlíku. Optimální podmínky byly zvoleny: 50 mg vzorku, čas a teplota mikrovlnné mineralizace 15 minut při 200 °C a rozkladná činidla 1 mL HNO₃ (65%, m/m) a 1 mL H₂O₂ (30%, m/m). Finální program mikrovlnného rozkladu je uveden v tabulce 8 v experimentální části 3.3.4.



Obrázek 18: Paretův graf standardizovaných efektů stanovení zbytkového uhlíku v mineralizátech vydřích tkání

4.4.2. Přesnost stanovení

Ze zkoumaných vydřích tkání byla pozornost dále zaměřena pouze na analýzu vydřích jater. Játra společně s ledvinami patří mezi orgány akumulující řadu toxikologicky významných prvků [158, 159]. U tkání tuků a kostí byly nalezeny nízké koncentrace většiny prvků (<LOD), vzhledem k počtu vzorků a časové náročnosti nebyla u těchto tkání prováděna kompletní analýza celého souboru vzorků. Pro potřeby analýzy pomocí ICP-*oa*-TOF-MS byla sledována většina izotopů daného prvku, vhodný izotop použitý pro kvantifikaci byl vybrán na základě jeho přirozeného zastoupení na dané hmotě či absenci polyatomických interferencí.

Přesnost stanovení vybraných prvků ve vzorcích vydřích jater byla ověřena na základě analýzy certifikovaného referenčního materiálu SRM[®] 1577c Bovine Liver. Jak je patrné z tabulky 45, byla nalezena dobrá shoda mezi deklarovanými a naměřenými koncentracemi prvků certifikovaných v referenčním materiálu. Pro prvky Ti, V, Ga, Ge, Zr, Ru, Pd, Ag, Sn, Cs, Hf, Ta, W, Re, Pt, Tl, Bi, Th a U nebyly poskytnuty výrobcem CRM deklarované hodnoty koncentrací, proto byly některé vzorky obohaceny multiprvkovým standardem. Správnost byla určena pro tyto prvky na základě vyhodnocení analytických návratností, která se pohybovala v rozmezí 85–107 % (data zde nejsou uvedena). Správné výsledky byly získány rovněž pro prvky, jako je Mn, Cu, As a Se, jejichž stanovení pomocí kvadrupólového spektrometru je problematické a vyžaduje využití CRC [168, 200] či DRC [161]. Shodnost stanovení u prvků byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka a pro jednotlivé prvky byla nižší než 8 %.

Tabulka 45: Výsledky stanovení koncentrací vybraných prvků v certifikovaném referenčním materiálu SRM[®] 1577c Bovine Liver

ICP- <i>oa</i> -TOF-MS	Koncentrace ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
⁷ Li ⁺	12 ^d	12,5 ± 0,08	104	3,57
⁵⁵ Mn ⁺	10,5 ± 0,5 ^e	10,5 ± 0,4 ^e	100	2,62
⁵⁹ Co ⁺	300 ± 18	307 ± 32,4	102	2,27
⁶³ Cu ⁺	275,2 ± 4,6 ^e	278,3 ± 9,1 ^e	101	3,27
⁷⁵ As ⁺	19,6 ± 1,6	20,1 ± 0,17	103	3,03
⁷⁸ Se ⁺	2,031 ± 0,045 ^e	2,011 ± 0,05 ^e	99	0,92
⁸⁵ Rb ⁺	35,3 ± 1,1 ^e	35,1 ± 0,8 ^e	99	1,54
⁸⁸ Sr ⁺	95,3 ± 4,2	92,5 ± 2,11	97	2,41
⁹⁸ Mo ⁺	3,3 ± 0,13 ^e	3,3 ± 0,07 ^e	101	1,6
¹¹⁴ Cd ⁺	97 ± 1,4	97,8 ± 5,4	101	2,16
¹²¹ Sb ⁺	3,13 ± 0,31	3,01 ± 0,3	96	5,28
¹³³ Cs ⁺	21,7 ± 1,4	22,1 ± 0,8	102	2,04
²⁰⁸ Pb ⁺	62,8 ± 1,0	64,5 ± 12	103	6,63
Termooxidační metoda	Koncentrace ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
Hg	5,36 ± 0,17	4,9 ± 0,42	92	7,06
FAAS/FAES	Koncentrace ^a (g kg^{-1})		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
Na	2,033 ± 0,064	1,93 ± 0,18	95	3,72
K	10,23 ± 0,64	9,72 ± 1,4	95	5,36
Mg	0,620 ± 0,042	0,612 ± 0,020	99	1,96

^a Střední hodnota ± 2 SD (n = 3).

^b Návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr naměřené hodnoty ku certifikované) × 100.

^c Relativní směrodatná odchylka (%) ze tří nezávislých stanovení.

^d Indikovaná hodnota.

^e mg kg^{-1} .

4.4.3. Detekční limity a mez stanovitelnosti

V tabulce 46 jsou uvedeny získané detekční limity (3σ) a mez stanovitelnosti (10σ) metody. Při výpočtu byla zohledněna navážka a ředění vzorku. Slepý pokus obsahoval použitá rozkladná činidla (HNO_3 a H_2O_2) a při analýze na ICP-MS porovnávací prvek Rh. V případě analýzy ICP-MS byla doba intergrace nastavena na deset vteřin a všechny vzorky, standardy a blanky byly změřeny v deseti replikách, prvky Mg a Na měřené na FAAS/FAES ve třech replikách.

Tabulka 46: Detekční limity a meze stanovitelnosti vybraných prvků pro ICP-*oa*-TOF-MS, AAS/AES a termooxidační metodu

ICP-<i>oa</i>-TOF-MS					
Analyt	LOD^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Analyt	LOD^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
⁷ Li ⁺	1,83	6,04	¹¹⁴ Cd ⁺	0,465	1,53
⁵¹ V ⁺	0,70	2,32	¹¹⁸ Sn ⁺	2,066	6,82
⁵⁵ Mn ⁺	2,49	8,22	¹²¹ Sb ⁺	0,181	0,597
⁵⁹ Co ⁺	0,43	1,42	¹³³ Cs ⁺	0,212	0,701
⁶⁵ Cu ⁺	4,65	15	¹⁷⁸ Hf ⁺	0,609	2,0
⁶⁹ Ga ⁺	1,38	4,56	¹⁸¹ Ta ⁺	0,749	2,47
⁷² Ge ⁺	5,14	17	¹⁸² W ⁺	0,597	1,97
⁷⁵ As ⁺	1,99	6,57	¹⁸⁷ Re ⁺	0,066	0,219
⁷⁸ Se ⁺	34	111	¹⁹⁵ Pt ⁺	0,160	0,529
⁸⁷ Rb ⁺	0,398	1,31	²⁰⁵ Tl ⁺	0,052	0,171
⁸⁸ Sr ⁺	0,223	0,737	²⁰⁸ Pb ⁺	0,193	0,638
⁹⁰ Zr ⁺	0,629	2,1	²⁰⁹ Bi ⁺	0,145	0,479
¹⁰¹ Ru ⁺	0,349	1,15	²³² Th ⁺	0,158	0,520
¹⁰⁴ Pd ⁺	0,439	1,45	²³⁸ U ⁺	0,015	0,049
¹⁰⁷ Ag ⁺	8,62	28			
Termooxidační metoda					
Analyt	LOD^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
Hg	0,0003	0,003	0,065	0,218	
FAAS/FAES					
Analyt	LOD^b (mg L^{-1})	LOQ^b (mg L^{-1})	LOD^a (mg kg^{-1})	LOQ^a (mg kg^{-1})	
Mg	0,0078	0,026	0,65	2,17	
Na	0,1814	0,605	15,1	50,4	

^a LOD, LOQ metody.

^b LOD, LOQ techniky.

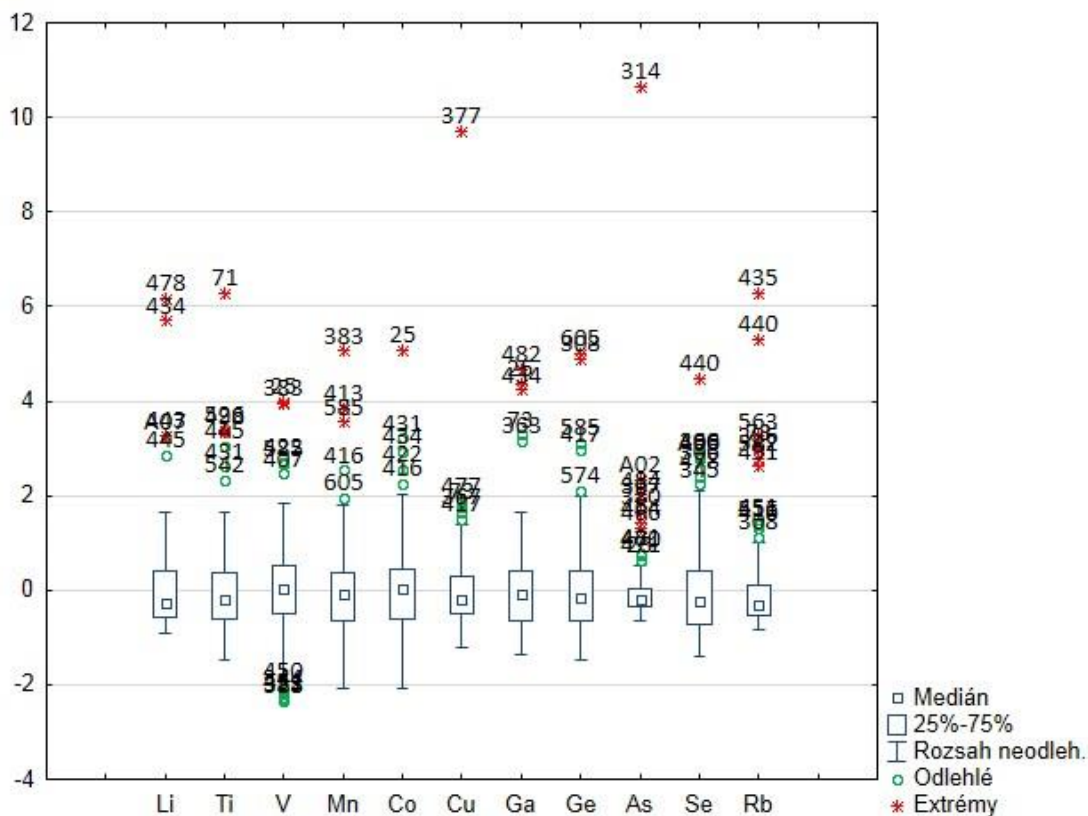
4.4.4. Aplikace pro analýzu reálných vzorků

Vypracovaný postup přípravy vzorků byl použit pro analýzu 149 tkání vydřích jater. Výsledky stanovení koncentrací zde nejsou uvedeny. Získaná data byla podrobena exploratorní a faktorové analýze.

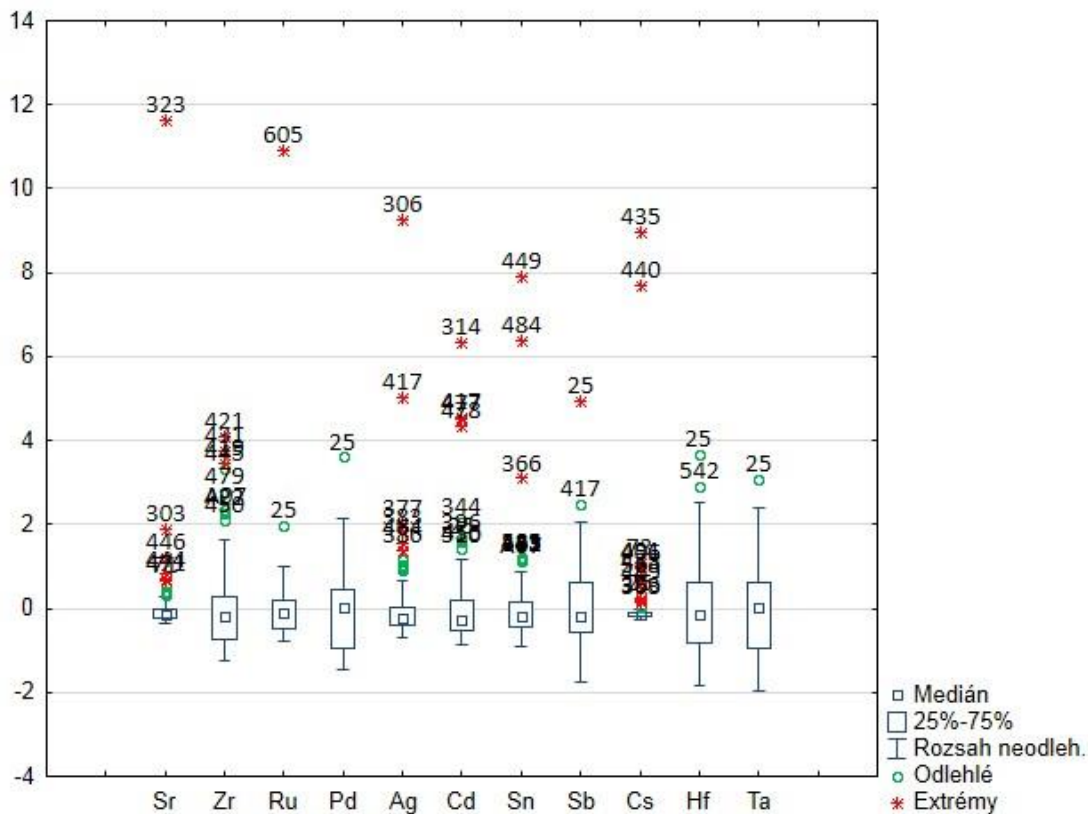
4.4.4.1. Exploratorní analýza

Data byla nejprve podrobena průzkumové analýze pro odhalení jejich zvláštností a ověření základních předpokladů. Tabulka 47 obsahuje souhrnné statistické charakteristiky

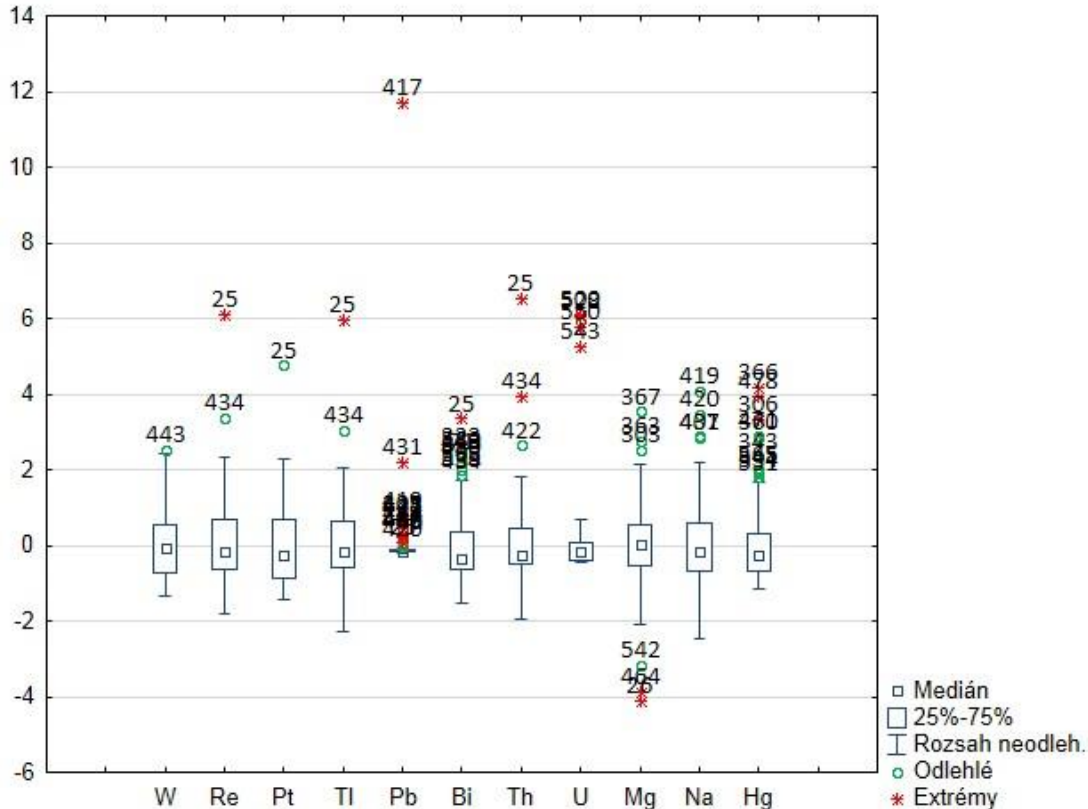
analyzovaných dat pro jednotlivé proměnné a počet odlehlých bodů nalezených v každém výběru. Z výsledků vyplynulo, že rozdělení některých ze studovaných výběrů se systematicky odlišují od rozdělení normálního, proto byla provedena exponenciální transformace dat, tím došlo k zesymetričtění rozdělení a stabilizaci výběru. Tabulky korelací a kovariancí zde nejsou uvedeny. Obrázky 19–21 představují krabicové grafy. Nejvíce extrémních hodnot koncentrací (pro prvky V, Co, Ga, Cs, Pb, Th, Bi, Tl a Re) a odlehlých bodů (pro prvky Ru, Ta, Pd, Hf a Pt) bylo nalezeno pro vzorek č. 25, kde se jednalo o vydřího samce nalezeného poblíž Kamenického Šenova (Liberecký kraj). Extrémní hodnoty koncentrací pro prvky Cs a Rb byly identifikovány u vzorků č. 435 a 440, v případě vzorku č. 440 ještě pro Se. Porovnání mediánů skupiny, identifikace dalších odlehlých bodů a jejich srovnání s literaturou či dostupnými limity bude diskutováno v kapitole 4.3.5.



Obrázek 19: Krabicový graf koncentrací prvků Li, Ti, V, Mn, Co, Cu, Ga, Ge, As, Se a Rb pro naměřená data po standardizaci



Obrázek 20: Krabicový graf koncentrací prvků Sr, Zr, Ru, Pd, Ag, Sn, Sb, Cs, Hf a Ta pro naměřená data po standardizaci



Obrázek 21: Krabicový graf koncentrací prvků W, Re, Tl, Pb, Bi, Th, U, Mg, Na a Hg pro naměřená data po standardizaci

Tabulka 47: Statistické charakteristiky stanovení obsahu Mg a Na (mg kg⁻¹), Li, Ti, V, Mn, Co, Cu, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Zr, Ru, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Cs, Hf, Ta, W, Re, Pt, Tl, Pb, Bi, Th, U a Hg (μg kg⁻¹) ve vzorcích vydřích jater (n = 149)

Analyt	Průměr	Spodní mez	Horní mez	Průměr ^a	Spodní IS ^a	Horní IS ^a	Rozptyl	Sm. Odch.	Šikmost	Špičatost	p^b	Medián	IS spodní	IS horní	OB
Li	0,0439	0,0364	0,0515	0,0306	0,0271	0,0345	0,0022	0,0465	3,47	19,2	4,94.10⁻⁸	0,0316	0,0258	0,0375	5
Ti	1,5	1,45	1,56	1,43	1,39	1,47	0,119	0,345	2,53	13,9	1,26.10⁻⁶	1,44	1,39	1,48	5
V	0,143	0,133	0,153	0,14	0,130	0,150	0,0037	0,0609	0,664	6,10	0,02061	0,144	0,135	0,153	2
Mn	9,3	8,7	10,0	8,76	8,17	9,38	18,2	4,3	1,60	8,40	7,59.10⁻⁵	9,02	8,26	9,78	3
Co	0,155	0,145	0,165	0,148	0,139	0,157	0,0038	0,0617	1,20	7,40	6,64.10⁻⁴	0,155	0,141	0,170	3
Cu	34,2	29,8	38,5	29,0	26,7	31,5	721	26,8	6,33	61	3,75.10⁻¹¹	28,8	26,2	31,3	1
Ga	0,112	0,104	0,121	0,101	0,095	0,109	0,0029	0,0538	2,07	9,87	8,38.10⁻⁶	0,107	0,0989	0,115	5
Ge	0,210	0,189	0,231	0,183	0,168	0,200	0,0169	0,130	2,09	10,2	7,61.10⁻⁶	0,191	0,1798	0,203	4
As	0,103	0,0798	0,126	0,074	0,0682	0,0814	0,0207	0,144	8,45	88	7,59.10⁻¹³	0,0726	0,0632	0,0820	7
Se	3,11	2,8	3,41	2,62	2,4	2,86	3,63	1,91	1,46	5,63	1,57.10⁻⁴	2,69	2,40	2,98	1
Rb	14,3	12,0	16,7	9,87	9,0	10,9	217	14,7	3,55	18,7	3,86.10⁻⁸	9,8	8,18	11,4	7
Sr	0,602	0,386	0,819	0,383	0,357	0,411	1,79	1,34	10,7	124	2,48.10⁻¹⁴	0,387	0,359	0,414	7
Zr	0,202	0,181	0,223	0,170	0,155	0,186	0,0167	0,129	1,67	6,52	5,24.10⁻⁵	0,176	0,153	0,200	5
Ru	0,0415	0,0328	0,0501	0,0314	0,0282	0,0349	0,0029	0,0535	8,85	97	3,97.10⁻¹³	0,0360	0,0296	0,0424	2
Pd	0,0915	0,0842	0,0988	0,0854	0,0787	0,0924	0,0020	0,0451	0,578	3,05	0,0381	0,0918	0,0868	0,0968	1
Ag	1,67	1,27	2,08	1,09	0,96	1,23	6,15	2,48	6,37	54,4	3,5.10⁻¹¹	1,15	0,919	1,38	9
Cd	0,216	0,175	0,256	0,142	0,127	0,160	0,0632	0,251	3,67	19,5	2,72.10⁻⁸	0,143	0,122	0,165	5
Sn	0,165	0,138	0,192	0,129	0,117	0,143	0,0280	0,168	5,32	38,7	3,46.10⁻¹⁰	0,131	0,121	0,141	3
Sb	0,0591	0,0538	0,0645	0,056	0,0507	0,0609	0,0011	0,0330	0,866	5,81	0,00513	0,0529	0,0451	0,0607	1
Cs	0,378	0,1733	0,583	0,168	0,153	0,184	1,60	1,27	7,97	67,5	1,73.10⁻¹²	0,172	0,151	0,193	11

^a Odhad parametru získaný po exponenciální transformaci dat.

^b Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0,05; rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05, data nevykazují normální rozložení. IS interval spolehlivosti; OB odlehlý bod.

Tabulka 47: Pokračování

Analyt	Průměr	Spodní mez	Horní mez	Průměr ^a	Spodní IS ^a	Horní IS ^a	Rozptyl	Sm. Odch.	Šikmost	Špičatost	p^b	Medián	IS spodní	IS horní	OB
Hf	0,151	0,140	0,163	0,140	0,1295	0,151	0,0051	0,0717	0,793	3,61	0,00839	0,142	0,133	0,150	0
Ta	0,164	0,151	0,177	0,160	0,147	0,173	0,0066	0,0813	0,250	2,82	0,395	0,167	0,157	0,177	0
W	0,117	0,160	0,128	0,108	0,0976	0,118	0,0045	0,0669	0,439	2,34	0,105	0,112	0,0999	0,123	0
Re	0,130	0,121	0,140	0,122	0,114	0,131	0,0035	0,0591	1,82	11,5	2,63.10⁻⁵	0,120	0,115	0,126	1
Pt	0,0925	0,0845	0,101	0,082	0,0756	0,0898	0,0025	0,0499	0,927	4,86	0,00345	0,0807	0,0651	0,0963	1
Tl	0,158	0,147	0,169	0,152	0,142	0,163	0,0046	0,0678	1,36	10,8	2,7.10⁻⁴	0,145	0,130	0,161	1
Pb	0,828	0,245	1,41	0,282	0,261	0,306	13,0	3,6	11,0	128	1,75.10⁻¹⁴	0,271	0,243	0,299	20
Bi	0,189	0,172	0,206	0,168	0,153	0,183	0,0114	0,107	0,844	3,22	0,00593	0,150	0,115	0,185	1
Th	0,146	0,137	0,155	0,138	0,131	0,146	0,0031	0,0557	2,34	15,1	2,72.10⁻⁶	0,131	0,121	0,140	3
U	0,0071	0,0048	0,0095	0,0036	0,0032	0,0042	0,00021	0,0145	5,30	31,3	3,62.10⁻¹⁰	0,0048	0,0034	0,0062	4
Mg	0,709	0,688	0,73	0,712	0,692	0,733	0,0164	0,128	-0,434	6,93	0,112	0,710	0,693	0,727	5
Na	4,5	4,4	4,7	4,4	4,27	4,5	0,765	0,875	1,03	5,27	0,001856	4,35	4,17	4,535	2
Hg	4,1	3,6	4,7	3,13	2,76	3,55	12,5	3,53	1,72	6,52	4,09.10⁻⁵	3,25	2,66	3,84	5

^a Odhad parametru získaný po exponenciální transformaci dat.

^b Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0,05; rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05, data nevykazují normální rozložení. IS interval spolehlivosti; OB odlehlý bod.

4.4.4.2. Faktorová analýza

K posouzení vnitřních souvislostí a vztahů v datech byla použita faktorová analýza. K tomuto účelu jsou ve faktorové analýze vytvořeny nové (latentní) proměnné, podmínkou použití této metody je stejně jako u analýzy hlavních komponent korelace mezi jednotlivými proměnnými.

Vlastní čísla matice $L L^T$, která jsou užívána jako rozlišovací kritérium při výběru počtu faktorů, jsou shrnuta v tabulce 48. Numerické hodnoty byly určeny programem Statistica 12. Hodnoty uvedené v tabulce 48 byly dosaženy pro analýzu dat po standardizaci a s užitím 10 proměnných, které byly na základě předběžných analýz faktorovou analýzou určeny jako nejvýznamnější z hlediska objasnění variability v datech. První sloupec, tzv. individuální procento, přináší procento celkové proměnlivosti v proměnných vystižené tímto faktorem a druhý sloupec pak kumulativní procento. Z informací uvedených v tabulce 48 je zřejmé, že dva faktory objasňují téměř 80 % variability v datech.

Tabulka 48: Vlastní čísla matice a související statistiky po rotaci Varimax vypočtená programem Statistica 12

Index	Vlastní číslo	Individuální %	Kumulativní %
1	5,569855	55,69855	55,69855
2	2,421912	24,21912	79,91767

Hodnoty faktorových vah pro jednotlivé faktory vyjadřující korelační strukturu jednotlivých původních proměnných s dotyčnými faktory jsou uvedeny v tabulce 49. Z tabulky je zřejmé, že Faktor 1 byl nejvíce ovlivněn proměnnými Co, Sb, Re, Pt, Tl a Th. Faktor 2 pak nejvíce proměnnými Pd, Hf, Ta a W. Uvedené závislosti rovněž dokumentuje graf faktorových vah na obrázku 22.

Tabulka 49: Faktorové váhy po rotaci Varimax

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
Co	0,779874	0,001731
Sb	0,803152	0,149128
Re	0,955222	0,107711
Pt	0,708268	0,517072
Tl	0,846894	0,320689
Th	0,919555	0,128361
Pd	0,297954	0,878214
Hf	0,137042	0,876381
Ta	0,111099	0,878957
W	0,076753	0,950485
Výkl.roz	4,355950	3,635817
Prp. celk.	0,435595	0,363582

Tabulka 50: Příspěvky daného faktoru do komunalit po rotaci Varimax

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2
Co	0,608203	0,608206
Sb	0,645054	0,667293
Re	0,912448	0,924050
Pt	0,501643	0,769006
Tl	0,717229	0,820071
Th	0,845582	0,862058
Pd	0,088777	0,860037
Hf	0,018781	0,786824
Ta	0,012343	0,784908
W	0,005891	0,909313

V tabulce 50 jsou uvedeny hodnoty komunalit, které ukazují, jak dobře je daná proměnná predikována vybranými faktory. Faktorová skóre jsou hodnoty faktorů pro jednotlivé řádky dat.

Hlavní strukturu nalezenou v datech znázorňuje rozptylový diagram faktorového skóre (obr. 23). Z obrázku je patrných několik shluků. U každého kadáveru byly shromažďovány společností ALKA Wildlife o.p.s. informace o stáří, stavu jedince, příčině a místě smrti, byla prováděna pitva, rozbor žaludku, parazitologická analýza atd. V době dokončování této práce nebyly s výjimkou místa nálezů kadáveru prozatím tyto informace o vydřích jedincích kompletní, nelze zatím v datech jednoznačně identifikovat či vyloučit souvislost mezi jedinci v rámci jednoho shluku. Mezi místem nálezů kadáveru a zobrazenými shluky nebyla nalezena souvislost.

4.4.5. Porovnání naměřených výsledků s dostupnou literaturou

Naměřená data byla porovnána s publikovanými výsledky analýzy vydřích tkání v předešlých letech v ČR a v dalších zemích. Ve vzorcích vydřích jater byla zjištěna koncentrace Hg v rozmezí 0,095–18,9 mg kg⁻¹ (medián skupiny 3,25 mg kg⁻¹), tyto výsledky jsou porovnatelné s hodnotami získanými v sousedním Polsku, kde byla měřena koncentrace Hg ve svalech savců (vydra, norek a mýval) 0,013–15,9 mg kg⁻¹ v sušině vzorku [164]. Pro ostatní země jsou uvedeny příklady v tabulce 51. Hodnoty Hg dříve publikované pro ČR [165] z období 1989–1994 jsou uvedeny pouze orientačně, tyto koncentrace Hg byly vyhodnoceny pro malý soubor vzorků (n = 5), přičemž v jednom případě byla naměřená koncentrace Hg v původním vzorku 55,6 mg kg⁻¹. Koncentrace Hg 30 mg kg⁻¹ je v literatuře uvedena pro vydru jako kritická [259], při vyšších hodnotách dochází u vyder ke špatné koordinaci pohybů až smrti. Nejvyšší koncentrace Hg byla nalezena ve vzorku vydry č. 366 (18,9 mg kg⁻¹), dále pak ve vzorku č. 478 (18 mg kg⁻¹), ani tyto koncentrace tedy nepřekračovaly kritickou hodnotu. Maximální koncentrace pro Cd 1,8 mg kg⁻¹ a As 1,6 mg kg⁻¹ byla naměřena pro vzorek č. 314, pro Cu 295 mg kg⁻¹ (vzorek č. 377), Mn 30,9 mg kg⁻¹ (vzorek č. 383) a Sr 16,2 mg kg⁻¹ (vzorek č. 435). Oproti mediánu skupiny byly tyto hodnoty o řád vyšší, v případě As, Cu a Sr se jednalo o ojedinělé případy a prozatím nebyla nalezena souvislost s místem nálezu kadáveru.

Ve třech vzorcích vyder (č. 421, 419 a 431), kdy byla příčinou smrti kondice jedince, byla zároveň zjištěna vyšší koncentrace Pb, to by naznačovalo, že příčinou smrti byla otrava olovem (zahrnující hladovění, problémy s trávením, kolika střev atd.) [226]. Nejvyšší koncentrace 43 mg kg⁻¹ byla zjištěna pro vydru č. 417, přičemž pro savce je v závislosti na druhu, vnějších faktorech a dalších, uváděna jako kritická hodnota 10 mg kg⁻¹. V tomto případě se jednalo o mládě, které resorbují olovo několikanásobně více než dospělí. Možnými zdroji olova jsou olovené broky používané na vodní ptactvo či olůvka používaná rybáři.

Tabulka 51: Porovnání námi naměřených koncentrací prvků (druhý sloupec) s hodnotami publikovanými v jednotlivých zemích v játrech vydry říční v Evropě a v Jižní Koreji

Lokace	ČR	Centrální Francie	Finsko	Jižní Finsko ^{b, f}	Jižní Korea	Velká Británie	Irsko	Německo	Maďarsko	FR	Rakousko	Maďarsko	ČR
Období nálezů / Rok publikace	2006–2015	2004–2008	1986–2000	1972–1995	2006–2012	2001	2001	2001	2009	1987–1995	1989–1994	1989–1994	1989–1994
Lit.	^{a, c}	[260] ^{a, c, e}	[261] ^{a, d}	[262] ^{a, d}	[158] ^{b, c}	[263] ^{b, c}	[263] ^{b, c}	[263] ^{b, c}	[259] ^{a, c}	[264] ^{b, c}	[165] ^{a, c}	[165] ^{a, c}	[165] ^{a, c}
Hg	4,12	2,1 ^d	5,5	5,7	2,26				3,85	4,71	1,01 ^d	0,65 ^d	14,4 ^d
Pb	0,828	1,0			0,289				0,213	0,42	0,37	0,83	0,39
Cd	0,216	0,3	0,6	0,08	0,34 ^f				0,15	0,17	0,36	0,31	1,51
Cu	34	57,1	35,8	14	27,1	28,27	23,77	21,1	23,84	26	38,7	17,1	23,1
As	0,103	0,1			0,150					0,055			
Mn	9,3			3,2	9,18	7,37	4,91	3,53					
Co	0,154					0,031	0,015	0,018					

^a Střední hodnota ^b geometrický průměr, ^c v sušině (m/m, %), ^d v původním vzorku, ^e hodnoty uvedeny pro dospělé samce, ^f koncentrace naměřené pro ledviny.

4.5. Analýza krmiv pro domácí zvířata

Suchá krmiva pro domácí zvířata zahrnují jak granule, tak pochutiny. Granule představují pro řadu domácích mazlíčků majoritní zdroj veškerých živin. Vysoký podíl organické složky a minerálů, které jsou do granulí přidávány, vytváří komplexní matici, kde lze očekávat při analýze ICP-MS i ICP-OES tvorbu jak spektrálních, tak nespektrálních interferencí. Mikrovlnný rozklad je důležitým aspektem při eliminaci interferencí, díky němu dojde ke zjednodušení matrice a mohou být potlačeny některé interference uhlíkových asociátů nebo chloridových iontů. Chloridové ionty mohou být částečně převedeny na HCl a organická matrice na CO₂. Kyseliny chlorovodíková, jak je patrné z přílohy 1 (str. 153), je oproti ostatním chloridům (CaCl, KCl, NaCl atd.) mnohem méně interferující. Neúplný rozklad tuků a proteinů může nastat díky relativně malému oxidačnímu potenciálu HNO₃ při teplotě 200 °C [265], proto pro rozklady krmiv byla použita směs HNO₃ a H₂O₂.

Mineralizace vzorků krmiv byla nejprve prováděna s již optimalizovaným postupem použitým pro rozklady potravin [266], kde byla využita směs 65% HNO₃ a 30% H₂O₂. Následně byly s ohledem na navážku vzorku (400 ± 10 mg) optimalizovány parametry, jako je objem a koncentrace kyseliny dusičné a koncentrace peroxidu vodíku, počet rozkladných kroků, doby nárůstu a držení teploty či výkon generátoru. Oproti dříve aplikovanému programu byl vytvořen jednokrokový teplotní program (220 °C po dobu 25 minut), koncentrace kyseliny dusičné 30 % a koncentrace peroxidu vodíku 5 % byla společně s teplotou 220 °C dostatečná pro mineralizaci vzorků. Doba rozkladu tak byla snížena přibližně o polovinu a zároveň byla snížena acidita výsledného roztoku, což je vhodnější pro instrumentaci s indukčně vázanou plazmou [140]. V kapitole 3.3.5. je shrnut výsledný optimalizovaný postup přípravy vzorků. Ve výsledném čirém mineralizátu bylo analyzováno 35 prvků. Prvky Mg, Na, K, P, Ca, Fe, Mn, Ba, Cu, Al a Zn byly stanoveny na ICP-OES spektrometru (viz kapitola 3.4.5.), rtuť termooxidační metodou přímo ve vzorcích krmiv bez předchozí úpravy (viz kapitola 3.4.4) a zbylé prvky (Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U) pomocí ICP-oa-TOF-MS.

4.5.1. Optimalizace lyofilizace, parametrů ICP-OES a ICP-MS

4.5.1.1. Optimalizace lyofilizace

Odstranění vody ze vzorku bylo provedeno pomocí lyofilizace (viz kapitola 3.3.5.). Doba lyofilizace vzorku byla optimalizována na základě rozdílů v sušině vzorku (m/m, %). Byly zvoleny tři doby lyofilizace 12, 24 a 48 hodin (výsledky stanovení sušiny zde nejsou uvedeny). Porovnáním pomocí Studentova *t*-testu nebyly nalezeny na hladině významnosti 0,05 významné rozdíly mezi dobou lyofilizace 12 a 48 hodin ($p = 0,067$). Z důvodu zajištění dostatečné robustnosti pak byla zvolena doba lyofilizace 24 hodin. Podíl vody v původních vzorcích nebyl vyšší než 5 %.

4.5.1.2. Optimalizace parametrů ICP-OES

Prvky byly nejprve pro vzorky hovězích, drůbežích, skopových a rybích granulí analyzovány vždy na dvouvlňových délkách za účelem odhalení možných spektrálních interferencí. Zvolené vlnové délky byly uvedeny v kapitole 3.4.5. V případě draslíku byla vybrána pouze vlnová délka 769,896 nm, protože ostatní vlnové délky nedosahovaly dostatečné citlivosti. Na základě párového *t*-testu (hladina významnosti 0,05) bylo zjištěno, že rozdíly mezi koncentracemi daného prvku měřené na dvouvlňových délkách byly nevýznamné ($p = 0,172$), to společně s výsledky analýzy CRM dokládá nepřítomnost spektrálních interferencí. Celková doba analýzy jednoho vzorku pomocí sekvenčního ICP-OES spektrometru trvala přibližně 30 minut pro dvě vlnové délky a 11 stanovených prvků. Proto byla pro další analýzy volena vždy jedna vlnová délka, která byla vybrána s ohledem na její citlivost, tím byla doba analýzy zkrácena na polovinu. Ke zjištění možného vlivu nespektrálních interferencí byly na zvolených vlnových délkách porovnány směrnice vodné kalibrace se směnicemi standardního přídatku a kalibrace s maticí (viz tabulka 52). Mezi diferencemi nebyly nalezeny významné rozdíly a pro analýzu ICP-OES bylo použito vodné kalibrace bez porovnávacího prvku.

Tabulka 52: Porovnání směrnic vodné kalibrace (VK) se směrnicemi získanými metodou přidavku standardu (SP) a kalibrací s maticí (KM) pro vybrané prvky při analýze ICP-OES

Analyt	λ (nm)	Směrnice VK	Δ KM/VK ^b	Δ SP/VK ^b
Al	308,215	10948	1,80	5,77
Zn	213,856	114762	5,55	0,96
Ba	455,403	1976790	5,93	-0,68
Mn	257,61	483190	3,74	-1,60
K	769,896	891	5,23	-3,90
Fe	259,94	389492	0,79	-2,00
Mg	279,553	121719	2,88	3,94
Cu	324,754	107275	1,80	-4,47
Na ^a	588,995	73800	3,33	-3,15
P ^a	213,618	5129	3,57	-4,17
Ca ^a	422,673	72585	-0,45	-2,82

^a Pro vzorky 100x naředěné.

^b Diference směrnic.

4.5.1.3. Optimalizace parametrů ICP-MS

Nastavení základních parametrů ICP-MS (kapitola 3.4.2.) bylo optimalizováno dříve [266]. Pozornost byla zaměřena na nastavení brány „SmartGate“. Nejprve bylo proměřeno hmotnostní spektrum neředěného roztoku vzorku v rozsahu 6–238 m/z. Signály, kde byla odezva větší než 10^7 countů (doba akvizice 1 s), odpovídaly prvkům Fe, Cu, Zn a Sr. Tyto analyty byly tedy z důvodu ochrany detektoru odstraněny (viz tabulka 18A, kapitola 3.4.2) a s tímto nastavením byly měřeny prvky Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U v neředěném mineralizovaném roztoku vzorku. Stejným postupem byla nastavena brána „SmartGate“ (viz tabulka 18B, kapitola 3.4.2.) pro roztoky vzorků, které byly naředěny 10x. Zde byly ze spektra odstraněny Fe a Zn a byly opět měřeny prvky Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U a navíc Rb a Sr.

4.5.2. Přesnost stanovení

Referenční materiál SRM[®] 3290 Dry Cat Food (National Institute of Standards & Technology, USA), který je v současné době jediným komerčně dostupným, nebyl vzhledem k vysoké ceně pro potřeby naší laboratoře dostupný. Navíc zde bylo certifikováno

pouze 10 analytů z námi analyzovaných 35. Za účelem potvrzení správnosti navrženého postupu byl analyzován referenční materiál SRM[®] 1577c Bovine Liver. Z tabulky 53 je patrné, že pro prvky certifikované v referenčním materiálu byla nalezena dobrá shoda mezi deklarovanými a naměřenými hodnotami. Vzorky byly dále obohaceny multiprvkovým standardem jak pro analýzu ICP-MS, tak ICP-OES. Správnost byla určena pro všechny prvky na základě vyhodnocení analytických návratností, kde se pohybovala v rozmezí 86–115 % (data zde nejsou uvedena). Shodnost metody vyjádřená jako RSD tří nezávislých analýz vzorků během jednoho dne byla lepší než 10 %.

Tabulka 53: Výsledky stanovení koncentrací vybraných prvků v certifikovaném referenčním materiálu SRM[®] 1577c Bovine Liver

ICP- <i>oa</i> -TOF-MS	Koncentrace ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
⁷ Li ⁺	12 ^d	12,8 ± 0,5	104	2,03
⁵² Cr ⁺	53 ± 14	55,4 ± 0,8	105	0,73
⁵⁸ Ni ⁺	44,5 ± 9,2	45,8 ± 10,2	103	11
⁵⁹ Co ⁺	0,300 ± 0,018 ^e	0,296 ± 0,006 ^e	99	1
⁷⁵ As ⁺	19,6 ± 1,6	20,0 ± 2,4	102	6
⁷⁸ Se ⁺	2,031 ± 0,045 ^e	1,994 ± 0,068 ^e	98	2,76
⁸⁵ Rb ⁺	35,3 ± 1,1 ^e	33,8 ± 0,7 ^e	96	1,1
⁸⁸ Sr ⁺	95,3 ± 4,2	99,3 ± 3,2	104	1,63
⁹⁸ Mo ⁺	3,3 ± 0,13 ^e	3,3 ± 0,16 ^e	100	2,45
¹²¹ Sb ⁺	3,13 ± 0,31	3,304 ± 0,28	106	4,31
¹³³ Cs ⁺	21,7 ± 1,4	20,4 ± 0,88	94	2,15
Termooxidační metoda	Koncentrace ^a ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
Hg	5,36 ± 0,17	4,9 ± 0,42	92	7,06
ICP-OES	Koncentrace ^a (g kg^{-1})		R ^b (%)	RSD ^c (%)
	Deklarováno	Nalezeno		
Na	0,2033 ± 0,0064 ^f	0,2024 ± 0,0029 ^f	100	1,5
P	1,175 ± 0,027 ^f	1,175 ± 0,0085 ^f	100	1
Ca	131 ± 10	126 ± 12	96	5,3
K	1,023 ± 0,064 ^f	1,026 ± 0,076 ^f	100	3,7
Mg	620 ± 42	626 ± 12	101	1
Fe	198 ± 0,65	198 ± 1	100	0,3
Mn	10,46 ± 0,47	10,9 ± 0,13	104	1,3
Zn	181,1 ± 1	180 ± 5,6	99	1,55
Cu	275,2 ± 4,6	276,6 ± 4,43	101	1
Na	0,2033 ± 0,0064 ^f	0,2024 ± 0,0029 ^f	100	1,5
P	1,175 ± 0,027 ^f	1,175 ± 0,0085 ^f	100	1

^a Střední hodnota ± 2 SD (n = 3).

^b Návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr naměřené hodnoty ku certifikované) × 100.

^c Relativní směrodatná odchylka (%) ze tří nezávislých stanovení.

^d Indikovaná hodnota, ^e mg kg⁻¹, ^f %.

4.5.3. Detekční limity a mez stanovitelnosti

Detekční limit (3σ) a mez stanovitelnosti (10σ) jsou zobrazeny v tabulce 54. V případě analýzy ICP-MS doba akvizice byla 5 vteřin a standardy a blanky byly analyzovány v deseti replikách, na ICP-OES pak ve třech replikách. Bylo dosaženo dostatečných detekčních limitů ke stanovení analytů v reálných vzorcích.

Tabulka 54: Detekční limity a mez stanovitelnosti techniky a metody

ICP-oa-TOF-MS					
Analyt	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Analyt	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
⁷ Li ⁺	1,3	4,2	¹³³ Cs ⁺	0,025	0,0825
⁵¹ V ⁺	2,5	8,3	¹⁴⁰ Ce ⁺	0,044	0,145
⁵² Cr ⁺	8,2	27	¹⁴¹ Pr ⁺	0,0156	0,0515
⁵⁸ Ni ⁺	1,7	5,61	¹⁴⁶ Nd ⁺	0,012	0,041
⁵⁹ Co ⁺	0,142	0,469	¹⁵¹ Eu ⁺	0,007	0,0231
⁷⁵ As ⁺	2,7	9,03	¹⁵⁷ Gd ⁺	0,006	0,0198
⁷⁸ Se ⁺	0,514	1,69	¹⁶¹ Dy ⁺	0,04	0,132
⁸⁵ Rb ⁺	0,428	1,41	¹⁶⁵ Ho ⁺	0,023	0,0759
⁸⁸ Sr ⁺	0,47	1,6	¹⁶⁶ Er ⁺	0,007	0,0232
⁹⁸ Mo ⁺	0,142	0,469	²³² Th ⁺	0,034	0,112
¹²¹ Sb ⁺	0,421	1,39	²³⁸ U ⁺	0,029	0,0957
ICP-OES					
Analyt	LOD (mg kg^{-1})	LOQ (mg kg^{-1})	Analyt	LOD (mg kg^{-1})	LOQ (mg kg^{-1})
K	5,6	18,5	Cu	0,175	0,578
Mg	0,156	0,516	Al	0,463	1,53
Fe	0,410	1,35	Na	1,5	4,95
Mn	0,173	0,571	P	1,05	3,47
Ba	0,0506	0,167	Ca	0,190	0,627
Zn	0,290	0,957			

Při výpočtu LOD, LOQ byla zohledněna navážka (400 mg) a ředění vzorku.

4.5.4. Aplikace pro analýzu reálných vzorků

Metoda byla použita pro analýzu 48 vzorků granulí a 3 pochutin („snacků“) určených pro kočky a psy, ve všech případech se jednalo o suchá krmiva. Výsledky analýzy zde nejsou uvedeny. Získaná data byla zhodnocena exploratorní průzkumovou, diskriminační a faktorovou analýzou. Pro potřeby diskriminační analýzy byly vzorky rozčleněny do dvou skupin podle určení (kočky/psi).

4.5.4.1. *Exploratorní analýza*

Data byla nejprve podrobena exploratorní analýze pro seznámení se strukturou dat a ověření základních předpokladů. Souhrnné statistické charakteristiky analyzovaných dat jsou pro jednotlivé proměnné uvedeny v tabulce 55. Ze skupiny metod klasifikační analýzy byla vybrána diskriminační analýza, základním předpokladem diskriminační analýzy je platnost vícerozměrné normality. Popisné statistiky diskriminátorů v rámci jednotlivých tříd dokumentuje tabulka 56. V tabulce jsou obsaženy rovněž výsledky kombinovaného testu normality. Předpoklad normality nebyl splněn v případě výběru koncentrace Hg, Na, Ca, Mg, Fe, Ba, Al, Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U v první skupině analyzovaných vzorků a v druhé skupině pro Li, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho a Er. V tabulce 56 jsou uvedeny dále i hodnoty směrodatných odchylek, které umožňují posoudit podobnost kovariančních matic jednotlivých tříd. Hodnoty celkových korelací a kovariancí vytvořené z jednotlivých kategorií a korelace a kovariance uvnitř jednotlivých tříd zde nejsou uvedeny. V datech však byla pozorována celá řada statisticky významných korelací, například mezi koncentrací Al a Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Ca-P, As-Hg atd.

Tabulka 55: Statistické charakteristiky stanovení obsahu Hg, Na, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, Ba, Zn, Cu, Al, Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U ve vzorcích (mg kg⁻¹) suchých krmiv pro kočky a psy (n = 51)

Analyt	Průměr	Spodní mez	Horní mez	Průměr ^a	Spodní IS ^a	Horní IS ^a	Rozptyl	Sm. odch.	Šikm.	Špič.	<i>p</i> ^b	Medián	IS spodní	IS horní	OB
Hg	0,006	0,0041	0,0086	0,0033	0,003	0,004	6,6.10 ⁻⁵	0,0081	2,601	9,9	2,0.10⁻⁴	0,0033	0,0026	0,004	5
Na	3621	3049	4194	3247	2856	3691	4,1.10 ⁶	2036	3,1	17	6,5.10⁻⁵	3467	2931	4003	1
P	9783	9082	10484	9686	9003	10385	6,2.10 ⁶	2494	0,669	7,4	0,134	9655	8809	10500	2
Ca	13776	12400	15153	1330	12055	14624	2,4.10 ⁷	4893	1,3	7,7	0,012	13686	11897	15475	1
K	6476	5890	7063	6056	5574	6602	4,3.10 ⁷	2084	0,803	3,0	0,077	6154	5485	6823	0
Mg	1151	1062	1242	1063	1002	1136	1,0.10 ⁵	321	1,2	3,7	0,015	1075	984	1166	0
Fe	258	224	292	230	205	259	14288	119	1,02	3,3	0,032	215	177	254	0
Mn	45	40	51	44	38	49	385	20	0,413	3,1	0,376	47	39,7	54	0
Ba	6,6	4,8	8,5	4,7	4	5,5	44	6,7	3,1	14	5,7.10⁻⁵	4,8	3,7	6	4
Zn	159	141	177	153	136	172	4262	65	0,603	4	0,176	162	143	181	0
Cu	16	14,3	18,1	16	14	17	46	6,8	0,703	4	0,117	16	14	17	1
Al	138	94	183	93	79	110	25120	158	3,7	19	1,6.10⁻⁵	86	66	107	3
Li	0,185	0,115	0,254	0,111	0,096	0,129	0,0614	0,247	3,6	17	1,7.10⁻⁵	0,112	0,091	0,132	5
V	0,484	0,352	0,616	0,306	266	0,357	0,220	0,469	2,4	9	3,9.10⁻⁴	0,305	0,239	0,371	3
Cr	1,04	0,884	1,2	0,922	0,8	1,1	0,305	0,552	1,02	3,7	0,032	0,909	0,717	1,1	0
Ni	2,6	2,2	2,9	2,3	2,0	2,6	1,5	1,2	1,2	4,3	0,017	2,2	1,9	2,6	0
Co	0,238	0,199	0,276	0,199	0,175	0,228	0,0182	0,135	1,6	5,6	0,0042	0,191	0,156	0,225	1
Ga	0,406	0,316	0,495	0,311	0,271	0,36	0,1	0,317	2,5	9,3	2,3.10⁻⁴	0,331	0,28	0,381	4

^a Odhad parametru získaný po exponenciální transformaci dat.

^b Kombinovaný test normality: Jestliže je *p* větší než 0,05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota *p* nižší než 0,05, data nevykazují normální rozložení. IS interval spolehlivosti; OB odlehlý bod.

Tabulka 55: Pokračování

Analyt	Průměr	Spodní mez	Horní mez	Průměr ^a	Spodní IS ^a	Horní IS ^a	Rozptyl	Sm. odch.	Šikm.	Špič.	p^b	Medián	IS spodní	IS horní	OB
As	0,197	0,135	0,258	0,098	0,082	0,119	0,048	0,218	1,7	5	0,0026	0,107	0,075	0,14	2
Se	0,678	0,552	0,803	0,544	0,466	0,638	0,199	0,446	1,3	4	0,011	0,518	0,425	0,611	1
Rb	4,6	4,1	5,3	4,2	3,8	4,7	4,6	2,1	2,0	9	9,1.10⁻⁴	4,1	3,6	4,7	1
Sr	18,8	15,1	22,6	15	13	18	177	13,3	1,3	3,7	0,0121	13	10	15	0
Mo	0,573	0,455	0,691	0,47	0,412	0,54	0,176	0,419	3,6	20	1,8.10⁻⁵	0,459	0,404	0,513	1
Sb	0,0496	0,0339	0,0653	0,032	0,027	0,039	3,1.10 ⁻³	0,056	2,8	11	1,2.10⁻⁴	0,029	0,021	0,037	5
Cs	0,0395	0,0342	0,0447	0,036	0,032	0,041	3,5.10 ⁻⁴	0,0186	2,4	13	3,5.10⁻⁴	0,038	0,035	0,04	1
Ce	0,242	0,131	0,354	0,145	0,123	0,171	0,156	0,395	5,4	34	7,1.10⁻⁷	0,146	0,105	0,187	4
Pr	0,0248	0,0164	0,033	0,0165	0,141	0,0195	9.10 ⁻⁴	0,03	4,5	26	3,1.10⁻⁶	0,017	0,012	0,021	3
Nd	0,0604	0,0368	0,084	0,0165	0,0142	0,0195	0,007	0,084	5	31	1,3.10⁻⁶	0,041	0,0308	0,052	3
Eu	0,0043	0,0029	0,0056	0,0028	0,0024	0,0033	2,3.10 ⁻⁵	0,0048	3,8	20	1,2.10⁻⁵	0,0028	0,0019	0,004	3
Gd	0,0105	0,0069	0,0141	0,0064	0,0054	0,0077	1,7.10 ⁻⁴	0,013	3,5	18	2,2.10⁻⁵	0,0067	0,0053	0,008	6
Dy	0,0137	0,0090	0,0184	0,0075	0,0063	0,009	2,8.10 ⁻⁴	0,017	2,5	9	2,4.10⁻⁴	0,0072	0,005	0,009	4
Ho	0,0027	0,0017	0,0038	0,0013	0,0011	0,0016	1,36.10 ⁻⁵	0,0037	2,5	8,8	2,7.10⁻⁴	0,0013	0,0009	0,002	4
Er	0,0087	0,0054	0,0121	0,0042	0,0036	0,0051	1,4.10 ⁻⁴	0,012	2,5	8,5	2,6.10⁻⁴	0,0039	0,0029	0,005	6
Th	0,0603	0,0468	0,0738	0,049	0,041	0,059	0,0023	0,048	2	6,9	0,0011	0,045	0,0418	0,049	6
U	0,164	0,0312	0,297	0,086	0	0,287	0,223	0,472	4	21	5,4.10⁻⁶	0,022	0,018	0,027	8

^a Odhad parametru získaný po exponenciální transformaci dat.

^b Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0,05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05, data nevykazují normální rozložení. IS interval spolehlivosti; OB odlehlý bod.

Tabulka 56: Statistické charakteristiky stanovení obsahu Hg, Na, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, Ba, Zn, Cu, Al, Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U ve vzorcích (mg kg⁻¹) suchých krmiv pro kočky a psy (n = 51) v rámci jednotlivých tříd

Průměr	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al
1	5,8.10 ⁻³	3546	9713	14055	6154	1129	240	45	6	160	16,4	109
2	9,2.10 ⁻³	4029	10161	12279	8208	1275	356	47	7,6	153	15,1	299
Sm. odchylka	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al
1	6,8.10 ⁻³	2157	2652	5139	1803	299	106	19,7	6,9	67	7,0	74
2	0,014	1205	1416	3087	2731	424	148	20	4,9	60	5,4	333
Šikmost	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al
1	2,2	3,2	0,712	1,2	0,664	1,157	1,1	0,638	3,3	0,714	0,743	2,3
2	2,0	-0,66	0,451	0,383	0,142	0,979	0,392	-0,896	0,777	-0,553	-0,458	1,3
Špičatost	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al
1	7,2	16,7	6,9	7,2	2,8	3,8	3,6	3,3	13,9	4,0	3,9	9,5
2	5,3	3,1	2,3	1,4	1,5	2,2	1,5	2,7	2,4	2,6	2,5	3,2
p^a	Hg	Na	P	Ca	K	Mg	Fe	Mn	Ba	Zn	Cu	Al
1	1,0.10⁻³	1,02.10⁻⁴	0,138	0,023	0,166	0,027	0,039	0,184	8,41.10⁻⁵	0,138	0,123	8,5.10⁻⁴
2	0,023	0,49	0,697	0,766	0,952	0,251	0,758	0,301	0,389	0,594	0,69	0,132

^a Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0,05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05, data nevykazují normální rozložení.

Tabulka 56: Pokračování

Průměr	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb
1	0,175	0,441	1,04	2,5	0,236	0,389	0,19	0,657	4,8	20	0,598	0,053
2	0,241	0,716	1,04	2,7	0,246	0,494	0,233	0,791	4,2	17,9	0,443	0,031
Sm. odchylka	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb
1	0,242	0,421	0,534	1,2	0,141	0,282	0,211	0,439	2,3	13,1	0,445	0,0598
2	0,286	0,659	0,684	1,6	0,103	0,480	0,269	0,499	1,5	15,1	0,220	0,021
Šikmost	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb
1	4,2	2,7	1,06	1,1	1,7	3,1	1,9	1,3	2,0	1,3	3,489	2,6
2	1,8	1,3	0,882	1,1	-0,244	1,1	1,1	1,4	0,265	1,04	0,943	1,99
Špičatost	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb
1	21	11	3,8	4,3	5,6	14	5,9	4,0	8,6	3,9	18,2	9,3
2	4,8	3,4	3,01	3,5	1,7	2,3	2,4	3,7	2,1	2,8	2,5	5,6
<i>p</i>^a	Li	V	Cr	Ni	Co	Ga	As	Se	Rb	Sr	Mo	Sb
1	1,3.10⁻⁵	2,8.10⁻⁴	0,038	0,0299	4,8.10⁻³	1,2.10⁻⁴	2,6.10⁻³	0,018	1,6.10⁻³	0,014	5,0.10⁻⁵	4,1.10⁻⁴
2	0,037	0,120	0,311	0,174	0,888	0,195	0,174	0,097	0,871	0,218	0,272	0,021

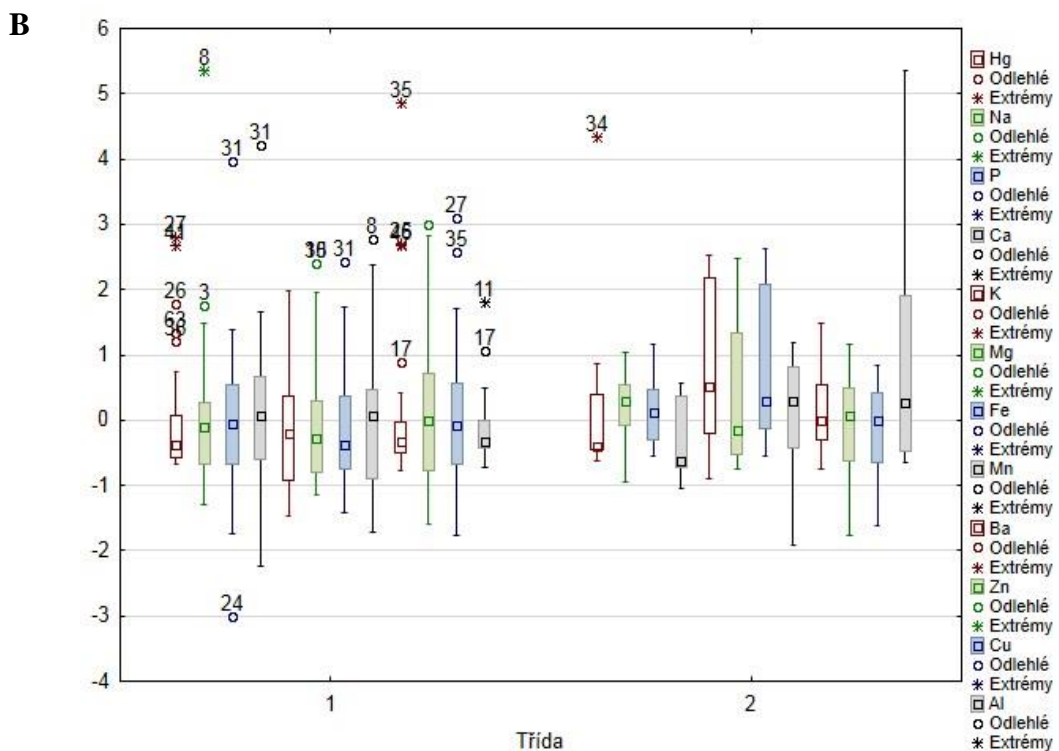
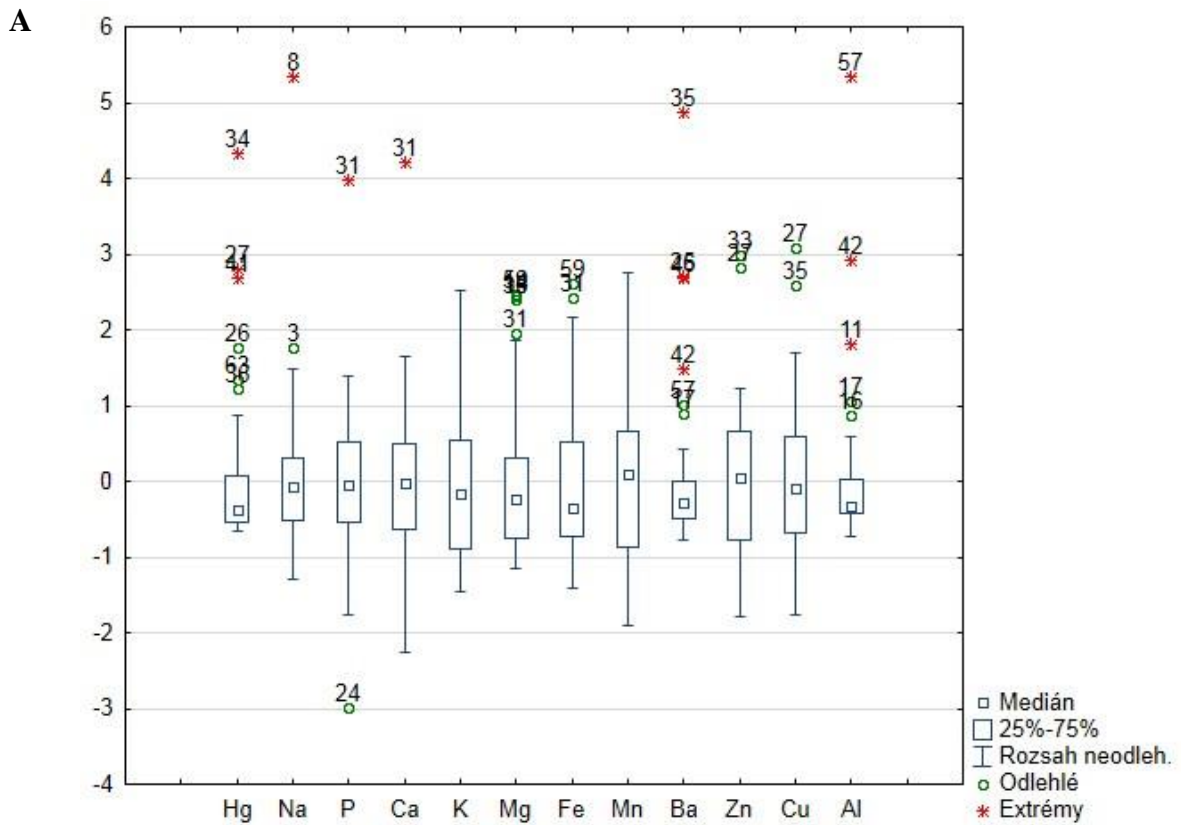
^a Kombinovaný test normality: Jestliže je *p* větší než 0,05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota *p* nižší než 0,05, data nevykazují normální rozložení.

Tabulka 56: Pokračování

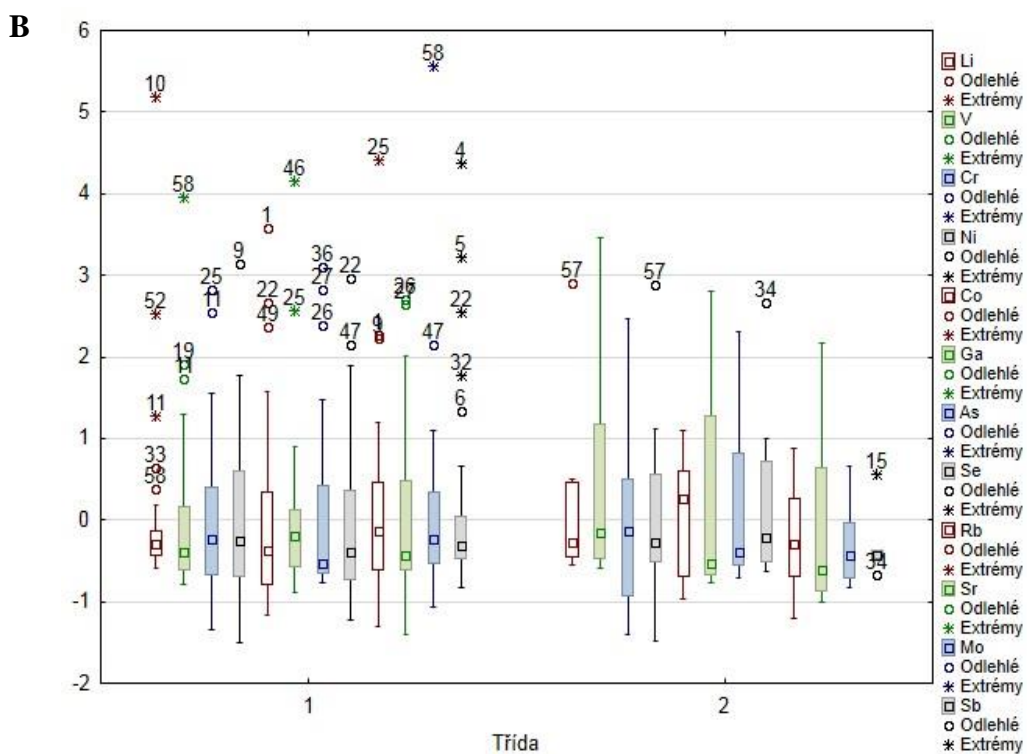
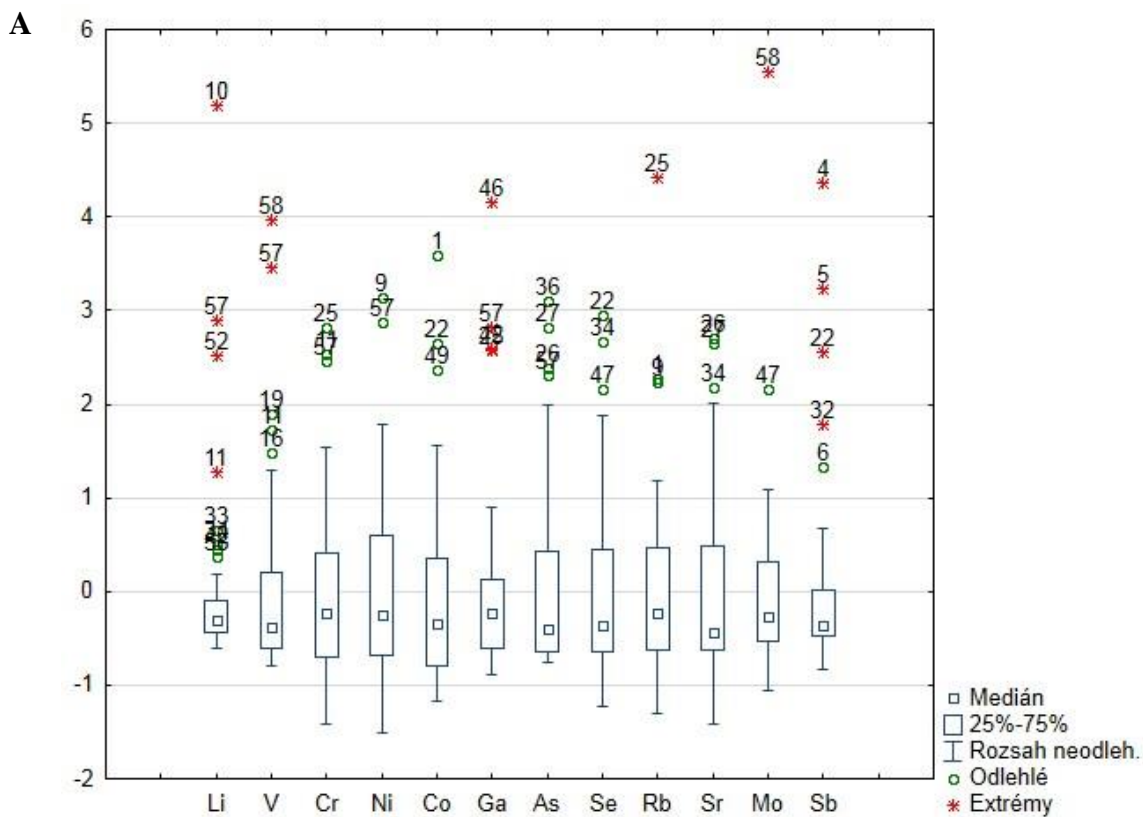
Průměr	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
1	0,037	0,189	0,021	0,050	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$9,2 \cdot 10^{-3}$	0,013	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$8,6 \cdot 10^{-3}$	0,055	0,189
2	0,055	0,533	0,046	0,118	$6,7 \cdot 10^{-3}$	0,017	0,019	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$9,5 \cdot 10^{-3}$	0,088	0,030
Sm. odchylka	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
1	0,014	0,153	0,015	0,036	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$8,4 \cdot 10^{-3}$	0,015	$3,6 \cdot 10^{-3}$	0,012	0,042	0,511
2	0,032	0,929	0,068	0,194	$9,8 \cdot 10^{-3}$	0,026	0,026	$4,5 \cdot 10^{-3}$	0,013	0,071	0,019
Šikmost	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
1	0,411	2,9	2,4	2,2	2,6	2,2	2,6	2,7	2,7	2,01	3,8
2	1,9	2,03	1,9	2,0	2,1	1,9	1,7	1,9	1,7	1,3	1,2
Špičatost	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
1	3,1	13,5	11,0	9,8	11,1	8,0	10,3	10,2	9,3	7,4	17,6
2	5,1	5,5	5,0	5,4	5,6	5,02	4,5	4,4	4,3	3,3	3,9
p^a	Cs	Ce	Pr	Nd	Eu	Gd	Dy	Ho	Er	Th	U
1	0,421	$1,9 \cdot 10^{-4}$	$6,8 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$2,54 \cdot 10^{-5}$
2	0,029	0,019	0,029	0,021	0,018	0,027	0,040	0,045	0,047	0,115	0,159

^a Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0,05, rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05, data nevykazují normální rozložení.

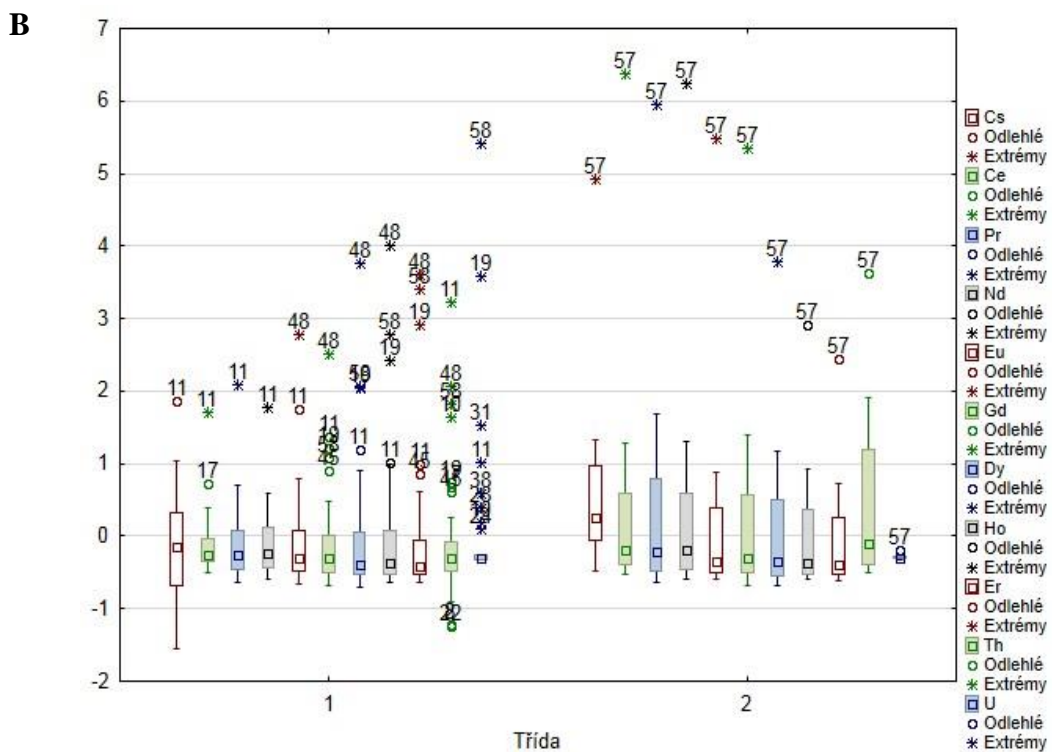
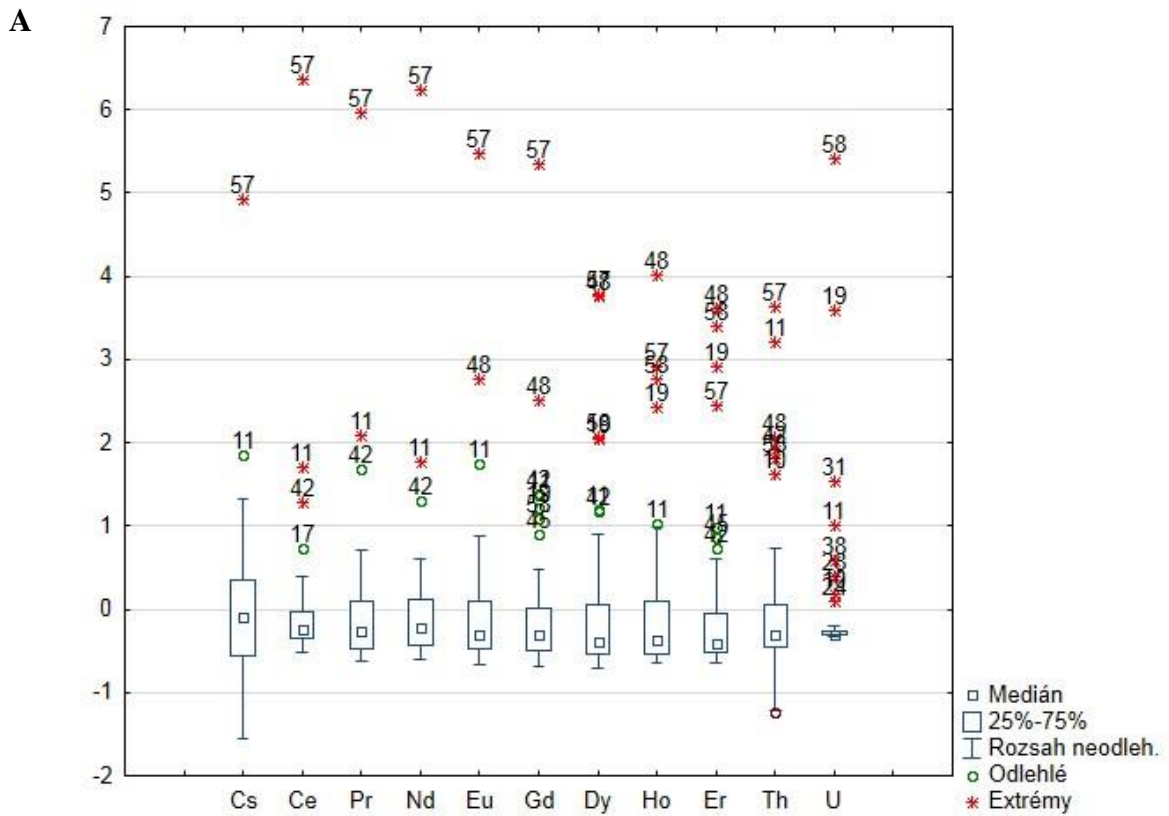
Robustní odhady polohy, minima a maxima prvního a třetího kvartilu, odlehlých hodnot a extrémů pro jednotlivé prvky jsou znázorněny v krabicových grafech (obr. 24A, 25A a 26A) a po rozdělení do jednotlivých tříd na základě diskriminační analýzy, jak bude diskutováno dále (obr. 24B, 25B a 26B). Jak je patrné z obrázků, extrémní hodnoty koncentrací byly naměřeny pro analyty Al, Li, V, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Ho, Er, Dy, Th a U ve vzorku č. 57, obdobně tomu bylo i pro koncentrace Li, Al, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Ho, Er, Dy, Th a U vzorku č. 11. Vysoké hodnoty koncentrace Sb byly nalezeny u 4 vzorků granulí s kuřecím masem a zeleninou či s brambory (č. 4, 5, 22 a 32), pro Hg pak u vzorků č. 27 a 34, kde se v obou případech jednalo o rybí granule. Z hodnot koncentrací matričních prvků nejvíce vybočoval vzorek č. 8 (Na), 31 (Ca a P) 35 a 26 (Ba). Porovnání naměřených koncentrací s limity danými legislativou a doporučenými maximálními nutričními koncentracemi bude diskutováno v kapitole 4.5.7.



Obrázek 24: Krabicový graf koncentrací prvků Hg, Na, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, Ba, Zn, Cu a Al pro naměřená data (A) a po rozdělení do jednotlivých tříd (B)



Obrázek 25: Krabicový graf koncentrací prvků Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo a Sb pro naměřená data (A) a po rozdělení do jednotlivých tříd (B)



Obrázek 26: Krabicový graf koncentrací prvků Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U pro naměřená data A a po rozdělení do jednotlivých tříd B

4.5.4.2. Diskriminační analýza

V rámci diskriminační analýzy byla užitá kroková analýza dopředná. Jelikož nebyla pro původní zdrojová data splněna podmínka vícerozměrné normality, byla analýza provedena pro transformovaná data po Box-Coxově transformaci. Následně byly nalezeny znaky s dostatečnou diskriminační silou. Vyřazení znaků, které nebyly pro klasifikační analýzu významné, bylo provedeno s využitím několika kritérií: Wilkova kritéria λ ; kritéria F a tolerance $1-R^2$, která je mírou redundance, tj. nadbytečnosti znaku. Nejlepší znaky pro klasifikaci dosahují nejvyšších hodnot tolerancí a nejnižších hodnot λ a F. Výsledky diskriminační funkční analýzy s postupným vypouštěním znaků jsou uvedeny v tabulce 57. Jako nejlepší znaky pro klasifikaci byly určeny: Fe, Cr, Cs, Cu, Hg, Ba, Ca a P, pro kanonickou korelační analýzu pak byla využita pouze tato podmnožina dat.

Tabulka 57: Výsledky diskriminační funkční analýzy po druhém opakování dokumentující diskriminátory zvolené pro tvorbu modelu

	Wilk. (Lambda)	Parc. (Lambda)	F na vyj ((3,11))	p-hodn.	Toler.	1-toler. (R²)
Fe	0,462612	0,829133	8,65531	0,005288	0,489334	0,510666
Cr	0,480283	0,798627	10,59025	0,002249	0,449240	0,550760
Cs	0,527587	0,727021	15,77000	0,000275	0,429725	0,570275
Cu	0,585463	0,655151	22,10732	0,000028	0,392372	0,607628
Hg	0,427365	0,897515	4,79589	0,034133	0,691051	0,308949
Ca	0,564823	0,679092	19,84734	0,000061	0,105124	0,894876
P	0,510939	0,750709	13,94713	0,000560	0,111607	0,888393
Ba	0,445659	0,860673	6,79900	0,012574	0,617621	0,382379

Odhady parametrů klasifikační funkce pro zařazování objektů do obou tříd jsou uvedeny v tabulce 58. Byly vyčísleny dvě diskriminační funkce – pro každou třídu jedna. V tabulce 59 klasifikační matice byly jednotlivé vzorky rozděleny do jednotlivých tříd, klasifikace proběhla na 100 %, žádný vzorek nebyl chybně zařazen.

Tabulka 58: Odhady parametrů klasifikační funkce pro jednotlivé třídy

	Třída 1 (p = 0,84314)	Třída 2 (p = 0,15686)
Fe	126,985	138,345
Cr	-1,979	-7,439
Cs	-88,455	-76,788
Cu	2,764	0,493
Hg	-0,067	0,207
Ca	0,447	0,287
P	-0,047	-0,035
Ba	-10,735	-5,642
Abs. člen	-386,325	-382,437

Tabulka 59: Klasifikační matice: řádky představují pozorované klasifikace a sloupce předpovězené klasifikace

	% (správných)	Třída 1 (p = 0,84314)	Třída 2 (p = 0,15686)
Třída 1	100	43	0
Třída 2	100	0	8
Celkem	100	43	8

Vyčíslena byla diskriminační funkce (počet je v daném případě o jednotku menší než počet tříd). Výsledek testu chí-kvadrát, který testuje statistickou významnost kořenů při jejich postupném odstraňování, je uveden v tabulce 60. Z hodnot uvedených v tabulce 60 je zřejmé, že statisticky významný je pouze první kořen. V tabulce 61 jsou shrnuty standardizované koeficienty pro kanonické proměnné. Hodnoty uvedené v tabulce 62 představují korelace mezi znaky a diskriminační funkcí. V tabulce 63 jsou uvedeny průměry kanonických proměnných pro jednotlivé třídy.

Tabulka 60: Test chí-kvadrát po odstranění postupných kořenů

Kořeny odstraněny	Vlastní číslo	Kan. (R)	Wilk. (Lambda)	Chí-kv.	SV	p-hodn.
0	1,607109	0,785133	0,383567	43,12089	8	0,000001*

* Parametr statisticky významný.

Tabulka 61: Standardizované koeficienty pro kanonické proměnné

	Fe	Cr	Cs	Cu	Hg	Ca	P	Ba	Vlastní	Kum. podíl
Kořen1	0,7526	-0,8527	1,0154	-1,1941	0,4905	-2,2253	1,9036	0,6049	1,6071	1,0

Tabulka 62: Faktorová strukturní matice

	Fe	Cr	Cs	Cu	Hg	Ca	P	Ba
Kořen1	0,27961	-0,03818	0,27706	-0,04615	0,07684	-0,09323	0,05747	0,10924

Tabulka 63: Průměry kanonických proměnných

	Třída 1	Třída 2
Kořen1	-0,535977	2,880878

V tabulce 64 jsou uvedeny hodnoty vypočtených aposteriorních pravděpodobností zařazení objektů do každé z tříd. Nejvyšší hodnota pravděpodobnosti značí příslušnost objektu do dané třídy. Z hodnot uvedených v tabulce je zřejmé, že všechny objekty testovacího souboru byly zařazeny správně do příslušné třídy.

Tabulka 64: Aposteriorní pravděpodobnosti

Pozorovaná klasifikace	Třída 1 (p = 0,84314)	Třída 2 (p = 0,15686)
Třída 1	0,999976	0,000024
Třída 1	0,994286	0,005714
Třída 1	0,999813	0,000187
Třída 1	0,998603	0,001397
Třída 1	0,999998	0,000002
Třída 1	0,982544	0,017456
Třída 1	0,999768	0,000232
Třída 1	0,999957	0,000043
Třída 1	0,998041	0,001959
Třída 1	0,976777	0,023223
Třída 1	0,996415	0,003585
Třída 1	0,999764	0,000236
Třída 1	0,999963	0,000037
Třída 2	0,002156	0,997844
Třída 2	0,058317	0,941683

Nesprávná klasifikace je označena *.

Tabulka 64: Pokračování

Pozorovaná klasifikace	Třída 1 (p = 0,84314)	Třída 2 (p = 0,15686)
Třída 2	0,007012	0,992988
Třída 1	0,590328	0,409672
Třída 1	0,999913	0,000087
Třída 1	0,999587	0,000413
Třída 1	0,999973	0,000027
Třída 1	0,999615	0,000385
Třída 1	0,999980	0,000020
Třída 1	0,999712	0,000288
Třída 1	0,999960	0,000040
Třída 1	0,999996	0,000004
Třída 1	0,996962	0,003038
Třída 1	0,999861	0,000139
Třída 1	0,996219	0,003781
Třída 1	0,983566	0,016434
Třída 1	0,988335	0,011665
Třída 1	0,999998	0,000002
Třída 1	0,664764	0,335236
Třída 2	0,000491	0,999509
Třída 1	0,723240	0,276760
Třída 1	0,996810	0,003190
Třída 1	0,972051	0,027949
Třída 1	0,999978	0,000022
Třída 1	0,999435	0,000565
Třída 1	0,999968	0,000032
Třída 2	0,036913	0,963087
Třída 1	0,965255	0,034745
Třída 1	0,999653	0,000347
Třída 1	0,999990	0,000010
Třída 1	0,999991	0,000009
Třída 1	0,999993	0,000007
Třída 1	0,999985	0,000015
Třída 2	0,001835	0,998165
Třída 1	0,540119	0,459881
Třída 2	0,336337	0,663663
Třída 2	0,180353	0,819647
Třída 1	0,997841	0,002159

Nesprávná klasifikace je označena *.

4.5.4.3. Faktorová analýza

K odhalení vnitřních souvislostí byla data podrobena faktorové analýze. Z informací uvedených v tabulce 65 (data po standardizaci a s užitím 16 proměnných) je zřejmé, že dva

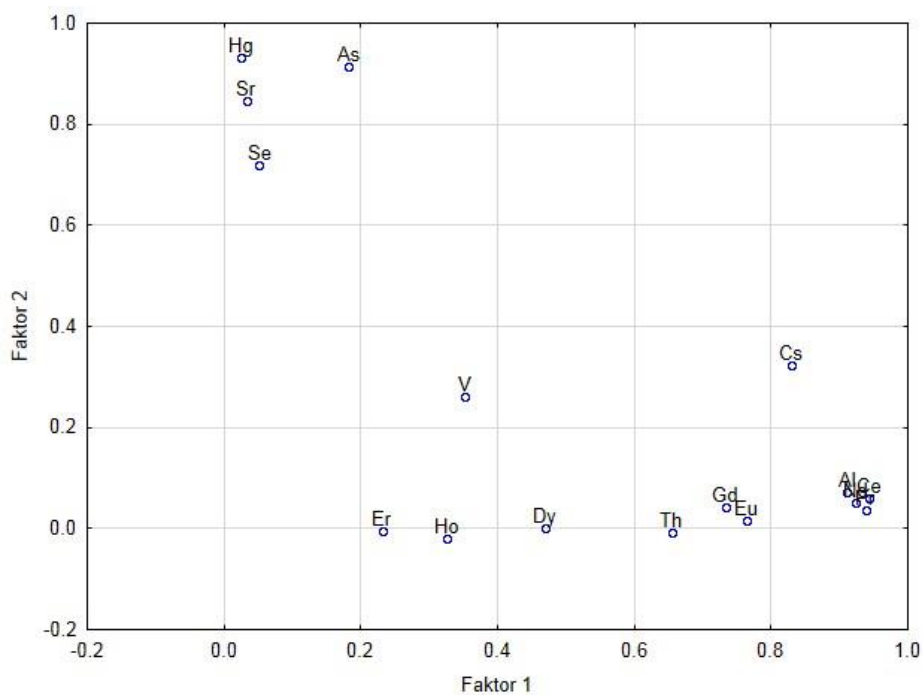
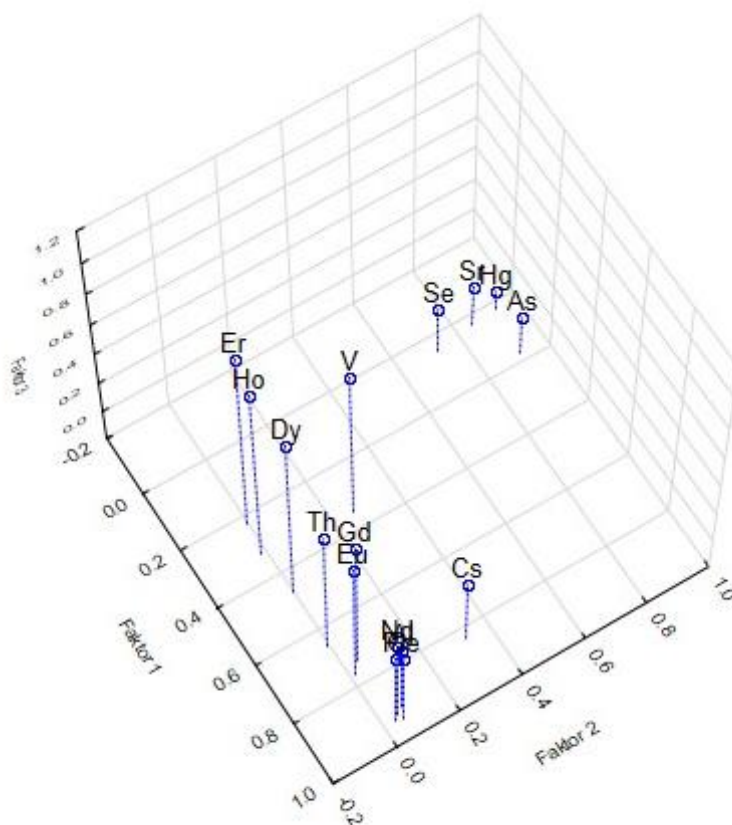
faktory objasňují téměř 80 % variability v datech, pro tři faktory se pak jedná téměř o 90%. Z tabulky 66 je zřejmé, že Faktor 1 je nejvíce ovlivněn proměnnými Al, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu a Gd, Faktor 2 pak nejvíce proměnnými Hg, As, Se a Sr a Faktor 3 V, Dy, Ho a Er. Uvedené závislosti rovněž dokumentuje graf faktorových vah na obrázku 27.

Tabulka 65: Vlastní čísla matice a související statistiky po rotaci Varimax vypočtená programem Statistica 12

Index	Vlastní číslo	Individuální %	Kumulativní %
1	9,510083	59,43802	59,43802
2	3,021990	18,88744	78,32545
3	1,552608	9,70380	88,02926

Tabulka 66: Faktorové váhy po rotaci Varimax

Proměnná	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
Hg	0,024443	0,932638	-0,079572
As	0,182527	0,914631	0,060864
Se	0,051811	0,720220	0,091508
Sr	0,032650	0,847493	0,060765
Al	0,911116	0,070993	0,255046
V	0,352531	0,262174	0,760777
Cs	0,829504	0,324166	0,207532
Ce	0,942748	0,059481	0,280941
Pr	0,938114	0,037017	0,302961
Nd	0,924243	0,052483	0,333038
Eu	0,763512	0,016075	0,592170
Gd	0,733218	0,042967	0,652730
Dy	0,469505	0,000397	0,866349
Ho	0,325856	-0,019726	0,934930
Er	0,231049	-0,004613	0,966425
Th	0,655235	-0,006874	0,627046
Výkl.roz	6,233102	3,132409	4,719170
Prp.celk	0,389569	0,195776	0,294948

A**B**

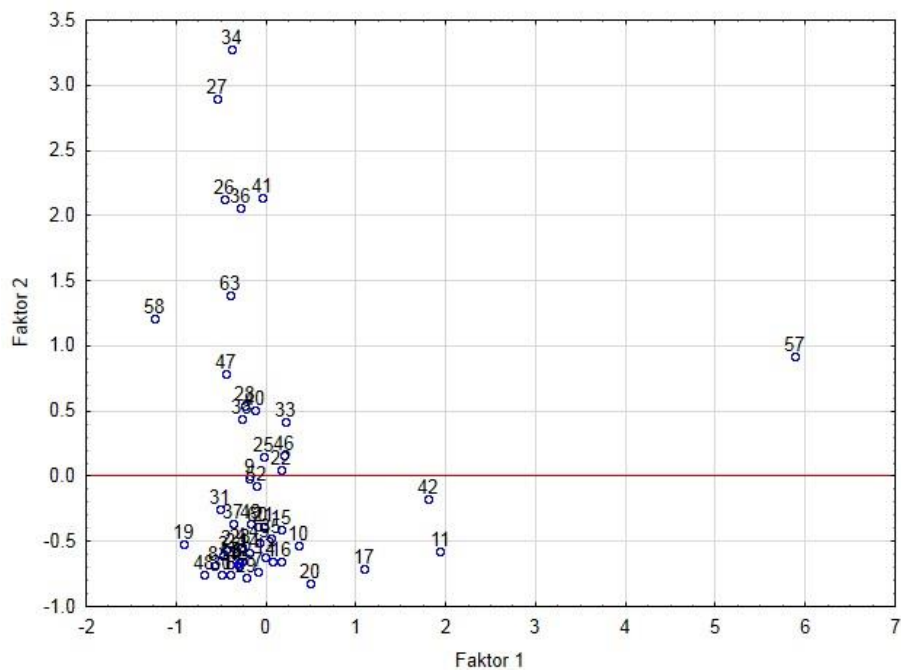
Obrázek: 27: 2D (A) a 3D (B) graf faktorových vah pro 51 objektů a 16 proměnných koncentrace Al, V, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th, Hg, As, Se, Sr po standardizaci dat

Tabulka 67: Příspěvky daného faktoru do komunality po rotaci Varimax

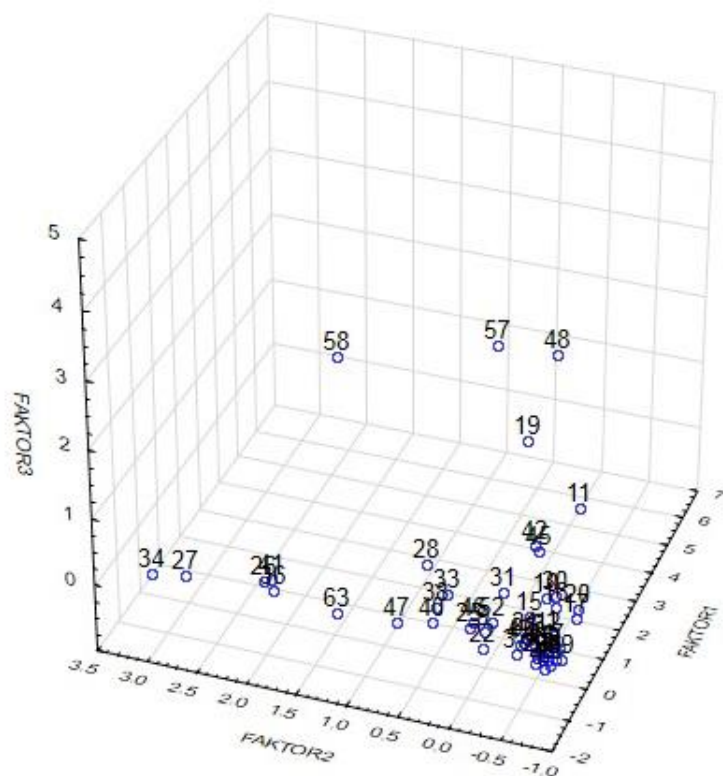
Proměnná	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3
Hg	0,000597	0,870412	0,876744
As	0,033316	0,869865	0,873570
Se	0,002684	0,521401	0,529774
Sr	0,001066	0,719311	0,723004
Al	0,830132	0,835172	0,900220
V	0,124278	0,193013	0,771795
Cs	0,688078	0,793161	0,836231
Ce	0,888774	0,892312	0,971240
Pr	0,880058	0,881428	0,973214
Nd	0,854225	0,856980	0,967894
Eu	0,582951	0,583209	0,933875
Gd	0,537609	0,539456	0,965512
Dy	0,220435	0,220435	0,970995
Ho	0,106182	0,106571	0,980666
Er	0,053383	0,053405	0,987381
Th	0,429332	0,429380	0,822566

Na základě hodnot komunalit uvedených v tabulce 67 lze usuzovat na správnost zařazení dané proměnné vytvořeným modelem. Rozptylový diagram faktorového skóre, který je uveden na obrázku 28, ukazuje na hlavní strukturu, která byla nalezena v datech. Z obrázku je patrný shluk sedmi vzorků rybích granulí (č. 26, 27, 34, 36, 41, 58 a 63), z naměřených hodnot lze v těchto vzorcích nalézt maximální či vyšší koncentrace Hg, As, Se a Sr oproti mediánu. Kromě vzorku č. 57 se pak dále vyčleňují vzorky č. 11 a 42 (obr. 27A). Na obrázku 27B je viditelný shluk vzorků č. 58, 57, 48 a 19, které mají vyšší koncentrace V, Dy, Ho a Er oproti mediánu. Na základě faktorové analýzy nebyla nalezena jednoznačná souvislost mezi různými druhy krmiv, složením, značkami či kvalitou.

A



B



Obrázek: 28: 2D (A) a 3D (B) rozptylový diagram faktorových skóre pro 51 objektů a 16 proměnných koncentrace Al, V, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th, Hg, As, Se, Sr po standardizaci dat

4.5.5. Porovnání naměřených výsledků s limity danými legislativou

Získané výsledky byly porovnány s limity danými legislativou (směrnice Evropského parlamentu a Rady o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat 181/2003/EC [267] a o nežádoucích látkách v krmivech 2002/32/ES [268]) nebo s hodnotami doporučenými organizací FEDIAF (Fédération Européenne de l'Industrie des Aliments pour Animaux Familiers) spolupracující s úřady a odborníky v oblasti výživy domácích mazlíčků [269].

Prvky uran a thorium, jejichž výskyt byl při analýze kočičích a psích granulí pozorován [206], byly nalezeny v koncentracích nad $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ve vzorcích č. 10, 11, 19, 24, 28, 31, 38 a 58 pro uran a 10, 11, 42, 48, 57 a 58 pro thorium. Nejvyšší koncentrace uranu $2,72 \text{ mg kg}^{-1}$ byla nalezena pro vzorek č. 58 a $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$ pro vzorek č. 19, což je oproti mediánu souboru vzorků $0,022 \text{ mg kg}^{-1}$ více jak o dva řády. Ve vzorku č. 57 a 11 byla nalezena nejvyšší koncentrace Th, konkrétně $0,235$ a $0,215 \text{ mg kg}^{-1}$ (medián souboru $0,045 \text{ mg kg}^{-1}$). Vysoká koncentrace oproti mediánu skupiny Al, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Th, Hg, V, Cr a Ni byla naměřena ve vzorku č. 57. Jednalo se o vzorek kočičích granulí se pstruhem a uzeným lososem americké značky Taste of the Wild[®]. V průměru 10x vyšší koncentrace Hg oproti mediánu ($0,003 \text{ mg kg}^{-1}$) byly zjištěny u vzorků č. 26, 27, 36, 41 a 34, ve všech případech se jednalo o granule s rybím masem.

Porovnání naměřených hodnot s legislativou danými limity či maximálními nutričními hodnotami, což je koncentrace, jejíž úroveň by neměla mít žádný škodlivý účinek, je uvedeno v tabulce 68. Koncentrace Cu, Fe, Mn, Se a Zn dané směrnicí Evropského parlamentu a Rady o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat 1831/2003/EC je zde uvedena pouze orientačně, tyto hodnoty jsou platné pouze v případě, že je daný prvek přidáván jako aditivum a nevztahují se na koncentrace vycházející z ingrediencí použitých pro výrobu. Jak je z tabulky patrné, ve všech případech je medián souboru vzorků pod hodnotami stanovenými legislativou. Tyto hodnoty nejsou překročeny pro prvky As a Hg ani při maximálních zjištěných koncentracích. Doporučená koncentrace Ca dle FEDIAF byla překročena pouze v jednom případě, kdy se jednalo o vzorek č. 31 (viz tabulka 68).

Tabulka 68: Porovnání naměřených koncentrací pro vybrané prvky s limity danými legislativou či koncentracemi doporučenými FEDIAF

Prvek	Limity/doporučení dané legislativou/ FEDIAF	Medián souboru dat	Maximální naměřená koncentrace (č. vzorku)
Ca (g kg⁻¹)	<i>FEDIAF [269]</i>	25 ^a	13,7
P (g kg⁻¹)		16 ^a	9,7
Cu (mg kg⁻¹)	<i>1831/2003/EC</i>	28	15,6
Fe (mg kg⁻¹)	[267]	1420	215,1
Mn (mg kg⁻¹)		170	46,9
Se (mg kg⁻¹)		0,568	0,518
Zn (mg kg⁻¹)		284	162,2
As (mg kg⁻¹)	<i>2002/32/ES [268]</i>	2 ^b	0,107
Hg (mg kg⁻¹)		0,4 ^b	0,003

^a Maximální doporučená nutriční hodnota.

^b Maximální obsah v mg kg⁻¹ v krmivu s 12 % obsahem vlhkosti.

5. Závěr

Disertační práce byla zaměřena na vývoj a optimalizaci nových metod pro analýzu uhelných popílků, vydřích tkání a suchých krmiv pro kočky a psy pomocí ICP-*oa*-TOF-MS, které nebyly v literatuře dosud publikovány. Pozornost byla rovněž věnována analýze sušeného mléka. Ačkoliv byla pro tuto matici v minulosti na našem pracovišti vypracována metoda [142], tento postup byl zaměřen zejména na eliminaci vlivu polyatomických iontů Ca pro stanovení vybraných prvků a nebyl univerzální. Z tohoto důvodu byly v této práci zkoumány další možnosti přípravy těchto vzorků. Rozlišení spektrometrů (GBC OptiMass 8000) s průletovým analyzátozem není dostatečné pro odlišení většiny interferujících iontů od analytu. Z dostupných řešení používaných k odstranění spektrálních interferencí lze při analýze vzorků pro tuto instrumentaci uplatnit matematické korekce, ty však nejsou pro stanovení nízké koncentrace prvku v komplexní matici dostatečně účinné [11, 142]. Nový přístup pocházející z našeho pracoviště nabízí modifikaci matrice. Tento přístup byl v minulosti použit pro analýzy mléka [142] či kyseliny sírové [232]. V daném případě byly polyatomické interference Ca odstraněny díky vysrážení Ca^{2+} s kyselinou šťavelovou, vliv matričního prvku S byl eliminován vysrážením síranové matrice barnatými ionty přidávanými ve formě BaBr_2 . V této práci byla mimo jiné pozornost věnována možnosti využití NH_4F , HNO_3 a H_2O_2 jako modifikátorů matrice. Cílem bylo vytvořit metody použitelné pro rutinní analytickou praxi, které by korespondovaly se současnými trendy a požadavky zelené chemie. Z tohoto důvodu byla pozornost zaměřena na optimalizaci přípravy vzorků s ohledem na možnosti úspory energií a reagensů či použití méně toxických činidel. Možné interference při analýze metodou ICP-*oa*-TOF-MS byly vytipovány na základě interferenčních křivek, ty však neodhalovaly vliv celé matrice reálných vzorků a pro každý typ vzorku byly řešeny individuálně. Kromě analýzy stopových prvků v roztocích vzorků pomocí ICP-*oa*-TOF-MS byly sledovány i koncentrace matričních prvků měřené prostřednictvím AAS/AES či ICP-OES. Pro všechny vypracované postupy byly určeny analytické charakteristiky metody analýzy reálných vzorků (LOD, citlivost, přesnost atd.). Navržené postupy byly validovány pomocí certifikovaných referenčních materiálů a analytických návratností. Výsledky analýz reálných vzorků byly zpracovány za využití nástrojů jednorozměrné a vícerozměrné analýzy dat.

V první části práce byla popsána jednoduchá a rychlá metoda mikrovlnné extrakce uhelných popílků s fluoridem amonným. Po filtraci extraktu byla provedena multiprvková analýza pomocí ICP-*oa*-TOF-MS. Fluorid amonný nahrazuje použití korozivních

a/nebo toxických kyselin, jako je HF, HClO₄, HCl, které byly dříve [270, 271] doporučeny pro rozklady uhelných popílků. Oproti přípravě vzorků s kyselinou fluorovodíkovou nebyla pozorována tvorba těkavých fluoridů některých analytů, pro něž je tento problém popisován v literatuře (např.: As, B, Se, Sb, Hg a Cr) [235]. Výsledné roztoky nevyžadovaly odstranění F⁻ pomocí H₃BO₃, nebo použití HF rezistentních komponent ICP-MS spektrometru (Pt kónusy, teflonový zmlžovač či mlžná komora atd.). Díky nekompletní extrakci matričních prvků (K, Ca, Mg a Fe) byla jejich koncentrace v analyzovaném roztoku < 25 mg L⁻¹, tato hodnota neovlivňovala stanovení problematických prvků tvorbou polyatomických iontů. Účinnost fluoridu amonného pro extrakci křemičitanové matrice byla potvrzena analýzou certifikovaných referenčních materiálů kalů, hnojiv a environmentálních vzorků s obsahem křemíku 10–230 mg kg⁻¹. Postup mikrovlnné extrakce s NH₄F byl rovněž použit pro validaci nové metody stanovení beryllia v půdách a sedimentech pomocí HR-CS-AAS [272]. Postup přípravy vzorku k analýze byl optimalizován za využití frakcionálního faktorového plánování. Mikrovlnná extrakce 10 mg uhelného popílku byla provedena za teploty 200 °C po dobu 10 minut s 5 mL NH₄F o koncentraci 140 g L⁻¹. Vypracovaná metoda MAE byla oproti konvenční mikrovlnné mineralizaci časově úspornější (10 minut vs. 50 minut), jednodušší a díky použití systému Multi Tube umožnila zpracovat více vzorků. Rozdíly směrnice vodné kalibrace a kalibrace s NH₄F nebyly pro jednotlivé analyty statisticky významné a pro kvantifikaci bylo použito vodné kalibrace s Rh jako porovnávacím prvkem. Dobrá shoda byla nalezena mezi certifikovanými a naměřenými hodnotami pro 11 prvků (Li, Be, Ni, As, Se, Rb, Sb, Cs, W, Tl a U) pro oba referenční materiály CTA-FFA-1 a NIST SRM 1633b. Relativní směrodatná odchylka byla ve všech případech nižší než 10 %, tím bylo potvrzeno, že analýza není pro navážku 10 mg mletých vzorků ovlivněna nehomogenitou.

Jak již bylo uvedeno, byl v minulosti na našem pracovišti validován rychlý a levný postup pro přímou analýzu mléka, některé toxikologicky významné prvky (Cu, Cd, Bi, Pb, Cd, Hg atd.) nemohly být touto metodou stanoveny vlivem jejich koprecipitace a/nebo inkluze ve vznikající sraženině [142] či tvorbou nerozpustných šřavelanů [241]. U vzorků kojeneckého sušeného mléka byl proveden totální rozklad pomocí optimalizovaného postupu mikrovlnné mineralizace s kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku. V takto připravených vzorcích bylo analyzováno 22 prvků (Hg, Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd a Li). Z hlediska optimalizace parametrů nastavení ICP-MS spektrometru byla pozornost věnována nastavení brány „SmartGate“. Z důvodu ochrany detektoru byly z hmotnostního spektra vyřezány ionty matričních prvků Zn a Fe. Přesnost

metody byla ověřena na základě analýzy dvou certifikovaných referenčních materiálů sušeného mléka NCS ZC73015 a BCR[®] 150. Správnost vyjádřená na základě vyhodnocení analytických návratností stanovení se pohybovala v rozmezí 72–116 %. Správných výsledků bylo dosaženo i pro prvky Ni, Co, As a Se, které jsou podle literatury [47, 142, 234] nejčastěji zatíženy interferencemi polyatomických iontů Ca. Shodnost stanovení byla vyhodnocena na základě analýzy obou referenčních materiálů třikrát během jednoho dne a byla lepší než 12 %. Detekční limity zohledňující přípravu vzorku byly dostatečné pro stanovení prvků v referenčních materiálech i v reálných vzorcích. Rhodium bylo vybráno jako porovnávací prvek k eliminaci nespektrálních interferencí. Metoda byla použita pro analýzu 21 kojeneckých sušených mlék. Získané výsledky byly zpracovány za využití exploratorní a diskriminační analýzy dat. Exploratorní analýza umožnila podrobné seznámení se strukturou dat, posouzení symetrie a špičatosti rozdělení, identifikaci odlehlých bodů, případných hrubých chyb, lokální koncentraci dat a ověření základních předpokladů, jako je normalita, nezávislost a homogenita. V rámci diskriminační analýzy byly sledovány možnosti klasifikace kojeneckých mlék podle země původu, výrobce či kategorie, v nichž jsou rozděleny i v reálné praxi (0-mléčná výživa pro nedonošené děti, 1-počáteční mléčná výživa, 2-pokračovací mléčná výživa, 3-mléčná výživa batolat). Jelikož zpracovatelé mléka pořizují v rámci EU syrové mléko z více zdrojů, nebylo možné usuzovat na souvislost mezi obsahem analyzovaných prvků a zemí původu. Navíc složení kojeneckých mlék je výrobcem upravováno, aby výrobky splnily nutriční požadavky kojence. Vzorky se podařilo úspěšně klasifikovat podle kategorie, přičemž zařazení objektů do tříd bylo 100 %. Naměřené koncentrace (Cd, Hg a Pb) nebyly v porovnání s limity danými legislativou v žádném vzorku překročeny. V dobré shodě s hodnotami deklarovanými výrobcem byly koncentrace prvků Ca, Zn, Mg a K, větší rozdíly způsobené nejspíše vlivem variability vstupních surovin používaných při výrobě byly nalezeny pro prvky Na, Cu a Se. Vypracovaná metoda umožňuje sledovat nejen toxikologicky významné či nutriční prvky, ale i analyty, které nejsou běžně analyzovány, rovněž může sloužit jako nástroj kontroly kvality vstupních surovin a celého procesu výroby.

Optimalizace přípravy vzorků biologického materiálu vydřích tkání probíhala s ohledem na unikátnost vzorku, požadavku archivace, konzervace a získání sušiny vzorku, k tomuto účelu byla zvolena lyofilizace. Následně byla provedena mikrovlnná mineralizace, kde byla snaha docílit použití minimálního množství činidel nutných pro rozklad vzorku. Tím bylo sníženo riziko kontaminace a došlo ke zlepšení LOD. Účinnost mikrovlnné mineralizace byla hodnocena na základě stanovení zbytkového uhlíku pomocí ICP-OES. Průchodnost vzorků

pro nádoby DAC-100S byla zvýšena využitím systému Multi Tube. Optimální podmínky lyofilizace a mikrovlnné mineralizace byly voleny na základě výsledků vyplývající z frakcionálního faktorového plánu. Lyofilizace byla provedena pro navážku 500 mg po dobu 24 hodin při tlaku 0,1 kPa. Jako optimální pro mikrovlnný rozklad 50 mg lyofilizovaných vydřích tkání byla určena teplota 200 °C po dobu 15 minut společně s 1 mL 65% HNO₃ a 1 mL 30% H₂O₂. Vliv způsobu přípravy vzorku a velikosti navážky byl sledován prostřednictvím výsledků stanovení Hg, kde analýza Hg byla vybrána pro svoji jednoduchost a rychlost. Rozdíl mezi homogenizovanými nebo nehomogenizovanými vzorky byl shledán dvoufaktorovou analýzou rozptylu ANOVA na hladině významnosti 0,05 jako nevýznamný ($p = 0,26$). Významný vliv na výsledky měla navážka vzorku, přičemž byl nalezen rozdíl mezi první (5 mg) a druhou navážkou (10 mg). Mezi druhou a třetí (15 mg) navážkou již významný rozdíl nebyl pozorován. Pro analýzu byla zvolena vždy navážka větší než 10 mg. S ohledem na časovou náročnost byly kompletní analýzy prováděny pouze pro vzorky vydřích jater. Přesnost stanovení vybraných prvků (Li, Ti, V, Mn, Ni, Co, Cu, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Zr, Ru, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Cs, Hf, Ta, W, Pt, Tl, Pb, Bi, Th, U, Mg, Na a Hg) ve vzorcích vydřích jater byly ověřeny na základě analýzy certifikovaného referenčního materiálu NIST 1577c Bovine Liver a vyhodnocení analytických návratností obohacených vzorků. Byla nalezena dobrá shoda mezi deklarovanými a naměřenými koncentracemi prvků certifikovaných v referenčním materiálu. Analytické návratnosti se pohybovaly v rozmezí od 85–107 %. Správné výsledky byly získány rovněž pro prvky, jako je Mn, Cu, As a Se, jejichž stanovení je pomocí kvadrupólového spektrometru problematické. Preciznost stanovení byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka a pro jednotlivé prvky byla nižší než 8 %. Data získaná analýzou 149 vzorků vydřích tkání byla zpracována exploratorní a faktorovou analýzou, která umožnila získání přesných odhadů míry polohy, stabilizaci rozptylu a zesymetričtění rozdělení. Na základě informací z průzkumové analýzy bylo přistoupeno k matematické transformaci dat. Použití dvou faktorů bylo dostačující pro vysvětlení více než 80 % variability v datech, největší vliv na tvorbu faktorů měly analyty Co, Sb, Re, Pt, Tl, Th a Pd, Hf, Ta, W. Kompletní informace o jednotlivých vydrách, jejichž tkáně byly analyzovány, není prozatím dostupná, v datech tedy nelze jednoznačně identifikovat či vyloučit souvislost mezi jedinci. Ze souboru vzorků vybočoval nejvíce vzorek č. 25 vysokou koncentrací V, Co, Ga, Cs, Pb, Th, Bi, Tl, Re, Ru, Ta, Pd, Hf a Pt. Nejvyšší koncentrace Hg byla nalezena ve vzorku vydry č. 366 (18,9 mg kg⁻¹), dále pak v jedinci č. 478 (18 mg kg⁻¹), tyto koncentrace nepřekračovaly pro vydry kritickou hodnotu Hg (30 mg kg⁻¹)

[259]. Vysoká koncentrace olova společně s nalezenou příčinou smrti poukazovala ve třech případech vyder (č. 421, 419 a 431) na otravu olovem [226].

V poslední části práce byly analyzovány vzorky suchých krmiv určených pro kočky a psy, které byly před analýzou podrobeny lyofilizaci a mikrovlnné mineralizaci. Cílem mikrovlnného rozkladu bylo vytvořit účinný a časově úsporný postup rozkladu vzorku s použitím zředěných kyselin a mikrovlnné mineralizace. Příprava vzorků byl jeden z možných kroků eliminace interferencí, kdy dojde ke zjednodušení a převedení některých složek matrice na méně interferující. Optimalizovány byly jednotlivé kroky přípravy vzorků a parametry analýzy ICP-OES a ICP-MS. Doba lyofilizace 24 hodin byla dostatečná pro získání sušiny vzorku. Zjištěno bylo, že obsah vody v původních vzorcích nepřesahoval 5 %. Byl vytvořen jednokrokový teplotní mikrovlnný program (220 °C, 25 min.), který společně s 30% (m/v) kyselinou dusičnou a 5% (m/v) peroxidem vodíku byl dostatečně účinný pro rozklady vzorků. Ve vzorcích bylo analyzováno 35 prvků (Mg, Na, K, P, Ca, Fe, Mn, Ba, Cu, Al a Zn, Hg, Li, V, Cr, Ni, Co, Ga, As, Se, Rb, Sr, Mo, Sb, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Th a U). Přesnost stanovení byla vyhodnocena na základě analýzy referenčního materiálu NIST 1577c Bovine Liver a analytických návratností obohacených vzorků. Mezi certifikovanými a naměřenými hodnotami koncentrací byla nalezena dobrá shoda. Analytické návratnosti měřených prvků se pohybovaly v rozmezí od 86–115 %. Data získaná analýzou 51 vzorků byla podrobena exploratorní, diskriminační a faktorové analýze. Za využití diskriminační analýzy se podařilo vzorky klasifikovat do 2 kategorií na kočičí a psí granule, jako znaky s dostatečnou diskriminující silou byly vybrány prvky Fe, Cr, Cs, Cu, Hg, Ba, Ca a P. Nalezeny byly funkce zařazení jednotlivých vzorků do dané kategorie, úspěšnost zařazení objektů do tříd byla 100 %. Z faktorové analýzy vyplynulo, že analyty důležité pro tvorbu faktoru 1 a 2 byly Al, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd a Hg, As, Se, Sr, u faktoru 3 pak V, Dy, Ho a Er, přičemž první dva faktory popisují více než 80 % variability v datech. Na základě faktorové analýzy nebyla nalezena jednoznačná souvislost mezi různými druhy krmiv, složením, značkami či kvalitou. Vzorek č. 57 vybočoval ze souboru vzorků nejvíce vysokou koncentrací Al, Cs, Ce, Pr, Nd, Eu, Gd, Th, Hg, V, Cr a Ni. Jednalo se o vzorek kočičích granulí se pstruhem a uzeným lososem americké značky. V souladu s dříve publikovanými daty [206] byla v řadě vzorků naměřena vyšší koncentrace U a Th, v našem případě větší než 0,1 mg kg⁻¹. Díky plně simultánnímu záznamu spektra spektrometrů ICP-oe-TOF-MS byly zjištěny vyšší koncentrace některých prvků (lanthanoidů, aktinoidů, Th a U), které nejsou na rozdíl od As a Hg běžně analyzovány.

6. Literatura

- [1] L. Husáková, I. Urbanová, L. Audrlická-Vavrušová, J. Šrámková, T. Černohorský, M. Bednaříková, L. Pilařová, *Microchim. Acta* **173**, (2011) 173.
- [2] L. Hendriks, A. Gundlach-Graham, B. Hattendorf, D. Gunther, *J. Anal. At. Spectrom.* **32**, (2017) 548.
- [3] GBC Scientific Equipment Pty. Ltd., *OptiMass 9600* [online].
<http://www.gbcsce.com/wp-content/uploads/2017/02/01-0875-05_Optimass9600.pdf>, citováno [4.7. 2017].
- [4] P.T. Anastas, M.M. Kirchhoff, *Acc. Chem. Res.* **35**, (2002) 686.
- [5] J.W. Olesik, *Anal. Chem.* **63**, (1991) 12A.
- [6] N. Jakubowski, T. Prohaska, L. Rottmann, F. Vanhaecke, *J. Anal. At. Spectrom.* **26**, (2011) 693.
- [7] L. Moens, N. Jakubowski, *Anal. Chem.* **70**, (1998) 251A.
- [8] H. Vanhoe, J. Goossens, L. Moens, R. Dams, *J. Anal. At. Spectrom.* **9**, (1994) 177.
- [9] E.H. Evans, J.J. Giglio, *J. Anal. At. Spectrom.* **8**, (1993) 1.
- [10] C.-S. Hsiung, J.D. Andrade, R. Costa, K.O. Ash, *Clin. Chem.* **43**, (1997) 2303.
- [11] R.F.J. Dams, J. Goossens, L. Moens, *Microchim. Acta* **119**, (1995) 277.
- [12] A.Y. Leykin, P.V. Yakimovich, *J. Anal. Chem.* **67**, (2012) 677.
- [13] A.A. Pupyshv, E.V. Semenova, *Spectrochim. Acta B* **56**, (2001) 2397.
- [14] A.L. Gray, *Spectrochim. Acta B* **41**, (1986) 151.
- [15] H.P. Longerich, B.J. Fryer, D.F. Strong, C.J. Kantipuly, *Spectrochim. Acta B* **42**, (1987) 75.
- [16] F. Vanhaecke, C. Vandecasteele, H. Vanhoe, R. Dams, *Microchim. Acta* **108**, (1992) 41.
- [17] W. Guo, S. Hu, J. Zhang, L. Jin, X. Wang, Z. Zhu, H. Zhang, *J. Anal. At. Spectrom.* **26**, (2011) 2076.
- [18] H. Louie, M. Wu, P. Di, P. Snitch, G. Chapple, *J. Anal. At. Spectrom.* **17**, (2002) 587.
- [19] J.C. Amarasiwardena, N. Lupoli, S. Korrick, H. Hu, V. Potula, *Analyst* **123**, (1998) 441.
- [20] Z. Chen, M. Megharaj, R. Naidu, *Talanta* **73**, (2007) 948.
- [21] C. Sariego Muniz, J. M. Marchante Gayon, J. Ignacio Garcia Alonso, A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, (1999) 1505.
- [22] I. Sánchez Trujillo, E. Vereda Alonso, A. García de Torres, J.M. Cano Pavón, *Microchem. J.* **101**, (2012) 87.
- [23] K.J. Mulligan, T.M. Davidson, J.A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.* **5**, (1990) 301.
- [24] A. T. Townsend, K. A. Miller, S. McLean, S. Aldous, *J. Anal. At. Spectrom.* **13**, (1998) 1213.
- [25] V.N. Epov, D. Lariviere, E.N. Epova, R.D. Evans, *Geostand. Geoanal. Res.* **28**, (2004) 213.
- [26] S.R. Bianchi, R.S. Amais, C.D. Pereira, R.F.S. Salazar, J.A. Nóbrega, A.R.A. Nogueira, *Anal. Lett.* **45**, (2012) 2845.
- [27] S. Stürup, R.B. Hayes, U. Peters, *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, (2005) 686.
- [28] L.L. Fialho, C.D. Pereira, J.A. Nóbrega, *Spectrochim. Acta B* **66**, (2011) 389.
- [29] B.L. Batista, J.L. Rodrigues, J.A. Nunes, V.C. de Oliveira Souza, F. Barbosa Jr, *Anal. Chim. Acta* **639**, (2009) 13.
- [30] I. Rodushkin, T. Ruth, D. Klockare, *J. Anal. At. Spectrom.* **13**, (1998) 159.
- [31] C. Agatemor, D. Beauchemin, *Anal. Chim. Acta* **706**, (2011) 66.
- [32] F.A.R. Martino, M.a.L.F. Sánchez, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* **442**, (2001) 191.
- [33] M.M. Kershisnik, R. Kalamegham, K.O. Ash, D.E. Nixon, E.R. Ashwood, *Clin. Chem.* **38**, (1992) 2197.

- [34] S.D. Tanner, V.I. Baranov, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, (1999) 1083.
- [35] D.W. Koppelaar, G.C. Eiden, C.J. Barinaga, *J. Anal. At. Spectrom.* **19**, (2004) 561.
- [36] S.D. Tanner, V.I. Baranov, D.R. Bandura, *Spectrochim. Acta B* **57**, (2002) 1361.
- [37] R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS*, Taylor and Francis Group New York, 2004, 0-8247-5319-4.
- [38] S. D'Illo, N. Violante, C. Majorani, F. Petrucci, *Anal. Chim. Acta* **698**, (2011) 6.
- [39] L. Balcaen, E. Bolea-Fernandez, M. Resano, F. Vanhaecke, *Anal. Chim. Acta* **894**, (2015) 7.
- [40] R.S. Amais, A. Virgilio, D. Schiavo, J.A. Nóbrega, *Microchem. J.* **120**, (2015) 64.
- [41] T. Prohaska, S. Hann, C. Latkoczy, G. Stingeder, *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, (1999) 1.
- [42] S. Becker, *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2007, 978-0-470-01200-0.
- [43] N. Jakubowski, L. Moens, F. Vanhaecke, *Spectrochim. Acta B* **53**, (1998) 1739.
- [44] A. Sarmiento-González, J.M. Marchante-Gayón, J.M. Tejerina-Lobo, J. Paz-Jiménez, A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, (2008) 2583.
- [45] J. Begerow, L. Dunemann, *J. Anal. At. Spectrom.* **11**, (1996) 303.
- [46] J. Begerow, M. Turfeld, L. Dunemann, *J. Anal. At. Spectrom.* **12**, (1997) 1095.
- [47] T. Prohaska, M. Watkins, C. Latkoczy, W.W. Wenzel, G. Stingeder, *J. Anal. At. Spectrom.* **15**, (2000) 365.
- [48] C. Moor, T. Lymberopoulou, V.J. Dietrich, *Microchim. Acta* **136**, (2001) 123.
- [49] F. Vanhaecke, L. Moens, R. Dams, I. Papadakis, P. Taylor, *Anal. Chem.* **69**, (1997) 268.
- [50] N.M. Reed, R.O. Cairns, R.C. Hutton, Y. Takaku, *J. Anal. At. Spectrom.* **9**, (1994) 881.
- [51] E. Marengo, M.C. Gennaro, C. Abrigo, *Anal. Chem.* **64**, (1992) 1885.
- [52] K.E. Murphy, S.E. Long, M.S. Rearick, O.S. Ertas, *J. Anal. At. Spectrom.* **17**, (2002) 469.
- [53] Y.-C. Sun, J. Mierzwa, C.-F. Lin, T. I. Yeh, M.-H. Yang, *Analyst* **122**, (1997) 437.
- [54] F. Ardini, E. Magi, M. Grotti, *Anal. Chim. Acta* **706**, (2011) 84.
- [55] M. Grotti, F. Soggia, F. Ardini, R. Frache, *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, (2009) 522.
- [56] G. Ertas, J.A. Holcombe, *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, (2005) 687.
- [57] X. Hou, B.T. Jones, *Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry*, Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2000, pp. 9468
- [58] P.P. Mahoney, S.J. Ray, G. Li, G.M. Hieftje, *Anal. Chem.* **71**, (1999) 1378.
- [59] M. Resano, M. Aramendia, F. Vanhaecke, *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, (2009) 484.
- [60] K.-C. Friese, U. Wätjen, K.-H. Grobecker, *Fresenius. J. Anal. Chem.* **370**, (2001) 843.
- [61] D.C. Grégoire, R.E. Sturgeon, *Spectrochim. Acta B* **48**, (1993) 1347.
- [62] K. Grünke, H.-J. Stärk, R. Wennrich, H.M. Ortner, J.A.C. Broekaert, *Fresenius. J. Anal. Chem.* **359**, (1997) 465.
- [63] R. E. Sturgeon, J. W. Lam, *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, (1999) 785.
- [64] H. Klinkenberg, T. Beeren, W. Van Borm, *Spectrochim. Acta B* **49**, (1994) 171.
- [65] J. Wang, E. Harald Hansen, B. Gammelgaard, *Talanta* **55**, (2001) 117.
- [66] M.a.S. Jiménez, R. Velarte, J.R. Castillo, *Spectrochim. Acta B* **57**, (2002) 391.
- [67] K. Benkhedda, H.G. Infante, F.C. Adams, E. Ivanova, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **21**, (2002) 332.
- [68] Z. Peng, H. Klinkenberg, T. Beeren, W. Van Borm, *Spectrochim. Acta B* **46**, (1991) 1051.
- [69] A.G. Coedo, M.T. Dorado, I. Padilla, *Spectrochim. Acta B* **60**, (2005) 73.
- [70] O. Vicente, A. Padró, L. Martinez, R. Olsina, E. Marchevsky, *Spectrochim. Acta B* **53**, (1998) 1281.
- [71] H.F. Maltez, M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, A.J. Curtius, E. Carasek, *Talanta* **74**, (2008) 586.
- [72] S. Liawruangrath, W. Som-aum, A. Townshend, *Talanta* **58**, (2002) 1177.

- [73] C. Vandecasteele, M. Nagels, H. Vanhoe, R. Dams, *Anal. Chim. Acta* **211**, (1988) 91.
- [74] F. Vanhaecke, H. Vanhoe, R. Dams, C. Vandecasteele, *Talanta* **39**, (1992) 737.
- [75] M. Mihaljevič, L. Strnad, O. Šebek, *Chem. Listy* **98**, (2004) 123.
- [76] J. O'Reilly, D. Douglas, J. Braybrook, P.W. So, E. Vergucht, J. Garrevoet, B. Vekemans, L. Vincze, H. Goenaga-Infante, *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, (2014) 1378.
- [77] S. Bürger, L.R. Riciputi, D.A. Bostick, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **274**, (2007) 491.
- [78] J. Lin, Y. Liu, Y. Yang, Z. Hu, *Solid Earth Sciences* **1**, (2016) 5.
- [79] P. Abbyad, J. Tromp, J. Lam, E. Salin, *J. Anal. At. Spectrom.* **16**, (2001) 464.
- [80] M.M. Cheatham, W.F. Sangrey, W.M. White, *Spectrochim. Acta B* **48**, (1993) 487.
- [81] V. Diaz Huerta, L. Hinojosa Reyes, J.M. Marchante-Gayon, M.L. Fernandez Sanchez, A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.* **18**, (2003) 1243.
- [82] T. Meisel, J. Moser, N. Fellner, W. Wegscheider, R. Schoenberg, *Analyst* **126**, (2001) 322.
- [83] K.G. Heumann, *Anal- Bioanal. Chem.* **378**, (2004) 318.
- [84] J. Heilmann, S.F. Boulyga, K.G. Heumann, *Anal- Bioanal. Chem.* **380**, (2004) 190.
- [85] R.S. Blissett, N.A. Rowson, *Fuel* **97**, (2012) 1.
- [86] E. Mulder, *Wate Manage.* **16**, (1996) 15.
- [87] A.A. Ramezani pour, *Cement Replacement Materials*, 1. vydání., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014, 978-3-642-36720-5.
- [88] V.C. Pandey, J.S. Singh, R.P. Singh, N. Singh, M. Yunus, *Resour. Conserv. Recy.* **55**, (2011) 819.
- [89] S. Motamedi, K.-I. Song, R. Hashim, *Mater. Struc.* **48**, (2015) 1061.
- [90] Z. Nalbantoğlu, *Constr. Build. Mater.* **18**, (2004) 377.
- [91] V.C. Pandey, N. Singh, *Agric. Ecosyst. Environ.* **136**, (2010) 16.
- [92] Z.T. Yao, X.S. Ji, P.K. Sarker, J.H. Tang, L.Q. Ge, M.S. Xia, Y.Q. Xi, *Earth-Sci. Rev.* **141**, (2015) 105.
- [93] T.R. Rautray, B. Behera, T. Badapanda, V. Vijayan, S. Panigrahi, *Indian J. Phys.* **83**, (2009) 543.
- [94] A. Stankova, N. Gilon, L. Dutruch, V. Kanicky, *J. Anal. At. Spectrom.* **26**, (2011) 443.
- [95] J.M. Lim, J.H. Jeong, J.H. Lee, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **298**, (2013) 201.
- [96] A. Stankova, N. Gilon, L. Dutruch, V. Kanicky, *Fuel* **89**, (2010) 3468.
- [97] S. Sushil, V.S. Batra, *Fuel* **85**, (2006) 2676.
- [98] M.A. Vieira, B. Welz, A.J. Curtius, *Spectrochim. Acta B* **57**, (2002) 2057.
- [99] T. Laitinen, H. Revitzer, M. Tolvanen, *Fresenius. J. Anal. Chem.* **354**, (1996) 436.
- [100] A. Iwashita, T. Nakajima, H. Takanashi, A. Ohki, Y. Fujita, T. Yamashita, *Fuel* **85**, (2006) 257.
- [101] A.K. Das, R. Chakraborty, M.d.l. Guardia, M.L. Cervera, D. Goswami, *Talanta* **54**, (2001) 975.
- [102] H. Lachas, R. Richaud, A. A. Herod, D. R. Dugwell, R. Kandiyoti, K. E. Jarvis, *Analyst* **124**, (1999) 177.
- [103] D.D. Link, H.M.S. Kingston, *Anal. Chem.* **72**, (2000) 2908.
- [104] R.N. Sah, P.H. Brown, *Plant Soil* **193**, (1997) 15.
- [105] R.N. Sah, P.H. Brown, *Microchem. J.* **56**, (1997) 285.
- [106] S. Mann, D. Geilenber, J. A. C. Broekaert, M. Jansen, *J. Anal. At. Spectrom.* **12**, (1997) 975.
- [107] S. Wu, Y.-H. Zhao, X. Feng, A. Wittmeier, *J. Anal. At. Spectrom.* **11**, (1996) 287.
- [108] N.M. Hassan, P.E. Rasmussen, E. Dabek-Zlotorzynska, V. Celis, H. Chen, *Water, Air, Soil Pollut.* **178**, (2007) 323.
- [109] H.-l. Xie, Y.-g. Tang, Y.-j. Li, L.-b. Li, *J. Cent. South Univ. T.* **14**, (2007) 68.
- [110] A. Krushevskaya, R.M. Barnes, *Analyst* **119**, (1994) 131.

- [111] X. Li, S. Dai, W. Zhang, T. Li, X. Zheng, W. Chen, *Int. J. Coal Geol.* **124**, (2014) 1.
- [112] J. Wang, T. Nakazato, K. Sakanishi, O. Yamada, H. Tao, I. Saito, *Anal. Chim. Acta* **514**, (2004) 115.
- [113] M. Bettinelli, S. Spezia, U. Baroni, G. Bizzarri, *At. Spectrosc.* **19**, (1998) 73.
- [114] E. Coni, B. Bocca, B. Galoppi, A. Alimonti, S. Caroli, *Microchem. J.* **67**, (2000) 187.
- [115] A. Oskarsson, I. Palminger Hallen, J. Sundberg, K. Petersson Grawe, *Analyst* **123**, (1998) 19.
- [116] N. Yamawaki, M. Yamada, T. Kan-no, T. Kojima, T. Kaneko, A. Yonekubo, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **19**, (2005) 171.
- [117] T.G. Kazi, N. Jalbani, J.A. Baig, H.I. Afridi, G.A. Kandhro, M.B. Arain, M.K. Jamali, A.Q. Shah, *Food Chem. Toxicol.* **47**, (2009) 1425.
- [118] A. Sorbo, A.C. Turco, M. Di Gregorio, L. Ciaralli, *Food Control* **44**, (2014) 159.
- [119] K. Ljung, B. Palm, M. Grandér, M. Vahter, *Food Chem.* **127**, (2011) 943.
- [120] M. Pandelova, W.L. Lopez, B. Michalke, K.-W. Schramm, *J Food Comp. Anal.* **27**, (2012) 120.
- [121] Z. Abdel-Salam, J. Al Sharnoubi, M.A. Harith, *Talanta* **115**, (2013) 422.
- [122] G.V. Pashkova, *Food Anal. Method* **2**, (2009) 303.
- [123] N. Ozbek, S. Akman, *Food Addit. Contam. Part A* **29**, (2012) 208.
- [124] A.S. Silva, G.C. Brandao, G.D. Matos, S.L.C. Ferreira, *Talanta* **144**, (2015) 39.
- [125] R. Honda, K. Tawara, M. Nishijo, H. Nakagawa, K. Tanebe, S. Saito, *Toxicology* **186**, (2003) 255.
- [126] S. Saracoglu, K.O. Saygi, O.D. Uluozlu, M. Tuzen, M. Soylak, *Food Chem.* **105**, (2007) 280.
- [127] I. Machado, G. Bergmann, M. Pistón, *Food Chem.* **194**, (2016) 373.
- [128] S.B. Yaşar, E.K. Baran, F. Tokay, *Spectrosc. Lett.* **46**, (2013) 100.
- [129] J.S.F. Pereira, L.S.F. Pereira, L. Schmidt, C.M. Moreira, J.S. Barin, E.M.M. Flores, *Microchem. J.* **109**, (2013) 29.
- [130] A. Ikem, A. Nwankwoala, S. Oduyungbo, K. Nyavor, N. Egiebor, *Food Chem.* **77**, (2002) 439.
- [131] P.J. McKinsty, H.E. Indyk, N.D. Kim, *Food Chem.* **65**, (1999) 245.
- [132] A. Lesniewicz, A. Wroz, A. Wojcik, W. Zyrnicki, *J Food Comp. Anal.* **23**, (2010) 424.
- [133] D.C.M.B. Santos, L.S.B. Carvalho, D.C. Lima, D.J. Leão, L.S.G. Teixeira, M.G.A. Korn, *J Food Comp. Anal.* **34**, (2014) 75.
- [134] M. Ahmed, A. Khaleeq, R. Huma, M.A. Qadir, M.I. Shafiq, A. Israr, A. Ali, S. Shahzad, *Food Anal. Method* **9**, (2016) 2933.
- [135] I. López-García, P. Viñas, R. Romero-Romero, M. Hernández-Córdoba, *Anal. Chim. Acta* **597**, (2007) 187.
- [136] A. Gürbay, M. Charehsaz, A. Eken, A. Sayal, G. Girgin, M. Yurdakök, Ş. Yiğit, D.D. Erol, G. Şahin, A. Aydın, *Biol. Trace Elem. Res.* **149**, (2012) 117.
- [137] P. Licata, D. Trombetta, M. Cristani, F. Giofrè, D. Martino, M. Calò, F. Naccari, *Environ. Int.* **30**, (2004) 1.
- [138] N. Khan, I.S. Jeong, I.M. Hwang, J.S. Kim, S.H. Choi, E.Y. Nho, J.Y. Choi, B.-M. Kwak, J.-H. Ahn, T. Yoon, K.S. Kim, *Food Chem.* **141**, (2013) 3566.
- [139] N. Mohd-Taufek, D. Cartwright, M. Davies, A.K. Hewavitharana, P. Koorts, P.N. Shaw, R. Sumner, E. Lee, K. Whitfield, *Food Anal. Method* **9**, (2016) 2068.
- [140] E.I. Muller, J.P. Souza, C.C. Muller, A.L.H. Muller, P.A. Mello, C.A. Bizzi, *Talanta* **156–157**, (2016) 232.
- [141] S.M. Azcarate, M. Savio, P. Smichowski, L.D. Martinez, J.M. Camiña, R.A. Gil, *Talanta* **143**, (2015) 64.

- [142] L. Husáková, I. Urbanová, J. Šrámková, M. Konečná, J. Bohuslavová, *Talanta* **106**, (2013) 66.
- [143] S. Dubascoux, M. Nicolas, C.F. Rime, J.R. Payot, E. Poitevin, J. AOAC Int. **98**, (2015) 953.
- [144] P. Cava-Montesinos, M.L. Cervera, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* **531**, (2005) 111.
- [145] S. D'Ilio, F. Petrucci, M. D'Amato, M. Di Gregorio, O. Senofonte, N. Violante, *Anal. Chim. Acta* **624**, (2008) 59.
- [146] S. Fernández-Menéndez, M.L. Fernández-Sánchez, B. Fernández-Colomer, R.R. de la Flor St. Remy, G.D.C. Cotallo, A.S. Freire, B.F. Braz, R.E. Santelli, A. Sanz-Medel, *J. Chromatogr. A* **1428**, (2016) 246.
- [147] N. Zand, B.Z. Chowdhry, F.B. Zotor, D.S. Wray, P. Amuna, F.S. Pullen, *Food Chem.* **128**, (2011) 123.
- [148] V. Höllriegl, M. González-Estecha, E.M. Trasobares, A. Giussani, U. Oeh, M.A. Herraiz, B. Michalke, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **24**, (2010) 193.
- [149] J. Grzunov LetiniĹ, M. Matek SariĹ, M. Piasek, J. JurasoviĹ, V.M. Varnai, A. Sulimanec Grgec, T. Orct, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **38**, (2016) 117.
- [150] R. Melø, K. Gellein, L. Evje, T. Syversen, *Food Chem. Toxicol.* **46**, (2008) 3339.
- [151] N. Herwig, K. Stephan, U. Panne, W. Pritzkow, J. Vogl, *Food Chem.* **124**, (2011) 1223.
- [152] N. Khan, I.S. Jeong, I.M. Hwang, J.S. Kim, S.H. Choi, E.Y. Nho, J.Y. Choi, K.S. Park, K.S. Kim, *Food Chem.* **147**, (2014) 220.
- [153] H.J. Reid, A.A. Bashammakh, P.S. Goodall, M.R. Landon, C. O'Connor, B.L. Sharp, *Talanta* **75**, (2008) 189.
- [154] D. Huynh, S.J. Zhou, R. Gibson, L. Palmer, B. Muhlhausler, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **29**, (2015) 75.
- [155] M.L. Fernández-Sánchez, R.R. de la Flor St. Remy, H.G. Iglesias, J.B. López-Sastre, B. Fernández-Colomer, D. Pérez-Solís, A. Sanz-Medel, *Microchem. J.* **105**, (2012) 108.
- [156] R.S. Picoloto, M. Doneda, E.L.M. Flores, M.F. Mesko, E.M.M. Flores, P.A. Mello, *Spectrochim. Acta B* **107**, (2015) 86.
- [157] S. Takahashi, I. Takahashi, H. Sato, Y. Kubota, S. Yoshida, Y. Muramatsu, *Lab. Anim.* **34**, (2000) 97.
- [158] S. Kang, J.-H. Kang, S. Kim, S.H. Lee, S. Lee, H.J. Yu, S.-J. Oh, J.-D. Park, K.-H. Nam, S.Y. Han, J.-D. Lim, D.-Y. Ryu, *Ecotoxicology* **24**, (2015) 1064.
- [159] S.M. Strom, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **54**, (2008) 546.
- [160] Q. Li, H. Liu, M. Alattar, S. Jiang, J. Han, Y. Ma, C. Jiang, *Sci. Rep.* **5**, (2015) 16936.
- [161] Perkin Elemer, Inc., *Determination of Copper and Iron in Liver Tissue Using the ELAN DRC ICP-MS* [online].
<<http://icpms.kocaeli.edu.tr/yuklemeler/Karaci%20dokusunda%20bak%C4%B1r%20ve%20demir%20analizi.pdf>>, citováno [21.11. 2016].
- [162] J. Locke, *Anal. Chim. Acta* **104**, (1979) 225.
- [163] J.K. Friel, C.S. Skinner, S.E. Jackson, H.P. Longerich, *Analyst* **115**, (1990) 269.
- [164] E. Kalisinska, N. Lanocha-Arendarczyk, D. Kosik-Bogacka, H. Budis, B. Pilarczyk, A. Tomza-Marciniak, J. Podlasinska, L. Cieslik, M. Popiolek, A. Pirog, E. Jedrzejewska, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **136**, (2017) 24.
- [165] A.C. Gutleb, A. Kranz, G. Nechay, A. Toman, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**, (1998) 273.
- [166] R.G. Treble, T.S. Thompson, H.R. Lynch, *BioMetals* **11**, (1998) 49.
- [167] A. Kotulanová, J. Komárek, *Acta Chim. Slov.* **49**, (2002) 437.
- [168] I. Varga, Á. Szebeni, N. Szoboszlai, B. Kovács, *Anal- Bioanal. Chem.* **383**, (2005) 476.

- [169] M. Costas, I. Lavilla, S. Gil, F. Pena, I. de la Calle, N. Cabaleiro, C. Bendicho, *Anal. Chim. Acta* **679**, (2010) 49.
- [170] I. La Calle, M. Costas, N. Cabaleiro, I. Lavilla, C. Bendicho, *Spectrochim. Acta B* **67**, (2012) 43.
- [171] S. Zimmermann, C.M. Menzel, Z. Berner, J.-D. Eckhardt, D. Stüben, F. Alt, J. Messerschmidt, H. Taraschewski, B. Sures, *Anal. Chim. Acta* **439**, (2001) 203.
- [172] Z. Pedrero, S. Mounicou, M. Monperrus, D. Amouroux, J. Anal. At. Spectrom. **26**, (2011) 187.
- [173] P. Zhang, C. Chen, M. Horvat, R. Jaćimović, I. Falnoga, M. Logar, B. Li, J. Zhao, Z. Chai, *Anal- Bioanal. Chem.* **380**, (2004) 773.
- [174] M. Vihnanek Lazarus, A. Sekovanić, Z. Kljaković-Gašpić, T. Orct, J. Jurasović, J. Kusak, S. Reljić, Đ. Huber, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **64**, (2013) 395.
- [175] S. Foster, W. Maher, F. Krikowa, S. Apte, *Talanta* **71**, (2007) 537.
- [176] E. Uchino, K. Jin, T. Tsuzuki, K. Inoue, *Analyst* **112**, (1987) 291.
- [177] G. Adams, *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Human Press, Totowa, Mew Jersey, 2007, 978-1-58829-377-0.
- [178] B.W. Schafer, C.Q. Cai, S.K. Embrey, R.A. Herman, P. Song, *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* **19**, (2008) 348.
- [179] P.A. Bolla, M.d.l.A. Serradell, P.J.d. Urraza, G.L.D. Antoni, *J. Dairy Res.* **78**, (2010) 15.
- [180] A.A. Leirner, V. Tattini, R.N.M. Pitombo, *Artificial Organs* **33**, (2009) 221.
- [181] H. Nygren, K. Börner, P. Malmberg, E. Tallarek, B. Hagenhoff, *Microscopy Research and Technique* **68**, (2005) 329.
- [182] Y. Wu, M. Wu, Y. Zhang, W. Li, Y. Gao, Z. Li, Z. Wang, G. Lubec, C. Zhang, *Amino Acids* **43**, (2012) 1383.
- [183] Y. Miyamoto-Shinohara, F. Nozawa, J. Sukenobe, T. Imaizumi, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**, (2010) 107.
- [184] I.R. Miksa, C.L. Buckley, N.P. Carpenter, R.H. Poppenga, *J. Vet. Diagn. Invest.* **17**, (2005) 331.
- [185] L.H. Reyes, J.L.G. Mar, G.M.M. Rahman, B. Seybert, T. Fahrenholz, H.M.S. Kingston, *Talanta* **78**, (2009) 983.
- [186] X. Cominos, S. Athanaselis, A. Dona, A. Koutselinis, *Forensic Sci. Inter.* **118**, 43.
- [187] B. Beneš, K. Jakubec, J. Šmíd, V. Spěváčková, *Biol. Trace Elem. Res.* **75**, (2000) 195.
- [188] L. Schmidt, C.A. Bizzi, F.A. Duarte, V.L. Dressler, E.M.M. Flores, *Microchem. J.* **108**, (2013) 53.
- [189] J. Djedjibegovic, T. Larssen, A. Skrbo, A. Marjanović, M. Sober, *Food Chem.* **131**, (2012) 469.
- [190] E. Engström, A. Stenberg, S. Senioukh, R. Edelbro, D.C. Baxter, I. Rodushkin, *Anal. Chim. Acta* **521**, (2004) 123.
- [191] S. Sobhanardakani, L. Tayebi, A. Farmany, M. Cheraghi, *Environ. Monit. Assess.* **184**, (2012) 6607.
- [192] R. Rahil-Khazen, B.J. Bolann, A. Myking, R.J. Ulvik, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **16**, (2002) 15.
- [193] R. Rahil-Khazen, B.J. Bolann, R.J. Ulvik, *BioMetals* **15**, (2002) 87.
- [194] M. Quintana, A.D. Klouda, A. Gondikas, M. Ochsenkühn-Petropoulou, B. Michalke, *Anal. Chim. Acta* **573–574**, (2006) 172.
- [195] D.V. Vayenas, M. Repanti, A. Vassilopoulos, D.A. Papanastasiou, *Int. J. Clin. Lab. Res.* **28**, (1998) 183.
- [196] K.S. Ferreira, W.A. Ferreira, J.M.M. Gomes, J.D. Correa-Júnior, C.L. Donnici, J.B.B. da Silva, *Microchem. J.* **124**, (2016) 350.

- [197] M.-M. Pornwilard, R. Weiskirchen, N. Gassler, A.K. Bosserhoff, J.S. Becker, *PLoS One* **8**, (2013) e58702.
- [198] J.S. Becker, A. Matusch, C. Palm, D. Salber, K.A. Morton, J. Susanne Becker, *Metallomics* **2**, (2010) 104.
- [199] C.N. Ferrarello, J. Ruiz Encinar, G. Centineo, J.I. Garcia Alonso, M.R. Fernandez de la Campa, A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.* **17**, (2002) 1024.
- [200] J. Griboff, D.A. Wunderlin, M.V. Monferran, *Microchem. J.* **130**, (2017) 236.
- [201] K. Jurowski, S. Walas, W. Piekoszewski, *Talanta* **115**, (2013) 195.
- [202] S.M. Monk, S.M. Lev, *J. Anal. At. Spectrom.* **28**, (2013) 274.
- [203] E.R. Gatiatulina, E.V. Popova, V.S. Polyakova, A.A. Skalnaya, E.F. Agletdinov, A.A. Nikonorov, A.V. Skalny, A.A. Tinkov, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **39**, (2017) 91.
- [204] J. Nriagu, M. Boughanen, A. Linder, A. Howe, C. Grant, R. Rattray, M. Vutchkov, G. Lalor, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **72**, (2009) 564.
- [205] S. Takahashi, I. Takahashi, H. Sato, Y. Kubota, S. Yoshida, Y. Muramatsu, *Biol. Trace Elem. Res.* **80**, (2001) 145.
- [206] R. Obenaus, L. Ernyei, R. Thomas, P. Atkins, W. Driscoll, *Spectroscopy* **26**, (2011).
- [207] C.A. Brown, K.-S. Jeong, R.H. Poppenga, B. Puschner, D.M. Miller, A.E. Ellis, K.-I. Kang, S. Sum, A.M. Cistola, S.A. Brown, *J. Vet. Diagn. Invest.* **19**, (2007) 525.
- [208] E. McCurdy, W. Proper, *Spectroscopy* **29**, (2014).
- [209] J. Søndergaard, G. Asmund, M.M. Larsen, *MethodsX* **2**, (2015) 323.
- [210] A. Luippold, M.S. Gustin, *Anim. Feed Sci. Tech.* **222**, (2016) 190.
- [211] A. Duran, M. Tuzen, M. Soylak, *Food Chem. Toxicol.* **48**, (2010) 2833.
- [212] S.S.L. da Costa, A.C. Lima Pereira, E. Andrade Passos, J.d.P. Hora Alves, C.A. Borges Garcia, R.G. Oliveira Araujo, *Talanta* **108**, (2013) 157.
- [213] D. Pick, M. Leiterer, J.W. Einax, *Microchem. J.* **95**, (2010) 315.
- [214] V. Dufailly, L. Noël, T. Guérin, *Anal. Chim. Acta* **611**, (2008) 134.
- [215] A. Kadar, L. Noël, R. Chekri, C. Vastel, S. Millour, T. Guérin, *Talanta* **85**, (2011) 2605.
- [216] E. Chevallier, R. Chekri, J. Zinck, T. Guérin, L. Noël, *J Food Comp. Anal.* **41**, (2015) 35.
- [217] N. Bilandžić, M. Sedak, M. Đokić, I. Varenina, B. Solomun Kolanović, Đ. Božić, M. Brstilo, B. Šimić, *J Food Comp. Anal.* **35**, (2014) 61.
- [218] E.P. Nardi, F.S. Evangelista, L. Tormen, T.D. Saint Pierre, A.J. Curtius, S.S.d. Souza, F. Barbosa Jr, *Food Chem.* **112**, (2009) 727.
- [219] O. Reykdal, S. Rabieh, L. Steingrimsdottir, H. Gunnlaugsdottir, *J Food Comp. Anal.* **24**, (2011) 980.
- [220] W. Guo, S. Hu, J. Zhao, S. Jin, W. Liu, H. Zhang, *Microchem. J.* **97**, (2011) 154.
- [221] V. Dufailly, L. Noël, T. Guérin, *Anal. Chim. Acta* **565**, (2006) 214.
- [222] T. Černohorský, A. Krejčová, M. Pouzar, L. Vavrušová, *Food Chem.* **106**, (2008) 1246.
- [223] A. Krejčová, T. Černohorský, D. Meixner, *Food Chem.* **105**, (2007) 242.
- [224] A.M. Nunes, R.A. de Sousa, C.S. da Silva, R.R.A. Peixoto, M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, S. Cadore, *J Food Comp. Anal.* **32**, (2013) 1.
- [225] N. Gerber, R. Brogioli, B. Hattendorf, M.R.L. Scheeder, C. Wenk, D. Günther, *animal* **3**, (2009) 166.
- [226] ALKA Wildlife, o.p.s., *Vydra říční* [online]. <<http://www.alkawildlife.eu/>>, citováno [23.1. 2017].
- [227] Berghof GmbH, *Speedwave MWS-3+* [online]. <http://www.onlinecas.com/Berghof/Telechargement_cata_berghof/Micro-onde_%20MWS3+/Catal_MWS3+_pdf/MWS-3+_documentation_en.pdf>, citováno [16.1. 2017].

- [228] Berghof GmbH, *MultiTube system for DAC-100* [online]. <http://www.onlinecas.com/Berghof/CATALOGUE%20BERGHOF/Micro-onde%20MWS3+/Catal_MWS3+_pdf/MTS_DAC-100_PT_en.pdf>, citováno [26.1. 2017].
- [229] R.E. Sturgeon, J.W.H. Lam, A. Saint, J. Anal. At. Spectrom. **15**, (2000) 607.
- [230] SensAA [online]. <<http://www.satia.com.ar/pdf/sensaa.pdf>>, citováno [13.3. 2017].
- [231] GBC Scientific Equipment, *Integra XL* [online]. <<http://www.gbcscientific.com/brochures/01082901.pdf>>, citováno [26.1. 2017].
- [232] L. Husakova, I. Urbanova, T. Sidova, T. Mikysek, Analytical Methods **7**, (2015) 5019.
- [233] K. Neubauer, U. Völlkopf, At. Spectrosc. **20**, (1999) 64.
- [234] M.G. Minnich, D.C. Miller, P.J. Parsons, Spectrochim. Acta B **63**, (2008) 389.
- [235] K. Swami, C.D. Judd, J. Orsini, K.X. Yang, L. Husain, Fresenius. J. Anal. Chem. **369**, (2001) 63.
- [236] E.G. Rakov, E.I. Mel'nichenko, Russ. Chem. Rev. **53**, (1984) 851.
- [237] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, Å. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, Chemom. Intell. Lab. Syst. **42**, (1998) 3.
- [238] J. Sucharová, I. Suchara, Anal. Chim. Acta **576**, (2006) 163.
- [239] ČSN ISO 5725: *Přesnost (správnost a shodnost) metod a výsledků měření* [online]. <<https://web.natur.cuni.cz/~sevcik/csn5725.htm>>, citováno [6.3. 2017].
- [240] W. Guo, S. Hu, Y. Wang, L. Zhang, Z. Hu, J. Zhang, Microchem. J. **108**, (2013) 106.
- [241] D.R. Lide, H.P.R. Frederikse, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 75. vydání., CRC, Boca Raton 1994.
- [242] J. G. K. Ševčík, *Přesnost (správnost a shodnost) metod a výsledků měření* [online]. <<http://web.natur.cuni.cz/~sevcik/csn5725.htm>>, citováno [9.7.2014].
- [243] M. Meloun, J. Militký, *Kompendium statistického zpracování dat*, 3. vydání., Karolinum Praha, 2012, 978-80-246-2196-8.
- [244] M. Meloun, J. Militký, *Interaktivní statistická analýza dat*, 3. vydání., Karolinum, Praha, 2012, 978-80-246-2173-9.
- [245] *Vyhláška č. 305/2004 Sb.* [online]. <www.szpi.gov.cz/ViewFile.aspx?docid=1006044>, citováno [29.3. 2017].
- [246] *Nářízení Evropské komise 2015/1006 ze dne 25. června 2015* [online]. <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1456411225457&uri=CELEX:32015R1006>>, citováno [29.3. 2017].
- [247] *Nářízení Evropské komise č. 488/2014 ze dne 12. května 2014* [online]. <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32014R0488&from=EN>>, citováno [29.3. 2017].
- [248] C.F. Mason, S.M. Macdonald, Ambio **33**, (2004) 148.
- [249] Mezinárodní svaz ochrany přírody, *Lutra lutra* [online]. <<http://www.iucnredlist.org/details/12419/0>>, citováno [18.1. 2017].
- [250] L. Poledník, K. Poledníková, J. Větrovcová, V. Hlaváč, V. Beran, Lynx **42**, (2011) 145.
- [251] E. Solgi, S.M. Ghasempouri, A.E. Sari, Ecopersia **1**, (2013) 1.
- [252] C.F. Mason, S.M. Macdonald, Chemosphere **17**, (1988) 1159.
- [253] C.F. Mason, A.B. Madsen, Chemosphere **25**, (1992) 865.
- [254] A. Mazet, G. Keck, P. Berny, Chemosphere **61**, (2005) 810.
- [255] L.A. Walker, A.J. Lawlor, E.A. Chadwick, E. Potter, M.G. Pereira, R.F. Shore, *Inorganic elements in the livers of Eurasian otters, Lutra lutra, from England and Wales in 2009 - a Predatory Bird Monitoring Scheme (PBMS) report* [online]. <http://nora.nerc.ac.uk/14176/1/PBMS_Metals_Otters_2009.pdf>, citováno [18.1. 2017].
- [256] J. Lanszki, L. Sugár, E. Orosz, D. Nagy, Acta Zool. Acad. Sci. Hung. **54**, (2008) 201.
- [257] A. Roos, E. Greyerz, M. Olsson, F. Sandegren, Environ. Pollut. **111**, (2001) 457.

- [258] K. Poledníková, L. Poledník, V. Beran, T. Mináriková, V. Hlaváč, J. Větrovcová, L. Husáková, J. Vadlejš, E. Bártová, P. Hájková, *Sběr a analýzy zhynulých vyder v České republice*, Conference Name, Conference Location (2017).
- [259] J. Lanszki, E. Orosz, L. Sugár, *Chemosphere* **74**, (2009) 741.
- [260] C. Lemarchand, R. Rosoux, P. Berny, *Chemosphere* **80**, (2010) 1120.
- [261] H. Hyvärinen, P. Tyni, P. Nieminen, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **70**, (2003) 0278.
- [262] M. Lodenius, U. Skarén, P. Hellstedt, E. Tulisalo, *Environ. Monit. Assess.* **186**, (2014) 325.
- [263] C.F. Mason, A. Stephenson, *Chemosphere* **44**, (2001) 351.
- [264] J. Ruiz-Olmo, L. Lafontaine, C. Prignioni, J.M. López-Martín, M. Santos-Reis, *Pollution and its effects on otter populations in South-western Europe*, First Otter Toxicology Conference, Isle of Skye, Skotsko (2000).
- [265] M.d.G. Andrade Korn, E.S. da Boa Morte, D.C.M. Batista dos Santos, J.T. Castro, J.T.P. Barbosa, A.P. Teixeira, A.P. Fernandes, B. Welz, W.P.C. dos Santos, E.B.G. Nunes dos Santos, M. Korn, *Appl. Spectrosc. Rev.* **43**, (2008) 67.
- [266] L. Husáková, I. Urbanová, J. Šrámková, T. Černohorský, A. Krejčová, M. Bednaříková, E. Frýdová, I. Nedělková, L. Pilařová, *Food Chem.* **129**, (2011) 1287.
- [267] *Nářízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003* [online]. <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=en>>, citováno [16.5. 2017].
- [268] *Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002* [online]. <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32002L0032>>, citováno [16.5. 2017].
- [269] The European Pet Food Industry Federation, *Nutritional Guidelines* [online]. <<http://www.fediaf.org/self-regulation/nutrition/>>, citováno [16.5.2017 2017].
- [270] K. Srogi, *Anal. Lett.* **40**, (2007) 199.
- [271] V. Fernandez-Perez, L.E. Garcia-Ayuso, M.D. Luque de Castro, *Analyst* **125**, (2000) 317.
- [272] L. Husáková, I. Urbanová, M. Šafránková, T. Šídová, *Talanta* **175**, (2017) 93.

Seznam publikací a odborných příspěvků

Publikace v mezinárodních odborných časopisech:

1. Husáková L., Urbanová I., Šídová T., Mikysek T.: Multi-elemental analysis of sulfuric acid by oaTOF-ICP-MS after matrix modification with barium bromide. *Analytical Methods* 7 (2015) 5019. ISSN: 1759-9660.
2. Husáková L., Urbanová I., Cahová T., Šídová T., Faltys T., Šrámková J.: Evaluation of ammonium fluoride for quantitative microwave-assisted extraction of silicon and boron from different solid samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 95 (2015) 922. ISSN: 0306-7319.
3. Husáková L., Urbanová I., Šafránková M., Šídová T.: Slurry sampling high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry for direct beryllium determination in soil and sediment samples after elimination of SiO interference by least-squares background correction. *Talanta* 175 (2017) 93. ISSN: 0039-9140.
4. Husáková L., Urbanová I., Šídová T., Šafránková M.: Simultaneous determination of 11 elements in fly ash by oaTOF-ICP-MS after closed-vessel microwave-assisted extraction with ammonium fluoride. *Journal of Analytical Chemistry* (2017). (V recenzním řízení)

Příspěvky prezentované na mezinárodních vědeckých konferencích:

1. Šídová T., Husáková L., Urbanová I., Šrámková J.: Matrix modification for overcoming the spectral effects during oTOF-ICP-MS analysis of sulfuric acid. *21th Young Investigators' Seminar on Analytical Chemistry 2014*. Univerzita Pardubice 2014. ISBN 978-80-7395-810-7. s.40. 25.6.–28.6.2014, Pardubice, Česká Republika. (Přednáška)
2. Šídová T., Husáková L., Urbanová I.: Multi-element analysis of fly ash samples by oTOF-ICP-MS after microwave assisted extraction with NH₄F. *22nd Young Investigators Seminar on Analytical Chemistry 2015*. University of Łódź, 2015. ISBN 978-83-6125-44-8. s. 44. 30.6.–4.7.2015, Łódź, Posko. (Přednáška)

3. Šídová T., Husáková L., Urbanová I.: Optimization of microwave-assisted extraction for fly ash elemental composition determination by oa-TOF-ICP-MS. *European Symposium on Atomic Spectrometry ESAS 2016*. Hungarian Chemical Society, 2016. ISBN 978-963-9970-65-6. s. 149. 31.3.–2.4.2016, Eger, Maďarsko. (Poster)

Publikace v národních odborných časopisech:

1. Venclová J., Husáková L., Šídová t., Urbanová I.: Multiprvková analýza náhradní kojenecké výživy. *Czech chemical society symposium series 15 (2017) 95*. ISSN 2336-7210.

Příspěvky prezentované na národních vědeckých konferencích:

1. Šídová T., Husáková L., Urbanová I., Šrámková J.: Multielementární analýza kyseliny sírové metodou TOF-ICP-MS. *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVI*. Univerzita Pardubice, 2014. ISBN 978-80-7395-821-3. s. 101. 9.–11.4.2014, Mladkov-Petrovičky. (Přednáška)
2. Nováková L., Husáková L., Urbanová I., Šídová T., Beran V., Poledník L., Poledníková K., Šrámková J.: Využití frakcionálního faktorového plánování a exploratorní analýzy dat při optimalizaci přípravy vzorku a stanovení rtuti ve vzorcích jater, kostí a tuku vyder říčních termooxidační metodou. *Soutěž o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie o cenu Karla Štulíka*. Ostrava: Ostravská univerzita, 2015. ISBN 978-80-7464-362-0. s. 125 Ostrava. 4.–5.2.2015, Ostrava. (Přednáška)
3. Šídová T., Husáková L., Urbanová I., Cahová T., Šrámková J.: Optimalizace mikrovlnné extrakce vzorků životního prostředí pro potřeby stanovení Si a B vybranými metodami atomové spektrometrie. *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVII*. Univerzita Pardubice, 2015. ISBN 978-80-7395-926-5. s. 89. 8.–10.4.2015, Mladkov-Petrovičky. (Přednáška)
4. Šafránková M., Husáková L., Šídová T., Urbanová I.: Stanovení Be ve vzorcích půd a sedimentů metodou HR-CS-ET-AAS. *Monitorování cizorodých látek v životním prostředí XVIII*. Univerzita Pardubice, 2016. ISBN 978-80-7560-005-9. s. 149. 30.3.–1.4.2016, Mladkov-Petrovičky. (Příspěvek ve sborníku)

5. Šídová T., Husáková L., Urbanová I.: Development of a simple and fast microwave-assisted extraction method for trace element determination in fly ash samples using inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, *68. sjezd chemiků*, Česká společnost chemická, 2016. ISSN: 2336-7202. s. 282. 4.–7.9.2016, Praha. (Přednáška)
6. Husáková L., Šafránková M., Urbanová I., Šídová T.: The use of fractional factorial design for optimization of direct determination of Be in soil and sediment samples by HR-CS-ET-AAS with slurry sampling, *68. sjezd chemiků*, Česká společnost chemická, 2016. ISSN: 2336-7202. s. 281. 4.–7.9.2016, Praha. (Přednáška)

Přílohy

Příloha 1: Spektrální interference pozorované při analýze roztoků hlavních matričních prvků pomocí ICP-oe-TOF-MS

Matriční prvek	Interferovaný izotop	Polyatomický iont	Koncentrace matričního prvku (mg L ⁻¹)							
			25	50	100	200	400	600	800	1000
			Falešně pozitivní signál (µg L⁻¹)							
Na	⁶² Ni ⁺	²³ Na ²³ Na ¹⁶ O ⁺	2,2	2,4	3,3	4,7	7,4	13,6	39,2	30,5
	⁶³ Cu ⁺	⁴⁰ Ar ²³ Na ⁺	0,6	0,7	0,9	1,6	3,1	5,6	11,4	11,4
K	⁵⁵ Mn ⁺	³⁹ K ¹⁶ O ⁺	0,6	0,6	0,6	0,8	1,0	1,3	1,6	1,7
	⁷⁴ Ge ⁺	³⁹ K ³⁵ Cl ⁺	0,7	0,7	1,2	1,4	2,0	2,6	3,5	3,7
	⁷⁸ Se ⁺	⁴¹ K ³⁷ Cl ⁺	0,8	1,1	2,2	3,1	4,2	5,4	6,5	7,5
Ca	⁹⁵ Mo ⁺	⁴⁰ Ar ³⁹ K ¹⁶ O ⁺	0,7	0,8	1,5	1,9	5,8	12,9	18,1	18,9
	⁵⁸ Ni ⁺	⁴⁰ Ca ¹⁸ O ⁺	0,0	0,0	0,2	1,5	6,3	10,6	14,7	19,4
	⁵⁹ Co ⁺	⁴³ Ca ¹⁶ O ⁺ , ⁴² Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺	0,5	0,6	0,8	1,2	2,0	2,9	4,0	5,0
	⁶⁰ Ni ⁺	⁴⁴ Ca ¹⁶ O ⁺ , ⁴³ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺	1,8	3,6	7,2	14,8	30,0	44,2	61,6	77,1
	⁶¹ Ni ⁺	⁴⁴ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺	19,2	42,3	88,5	184	379	565	802	1 015
	⁶² Ni ⁺	⁴⁴ Ca ¹⁸ O ⁺	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	2,6	4,2	5,9
	⁷⁵ As ⁺	⁴³ Ca ¹⁶ O ₂ ⁺	0,3	0,4	0,6	0,9	1,3	1,6	2,4	2,7
	⁷⁶ Se ⁺	³⁶ Ar ⁴⁰ Ca ⁺ , ⁴⁴ Ca ¹⁶ O ₂ ⁺	0,3	0,4	1,0	1,6	2,6	3,0	3,9	3,8
	⁷⁸ Se ⁺	³⁸ Ar ⁴⁰ Ca ⁺	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	1,3	1,9	2,5
	⁸⁴ Sr ⁺	⁴⁰ Ar ⁴⁴ Ca ⁺	0,4	1,1	2,7	5,5	14,5	22,6	30,5	41,3
	⁸⁶ Sr ⁺	⁴⁰ Ar ⁴⁶ Ca ⁺	0,8	1,8	3,4	5,9	15,2	23,6	32,8	41,8
	⁸⁸ Sr ⁺	⁴⁰ Ar ⁴⁸ Ca ⁺	1,1	1,8	3,3	5,6	14,6	22,9	32,0	41,2
Mg	⁶¹ Ni ⁺	³⁶ Ar ²⁵ Mg ⁺	40,5	42,8	91,8	156	339	579	861	1224
	⁶² Ni ⁺	³⁶ Ar ²⁶ Mg ⁺	0,3	1,6	4,9	11,1	24,5	38,3	53,2	68,8
Cl	⁵¹ V ⁺	³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ ⁺	1,5	1,6	1,8	2,5	4,3	6,4	8,9	11,1
	⁵³ Cr ⁺	³⁷ Cl ¹⁶ O ⁺	5,9	5,1	6,3	8,7	14,9	21,6	29,8	36,7
	⁵⁴ Fe ^{+a}	³⁷ Cl ¹⁷ O ⁺ , ³⁷ Cl ¹⁶ O ¹ H ⁺	11,0	11,3	13,1	17,3	23,7	32,6	40,2	46,6
	⁷⁵ As ^{+b}	⁴⁰ Ca ³⁵ Cl ⁺	3,2	4,9	13,2	26,2	98,8	169	195	271
	⁷⁷ Se ^{+b}	⁴⁰ Ca ³⁷ Cl ⁺	9,0	14,7	38,5	77,9	303	521	604	840
C	⁴⁵ Sc	¹² C ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ , ¹² C ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ¹³ C ¹⁶ O ₂ ⁺	0,1	0,3	0,5	1,1	2,5	4,3	6,3	8,6
	⁵² Cr ⁺	⁴⁰ Ar ¹² C ⁺	1,9	2,0	2,1	2,2	3,5	4,7	6,4	8,0

^aKoncentrace Cl⁻ ve formě NaCl byla 39, 78, 156, 312, 624, 936, 1 248 a 1 560 mg L⁻¹.

^bKoncentrace Cl⁻ ve formě CaCl₂ byla 45, 90, 180, 360, 720, 1 080, 1 440 a 1 800 mg L⁻¹.

Příloha 1: Pokračování

Matriční prvek	Interferovaný izotop	Polyatomický iont	Koncentrace matričního prvku (mg L ⁻¹)							
			25	50	100	200	400	600	800	1000
			Falešně pozitivní signál (µg L⁻¹)							
S	⁴⁸ Ti ⁺	³² S ¹⁶ O ⁺	6,4	12,1	26,0	55,7	121	193	264	324
	⁴⁹ Ti ⁺	³³ S ¹⁶ O ⁺ ,	6,2	11,7	23,8	48,2	101	160	218	268
		³² S ¹⁶ O ¹ H ⁺								
	⁵⁰ Ti ⁺	³⁴ S ¹⁶ O ⁺ ,	3,0	5,0	9,8	19,2	38,8	59,3	80,1	97,4
		³³ S ¹⁶ O ¹ H ⁺								
	⁶⁴ Ni ⁺	³² S ₂ ⁺ , ³² S ¹⁶ O ₂ ⁺	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	2,2	3,9	5,5
	⁶⁴ Zn ⁺	³² S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³² S ₂ ⁺	7,4	8,1	10,8	18,4	32,0	49,6	66,4	83,1
	⁶⁵ Cu ⁺	³² S ³³ S ⁺ ,	0,4	0,5	1,0	2,2	4,4	7,2	10,1	12,7
		³³ S ¹⁶ O ₂ ⁺ ,								
		³² S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺								
	⁶⁶ Zn ⁺	³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ ,	4,6	4,7	4,9	6,6	6,9	8,7	10,0	11,4
		³² S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ ,								
		³² S ¹⁷ O ₂ ⁺ ,								
		³³ S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ ,								
		³² S ³⁴ S ⁺ , ³³ S ₂ ⁺								
⁶⁷ Zn ⁺	³³ S ³⁴ S ⁺ ,	1,4	1,5	1,7	3,7	4,3	6,8	8,6	10,9	
	³⁴ S ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺ ,									
	³³ S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ ,									
	³² S ¹⁷ O ¹⁸ O ⁺ ,									
	³³ S ¹⁷ O ₂ ⁺									
⁸² Se ⁺	³² S ¹⁷ O ₂ ¹⁶ O ⁺ ,	0,9	0,9	1,6	3,3	7,2	11,5	15,9	18,8	
	³³ S ¹⁶ O ₂ ¹⁷ O ⁺									
P	⁴⁷ Ti ⁺	³¹ P ¹⁶ O ⁺	170	378	776	1660	3255	4785	6165	7488
	⁴⁸ Ca ⁺	³¹ P ¹⁷ O ⁺ ,	57,2	69,0	102	168	303	429	560	674
		³¹ P ¹⁶ O ¹ H ⁺								
	⁴⁸ Ti ⁺	³¹ P ¹⁷ O ⁺ ,	2,5	3,8	7,4	14,6	29,4	43,2	57,6	70,2
		³¹ P ¹⁶ O ¹ H ⁺								
	⁴⁹ Ti ⁺	³¹ P ¹⁸ O ⁺ ,	0,9	1,0	2,0	4,0	8,1	11,9	15,8	19,8
		³¹ P ¹⁷ O ¹ H ⁺								
	⁶³ Cu ⁺	³¹ P ¹⁶ O ₂ ⁺	1,2	1,5	1,9	2,9	5,2	7,8	10,8	13,8
	⁶⁴ Zn ⁺	³¹ P ¹⁶ O ¹⁷ O ⁺	6,0	6,2	6,5	7,0	9,2	12,4	14,1	17,3
⁶⁵ Cu ⁺	³¹ P ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺	0,09	0,06	0,09	0,2	0,4	0,8	1,2	1,8	

Příloha 2: Návrh frakcionálního faktorového plánu (3^{4-1}) pro optimalizaci MAE vzorků s křemičitanovou maticí pomocí NH_4F a výsledky stanovení křemíku v CRM BCR[®]-032

Navážka vzorku (mg)	Objem NH_4F (mL) ^a	Teplota (°C)	Čas (min)	Si (g kg^{-1}) ^b
150	2	140	10	6,12 ± 0,60
100	2	140	15	7,89 ± 0,58
50	5	140	15	8,90 ± 0,62
100	7	180	10	9,03 ± 0,38
50	5	160	10	10,13 ± 0,24
150	7	180	5	5,93 ± 0,44
100	7	140	5	5,36 ± 0,36
50	2	160	15	10,48 ± 0,36
50	7	160	5	7,79 ± 0,51
50	2	180	10	9,58 ± 0,18
50	7	140	10	8,62 ± 0,24
150	7	140	15	4,94 ± 0,60
100	2	180	5	8,79 ± 0,44
50	7	180	15	9,50 ± 0,22
150	5	160	15	9,48 ± 0,34
150	5	180	10	9,33 ± 0,48
150	7	160	10	7,06 ± 0,66
100	5	160	5	8,93 ± 0,32
150	5	140	5	9,21 ± 0,30
50	5	180	5	9,78 ± 0,54
100	2	160	10	8,51 ± 0,74
100	5	180	15	10,53 ± 0,53
100	7	160	15	7,22 ± 0,60
150	2	160	5	6,57 ± 0,54
50	2	140	5	8,54 ± 0,18
100	5	140	10	8,47 ± 0,68
150	2	180	15	6,52 ± 0,23

^a NH_4F o koncentraci 100 g L^{-1} .

^b Střední hodnota ± 2 SD (n = 3).

Příloha 3: Finální frakcionální faktorový plán (3^{3-1}) pro optimalizaci MAE uhelných popílků (CTA-FFA-1 Fine Fly Ash) pomocí NH_4F a výsledky vybraných prvků stanovených na ICP-*oa*-TOF-MS

Exp.	Replika	Proměnná			Návratnost (%) ^a							
		NH_4F (mg)	Teplota (°C)	Čas (min)	Li	Ni	As	Rb	Sb	Cs	W	U
11	2	300	180	15	88,4	82,4	74,1	72,5	56,1	77,2	85,2	1,9
18	2	700	200	15	108,8	82,4	84,5	98,7	103,3	79,5	103,0	87,7
24	3	500	200	5	103,1	85,1	69,2	91,3	85,3	85,3	78,7	73,7
8	1	700	180	5	108,0	75,1	77,1	98,6	106,1	80,2	89,4	85,8
16	2	700	160	10	103,6	75,1	69,5	100,9	77,8	75,6	85,3	78,3
13	2	500	160	15	107,0	77,0	75,6	87,8	75,1	79,1	83,7	77,0
1	1	300	160	5	99,5	71,5	73,4	79,9	57,6	69,0	77,4	58,2
26	3	700	180	5	93,6	69,9	78,1	102,6	110,4	83,7	91,7	89,8
23	3	500	180	10	104,5	83,5	78,5	92,4	95,4	81,0	96,0	83,5
3	1	300	200	10	101,9	80,0	91,0	82,0	56,3	77,8	87,7	60,8
17	2	700	180	5	96,1	80,0	65,1	100,7	93,6	81,6	74,9	76,4
15	2	500	200	5	105,7	83,0	76,3	95,9	94,4	81,9	81,4	84,3
10	2	300	160	5	95,6	76,3	71,4	77,0	58,5	69,4	74,2	61,4
19	3	300	160	5	92,8	79,3	72,2	75,2	54,8	58,7	73,7	62,3
9	1	700	200	15	109,5	78,1	76,4	100,0	108,2	82,7	88,7	88,0
27	3	700	200	15	107,0	77,2	78,1	103,6	119,1	83,0	91,8	90,0
2	1	300	180	15	64,0	80,7	52,3	52,8	27,4	73,6	83,0	1,4
12	2	300	200	10	101,7	94,3	94,5	84,7	68,5	78,8	82,9	75,1
20	3	300	180	15	74,7	80,3	58,4	62,0	23,2	72,0	83,8	19,7
4	1	500	160	15	99,4	81,5	70,0	95,4	75,6	79,8	82,5	73,6
5	1	500	180	10	98,9	86,5	74,8	91,9	106,7	80,1	88,6	79,3
25	3	700	160	10	106,4	80,0	70,7	97,3	109,2	75,9	84,7	81,4
14	2	500	180	10	96,2	99,4	91,5	97,9	93,5	98,6	108,2	98,2
7	1	700	160	10	109,4	84,5	54,9	98,8	84,8	74,6	66,0	82,0
21	3	300	200	10	98,9	83,9	94,4	81,0	55,0	76,3	85,4	42,7
6	1	500	200	5	92,1	76,1	73,3	98,0	98,9	76,2	78,5	76,3
22	3	500	160	15	107,5	76,8	81,0	97,6	101,8	82,1	87,4	102,2

^a Návratnost R (%) vyjádřená jako (poměr hodnoty získané výše popsanou metodou ku certifikované) $\times 100$.

Příloha 4: Tabulka výsledných koncentrací jednotlivých prvků pro 21 vzorků sušeného mléka

Vzorek	Hg ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Mg (mg kg^{-1})	Fe (mg kg^{-1})	Na (mg kg^{-1})	Ca (mg kg^{-1})	K (mg kg^{-1})	Zn (mg kg^{-1})
1	2,27 ± 0,81	522 ± 12	84 ± 5	3435 ± 53	5375 ± 338	4160 ± 109	51 ± 0,8
2	0,46 ± 0,06	349 ± 69	30 ± 4	1268 ± 331	3626 ± 819	4445 ± 779	31 ± 7
3	3,25 ± 0,75	409 ± 45	31 ± 2	1398 ± 171	3689 ± 195	5096 ± 593	35 ± 5
4	2,81 ± 0,33	452 ± 41	53 ± 6	1573 ± 184	5755 ± 1061	5163 ± 652	36 ± 13
5	1,94 ± 0,17	435 ± 31	40 ± 3	1281 ± 50	5489 ± 980	4640 ± 236	43 ± 3
6	1,78 ± 0,45	341 ± 5	45 ± 0,8	1353 ± 11	4787 ± 577	4287 ± 140	31 ± 2
7	1,77 ± 0,14	436 ± 17	34 ± 4	1154 ± 72	3992 ± 128	4405 ± 125	51 ± 6
8	3,57 ± 0,34	607 ± 5	36 ± 1	2498 ± 130	5884 ± 427	4342 ± 115	53 ± 0,3
9	1,41 ± 0,36	419 ± 23	41 ± 2	1546 ± 85	3763 ± 501	4379 ± 600	38 ± 2
10	1,28 ± 0,36	529 ± 11	48 ± 3	1414 ± 55	4784 ± 758	4408 ± 83	34 ± 3
11	1,02 ± 0,07	524 ± 10	60 ± 6	1766 ± 79	6021 ± 174	4652 ± 305	51 ± 2,6
12	1,00 ± 0,14	463 ± 9,7	46 ± 2	1398 ± 305	8641 ± 654	5977 ± 93	49 ± 2
13	0,4 ± 0,02	362 ± 4,7	31 ± 5	1646 ± 60	3385 ± 142	4632 ± 104	35 ± 2
14	0,35 ± 0,01	398 ± 3,6	32 ± 2	999 ± 50	4968 ± 464	4127 ± 223	39 ± 5
15	0,56 ± 0,03	511 ± 7	53 ± 3	1117 ± 15	4709 ± 111	4321 ± 71	30 ± 1
16	0,36 ± 0,05	482 ± 8	59 ± 4	1595 ± 74	6655 ± 159	5344 ± 77	54 ± 1
17	0,42 ± 0,05	498 ± 15	35 ± 0,2	1441 ± 3	5374 ± 853	4577 ± 28	50 ± 2
18	0,53 ± 0,06	533 ± 9	50 ± 5	2370 ± 66	4985 ± 214	5375 ± 240	40 ± 2
19	2,27 ± 0,11	451 ± 5	71 ± 13	1188 ± 31	4946 ± 367	4930 ± 675	35 ± 4
20	3,06 ± 0,06	383 ± 3	55 ± 3	1173 ± 17	3273 ± 463	4267 ± 162	26 ± 1
21	0,35 ± 0,05	458 ± 18	38 ± 2	1631 ± 117	3832 ± 302	4853 ± 554	42 ± 4

^a Střední hodnota ± 2 SD.

Příloha 4: Pokračování

Vzorek	Mo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Co ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Cs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Sr ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Rb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	U ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	313 \pm 5	24,8 \pm 1,6	4148 \pm 501	4,7 \pm 0,3	2432 \pm 22	4365 \pm 55	3,7 \pm 0,4
2	218 \pm 48	23,4 \pm 4,5	2417 \pm 755	13,7 \pm 2,2	2279 \pm 489	1593 \pm 341	5,9 \pm 1,0
3	145 \pm 15	25,1 \pm 4,6	3142 \pm 278	17,6 \pm 0,8	1743 \pm 152	3565 \pm 342	2,7 \pm 0,4
4	281 \pm 38	27,9 \pm 2,6	3782 \pm 255	22,3 \pm 1,9	2052 \pm 228	6237 \pm 631	4,6 \pm 0,1
5	99 \pm 4	28,7 \pm 2,7	5422 \pm 228	14,4 \pm 0,5	3233 \pm 190	982 \pm 53	7,9 \pm 0,5
6	196 \pm 4	28,3 \pm 2,3	2950 \pm 312	16,9 \pm 0,7	1429 \pm 24	3379 \pm 59	3,9 \pm 0,2
7	59 \pm 5	18,0 \pm 1,1	3839 \pm 200	8,2 \pm 0,1	1350 \pm 36	1987 \pm 73	2,8 \pm 0,2
8	219 \pm 14	28,3 \pm 1,5	3680 \pm 201	5,3 \pm 0,1	3297 \pm 220	572 \pm 21	12,3 \pm 0,8
9	119 \pm 20	18,7 \pm 4,3	2858 \pm 240	7,4 \pm 0,3	1563 \pm 287	1879 \pm 111	2,0 \pm 0,4
10	130 \pm 10	18,7 \pm 1,6	2385 \pm 71	8,4 \pm 0,2	1816 \pm 45	2490 \pm 28	0,8 \pm 0,1
11	91 \pm 4	23,9 \pm 0,9	3385 \pm 105	8,6 \pm 0,1	2435 \pm 33	2377 \pm 49	3,4 \pm 0,2
12	196 \pm 33	33,0 \pm 4,6	2212 \pm 27	10,5 \pm 0,1	4095 \pm 292	3843 \pm 189	13,1 \pm 1,4
13	76 \pm 16	18,9 \pm 1,0	3116 \pm 266	5,0 \pm 0,4	1697 \pm 127	760 \pm 1	4,9 \pm 0,4
14	143 \pm 9	19,0 \pm 2,1	3643 \pm 369	5,8 \pm 0,3	1054 \pm 23	1976 \pm 24	2,7 \pm 0,5
15	119 \pm 4	19,1 \pm 2,1	2200 \pm 309	8,4 \pm 0,4	1641 \pm 55	2536 \pm 45	1,1 \pm 0,2
16	197 \pm 20	28,1 \pm 0,6	3188 \pm 124	13,1 \pm 0,6	2867 \pm 79	3166 \pm 105	9,1 \pm 0,7
17	92 \pm 11	20,4 \pm 2,0	2525 \pm 53	6,8 \pm 0,2	1655 \pm 33	1869 \pm 9	6,1 \pm 0,7
18	125 \pm 27	19,0 \pm 1,2	3228 \pm 284	10,0 \pm 0,4	3383 \pm 131	4043 \pm 152	1,6 \pm 0,3
19	97 \pm 9	28,8 \pm 8,3	3068 \pm 776	6,9 \pm 0,3	2844 \pm 83	425 \pm 16	13,2 \pm 1,0
20	208 \pm 2	16,6 \pm 1,3	2275 \pm 283	10,0 \pm 0,4	1504 \pm 38	512 \pm 10	7,0 \pm 0,8
21	131 \pm 2	14,9 \pm 0,9	3400 \pm 121	4,5 \pm 0,1	2097 \pm 29	460 \pm 8	10,6 \pm 0,8

^a Střední hodnota \pm 2 SD.

Příloha 4: Pokračování

Vzorek	As ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Se ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Sb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	La ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Ba ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Li ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1	16,4 ± 2,6	158 ± 44	10 ± 1,1	11,3 ± 0,9	6,2 ± 0,4	355 ± 26	9,0 ± 0,7	9,5 ± 0,8
2	14,5 ± 2,0	69 ± 6	40 ± 5,5	16,4 ± 2,1	2,6 ± 0,1	264 ± 23	9,6 ± 1,3	11,8 ± 2,3
3	14,9 ± 1,9	82 ± 9	27 ± 3,0	16,6 ± 1,0	3,3 ± 0,2	334 ± 23	8,9 ± 1,0	21,9 ± 0,7
4	15,7 ± 4,4	76 ± 2	46 ± 21,7	15,0 ± 1,5	7,2 ± 1,0	554 ± 92	9,7 ± 0,3	26,4 ± 1,7
5	16,3 ± 1,7	130 ± 1	24 ± 3,3	15,6 ± 0,3	2,5 ± 0,2	262 ± 18	8,3 ± 0,4	39,0 ± 2,3
6	18,3 ± 2,3	76 ± 5	44 ± 6,0	21,9 ± 5,5	4,0 ± 0,4	383 ± 53	9,5 ± 0,3	6,0 ± 0,4
7	6,9 ± 1,2	122 ± 21	25 ± 2,1	11,2 ± 1,6	5,9 ± 0,3	175 ± 16	3,0 ± 0,4	0,9 ± 0,04
8	13,7 ± 2,4	151 ± 11	42 ± 1,2	14,3 ± 1,1	22,7 ± 1,2	520 ± 83	8,7 ± 1,1	15,1 ± 5,0
9	7,7 ± 1,1	119 ± 20	49 ± 8,2	12,6 ± 1,3	6,8 ± 0,5	510 ± 40	3,9 ± 0,4	7,5 ± 0,01
10	6,7 ± 0,4	119 ± 6	35 ± 9,3	11,2 ± 1,5	7,0 ± 1,2	542 ± 61	4,3 ± 0,9	10,8 ± 1,0
11	2,5 ± 0,2	66 ± 16	36 ± 7,8	12,5 ± 1,5	10,0 ± 0,2	366 ± 63	9,2 ± 0,3	19,0 ± 0,3
12	11,0 ± 1,9	145 ± 13	49 ± 13,5	11,6 ± 0,4	5,4 ± 0,5	681 ± 160	5,1 ± 0,8	28,2 ± 7,0
13	5,2 ± 0,8	126 ± 2	27 ± 6,1	9,6 ± 0,3	2,5 ± 0,3	166 ± 27	8,1 ± 0,3	9,5 ± 0,7
14	5,6 ± 1,1	167 ± 50	22 ± 4,9	9,3 ± 0,3	3,0 ± 0,4	245 ± 24	5,1 ± 0,5	0,8 ± 0,5
15	9,2 ± 0,3	149 ± 31	23 ± 5,1	9,4 ± 0,3	3,7 ± 0,01	210 ± 31	3,6 ± 0,1	6,7 ± 0,7
16	6,6 ± 1,4	176 ± 31	25 ± 5,6	9,4 ± 0,9	3,0 ± 0,6	1029 ± 531	8,5 ± 0,7	14,6 ± 0,9
17	11,4 ± 0,6	140 ± 17	20 ± 1,6	10,0 ± 0,2	6,4 ± 0,2	164 ± 18	5,6 ± 0,5	6,3 ± 1,0
18	5,3 ± 0,7	124 ± 32	26 ± 6,8	9,2 ± 0,4	2,5 ± 0,7	535 ± 62	4,1 ± 0,7	30,0 ± 1,6
19	6,7 ± 1,1	91 ± 4	40 ± 8,2	10,3 ± 0,2	6,9 ± 0,9	187 ± 11	10,4 ± 0,8	24,5 ± 1,9
20	12,1 ± 0,5	105 ± 22	14 ± 9,0	8,2 ± 1,1	10,2 ± 0,1	856 ± 24	10,0 ± 0,4	5,9 ± 0,3
21	2,1 ± 0,5	104 ± 8	41 ± 1,1	10,1 ± 0,3	15,4 ± 0,9	282 ± 61	8,1 ± 1,9	6,6 ± 0,5

^a Střední hodnota ±2 SD.

Příloha 5: Statistické charakteristiky stanovení obsahu Mg, Fe, Na, Ca, K, Zn (mg kg⁻¹), Hg, Mo, Co, Cu, Cs, Sr, Rb, U, As, Se, Pb, Sb, La, Ba, Cd, Li (µg kg⁻¹) ve vzorcích náhradní mléčné kojenecké stravy (n = 21) v rámci jednotlivých tříd

Průměr	Hg	Mg	Fe	Na	Ca	K	Zn	Mo	Co	Cu	Cs
1	2,92	565,1	59,9	2967	5630	4251	52,3	266,1	26,6	3914	5,0
2	1,34	415,3	36,6	1354	4140	4543	39,0	128,9	20,2	3264	9,3
3	1,33	468,3	54,9	1402	5167	4627	36,1	152,0	24,5	2962	11,9
4	0,66	493,3	51,3	1788	6761	5566	47,6	172,8	26,7	2876	11,2
Sm. odchylka	Hg	Mg	Fe	Na	Ca	K	Zn	Mo	Co	Cu	Cs
1	0,92	59,7	34,1	662,8	360,0	129,1	1,4	66,8	2,5	331,3	0,4
2	1,14	44,9	7,5	215,8	821,6	284,1	8,1	52,4	4,3	918,6	4,5
3	0,86	71,4	9,2	241,6	570,0	357,0	7,5	73,3	4,6	596,0	6,2
4	0,30	36,1	6,7	514,1	1829,9	356,6	6,9	41,3	7,1	575,7	1,7
Šikmost	Hg	Mg	Fe	Na	Ca	K	Zn	Mo	Co	Cu	Cs
1	1,12.10 ⁻¹⁵	0	9,10.10 ⁻¹⁶	2,90.10 ⁻¹⁵	5,31.10 ⁻¹⁵	-1,49.10 ⁻¹⁴	-1,09.10 ⁻¹⁴	9,66.10 ⁻¹⁶	6,06.10 ⁻¹⁵	0	4,31.10 ⁻¹⁵
2	0,637	0,271	1,433	-0,063	0,744	0,520	0,057	0,529	0,775	1,247	0,667
3	0,796	-0,955	0,751	0,314	0,719	0,498	1,370	0,978	-0,355	-0,005	0,904
4	0,545	0,490	0,442	0,592	0,105	0,701	-0,372	-0,707	-0,343	-0,703	0,633
Špičatost	Hg	Mg	Fe	Na	Ca	K	Zn	Mo	Co	Cu	Cs
1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2	1,927	2,428	4,364	1,886	1,935	2,666	2,208	2,247	2,554	4,096	2,088
3	2,423	2,676	2,488	1,917	1,682	1,706	3,527	2,505	1,361	1,772	2,137
4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
p^a	Hg	Mg	Fe	Na	Ca	K	Zn	Mo	Co	Cu	Cs
1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996
2	0,474	0,845	0,076	0,973	0,381	0,591	0,974	0,581	0,356	0,119	0,447
3	0,410	0,289	0,449	0,858	0,478	0,691	0,099	0,274	0,824	0,994	0,325
4	0,645	0,699	0,745	0,599	0,978	0,495	0,809	0,489	0,835	0,492	0,559

^a Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0,05; rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05, data nevykazují normální rozložení.

Příloha 5: Pokračování

Průměr	Sr	Rb	U	As	Se	Pb	Sb	La	Ba	Cd	Li
1	2865	2468	8,0	15,0	154,2	25,9	12,8	14,5	437,5	8,9	12,3
2	1818	1558	5,3	9,7	116,4	28,9	11,9	5,9	325,8	7,1	11,0
3	2036	2907	4,5	9,8	96,1	37,0	13,4	6,5	373,6	7,8	15,6
4	3448	3684	7,9	7,7	148,5	33,4	10,1	3,6	748,2	5,9	24,2
Sm. odchylka	Sr	Rb	U	As	Se	Pb	Sb	La	Ba	Cd	Li
1	611,5	2681,8	6,1	1,92	5,2	22,3	2,1	11,7	115,9	0,2	4,0
2	606,0	934,3	2,8	4,83	28,0	10,9	3,1	4,2	212,5	2,5	11,5
3	526,5	1900,6	4,5	5,97	31,7	8,3	4,6	2,3	156,4	3,0	9,0
4	616,6	459,7	5,8	2,96	26,5	13,8	1,3	1,5	253,8	2,3	8,4
Šikmost	Sr	Rb	U	As	Se	Pb	Sb	La	Ba	Cd	Li
1	$1,66 \cdot 10^{-15}$	$6,99 \cdot 10^{-16}$	$-3,49 \cdot 10^{-16}$	0	0	$-6,42 \cdot 10^{-16}$	0	$7,11 \cdot 10^{-16}$	$2,11 \cdot 10^{-15}$	0	0
2	1,240	0,737	0,522	-0,051	-0,024	0,659	0,517	1,268	1,741	-0,456	1,593
3	0,442	0,684	1,340	0,350	0,790	-0,802	1,172	0,143	-0,017	-0,667	0,103
4	0,194	-0,560	-0,350	0,559	0,217	0,705	0,696	0,622	0,453	0,554	-0,674
Špičatost	Sr	Rb	U	As	Se	Pb	Sb	La	Ba	Cd	Li
1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2	4,091	3,156	2,309	1,663	2,607	2,286	1,669	3,626	4,983	1,770	4,581
3	1,918	2,961	3,458	1,739	2,178	2,629	3,017	2,038	1,512	1,552	1,311
4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
p^a	Sr	Rb	U	As	Se	Pb	Sb	La	Ba	Cd	Li
1	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996	0,996
2	0,121	0,386	0,588	0,976	0,979	0,454	0,594	0,113	0,037	0,659	0,052
3	0,745	0,509	0,108	0,828	0,415	0,405	0,169	0,963	0,994	0,526	0,979
4	0,940	0,630	0,829	0,632	0,927	0,490	0,499	0,570	0,735	0,636	0,520

^a Kombinovaný test normality: Jestliže je p větší než 0,05; rozdělení lze považovat za normální, pokud je hodnota p nižší než 0,05, data nevykazují normální rozložení.

Příloha 6: Frakcionální faktorový plán 2^{5-2} (n = 2) pro optimalizaci mikrovlnné mineralizace vydřích tkání a výsledky stanovení uhlíku

Pokus	Replika	Navážka (mg)	Materiál	Činidla (mL) HNO₃ : H₂O₂	Teplota (°C)	Čas (min)	C (g kg⁻¹)
10	2	200	Játra	1 : 0,4	180	5	73,60
1	1	50	Játra	1 : 0,4	220	20	60,03
6	1	200	Játra	1 : 1	180	20	42,33
13	2	50	Játra	1 : 1	220	5	50,11
3	1	50	Tuk	1 : 0,4	180	20	266,2
7	1	50	Tuk	1 : 1	180	5	144,0
15	2	50	Tuk	1 : 1	180	5	147,4
9	2	50	Játra	1 : 0,4	220	20	65,25
12	2	200	Tuk	1 : 0,4	220	5	182,9
4	1	200	Tuk	1 : 0,4	220	5	149,8
5	1	50	Játra	1 : 1	220	5	47,08
2	1	200	Játra	1 : 0,4	180	5	73,8
8	1	200	Tuk	1 : 1	220	20	165,0
11	2	50	Tuk	1 : 0,4	180	20	275,0
14	2	200	Játra	1 : 1	180	20	27,49
16	2	200	Tuk	1 : 1	220	20	157,1