

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**KONTAMINUJÍCÍ LÁTKY A MYKOTOXINY V POTRAVINOVÝCH
DOPLŇCÍCH**

KRISTÝNA ŠKVOROVÁ FIALOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Dalibor Šatinský, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2022

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Daliboru Šatínskému, PhD. za jeho trpělivost, cenné rady a připomínky, které mi poskytl v průběhu psaní této práce.

OBSAH

1.	Použité zkratky	6
2.	Zadání a cíl práce	8
3.	Úvod	9
4.	Teoretická část	10
4.1	Potravinové doplňky.....	10
4.2	Mykotoxiny.....	11
4.2.1	Aflatoxiny.....	12
4.2.2	Ochratoxiny	13
4.2.3	Trichotheceny.....	13
4.2.4	Zearalenon.....	14
4.2.5	Fumonisy	15
4.3	Těžké kovy	15
4.3.1	Olovo	16
4.3.2	Rtuť	17
4.3.3	Kadmium.....	18
4.3.4	Arsen.....	18
4.4	Kontaminace potravinových doplňků mykotoxiny.....	19
4.5	Kontaminace potravinových doplňků těžkými kovy.....	20
5.	Analytická část.....	21
5.1	Analýza mykotoxinů	21
5.2	Možnosti stanovení mykotoxinů	22
5.2.1	Rychlá analytická metoda pro stanovení aflatoxinů v rostlinných doplňcích stravy a v kosmetických olejích.....	22
5.2.2	Screening více mykotoxinů v ovoci metodou UHPLC v kombinaci s hmotnostní detekcí využívající kvadrupólový analyzátor s iontovou mobilitou a analyzátor doby letu.....	23
5.2.3	Výskyt aflatoxinů v potravinových doplňcích s obsahem ostropestřce mariánského ..	24
5.2.4	Stanovení toxických látek, pesticidů a mykotoxinů v potravinových doplňcích s ginkgo biloba metodou kapalinové chromatografie s hmotností detekcí využívající Orbitrap	24
5.2.5	Stanovení aflatoxinů, deoxynivalenolu, ochratoxinu A a zearalenonu v doplňcích na bázi pšeničných a ovesných otrub, prodávaných na španělském trhu.	25
5.2.6	Výskyt mykotoxinů v infúzních nápojích využívaných jako doplňky stravy.....	26
5.2.7	Vývoj a validace metody LC-MS/MS pro současné stanovení citrininu a ochratoxinu v různých krmivech a potravinách.....	27
5.2.8	Příprava citrinin-selektivního molekulárně vtištěného polymeru a jeho použití pro on-line extrakci na tuhou fázi ve spojení s kapalinovou chromatografií	28

5.2.9	Stanovení více toxinů v doplňcích stravy obsahujících extrakty ze zelených kávových zrn za použití ultra-účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií	29
5.2.10	Multiplexování dat nezávislých a necílených pracovních postupů pro screening mykotoxinů na platformě hmotnostní spektrometrie (kvadrupól-Orbitrap) s vysokým rozlišením	30
5.3	Analýza těžkých kovů.....	30
5.4	Možnosti stanovení těžkých kovů	32
5.4.1	Vývoj a validace spektrometrické metody pro stanovení kadmia a olova u zeolitů a vyhodnocení bezpečnosti.....	32
5.4.2	Současné stanovení a speciální analýza arsenu a chromu v doplňcích železa používaných k léčbě anémie pomocí HPLC-ICP-MS	33
5.4.3	Mikrovlákná digesce s použitím zředěného roztoku kyseliny dusičné a zkoumání kalibračních strategií pro stanovení As, Cd, Hg a Pb v doplňcích stravy pomocí ICP-MS.....	33
5.4.4	Stanovení rtuti v přírodních zeolitech metodou atomové absorpční spektrometrie s tepelným rozkladem. Validace metody v souladu s požadavky na použití zeolitů jako doplňků stravy	34
5.4.5	Stanovení toxických kovů pomocí ICP-MS v asijských a evropských léčivých rostlinách a doplňcích stravy.....	35
5.4.6	Vývoj, validace a aplikace metody ICP-SFMS pro stanovení kovů ve vzorcích proteinových prášků pocházejících z Irsku, s hodnocením rizik pro irské spotřebitele	35
6.	Závěr	37
7.	Použitá literatura.....	39

1. POUŽITÉ ZKRATKY

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AF	Aflatoxin
AFB1	Aflatoxin B1
AFB2	Aflatoxin B2
AFG1	Aflatoxin G1
AFG2	Aflatoxin G2
AFM1	Aflatoxin M1
AFM2	Aflatoxin M2
AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie
ASV	Anodická rozpouštěcí voltametrie
BEN	Balkánská endemická nefropatie
CIT	Citrinin
CVAAS	Atomová absorpční spektrometrie studených par
DAD	Detektor diodového pole
DLLME	Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
DON	Deoxynivalenol
DPP	Diferenční pulzní voltametrie
EU	Evropská unie
FB1	Fumonisin B1
FD	Fluorescenční detekce
GFAAS	Atomová absorpční spektrometrie v grafitové peci
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC-ICP-MS	Kapalinová chromatografie spojená v kombinaci s indukčně vázaným plazmatem a hmotnostní spektrometrií

IAC	Imunoafinitní kolona
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	Emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-SFMS	Inductively coupled plasma-sector field mass spectrometer
LC-MS/MS-IT	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem s analyzátozem iontové pasti
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MIP	Molekulárně vtištěný polymer
MS	Hmotnostní spektrometrie
NAA	Neutronová aktivační analýza
OTA	Ochratoxin A
OTB	Ochratoxin B
OTC	Ochratoxin C
PTFE	Polytetrafluorethylen
QuEChERS	Disperzní extrakce na tuhous fázi (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SPE	Extrakce na tuhou fázi
TD-AAS	Atomová absorpční spektrometrie s tepelným rozkladem
UHPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
UPLC-IMS QTOF MS	Ultra-účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí využívající iontovou mobilitu a analyzátor doby letu
XRFS	Rentgenová fluorescenční spektroskopie
ZEA	Zearalenon

2. ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo vyhledat a uspořádat informace týkající se mykotoxinů a konkrétních těžkých kovů, a popsat některé vybrané metody a možnosti, pomocí kterých je možné tyto látky stanovit v potravních doplňcích.

3. ÚVOD

V současné době je trh přesycen přípravky, které dle výrobců mají mít pozitivní zdravotní vliv nebo mají dodat organismu živiny, které nezískává v adekvátní míře stravou. Potravinové doplňky jsou zvláštní kategorií potravin, které obsahují účinné látky jako jsou minerály, vitamíny a další složky. Často však mohou obsahovat ve stopových množstvích též nežádoucí či dokonce škodlivé látky jako jsou mykotoxiny nebo těžké kovy. Ty mohou být přítomny zejména u potravních doplňků na bázi rostlinných extraktů, kde přenos kontaminantů probíhá převážně z rostlinné výroby a nevhodného sušení a skladování.

Mykotoxiny jsou toxické látky produkovány vláknitými houbami (plísněmi). Známe více než 300 druhů plísní, a většina z nich produkuje více než jeden mykotoxin. Chronický příjem těchto látek může vést k poškození jater, trávicího traktu, imunotoxicitě, k halucinacím, nekrózám i k rozvoji rakoviny.

Těžké kovy, jako je olovo, arsen, kadmium a rtuť jsou běžnou součástí půdy, a to je důvod, proč jsou také složkou potravinového řetězce. Ve větší míře se však do potravin dostávají působením lidské činnosti např. plynovými zplodinami průmyslu nebo odpadními vodami. Pokud se však dostanou do lidského organismu v dostatečně velkém množství mohou poškozovat játra, ledviny i nervový systém.

Kontaminace potravinových doplňků mykotoxiny i těžkými kovy, či dalšími škodlivými látkami představuje problém, neboť se tyto přípravky těší čím dál větší popularitě. Ke kontaminaci dochází i přes dodržování vhodných zemědělských a technologických postupů a opatření. Chceme-li ochránit zdraví spotřebitele, je důležité zavedení rychlých, spolehlivých a citlivých metod pro stanovení těchto kontaminantů v doplňcích stravy.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Potravinové doplňky

Potravinové doplňky (též nutraceutika či doplňky stravy) jsou potraviny, lišící se od potravin pro běžnou spotřebu vysokým obsahem minerálních látek, vitamínů či dalších látek s fyziologickým nebo nutričním účinkem. Potravinové doplňky jsou vyráběny za účelem doplnění stravy jedince na potřebnou úroveň, která bude příznivě ovlivňovat jeho zdravotní stav, a tudíž nejsou určeny k léčbě ani předcházení onemocnění (1).

Do skupiny potravinových doplňků můžeme zařadit látky naprosto odlišných skupin. Mohou to být vitaminy, minerály, alkaloidy, stopové prvky, oligosacharidy, polysacharidy, také vláknina, mastné kyseliny, aminokyseliny a látky bílkovinné povahy. Vzhledem k tomu, že mají tyto látky odlišnou chemickou strukturu, mají také rozličný účinek na lidský organismus. Nejčastěji doplňují látky, které organismus není schopen přijmout běžnou stravou. Mezi doplňky stravy můžeme tedy řadit látky působící na imunitní systém, antioxidanty a vitamíny, látky ovlivňující metabolismus tuků a cholesterolu, látky, které působí na centrální nervový systém, látky ovlivňující tělesnou hmotnost, působící na trávicí trakt a jiné další (2).

Problémem s potravinovými doplňky je, že účinky, které výrobce deklaruje nejsou nikým ověřovány, u doplňků stravy se totiž neposuzuje účinnost ani kvalita obsahu. Na rozdíl od léčivých přípravků, které posuzuje a schvaluje Státní úřad pro kontrolu léčiv, potravinové doplňky uvádí do oběhu Ministerstvo zemědělství, v souladu se zákonem č.110/1997 Sb. (*Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů*). Právní definici, co potravinové doplňky musejí nebo naopak nesmějí obsahovat nám udává vyhláška č.28/2018 Sb. (*Vyhláška o doplňcích stravy a složení potravin*). Dle těchto právních předpisů doplňky stravy nesmějí deklarovat vlastnosti léčby, vyléčení onemocnění či prevence. Výrobci se však často snaží navodit dojem, že jejich výrobky tyto vlastnosti mají a na podporu svých tvrzení se odvolávají na klinické studie, a to zejména přes webové stránky, které byly s danou účinnou látkou provedeny, avšak mimo živý organismus nebo na studie, které byly prováděny s léčivým přípravkem obsahující stejnou účinnou látku (1).

4.2 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity hub, tj., nejsou nezbytné pro normální růst a rozmnožování, ale jsou schopné způsobit fyziologické, biochemické a patologické změny u mnoha rozličných organismů. Pozorované škodlivé účinky mykotoxinů zahrnují zejména karcinogenitu, teratogenitu, imunotoxicitu, neurotoxicitu, hepatotoxicitu, nefrotoxicitu, reprodukční a vývojovou toxicitu, zažívací potíže a další (3).

V dnešních dnech je identifikováno více než 400 druhů mykotoxinů a další stále přibývají. Kolísání teploty a vlhkosti ovlivňuje rychlost růstu hub a také typy a množství produkovaných toxinů. Jednotlivé houby často produkují několik různých mykotoxinů. Mykotoxiny jsou produkovány řadou plísňových rodů, především rody *Aspergillus*, *Penicillium*, a *Fusarium*. Velké množství houbových metabolitů je označováno jako mykotoxiny, avšak jen malé procento z nich má vliv na zdraví lidí či zvířat. S mykotoxiny také souvisí pojem mykotoxikóza, což je termín označující stav vyvolaný právě požitím mykotoxinů (3,4).

Ačkoli jsou všechny mykotoxiny houbového původu, ne všechny toxické sloučeniny produkové houbami se nazývají mykotoxiny. Zásadní pro rozdělení je cílová struktura, na kterou toxin působí a jeho koncentrace. Například metabolity toxické především pro bakterie, se obvykle nazývají antibiotika. Na obratlovce působí mykotoxiny již v nízkých koncentracích toxicky. Další nízkomolekulární látky, které houby produkují (např. ethanol), jsou toxické až při vysokých dávkách, a nejsou považovány za mykotoxiny. Mezi mykotoxiny nepatří ani houbové jedy, ačkoli jsou to nepochybně houbové metabolity a mohou způsobit i úmrtí lidí či zvířat. Rozdíl mezi mykotoxinem a houbovým jedem je založen primárně na velikosti produkující houby, zatímco mykotoxiny jsou produkovány mikroskopickými houbami plísněmi), houbové jedy produkují makroskopické houby (3,5).

Mykotoxiny je nejen těžké definovat, ale také klasifikovat. Rozdíly najdeme v chemických strukturách, biosyntetickém původu, v biologickém účinku a také jsou produkovány odlišnými houbami. Kliničtí lékaři je dělí podle orgánů, na které působí, lze je tedy dělit na nefrotoxiny, hepatotoxiny, imunotoxiny a tak dále. Buněční biologové je řadí do generických skupin, jako jsou teratogeny, mutageny, karcinogeny a alergeny. Organičtí chemici využívají ke klasifikaci chemické struktury, biochemici zase jejich biosyntetických

původ a mykologové podle hub, které je produkují. Ani jedna z těchto klasifikačních tříd však není uspokojivá (3).

4.2.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou patrně vědecky nejvíce prozkoumanými a nejvíce známými mykotoxiny. Jsou to toxické látky produkované vláknitými houbami rodu *Aspergillus*, především druhů *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Chemicky lze charakterizovat jako polycyklické, nesaturované, vysoce substituované kumariny nebílkovinné povahy s difuranomarinovým skeletem. V přírodě se vyskytují běžně, a také se nacházejí v potravinách a krmivech všude na Zemi (6,7).

V současnosti je popsáno přibližně 20 aflatoxinů, z nichž byly postupně identifikovány jako přirozeně se vyskytující a nejčastější: AFB1, AFB2, AFG1 a AFG2. Nejvýznamnější a nejvíce prostudován je AFB1, protože se jedná o silný toxin, mutagen a karcinogen. Označení B a G odkazují na vizualizaci při chromatografii na tenké vrstvě, kdy toxiny s označením B vykazují modrou (anglicky Blue) fluorescenci pod UV zářením a toxiny G zase zelenou (anglicky Green). Číselný index 1 a 2 vyjadřují pořadí v chromatografickém poli. Významné jsou také aflatoxiny M1 a M2 (M jako Milk), které byly identifikovány později v mléce kravských dojníc, jež byli krmeny potravou kontaminovanou AFB1 a AFB2. Chemicky jsou AFM1 a AFM2 hydroxy-deriváty AFB1 a AFB2 (4,6).

Aflatoxiny mají různé mechanismy účinku a tím i různé toxikologické účinky, z nichž většina ještě není zcela objasněna. Většina aflatoxinů jsou prokancerogeny, které podléhají metabolismu první i druhé fáze v játrech. Za jejich transformaci v první fázi u savců jsou zodpovědné především cytochromy P450. Metabolismus první fáze může vést k tvorbě méně toxických nebo naopak reaktivnějších molekul (4, 8).

Aflatoxiny mají karcinogenní, teratogenní, hepatotoxické, mutagenní a imunosupresivní účinky, přičemž hlavním postiženým orgánem jsou játra. Jsou spojeny s akutní toxicitou i chronickou karcinogenitou v lidské i zvířecí populaci. AFB1 je klasifikován Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) jako karcinogen skupiny 1 s vysokým rizikem vzniku hepatocelulárního karcinomu u jedinců vystavených aflatoxinům (9).

4.2.2 Ochratoxiny

Ochratoxiny jsou běžnými kontaminanty v potravinách a krmivech. Rozdělujeme 3 třídy ochratoxinů: Ochratoxin A (OTA), Ochratoxin B (OTB) a Ochratoxin C (OTC), které jsou produkovány rody *Aspergillus* a *Penicillium*, zejména druhy *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* a *Penicillium verrucosum*. Všechny tři třídy jsou si chemicky podobny, obsahují fenylalaninovou složku navázanou na dihydroisokumarinovou skupinu amidovou vazbou. Z hlediska zdraví lidí i zvířat je nejdůležitější a nejběžnější ochratoxin A (4,10).

Ochratoxin A má vysokou afinitu k proteinům, zejména k sérovým albuminům. Když zvířata konzumují kontaminovaná krmiva, napomáhají tyto proteiny bioakumulaci toxinu v jejich orgánech, což vede ke kontaminovaným živočišným produktům, jako jsou vejce, mléko, jaterní produkty atd. Kontaminace OTB v potravinách i krmivech je poměrně nižší než OTA. V případě savců je i nízká koncentrace OTA považována za nefrotoxickou. OTA je také zodpovědný za Balkánskou endemickou nefropatii (BEN), jež se projevila v dané lokalitě selháním ledvin i nádory.

OTA byl spojen s toxikologickými účinky jako je teratogenita, karcinogenita, mutagenita, hepatotoxicita, genotoxicita, imunotoxicita, embryotoxicita, neurotoxicita, testikulární toxicita, poškození hematoencefalické bariéry a nefrotoxicita. OTA byl rovněž klasifikován jako karcinogen 2B skupiny (10).

4.2.3 Trichotheceny

Trichotheceny tvoří rodinu více než šedesáti sesquiterpenoidních metabolitů produkováných řadou mykotických rodů, především rody *Fusarium*, *Myrothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* a *Trichothecium*.

Všechny trichotheceny obsahují společnou 12,13-epoxytrichithenovou kostru a alkenovou vazbu s různými substituenty na postranních řetězcích. Klasifikují se jako makrocyclické nebo nemakrocyclické v závislosti na přítomnosti makrocyclického esteru nebo ester-etherového mostu mezi C-4 a C-15. Nemakrocyclické trichotheceny mohou být dále rozdělovány do dvou skupin: typu A, které mají postranní řetězec typu vodík nebo ester na

pozici C-8 a zahrnují toxin T-2, neosolaniol a diacetoxyscirpenol, zatímco skupina typu B obsahuje keton a zahrnuje fusarenon-x, nivalenol a deoxynivalenol (3).

T-2 toxin je považován za silný cytotoxin a imunosupresivum schopné vyvolat akutní intoxikace a chronická onemocnění u lidí i zvířat. Příznaky akutní intoxikace jsou nevolnost, třes, bolest břicha, průjem a úbytek na váze. U zvířat lze pozorovat střevní krvácení, nižší produkci mléka až úhyn skotu. T-2 toxin inhibuje syntézu proteinů, což vede k sekundárnímu poškození DNA a RNA syntézy. Navíc má nepříznivý vliv na imunitní systém, který se projevuje změnami počtu leukocytů a přecitlivělostí. Vzhledem k nedostatku nesporných důkazů o lidské a zvířecí karcinogenitě, klasifikuje IARC toxin T-2 do skupiny 3 látek, které nelze klasifikovat jako lidské karcinogeny.

Deoxynivalenol (DON) je další toxin z rodiny trichothecenů, a ačkoli se na něj pohlíží jako na jeden z méně toxických mykotoxinů, DON získává na významu díky svému vysokému výskytu v potravinách po celém světě. U lidí konzumujících kontaminované potraviny vyvolává akutní nevolnost, zvracení, průjem, bolest břicha, bolest hlavy, závrať a horečku. V roce 1993 dospěla IARC k závěru, že neexistují dostatečné důkazy o karcinogenitě a zařadili toxin do skupiny 3. Ovšem synergie mezi DON a jinými mykotoxiny však byla prokázána nade vší pochybnost, například pokud je přítomen současně s AFB1, DON vykazuje výraznější mutagenní účinky (11).

4.2.4 Zearalenon

Zearalenon je nesteroidní estrogení mykotoxin produkovaný několika druhy plísní rodu *Fusarium*, ale především *Fusarium graminearum*, dále pak druhy *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium equiseti* a *Fusarium verticillioides*.

Zearalenon a jeho deriváty jsou jediné známé mykotoxiny, jejichž účinky jsou primárně estrogení. Tyto účinky umožňuje jejich trojrozměrná konfigurace, která je velmi podobná estradiolu. Zearalenon a jeho metabolity tak mohou obsadit a následně aktivovat estrogenové receptory a aktivovat genovou transkripci. Tím také může působit jako tzv. endokrinní disruptor (4).

Zearalenon je mykotoxin s řadou toxických účinků. Toxický efekt závisí na koncentraci a délce expozice, sám zearalenon a jeho metabolity však mají nízkou akutní toxicitu.

Na základě svého estrogenního účinku může způsobovat reprodukční poruchy a činí ho též potencionálním karcinogenem. Mnoho studií ukazuje, že zearalenon indukuje genotoxicitu fragmentací DNA, tvorbou mikrojader, tvorbou aduktů DNA či chromozomálními aberacemi. Dále také inhibuje proliferaci buněk a syntézu biomolekul v různých buněčných liniích. Jiné studie zjistili, že zearalenon indukuje léze v játrech s následným rozvojem karcinomu. Jsou také známy imunotoxické, nefrotoxické a hepatotoxické účinky zearalenonu (12).

4.2.5 Fumonisin

Fumonisin jsou mykotoxiny produkované vláknitými houbami, především druhy *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* a dalšími druhy rodu *Fusarium*. Produkce některých typů fumonisinů byla zjištěna i u druhu *Aspergillus niger* a *Tolypocladium inflatum* (4).

Fumonisin částečně vystupují ze skupiny mykotoxinů, protože mají jedinečné fyzikální vlastnosti. Jsou rozpustné ve vodě, acetonitrilu a methanolu, dále jsou tepelně stabilní a odolné vůči zásadám (13).

Již bylo identifikováno více než 30 homologů fumonisinů a jejich počet stále roste. Fumonisin B1 (FB1), B2 a B3 jsou nejčastější. Údaje o metabolismu FB1 u lidí jsou velmi omezené. Na pokusných zvířatech byla dokázána velmi špatná absorpce, zato velmi rychlá eliminace. Malé množství FB1 se obvykle zadržuje v játrech a ledvinách. Údaje ze studií ukazují, že fumonisin mohou souviset s rakovinou jícnu u lidí, rakovinou jater u potkanů, plicním edémem u prasat a leukoencefalomalacií u koní a oslů. Vzhledem k nedostatečnému epidemiologickému výzkumu u lidí, ale dostatečným důkazům o karcinogenitě u zvířat zařadila IARC fumonisin B1 do skupiny kancerogenů 2B, tj. možný lidský karcinogen (4,13).

4.3 Těžké kovy

Do skupiny těžkých kovů, lze obecně zařadit kovy s hustotou větší než 5 g.cm⁻³. Převážnou část z nich řadíme mezi stopové prvky. Za stopový prvek můžeme označit takový, jehož koncentrace nepřesahuje 250 pg na gram matrice. Stopové prvky můžeme dělit na tři skupiny, na prvky esenciální, potenciálně esenciální a prvky potenciálně toxické a toxické. I přes zařazení prvku do skupiny potenciálně toxických, může být ve velmi malých dávkách

pro organismus nepostradatelný. Mezi nejvíce toxické prvky řadíme olovo, kadmium, rtuť a arsen, dále pak hliník, lithium a cín (14).

Výskyt těžkých kovů a jejich koncentrace v životním prostředí má velký dopad na potravinový řetězec. Ohroženo je zdraví nejenom člověka, ale i dalších živých organismů, protože těžké kovy nejsou biologicky odbouratelné, jejich organické sloučeniny mají dlouhý poločas rozpadu a často se akumulují v různých orgánech či tkáních, což může vést k nežádoucím účinkům. Kovy užívané v průmyslu a procesy jejich zpracování, způsobují uvolnění velkého množství potenciálně toxických kovů do vodního a zemského prostředí a do atmosféry. Dalším zdrojem kontaminace potravin může být jejich kontakt s kovem během procesu výroby a skladování (15).

Obecně můžeme říci, že mají těžké kovy negativní vliv na zdraví člověka. Jejich účinky na lidský organismus mohou být hepatotoxické, neurotoxické, nefrotoxické, imunotoxické, karcinogenní, mohou ovlivňovat fertilitu a vývoj plodu u těhotných žen a stavbu kostí (14).

4.3.1 Olovo

Olovo je běžný kontaminant životního prostředí, který se nachází ve formě prvků či sloučenin ve vodě a půdě a ve stopovém množství i v potravinách. Velký podíl na znečištění životního prostředí olovem, má používání olovnaté barvy na natírání budov. V současné době můžeme stále najít více než 900 povolání (v oborech rafinace, těžby, tavení, svařování, malování, výroby vitráží a keramického skla) vystaveno olovu, což může vést k otravě olovem.

Anorganické sloučeniny olova a elementární olovo, ve formě olovnatého prachu, mohou být absorbovány trávicím a dýchacím systémem. Organické sloučeniny olova založené na kovalentních vazbách mají odlišné toxikologické účinky než anorganické. Mohou být absorbovány kůží, a poté dále pronikají až do centrálního nervového systému. Skrze plazmu se olovo také dostává do dalších měkkých i tvrdých tkáních, kde se akumuluje (16).

Akutní intoxikace se projevuje především problémy v trávicí soustavě jako je nauzea, bolest břicha, zvracení a anorexie, dále potom poruchou jater a ledvin, hypertenzí, neurologickými projevy jako encefalopatie či ospalost, to vše může vyústit ve smrt jedince. Častější je ovšem chronická intoxikace, která způsobuje bolest hlavy, letargii, svalovou slabost, křeče, podráždění, třes, paralýzu, ataxii a anémii.

Toxické účinky olova jsou založené na schopnosti nahrazovat v molekulách polyvalentní ionty (Ca^{2+} a Zn^{2+}), což ovlivňuje energetický metabolismus, intracelulární a intercelulární signalizaci, buněčnou adhezi, apoptózu, transport kovů, různé enzymatické procesy, genetickou regulaci a syntézu proteinů. Buňky mají vyvinutou vazebnou selektivitu pouze pro běžné endogenní ionty, pro ty exogenní není vyvinutý žádný regulační mechanismus (14).

4.3.2 Rtuť

Rtuť je další poměrně běžný kontaminant životního prostředí. Vyskytuje se ve třech formách, a to v elementární, anorganické a organické, každá má jinou toxicitu, přičemž nejméně toxická je elementární rtuť. Tato elementární neboli kovová rtuť je lesklý stříbrný kov, který se za pokojové teploty vyskytuje v kapalně fázi. V praxi se využívá v elektrických spínačích, barometrech, katalyzátorech a bateriích, v zubních výplních, při těžbě zlata z rudy a v řadě dalších výrobních procesů (14,16).

Ačkoli se rtuť v životním prostředí vyskytuje v malé míře, její toxicita, odolnost a bioakumulace mohou představovat vážnou zdravotní hrozbu pro člověka i další organismy. Kovová rtuť se na vzduchu oxiduje na anorganickou, také se ve formě par vstřebává dýchacím ústrojím. Díky svým rozpustným vlastnostem rtuť snadno prochází buněčnou membránou a prostřednictvím krve se dostává do dalších orgánů a tkání.

Ve srovnání s organickou formou, která postihuje hlavně centrální nervový systém, anorganická forma rtuti se distribuuje nepravidelně, především však v ledvinách, kde způsobuje akutní selhání ledvin. Rtuť je také jedna z hlavních příčin autoimunitních onemocnění, dle studií je také příčinou vzniku Alzheimerovy choroby a Parkinsonovy choroby (16).

Mechanismem toxického působení rtuti je především inhibice enzymů, jejímž důsledkem je poškození buněk. V organismu mají ionty rtuti vysokou afinitu k biomolekulám, které obsahují -SH skupinu (Alb, GSH, Mt, N-acetyl cystein, homocystein a Cys). Po absorpci do organismu, ionty rtuti vytvoří konjugáty s thioley, které jsou velmi podobné endogenním látkám, a tak snadno dochází k jejich transportu do buněk, čímž ovlivňují intracelulární procesy. Jako další toxické mechanismy se uplatňují vyvolání oxidačního stresu a autoimunitních procesů (14).

4.3.3 Kadmium

Kadmium je těžký kov, který se přirozeně vyskytuje v rudách. Spolu se svými sloučeninami je to další kontaminant životního prostředí. Za zvýšené množství kadmia v půdě může používání fosfátových hnojiv s obsahem Cd, jeho ukládání z atmosféry a sedimentace kalů v odpadních vodách. Takto zvýšený obsah prvku v půdě má za následek jeho vstup do rostlin. Obvykle se využívá jako stabilizátor pro různé produkty. Profesionální expozice kadmium zahrnuje vdechování kouře, průmysl nikl-kadmiových baterií, elektropokovování a barevné pigmenty (14,16).

Dlouhodobá expozice kadmium vdechováním může mít za následek obstrukční onemocnění dýchacích cest. Pokud bude hladina expozice vysoká dochází k akutní pneumonitidě, kterou doprovází plicní edém, jehož následkem je smrt. Polovina tělesné zátěže kadmium se ukládá v ledvinách a v játrech. Část kadmia se také ukládá v krevním řečišti do erytrocytů. U pacientů, kteří byli vystaveni kadmium byla také pozorována vyšší četnost výskytu rakoviny ledvin, varlat a prostaty a plic (14).

Nejvýznamnější z toxikologického hlediska jsou ionty Cd^{2+} . Ačkoli se kadmium špatně absorbuje z gastrointestinálního traktu i přesto je u člověka největší příjem alimentární cestou. Kadmium se v krevním řečišti váže na metalothionein, alfa globuliny, albumin nebo krevní buňky. Jedním z mechanismů toxického účinku je inhibice sulfhydrylových enzymů, ke které dochází, když kadmium vytěsňuje zinek, měď či železo z jejich vazebných míst (15).

4.3.4 Arsen

Arsen je jedním z nejtoxičtějších kovů získaných z přírodního prostředí. Jedná se o přirozeně se vyskytující prvek s všudypřítomným rozložením v zemské kůře a podzemních vodách. Za uvolňování arsenu do životního prostředí mohou především těžební procesy, ale i přírodní jevy jako je vulkanická činnost.

Arsen je vedlejším produktem při tavení mnoha rud, včetně zlata, olova, kobaltu, niklu a zinku. Arsenový plyn se používá při výrobě arsenidu galia, který se dodnes používá jako nedílná součást polovodičů, laserů, světelných diod, fotoelektrických článků a mikrovlnných zařízení. Jednou z nejvýznamnějších příčin toxicity arsenu je kontaminovaná pitná voda v důsledku eroze půdních zdrojů a kontaminovaných studní.

Akutní toxicita se projevuje gastroenteritidou následovanou hypotenzí. Dávky již pod 5 mg mají za následek nauzeu, zvracení, průjem a bolesti břicha. Hypotenze je následek dehydratace a ztráty objemu. Chronická expozice se často projevuje dermatologickými příznaky jako je hyperpigmentace a hyperkeratóza, ekzematoidní léze, bradavice a alopecie. Dlouhodobá expozice arsenu může mít také za následek bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom, rakovinu kůže, angiosarkom, hepatomegalii, rakovinu plic a močového měchýře (17).

Arsen se vyskytuje převážně ve dvou oxidačních stavech: trivalentní forma, arsenit (As_2O_3 , As III) a pentavalentní forma, arsenát (As_2O_5 , As V). Trivalentní forma je 60x více toxická než pentavalentní. Zejména As III váže thiolové nebo sulfhydrylové skupiny v tkáňových proteinech jater, plic, ledvin, sleziny, gastrointestinální sliznice a keratinových tkáních. Dále jsou rozdíly mezi organickým arsenem, který je netoxický a anorganickým, který je toxický. V důsledku arsenové toxicity dochází k inaktivaci až 200 enzymů, zejména těch, které se podílejí na buněčných energetických drahách a replikaci a opravě DNA. Také nevázaný arsen je toxický, je schopen generovat reaktivní kyslíkové molekuly, které způsobují peroxidaci lipidů a poškození DNA (18).

4.4 Kontaminace potravinových doplňků mykotoxiny

Vláknité houby, které mykotoxiny produkují, mohou růst na rostlinách přímo na poli, během sklizně, přípravy zpracování či skladování. Přítomnost toxikogenních hub nemusí nutně znamenat produkci mykotoxinů. Tato produkce je ovlivněna mnoha aspekty, včetně genetických faktorů, podmínek růstu, počasí, zeměpisné oblasti, vlhkosti, poměru $\text{CO}_2:\text{O}_2$ a přítomností fungicidů nebo jiných kompetitivních mikrobiálních druhů. Nicméně přítomnost toxigenních plísní představuje riziko kontaminace mykotoxiny.

Kontaminace surovin může mít za následek výskyt mykotoxinů v rostlinných potravinových doplňcích. Vzhledem k tomu, že toxigenní houby jsou v životním prostředí velmi rozšířené, nelze se zcela vyhnout přítomnosti mykotoxinů (19).

Kontaminace potravin mykotoxiny je trvalý celosvětový problém. Dochází k ní i tam, kde jsou zavedeny správné zemědělské, skladovací a zpracovatelské postupy. Mnohé mykotoxiny nelze eliminovat ani zpracováním, díky jejich vysoké tepelné stabilitě. Dalším

možným nebezpečím je kontaminace krmiv, touto cestou může docházet k přenosu mykotoxinů do produktů živočišného původu (9).

Většina studií zabývajících se osudem mykotoxinů během zpracování, se zaměřuje na snížení koncentrace původního (mateřského) mykotoxinu v surové plodině a v konečném produktu. Tento přístup se uplatňuje u potravin, které nezpůsobují rozklad mateřského mykotoxinu. Při zpracování může dojít k degradaci mykotoxinu na rozkladné produkty, které však mohou mít odlišné toxikokinetické a toxikodynamické vlastnosti než původní mykotoxin. Takto získané znalosti o osudu mykotoxinů při zpracování potravin jsou nezbytné pro úplné posouzení rizika konzumace potravin (20).

4.5 Kontaminace potravinových doplňků těžkými kovy

Kontaminace kovů byla zjištěna u různých typů potravinových doplňků. Tento druh kontaminace může nastat v důsledku jediného faktoru nebo kombinací více zdrojů, které se mohou lišit podle typu konkrétního doplňku. Například u rostlinných doplňků stravy může být za kontaminaci zodpovědné chemické složení půdy, vlastnosti rostliny a její podmínky při pěstování, případně další aspekty související s nedostatečnou čistotou extrakční techniky, výroba, přeprava a skladovací podmínky (19).

Znečištění těžkými kovy je rozšířeno po celé zeměkouli, vážně narušuje životní prostředí a představuje závažná zdravotní rizika pro člověka. Za hlavní příčiny tohoto problému se považuje rychlé tempo změn ve využívání půd a industrializace, zejména pak v rozvojových zemích s extrémně vysokým počtem obyvatel.

Půda je základní výživovou složkou potravinářských plodin a těžké kovy ji značně narušují. K narušení může docházet buď z bodových zdrojů, tj. energeticky náročná průmyslová odvětví jako jsou tepelné elektrárny a uhelné doly, chemický průmysl založený na práci s chlorem nebo alkalickými hydroxidy, tavení, elektropokovování, textilní a kožedělný průmysl, nebo z nebodových zdrojů, např. těžké kovy nepříznivě ovlivňují půdní biotu prostřednictvím mikrobiálních procesů a interakcí půdních mikrobů, takto je ovlivněn nejen půdní hmyz, ale i malí či velcí savci (21).

5. ANALYTICKÁ ČÁST

5.1 Analýza mykotoxinů

Stanovení maximálních přípustných limitů v mnoha zemích světa vyžaduje použití technik schopných poskytovat přesné a spolehlivé výsledky v analýze mykotoxinů. Převládající analytickou technikou je chromatografie, která se využívá při analýze mykotoxinů v potravinách a krmivech. Prostřednictvím chromatografických separací jsme schopni dosáhnout kvalitativního i kvantitativního stanovení. Nicméně chromatografické techniky mají i své nevýhody, protože se jedná o techniky vyžadující často náročnou úpravu vzorku, k odečtení výsledků je vyžadován zkušený analytik, požadují nákladnou instrumentaci a značný čas na zpracování výsledků. Další potíže pro stanovení mykotoxinů jsou způsobeny přítomností mykotoxinů často ve velmi nízkých koncentracích, koexistencí mnoha mykotoxinů ve stejné potravinové matrici a jejich rozdílnou chemickou strukturou (22).

Volba analytické techniky primárně souvisí s povahou mykotoxinu. Mezi chromatografickými technikami je tenkovrstvá chromatografie považována za nejstarší a využívá se k rychlému screeningu mykotoxinů. Jde o levnou techniku, ale měření nelze považovat za přesná a citlivá. Plynová chromatografie se při analýze mykotoxinů používá zřídka, protože převážná většina mykotoxinů jsou netěkavé a polární látky a pro jejich přeměnu je vyžadován derivatizační krok.

Současné trendy v analýze mykotoxinů jsou zaměřeny především na aplikaci robustní, rychlé, snadno použitelné a levné technologie, které jsou schopny detekovat a kvantifikovat různé mykotoxiny s vysokou citlivostí v jedné analýze. Pro splnění těchto potřeb byli vyvinuty metody využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) především ve spojení s detektorem diodového pole (DAD), fluorescenčním detektorem (FLD) a v posledních letech převážně s hmotnostním spektrometrem (MS) (9,22).

Dalšími využívanými technikami pro analýzu jsou rychlé screeningové testy, založené na imunologických reakcích. Obecně jsou tyto testy kvalitativní, prokazující přítomnost či nepřítomnost mykotoxinů. Screeningové testy mají výhodu především v rychlosti, s jakou se analýza provádí, v jednoduchosti přípravy vzorku a v nízkých nákladech. Mají také řadu nevýhod, z nichž nejpozoruhodnější je spolehlivost, protože často poskytují falešně pozitivní

výsledky. Stále se však různé typy imunologických technik v praxi používají a jsou dále vyvíjeny (23).

Kromě výše popsaných metod má potenciální využití několik dalších analytických metod. Pro své omezené použití však nebyli široce používány mimo výzkumné prostředí a vyžadují tak další ověření a validaci. Mezi takovéto metody spadají biosenzory, nukleární magnetická rezonance, kapilární elektroforéza a infračervená spektroskopie (9,22).

5.2 Možnosti stanovení mykotoxinů

5.2.1 Rychlá analytická metoda pro stanovení aflatoxinů v rostlinných doplňcích stravy a v kosmetických olejích

Pro stanovení aflatoxinů v rostlinných olejích byla vyvinuta metoda využívající extrakce na tuhé fázi (SPE) následovaná chromatografií s fluorescenční detekcí (HPLC-FD).

Vzorky olejů byly rozpuštěny v 6 ml hexanu a aplikovány do kolony pro SPE, která obsahovala 30 mg křemičité tuhé fáze. S použitím vakuového systému byla provedena extrakce a následné promytí hexanem a kombinovanými hexany v poměru 2:1 ml. Aflatoxiny byly eluovány přímo do vialek v autosampleru společně s 1,0 ml MeOH/H₂O (9:1 v/v). Chromatografická separace probíhala na koloně Inertsil ODS-3 (250 mm x 4,6 mm) s velikostí částic 5 μm. Počáteční složení mobilní fáze H₂O/CH₃CN/MeOH (45:25:30, v/v/v) bylo udržováno po dobu 2 minut, následoval gradient na 100 % MeOH během 8 minut, toto složení mobilní fáze zůstalo po další 1 minutu. Průtoková rychlost byla 1,0 ml/min.

Metodou bylo analyzováno 20 vzorků, které obsahovaly 8 rostlinných olejů běžně používaných v doplňcích stravy a v kosmetice. Stanovovanými aflatoxiny byli B1, B2, G1 a G2. Výtěžnost metody se u aflatoxinů B1, B2 a G2 blížila 100 % u všech olejových matric, výtěžky aflatoxinu G1 byli nižší, zpravidla 90 %. Maximální nalezené hladiny mykotoxinů byly 0,9 ppb pro AFB1 a AFG1 a 0,2 ppb pro AFB2 a AFG2, což jsou hodnoty výrazně nižší, než vyžadují předpisy EU (24).

5.2.2 Screening více mykotoxinů v ovoci metodou UHPLC v kombinaci s hmotnostní detekcí využívající kvadrupólový analyzátor s iontovou mobilitou a analyzátor doby letu

Pro screening ovoce a sušeného ovoce využívaného v tradiční medicíně na přítomnost 20 mykotoxinů (konkrétně *Alternaria* toxiny, ochratoxin, patulin, aflatoxiny a trichoceteny) byla vyvinuta metoda skládající se z QuEChERS extrakce (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) a ultra-účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí využívající iontovou mobilitu a analyzátor doby letu.

Analyzované ovoce bylo homogenizováno a umístěno do centrifugačních zkumavek s přidáním 10 ml vody a 10 ml acetonitrilu s obsahem 1% kyseliny octové. Směs byla protřepána při 2500 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. Následně byly přidány 4 g bezvodého $MgSO_4$ a 1 g NaCl za prudkého protřepávání. Po centrifugaci 5 minut při $5000 \times g$ byl supernatant téměř odpařen do sucha pod proudem dusíku při $40^\circ C$. V posledním kroku byl ke vzorku přidán 1 ml kombinovaného roztoku acetonitril/metanol/kyselina mravenčí (70:29:1, v/v/v) a po řádném promíchání došlo k přefiltrování přes polytetrafluorethylenový (PTFE) filtr $0,22 \mu m$ a nadávkování do systému UPLC-IMS QTOF MS. Chromatografická separace probíhala při $40^\circ C$ na koloně Acquity UPLC HSS T3 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$) s velikostí částic $1,8 \mu m$. Mobilní fáze sestávala ze složky A obsahující acetonitril s kyselinou mravenčí 0,1 % (v/v) a složky B obsahující ultračistou vodu s kyselinou mravenčí 0,1 % (v/v). Byla použita gradientová eluce, zpočátku bylo použito 5% mobilní fáze A, lineárně navýšena na 80 % do 2,5 minut a 90 % do 2 minut, poté udržováno po dobu 1,5 minuty. Průtoková rychlost byla 0,3 ml/min.

Pro vyhodnocení účinnosti vyvinuté metody byli získány uspokojivé validační parametry, jako linearita ($R^2 \geq 0,9992$), preciznost (relativní směrodatná odchylka $\leq 9,8 \%$), výtěžnost (81,2 - 99,2 %), limit detekce (LOD) ($0,06 - 2,22 \mu g \cdot kg^{-1}$) a limit kvantifikace (LOQ) ($0,2 - 7,39 \mu g \cdot kg^{-1}$). Výsledky také ukázaly, že v analyzovaných vzorcích byly zjištěny všechny cílené mykotoxiny s výjimkou ZEN. Nejrozšířenějším mykotoxinem byl alternariol monomethyl ether (AME) (69,23 %) a v čerstvém ovoci byla v nejvyšší koncentraci zastoupena kyselina tenuazonová ($7830,19 \mu g \cdot kg^{-1}$). Ze vzorků sušeného ovoce byly u více než 50 % vzorků zjištěny čtyři mykotoxiny (AFB2, AME, tentoxin, enniatin B), přičemž nejrozšířenější byl AFB2 (25).

5.2.3 Výskyt aflatoxinů v potravinových doplňcích s obsahem ostropestřce mariánského

Byla vyvinuta metoda pro stanovení aflatoxinů v potravinových doplňcích obsahujících ostropestřec mariánský, sestávající z extrakce acetonitril/voda, pročištění na imunoafinitní koloně (IAC), separace kapalinovou chromatografií, postkolonové derivace a fluorescenční detekce.

K přípravkům s obsahem ostropestřce byl přidán roztok acetonitril/voda (84:16, v/v) a 0,4 g NaCl. Po promíchání na třepačce došlo k centrifugaci při 7000 otáčkách/min po dobu 10 minut. Následně došlo k smíchání 10 ml supernatantu a 90 ml ředícího roztoku (10 mM PBS obsahujícího 0,1 % Tween 20), tato směs byla filtrována přes filtrační papír s mikrovláknou. Na IAC bylo nanášeno 50 ml filtrátu. K eluci byl použit methanol. Chromatografická separace probíhala na koloně YMC C18 (150 × 4,6 mm) s velikostí částic 3 μm. Mobilní fáze byla složena ze směsi methanol/acetonitril/voda (25:15:60, v/v/v). Průtoková rychlost byla 0,8 ml/min.

Průměrná výtěžnost metody byla 76 %. Průměrná relativní směrodatná odchylka (RSD) byla 5,10 %, mez detekce 0,01 mg.kg⁻¹ a mez kvantifikace 0,03 mg.kg⁻¹. Výsledky ukázaly, že 19 % testovaných vzorků obsahovalo aflatoxiny v hodnotách 0,04-2,04 mg.kg⁻¹ (26).

5.2.4 Stanovení toxických látek, pesticidů a mykotoxinů v potravinových doplňcích s ginkgo biloba metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí využívající Orbitrap

Byla vyvinuta metoda pro stanovení a kvantifikaci více než 250 toxických látek v produktech s obsahem ginkgo biloba. Pro extrakci byl využit postup „zředění a dávkování“, následované čištěním za použití směsi různých sorbentů. Separace využívá kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí s vysokým rozlišením.

Vývoj extrakční metody byl proveden metodou „zředění a dávkování“ v několika krocích, kdy nejprve došlo k smíchání 2,5 g vzorku s optimálním množstvím směsi standardů pro dosažení cílové koncentrace 100 μg.kg⁻¹ k určení extrakční účinnosti na této hladině. V dalším kroku došlo k přidání 2,5 ml vody a řádnému protřepání po dobu 30 s, dále došlo k přidání 7,5 ml acetonitrilu okyseleného kyselinou mravenčí (1 %, v/v), protřepání po dobu 1 hod a centrifugaci při 2755 × g po dobu 10 min. Pro chromatografickou separaci byla využita kolona Hypersil GOLD aQ (100 × 2,1 mm) s velikostí částic 1,9 μm. Jako mobilní fáze byla

použita směs vodného roztoku mravenčanu amonného 4mM a kyseliny mravenčí 0,01 % (v/v) (eluent A) a methanolvý roztok mravenčanu amonného 4mM a kyseliny mravenčí 0,01 % (v/v) (eluent B). Gradient pro analýzu byl nastaven pro začátek na 95 % eluentu A. Po 1 minutě bylo toto procento lineárně sníženo na 0 % za 7 minut, toto uspořádání zůstalo zachováno po 4 minuty a následně se znovu zvýšilo na 95 % za 0,5 minut. Teplota kolony byla nastavena na 30 °C a průtoková rychlost byla 0,3 ml/min.

Extrakční výtěžnost metody se pohybovala v rozmezí 70 a 120 % s hodnotami RSD nižšími než 20 %. Byly získány meze detekce a kvantifikace nižší než 5, respektive 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. V 6 vzorcích byly nalezeny v různých koncentračních rozmezích mykotoxiny AFB1 (5- 54 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), AFB2 (4 - 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a T-2 toxin (18–20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Je třeba zmínit, že tyto hodnoty jsou velmi vysoké, zejména hodnoty pro AFB2, přičemž tolerované limity definované v evropských právních předpisech pro ostatní matrice jsou nižší než 2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (27).

5.2.5 Stanovení aflatoxinů, deoxynivalenolu, ochratoxinu A a zearalenonu v doplňcích na bázi pšeničných a ovesných otrub, prodáváných na španělském trhu.

V dnešní době se setkáváme s nárůstem konzumace potravinových doplňků obsahujících otruby, pro jejich vysoký obsah vlákniny. Cílem studie bylo stanovení koncentrací vybraných mykotoxinů ve vzorcích doplňků stravy na bázi otrub určených k přímé spotřebě.

Pro stanovení aflatoxinů a OTA byl zvolen následující postup. Vzorek otrub byl smíchán s extrakčním roztokem (60 % acetonitrilu, 40% vody), přefiltrován přes filtr Whatman č.1. Následně byli 2 ml filtrátu zředěny PBS a aplikovány na IAC. Separace probíhala na chromatografické koloně Water Spherisorb (250 × 4,6 mm) s velikostí částic 5 μm . Mobilní fáze sestávala z methanolu (27 %), acetonitrilu (14 %) a kyseliny octové 0,1 % (59 %), toto složení bylo udržováno po dobu 16 minut a pak změněno na methanol (50 %) a acetonitril (50 %). Průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,8 ml/min. Pro stanovení aflatoxinů byla ještě třeba postkolonová derivatizace a následná detekce fluorescenčním detektorem.

Pro stanovení DON byl zvolen následující postup. Vzorek otrub byl smíchán s 40 ml destilované vody a centrifugován po dobu 8 minut při 1780 × g. Supernatant byl přefiltrován přes mikrovláknový filtr a 5 ml filtrátu bylo nanášeno na IAC. Vyčištěné vzorky byly promíchány

s roztokem mobilní fáze ve složení voda/acetonitril/methanol (92:4:4). Pro chromatografickou separaci byla využita HPLC ve spojení s UV detektorem. Průtok mobilní fáze byl 1,2 ml/min.

Pro stanovení ZEA byl zvolen následující postup. Vzorek otrub byl smíchán s 25 ml extrakčního roztoku ve složení acetonitril/mili-Q voda (75:25) a profiltrován přes filtr Whatman č.1. z filtrátu bylo odebráno 10 ml a zředěno PBS a aplikováno na IAC. Chromatografická separace probíhala na stejné koloně jako v případě aflatoxinů a OTA. Mobilní fáze sestávala z acetonitrilu a vody (60:40), nastavené na pH 3,2 kyselinou octovou. Průtoková rychlost byla 1 ml/min.

Tři ze čtyř studovaných mykotoxinů (ZEA, DON, AF a OTA) byly často detekovány v mnoha vzorcích. V žádném vzorku nebyli zjištěny AF (limit detekce $0,55 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Analyzovaným mykotoxinem s velkou incidencí byl DON, který byl přítomen v 28 vzorcích (42 %) v rozsahu koncentrací od LOD ($100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) do hodnot $6178 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Třináct vzorků (19 %) vykazovalo hodnoty DON nad legislativním limitem EU ($750 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). ZEA byl přítomen v 10 vzorcích (15 %), koncentrace se pohybovala v rozmezí od LOD ($2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) do $25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. OTA byl přítomen v 17 vzorcích (25 %) v rozmezí koncentrací LOD ($0,2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a $2,3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. DON byl jediný analyzovaný mykotoxin, který byl zjištěn v koncentracích nad zákonnými limity EU (28).

5.2.6 Výskyt mykotoxinů v infúzních nápojích využívaných jako doplňky stravy

Cílem studie bylo stanovení mykotoxinů metodou kapalinové chromatografie spojenou s hmotnostní spektrometrií s analyzátozem iontové pasti (LC-MS/MS-IT) po disperzní liquid mikroextrakci (DLLME).

Pro postup DLLME bylo nadávkováno 5 ml předem připraveného čaje do kónické zkumavky a přidán 1 g NaCl. Po 1minutovém míchání byla přidána směs disperze (CH_3CN) a extrakčního rozpouštědla (EtOAc) a vzorek byl následně další minutu protřepáván. Byla provedena centrifugace při 4000 otáčkách/min a odebrána organická fáze. Ke zbytku byla přidána směs disperze (MeOH) a extrakčního rozpouštědla (CHCl_3) a po protřepání a oddělení byla organická fáze opět přidána k oddělené první organické fázi, tyto dvě fáze byly pod proudem dusíku odpařovány téměř do sucha. Získaný vzorek byl rekonstituován v mravenčanu amonném (20mM) a přefiltrován nylonovým filtrem. Chromatografická separace probíhala na koloně Gemini-NX C18 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$) s velikostí částic $5 \mu\text{m}$

při teplotě 40 °C. Mobilní fáze sestávala z eluentu A: voda okyselená mravenčanem amonným (5mM) a kyselina mravenčí 0,1 % a z eluentu B: methanol okyselený mravenčanem amonným (5mM) a kyselina mravenčí 0,1 %. Eluční gradient začínal 0 % eluent B, po 10 minutách došlo ke zvýšení na 100 %, dále po dobu 5 minut došlo ke snížení na 80 % eluentu B a nakonec k poklesu na 70%. Průtoková rychlost byla 0,25 ml/min.

Tato metoda zaznamenává velmi dobrou linearitu (R^2 v rozmezí 0,993 a 0,999). Hodnoty pro LOD se pohybovaly v rozmezí od 0,05 $\mu\text{g.l}^{-1}$ do 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Získané výsledky ukázaly, že ve vzorcích byly zjištěny následující mykotoxiny: AFB2 v koncentracích 19,1-134,7 $\mu\text{g.l}^{-1}$, a AFG2 v koncentracích 2,2-13,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Také byl v jednom vzorku detekován 15- acetyldeoxynivalenol v hodnotě 112,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a enniatin B byl detekován ve dvou vzorcích, ale ve velmi nízkých koncentracích. Evropská komise nestanovila úroveň koncentrace mykotoxinů v bylinných infuzích, ale v podobných produktech, jako je koření. Maximální limity jsou nastaveny pro AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 v pepři (15 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), muškátový oříšek, zázvor a kurkuma (20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) a pro směsi těchto koření (15 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Pro AFB2 a DON byly tedy tyto limity u testovaných doplňků několikrát překročeny (29).

5.2.7 Vývoj a validace metody LC-MS/MS pro současné stanovení citrininu a ochratoxinu v různých krmivech a potravinách

Byla vyvinuta metoda UHPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií využívající elektrosprej pro současnou analýzu citrininu (CIT) a ochratoxinu A v krmivech s potravinách (obilné výrobky, ovoce, zeleninové šťávy, ořechy, semena, bylinky, koření, sójové výrobky, alkoholické nápoje, kojenecká výživa a doplňky stravy).

Mykotoxiny byli z těchto matric extrahovány metodou založenou na QuEChERS bez dalšího přečištění. Vzorky byli pětinasobně koncentrované. Chromatografická separace probíhala na koloně Acquity UPLC HSS T3 (100 × 0,1 mm) s velikostí částic 1,8 μm , při teplotě 40 °C. Mobilní fáze sestávala z eluentu A: kyselina octová 0,05 % (v/v) a 5 mM vodný roztok octanu amonného, a z eluentu B: MeOH. Separace byla zahájena lineárním nárůstem eluentu B z 30 % na 90 % během 6,5 min, s okamžitým nárůstem eluentu B na 100 % a zachováním těchto podmínek po další 2,5 min. Průtoková rychlost byla 0,4 ml/min.

Tato metoda zaznamenává u většiny matric hodnotu korelačního koeficientu ($R^2 \geq 0,995$), což značí dobrou linearitu. Výtěžnost se pohybovala v rozsahu u CIT 70-120 % a

u OTA 70-110 %. Všechny hodnoty RSD byly nižší než 20 %. Limit detekce u CIT se pohyboval v hodnotách 0,1-2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, v závislosti na matrici, a u OTA v hodnotách 0,1-1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. LOQ u CIT byl v rozsahu 0,3-5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a u OTA v rozsahu 0,3-1,9 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Metoda pro kvantitativní analýzu CIT a OTA byla validována v souladu s požadavky evropské legislativy, pro každou matrici (prasečí krmivo, pšeničná mouka, jablečný džus, vlašské ořechy, pivo, slunečnicová semena, muškátový oříšek, tofu, potravinové doplňky na bázi červené rýže a dětské sušené mléko). V současné době jsou nastaveny pouze limity maximálních koncentrací v krmivech a vybraných potravinách pro OTA, avšak nejsou stanoveny pro CIT, s výjimkou potravinových doplňků na bázi červené rýže, kde je definovaný limit 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (30).

5.2.8 Příprava citrinin-selektivního molekulárně vtištěného polymeru a jeho použití pro on-line extrakci na tuhou fázi ve spojení s kapalinovou chromatografií

Byla vyvinuta plně validovaná metoda, pro kterou byl připraven selektivní molekulárně vtištěný polymer (MIP), použitý pro extrakci v on-line systému SPE-HPLC, aby se dosáhlo selektivního stanovení citrininu. Metoda byla následně použita pro analýzu doplňků stravy na bázi červené rýže.

Polymerační směsi pro přípravu MIP a jejich nevtištěných analogů se skládaly z funkčního monomeru (akrylamid nebo 4-vinilpyridin), porogenního rozpouštědla (aceton nebo acetonitril), síťovadla (ethylendimethylakrylát) a iniciátoru volných radikálů (azobisisobutyronitril). Do směsi pro přípravu MIP byla také přidána 1-hydroxy-2-naftoová kyselina, která je strukturně velmi podobná citrininu. Směsi byly polymerovány ve skleněných zkumavkách umístěných v olejové lázni zahřáté na 60 °C po dobu 24 hodin. Takto vytvořená polymerová tyčinka byla rozdrcena a proseta, aby byli získány částice o velikosti 32-80 μm .

Do extrakční kolony byl v iniciační promývací fázi dávkován vzorek sestávající z 25 % MeOH ve vodné 0,5 % kyselině octové. Po jedné minutě došlo k přepnutí ventilu a pomocí mobilní fáze obsahující 30 % acetonitrilu ve vodné 0,5 % kyselině octové, došlo k uvolnění sloučenin na analytickou kolonu v systému HPLC. Chromatografická separace probíhala na koloně Kinetex Biphenyl (100 × 4,6 mm) v velikostí částic 5 μm . Separace byla provedena za použití acetonitrilového gradientu lineárně stoupajícího z 30 do 75 % během

4 minut. V závěru byly obě kolony proplachovány 100 % acetonitrilem po dobu 1 minuty pro odstranění nečistot. Průtoková rychlost byla 1ml/min.

Výtěžnost metody pro potravinové doplňky na bázi červené rýže byla 75,6 %, korelační koeficient byl v hodnotách 0,9998, limit detekce byl stanoven pro hodnotu 7,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a limit kvantifikace pro hodnotu 25 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Bylo analyzováno 6 doplňků stravy z nichž 2 byly kontaminovány citrininen ve velmi malých koncentracích nepřekračujících limity dané EU (31).

5.2.9 Stanovení více toxinů v doplňcích stravy obsahujících extrakty ze zelených kávových zrn za použití ultra-účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Byla vyvinuta metoda UHPLC metoda s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro stanovení 34 mykotoxinů v doplňcích stravy obsahujících extrakty ze zelených kávových zrn.

Pro izolaci analytů byl použit postup podobný QuEChERS. Chromatografická separace probíhala na koloně Acquity UPLC HSS T3 (100 × 2,1 mm) s velikostí částic 1,7 μm , při teplotě 40 °C. V závislosti na nastavení polarizace elektrospřeje byli použity různé mobilní fáze. U analýz provedených v pozitivním iontovém režimu byl eluent A složen z 5 mM vodného roztoku mravenčanu amonného a kyseliny mravenčí 0,2 %, u záporného iontového režimu byl eluent A složen z 5 mM octanu amonného. Eluent B byl tvořen methanolem. Gradient pro separaci byl nastaven následovně: 5 % eluentu B s nárůstem na 50 % během 1 min, další nárůst eluentu B na 100 % během dalších 7 min a toto složení udržováno po další 2 min. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,4 ml/min.

Přesnost metody vyjádřena RSD byla nižší než 12 %. Průměrná výtěžnost analytů se pohybovala v rozmezí 75-110 %. Meze detekce byly v rozmezích 1,0-50,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Meze kvantifikace byly v hodnotách 2,5-100 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Bylo testováno 50 komerčně dostupných potravinových doplňků a v nich nalezeny 4 mykotoxiny: OTA (v 36 % vzorků), OTB (32 %), fumonisin B1 (10 %) a kyselina mykofenolová (16 %). Tyto mykotoxiny se vyskytovaly v následujících koncentračních rozmezích: OTA (<1,0-136,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), OTB (<1,0-20,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), fumonisin B1 (<50,0-415,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) a kyselina mykofenolová (<5,0-395,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Přestože pro extrakty ze zelených kávových zrn není v EU stanoven žádný limit, suma fumonisinů B1 a B2 je v obilovinách regulována v koncentracích 800-4000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Taktéž i pro OTA, kde norma

pro většinu potravin a produktů z nich je nastavena v rozmezí 2-20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ byla několikrát překročena (32).

5.2.10 Multiplexování dat nezávislých a necílených pracovních postupů pro screening mykotoxinů na platformě hmotnostní spektrometrie (kvadrupól-Orbitrap) s vysokým rozlišením

Byla vyvinuta nová multianalytická strategie pro screening mykotoxinů a jejich produktů v potravinových doplňcích ze zeleného čaje. Bylo stanovováno 7 tříd mykotoxinů za použití plně automatizované on-line extrakce následované ultraúčinnou kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením.

Použitý extrakční postup byl založen na metodě „zředění a přímého nástřiku“. Přečišťující krok byl proveden metodou d-SPE (disperzní extrakce na pevné fázi). Chromatografická separace probíhala na koloně Hypersil Gold AQ C18 (100 × 2,1 mm) s velikostí částic 1,9 μm , při teplotě 30 °C. Mobilní fáze A a B byly voda a MeOH, obě obsahující 4 mM mravenčan amonný a okyselené kyselinou mravenčí 0,1 % (v/v). Gradient byl zahájen 100 % eluentu A po dobu 1 min, následně došlo k navýšení eluentu B na 100 % během 7 min, toto složení zůstalo po následující 2 min. Průtoková rychlost byla 0,3 ml/min.

Analyzované mykotoxiny vykazovaly výtěžnost v rozmezí 82-108 %. Linearita určená korelačním koeficientem se pohybovala v rozmezí 0,9920-0,9999. RSD byly v hodnotách 3,2- 14,9 %. Limit kvantifikace se pohyboval v rozmezí 0,022-0,50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Z 89 analyzovaných vzorků bylo 7 kontaminováno mykotoxiny. AFB1 byl nalezen ve dvou vzorcích (v koncentracích 0,97 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a 0,95 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). V nejvyšší koncentraci byl nalezen T-2 toxin (7,92 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a dva vzorky byly pozitivní na přítomnost více než 2 mykotoxinů. Pro potravinové doplňky ze zeleného čaje nejsou nastaveny limity maximálních přípustných koncentrací mykotoxinů, ale v jiných potravinách existují určité limity tolerance, které jsou nižší než 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro AFB1 (33).

5.3 Analýza těžkých kovů

Odhaduje se, že 70-80% světové populace se spoléhá na medicínu, především rostlinného původu. Vzhledem k povaze zdrojů rostlinných léčivých přípravků, dochází někdy ke kontaminaci těžkými kovy, jako je olovo, arsen, kadmium a rtuť, které představují vážná

zdravotní rizika pro spotřebitele. Zásadní význam má analýza výchozích materiálů pro těžké kovy, aby se zajistilo, že jejich koncentrace splňuje související normy omezující jejich koncentrace v léčivých přípravcích či suplementech. Nicméně i ve finálních produktech se mohou objevit kontaminanty. Dle nařízení 629/2008/ES jsou pro Českou republiku stanoveny limity pro obsah olova ($3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$), rtuti ($0,10 \text{ mg.kg}^{-1}$) a kadmia ($1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) v potravinových doplňcích (34, 35).

Pro stanovení těžkých kovů v různých matricích je možno využít mnoho technik. Často se v analýze používají optické metody. Jednou ze základních analytických technik pro stanovení těžkých kovů a defacto zlatým standardem je obecně atomová absorpční spektrometrie (AAS), která využívá vlastnosti atomů absorbovat světlo specifické vlnové délky, a toto pohlcené množství energie je úměrné koncentraci atomů přítomných ve vzorku. Metoda umožňuje stanovit až 70 prvků, avšak je poměrně přístrojově náročná. V dnešní době má tato technika již několik variací, jako je atomová absorpční spektrometrie v grafitové peci (GFAAS), která dosahuje vyšší citlivosti nebo atomová absorpční spektrometrie studených par (CVAAS), která se využívá pro stanovení rtuti, neboť ta se vyskytuje ve volné formě při pokojové teplotě. Atomová fluorescenční spektrometrie (AFS) se od AAS liší ve způsobu excitace atomů a v detekci emitovaných signálů. Rentgenová fluorescenční spektroskopie (XRFS) využívá silné rentgenové nebo gama záření k ionizaci atomů, v důsledku čehož dochází v závěru k vyzaření fluorescence, která je však jedinečná pro každý prvek, kvůli jeho specifickému uspořádání energetických hladin. Proto XRFS umožňuje měřit elementární složení vzorku nedestruktivně.

V posledních letech se masově používanou analytickou technikou stala emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES), jde o techniku používanou ke stanovení především stopového množství kovových prvků měřením charakteristické vlnové délky specifického světla, které kovy vyzařují při vystavení elektrickým proudům, které vznikají elektromagnetickou indukcí. Také se můžeme setkat s uspořádáním, kde výboj indukčně vázané plazmy slouží jako zdroj iontů pro hmotnostní spektrometrii (IPC-MS) (34,36).

HPLC se běžně používá k separaci molekul na základě jejich polarity či lipofility. Samotné těžké kovy nemohou být stanovovány pomocí HPLC, protože jako ionty postrádají lipofilitu. Je však možné využít předkolonových derivatizačních kroků s chelatačními činidly, které již umožní separaci vzniklých komplexů.

Jako vysoce citlivá, levná a spolehlivá technika pro stanovení stopových množství se v mnoha podobách využívá anodická rozpouštěcí voltametrie (ASV). Další podtřídou voltametrie je také diferenční pulzní polarografie (DPP), která používá jako pracovní elektrodu rtuťovou kapku a umožňuje detekční limity v řádech 10^{-8} mol.l⁻¹.

Neutronová aktivační analýza (NAA) je metoda, která umožňuje stanovení koncentrace prvků ve velkém množství materiálu, protože nebere v úvahu chemickou podstatu vzorku, ale zaměřuje se pouze na jádra atomů. Vzorek je bombardován neutrony, čímž vznikají radioaktivní izotopy a dráhy těchto radioaktivních rozpadů jsou pro většinu prvků dobře známé. Výhodou této techniky je, že nedochází k destrukci vzorku (34).

5.4 Možnosti stanovení těžkých kovů

5.4.1 Vývoj a validace spektrometrické metody pro stanovení kadmia a olova u zeolitů a vyhodnocení bezpečnosti

Pro stanovení stopových množství Cd a Pb v zeolitech používaných jako doplňky stravy byla vyvinuta a validována analytická metoda založená na mikrovlnné digesční spektrometrii a atomové absorpční spektrometrii s grafitovou pecí jako atomizátorem (GF-AAS).

Mikrovlnná digesce vzorku byla provedena směsí 65 % HNO₃, 37 % HCl a 40 % HF. Program ohřevu zahrnoval tři kroky: ohřev na 160 °C, 200 °C a chlazení na 100 °C v celkové době 30 min. Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo přidáno 20 ml nasycené H₃BO₃ a vzorky byly znovu zahřívány na 160 °C v mikrovlnném systému po dobu 15 min. Vzorky byly zchlazeny na pokojovou teplotu a přefiltrovány přes celulózové filtry pomocí trychtýřů z PTFE do odměrných baněk o objemu 50 ml a zředěny do konečného objemu ultračistou vodou. Výsledné stanovení Cd a Pb bylo provedeno metodou GF-AAS.

Výtěžnost metody pro Cd i Pb se pohybovala v rozmezí 80-110 %. Získané hodnoty LOD (0,03 mg.kg⁻¹ pro Cd a 0,13 mg.kg⁻¹ pro Pb) a LOQ (0,10 mg.kg⁻¹ pro Cd a 0,43 mg.kg⁻¹ pro Pb) byly nižší než limity stanovené právními předpisy. V analyzovaných doplňcích stravy byla nalezena průměrná koncentrace Pb 2,4 mg.kg⁻¹, což je směrnice tolerovaná hodnota. Kadmium se ve všech hodnocených vzorcích nacházelo pod limitem kvantifikace (37).

5.4.2 Současné stanovení a speciální analýza arsenu a chromu v doplňcích železa používaných k léčbě anémie pomocí HPLC-ICP-MS

Tato metoda navrhuje použití vysoce účinné kapalinové chromatografie spojené v kombinaci s indukčně vázaným plazmatem a hmotnostní spektrometrií pro simultánní stanovení arsenu a chromu v doplňcích železa.

Jako extrakční proces byla zvolena mikrovlnná digesce, provedena se směsí 69,0 % HNO₃ a 30,0 % H₂O₂. Ohřevný program sestával ze čtyř kroků: zahřívání při 90 °C po dobu 2 min, 140 °C po dobu 5 min, 200 °C po dobu 5 min a udržování při 200 °C po 11 min. Následně byly vzorky ochlazeny na pokojovou teplotu a zředěny do 25 ml ultračistou vodou. Chromatografická separace probíhala na koloně Phenomenex Kinetex C18 (100 × 4,6 mm) s velikostí částic 2,6 μm. Mobilní fáze obsahovala 1,0 mM tetrabutylamonium hydroxid, 0,7 mM EDTA a 5 % MeOH při pH 7,2. Analýza probíhala v izokratickém režimu. Průtoková rychlost byla 0,7 ml/min. Stanovení koncentrací bylo provedeno metodou ICP-MS.

Metoda vykazovala dobrou výtěžnost v rozmezí 81-119 %. Preciznost daná relativní směrodatnou odchylkou byla 5 % pro arsen a 4 % pro chrom. LOD a LOQ byly 0,009 a 0,027 μg.g⁻¹ pro arsen a 0,029 a 0,089 μg.g⁻¹ pro chrom. Bylo analyzováno 15 doplňků stravy, u osmi byl obsah As nižší než LOQ a u dalších vzorků se nacházela koncentrace As od 0,04- 1,5 μg.g⁻¹. U Cr byly koncentrace ve třech vzorcích nižší než LOQ a v ostatních vzorcích se koncentrace nacházela v rozmezí 0,18-62,3 μg.g⁻¹. Pouze u jednoho vzorku byla překročena hladina As stanovená US Pharmacopeia (38).

5.4.3 Mikrovlnná digesce s použitím zředěného roztoku kyseliny dusičné a zkoumání kalibračních strategií pro stanovení As, Cd, Hg a Pb v doplňcích stravy pomocí ICP-MS

Metoda navrhuje analytický postup pro přípravu vzorků doplňků stravy pro sportovce mikrovlnou digescí s použitím roztoku zředěné kyseliny dusičné následovaný stanovením kontaminantů (As, Cd, Hg, Pb) pomocí ICP-MS.

Pro optimalizaci přípravy vzorku byla použita upravená Doehlertova faktoriální metoda ve třech úrovních pro variabilní koncentraci HNO₃ a ve čtyřech úrovních pro variabilní objem H₂O₂. Do jednoduché reakční komory byly napipetovány objemy 150 ml vody a 5,0 ml koncentrované HNO₃. Komora byla přetlakována plynným dusíkem na 40 barů. Ohřevný

program byl aplikován takto: 2,5 min do dosažení 180 °C, 2,5 min při 180 °C, 2,5 min do dosažení 210 °C, 2,5 min při 210 °C, 10 min do dosažení 220 °C a 10 min při 220 °C. Následně byly vzorky zředěny destilovanou deionizovanou vodou na 20,0 ml a alikvotní část každého roztoku byla vhodně dvojnásobně naředěna. Následovala kvantifikace pomocí IPC-MS.

Výtěžnosti metody se pohybovaly v rozmezích 82-125 % v závislosti na použité kalibrační metodě. Preciznost byla nižší než 10 % RSD. Limity kvantifikace se nacházeli v rozmezí 0,020-0,034 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro As, $4,8-5,3\times 10^{-3}$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro Cd, 0,30-0,37 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro Hg a 0,026-0,038 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro Pb. Korelační koeficient byl vyšší než 0,9991. Všechny analyty se nacházely v koncentracích pod příslušnými LOD a LOQ, s výjimkou As v jednom vzorku, Cd v sedmi vzorcích a Pb ve třech vzorcích. Avšak všechny analyzované sportovní doplňky vykazovaly koncentrace pod maximálními povolenými limity (39).

5.4.4 Stanovení rtuti v přírodních zeolitech metodou atomové absorpční spektrometrie s tepelným rozkladem. Validace metody v souladu s požadavky na použití zeolitů jako doplňků stravy

Byla vyvinuta metoda pro přímé stanovení celkové Hg ve vzorcích zeolitu založená na atomové absorpční spektrometrii s tepelným rozkladem (TD-AAS).

Metoda sestává ze dvou částí. V první části dochází k tepelnému rozkladu, kdy se vzorek s obsahem rtuti umístí do niklových nádob a zavede se do pece, kde se vzorek suší a rozkládá při teplotě, která zajišťuje uvolňování Hg spolu s ostatními sloučeninami. Všechny uvolněné sloučeniny jsou dále přenášeny katalyzátorovou trubicí proudem kyslíku, kde se Hg^{2+} oxiduje na kovovou rtuť (Hg^0). V této trubici také dochází k zadržení rušivých sloučenin jako jsou halogeny a oxidy dusíku a síry. V závěru prochází tok rtuti zlatým amalgátorem, který kovovou rtuť vychytá. Po této fázi se amalgátor zahřeje, čímž se rtuť uvolní a je dále unášena do měřicí části přístroje, ve které se nachází atomový absorpční spektrometr.

Metoda vykazuje výtěžnost v hodnotách 85-115 % a preciznost nižší než 20 %. Limit detekce rtuti byl 0,45 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a limit kvantifikace 0,90 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Celkové koncentrace Hg ve zkoumaných vzorcích se pohybovaly v rozmezí 36,0-152 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Navzdory tomu, že ve většině vzorků (80 %) byla koncentrace Hg nižší než 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ve třech vzorcích byla překročena maximální povolená hodnota pro celkovou rtuť v doplňcích stravy, stanovená právními předpisy (40).

5.4.5 Stanovení toxických kovů pomocí ICP-MS v asijských a evropských léčivých rostlinách a doplňcích stravy

Pro stanovení koncentrací těžkých kovů (Cd, Pb, Al, As, Ba, Ni a Sb) byla použita metoda indukčně vázaná plazmatická hmotnostní spektrometrie s extrakčním postupem mikrovlnné digesce využívajícím HNO₃.

Pro následné stanovení metodou ICP-MS byly vzorky rostlin i doplňků stravy vysušeny a přeneseny do teflonových nádob. Po přidání 65 % HNO₃ byly podrobeny mineralizaci mikrovlnou digescí po dobu 30 min. V závěru byly vzorky kvantitativně přeneseny do 50 ml odměrných baněk a doplněny deionizovanou vodou. Analýza byla provedena podle schématu, které by se dalo stručně popsat následovně: zavedení vzorku, nebulizace, fragmentace sloučenin s charakteristických iontovým nábojem, ionizace prvků ve vysokoteplotním argonovém plazmatu, hmotnostní separace ve kvadrupólovém analyzátoru a detekce na základě poměru m/z.

Výtěžnost metody byla více než 95 %. Limity detekce bylo pro Cd $0,9 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Pb $1,3 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Sb $0,8 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Ni $5,1 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Ba $3,5 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, Al $11,5 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a As $9,4 \times 10^{-6}$ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Analýza vzorků rostlin a doplňků stravy ukázala, že obsah Pb a Cd nepřekračuje hladiny stanovované právními předpisy, výjimku tvoří doplňky stravy z rostliny *Bacopa monnieri*, kde byla nalezena koncentrace Pb $9,27 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (maximální povolená hodnota $3,00 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Pro další analyzované toxické kovy nejsou stanovené maximální limity (41).

5.4.6 Vývoj, validace a aplikace metody ICP-SFMS pro stanovení kovů ve vzorcích proteinových prášků pocházejících z Irska, s hodnocením rizik pro irské spotřebitele

Byla vyvinuta a optimalizována metoda ICP-SFMS (inductively coupled plasma-sector field mass spectrometer) pro analýzu potravinových suplementů ve formě proteinových prášků. Tato metoda byla použita při hodnocení 21 prvků (Al, Au, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Li, Mg, Mn, Mo, Pb, Pt, Sn, Ti, Tl, V).

Pro přípravu vzorku byla využita metoda mikrovlnné digesce. Proteinový prášek byl smíchan s 67 % HNO₃ a 34 % HCl a deionizovanou vodou. Ohřevný program probíhal následovně: během 15 minut zvýšení na 170 °C, udrženo zde po 1 min, zvýšení na 190 °C

během 10 min a při této teplotě udržováno po 20 min před ochlazením. Vzorky byly skladovány při -24 °C a před ICP-SFMS analýzou ponechány ekvilibrovat při pokojové teplotě a ředěny roztokem 2,82 % HNO₃/0,24 % HCl v poměru 1:5.

Výtěžnost metody se nacházela v rozmezí 85-115 %. Mnoho z testovaných vzorků mělo koncentrace nižší než mez detekce u Li, Be a Sn, zatímco mnoho výsledků Al a Fe se nacházelo nad kalibračním rozmezím. U všech testovaných vzorků byl také překročen kalibrační rozsah Mg. Koncentrace Cd se nacházely v rozmezí 0,6-58,1 µg.kg⁻¹, Hg <0,2-18,4 µg.kg⁻¹ a Pb 0,8- 88,4 µg.kg⁻¹, což jsou hodnoty tolerované právními předpisy (42).

6. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo sesbírat informace o nejčastějších kontaminantech potravinových doplňků, konkrétně o mykotoxinech a těžkých kovech, seznámit se se způsoby kontaminace i s efekty na lidský organismus a sepsat analytické metody, které umožňují stanovení těchto látek v potravinových doplňcích.

Teoretická část práce je uvedena definicí pro potravinové doplňky a legislativou, která stanovuje hladiny a druhy kontaminantů v nich. Další kapitola shrnuje informace o nejčastějších skupinách mykotoxinů a jejich nejvýznamnějších zástupcích, stručně je zde uvedena chemická podstata a původ, stejně jako jejich účinky na lidské zdraví. Stejným způsobem jsou dále rozebírány těžké kovy, konkrétně čtyři zástupci arsen, kadmium, olovo a rtuť. Jsou zde uvedeny mechanismy kontaminace a podstata jejich toxicity.

Analytická část je rozdělena na dva sektory, kdy první část je věnovaná metodám, zaměřeným na stanovení mykotoxinů v potravinových doplňcích. Je zde sepsán stručný výčet analytických technik k tomuto účelu využívaných, následovaný konkrétními, v praxi použitými metodami, které byly vyvinuty pro stanovení konkrétního mykotoxinu (či skupiny mykotoxinů). Analogicky je druhý sektor věnován metodám, stanovujícím těžké kovy.

Pro stanovení mykotoxinů je nejčastěji používána metoda HPLC, respektive UHPLC v kombinaci s hmotnostním spektrometrem, či fluorescenčním detektorem, neboť velká část mykotoxinů vykazuje schopnost fluorescence. Větší variabilita se nacházela v použitých extrakčních technikách, které zahrnovaly různé variace SPE, mikroextrakce, disperzní extrakce (QuEChERS) a další, v on-line i off-line uspořádání. Metody pro stanovení těžkých kovů byly použity především dvě, a to atomová absorpční spektrometrie a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Extrakční technika zde byla jednotná: metoda mikrovlnné digesce. Obecně se však dá říct, že problematika stanovení kontaminantů v potravních doplňcích není v odborné literatuře zatím šířeji publikována a počet odborných prací teprve narůstá (43).

Nejčastěji analyzovanými mykotoxiny byly aflatoxiny (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2), ochratoxin A, případně ochratoxin B, dále deoxynivalenol, zearalenon, citrinin a fumonisiny. Některé z nich jsou vázány svým výskytem, ke konkrétnímu typu potravinách doplňků, např. produkty na bázi červené rýže často obsahují citrinin, doplňky z ostropestřce mariánského

zase ochratoxin A. Takovéto charakteristiky umožňují nastavení maximálních povolených limitů v daných doplňcích. V současné době jsou pro vybrané mykotoxiny nastaveny limity v potravinách, před jejich užitím jako potravinovou složkou, nikoli však ve finálně produkovaných doplňcích. Jak je však vidět z citovaných prací, u velké části analyzovaných nutraceutik byla zjištěna v nemálo případech kontaminace mykotoxiny převyšující standardní normy pro potraviny či produkty z nich. Náš trh, a obecně i celosvětový trh je však přehlcen různými variacemi nutraceutik, a legislativa nestíhá doplňovat přípustné hladiny mykotoxinů v nich. S těžkými kovy je situace jednodušší, zde jsou limity nastaveny souhrnně pro všechny doplňky stravy, výjimkou je však arsen, pro který zatím maximální přípustnou hodnotu nemáme.

Způsoby stanovení kontaminantů v doplňcích stravy se v posledních letech vyvíjejí velmi rychle. Jsou zde snahy nejen o co nejkvalitnější instrumentální separaci ale i o účinné metody extrakce a následné detekce. Vzhledem k tomu, že na trhu přibývají nové a nové potravinové doplňky, můžeme předpokládat, že se metody budou dále vyvíjet. Protože jsou nutraceutika již finálním produktem, je cílem těchto metod, především selektivní a rychlá analýza, která umožní včasné upozornění na přítomnost kontaminace.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Rozlišení doplňků stravy od léčivých přípravků. Státní úřad pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2021-11-03]. Dostupné z: [https://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplнку-stravy-od-
lecivych-pripravku](https://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplнку-stravy-od-lecivych-pripravku)
2. KOHOUT, Pavel. Možnosti ovlivnění imunitního systému nutraceutiky. Klinická farmakologie a farmacie [online]. 2010, 24(1), 47-50 [cit. 2021-11-03]. Dostupné z: [https://www.klinickafarmakologie.cz/artkey/far-201001-
0009_Moznosti_ovlivneni_imunitniho_systemu_nutraceutiky.php?back=%2Fsearch.p
hp%3Fquery%3Dnutraceutika%26sfrom%3D0%26spage%3D30](https://www.klinickafarmakologie.cz/artkey/far-201001-0009_Moznosti_ovlivneni_imunitniho_systemu_nutraceutiky.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dnutraceutika%26sfrom%3D0%26spage%3D30)
3. BENNETT, J. W. a M. KLICH. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews [online]. 2003, 16(3), 497-516 [cit. 2021-11-03]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12857779/>
4. HASCHEK, Wanda M. a Kenneth A. VOSS. Mycotoxins. HASCHEK, Wanda M., Colin G. ROUSSEAU a Matthew A. WALLING. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology [online]. 3. Academic Press, 2013, s. 1187-1258 [cit. 2021-11-03]. ISBN 978-0-12-415759-0. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012415759000039X>
5. KOHOUTOVÁ, Kateřina. Možnosti stanovení mykotoxinů v potravinách - ochratoxin A. Hradec Králové, 2021. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
6. KOTALOVÁ, Kateřina. Aflatoxiny, možný vliv na lidské i zvířecí zdraví. Hradec Králové, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta.
7. MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ. Aflatoxins - toxic effects in man. Kontakt [online]. 2012, 14(1), 85-93 [cit. 2021-11-07]. ISSN 12124117. Dostupné z: [https://kont.zsf.jcu.cz/artkey/knt-201201-0010_aflatoxiny-toxicke-ucinky-u-
cloveka.php?!=cz](https://kont.zsf.jcu.cz/artkey/knt-201201-0010_aflatoxiny-toxicke-ucinky-u-cloveka.php?!=cz)
8. BENKERROUM, Noredidine. Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action. International Journal of Environmental Research and Public Health [online]. 2020, 17(2) [cit. 2021-11-08]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/2/423/htm>
9. ALSHANNAQ, Ahmad a Jae-Hyuk YU. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. International Journal of Environmental Research and Public

- Health [online]. 2017, 14(6) [cit. 2021-11-08]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28608841/>
10. KUMAR, Pradeep, Dipendra Kumar MAHATO, Bharti SHARMA, et al. Ochratoxins in food and feed: Occurrence and its impact on human health and management strategies. *Toxicon* [online]. 2020, 187, 151-162 [cit. 2021-11-08]. ISSN 00410101. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32889024/>
11. TOLDRA, Fidel. Mycotoxins in food and feed. TOLDRA, Fidel. *Advances in Food and Nutrition Research* [online]. Academic Press, 2019, s. 297-345 [cit. 2021-11-08]. ISBN 0128171723, 9780128171721. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31351529/>
12. RAI, Ankita, Mukul DAS a Anurag TRIPATHI. Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2020, 60(16), 2710-2729 [cit. 2021-12-27]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31446772/>
13. PLEADIN, Jelka, Jadranka FRECE a Ksenija MARKOV. Mycotoxins in food and feed. *Advances in Food and Nutrition Research* [online]. Academic Press, 2019, s. 297-345 [cit. 2021-12-27]. ISBN 978-0-12-817171-4. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31351529/>
14. ŠTURSOVÁ, Barbora. Nefrotoxita těžkých kovů [online]. Pardubice, 2019 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://dk.upce.cz/handle/10195/74128>. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
15. FORMANOVÁ, Bc. Kristýna. Vybrané mikronutrienty a těžké kovy v ovoci [online]. Brno, 2012 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/12680/final-thesis.pdf?sequence=6>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
16. FU, Zhushan a Shuhua XI. The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods* [online]. 2020, 30(3), 167-176 [cit. 2021-12-28]. ISSN 1537-6516. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31818169/>
17. KUIVENHOVEN, Matthew a Kelly MASON. Arsenic toxicity. *National Center for Biotechnology Information* [online]. 2021, 2021-07-20 [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541125/>

18. RATNAIKE, R N. Acute and chronic arsenic toxicity. Postgraduate Medical Journal [online]. 2003, 79(933), 391-396 [cit. 2021-12-29]. ISSN 0032-5473. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12897217/>
19. COSTA, João Guilherme, Bojana VIDOVIC, Nuno SARAIVA, Maria DO CÉU COSTA, Giorgia DEL FAVERO, Doris MARKO, Nuno G. OLIVEIRA a Ana Sofia FERNANDES. Contaminants: a dark side of food supplements?. Free Radical Research [online]. 2019, 53(1), 1113-1135 [cit. 2022-02-24]. ISSN 1071-5762. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31500469/>
20. STADLER, David, Franz BERTHILLER, Michele SUMAN, Rainer SCHUHMACHER a Rudolf KRŠKA. Novel analytical methods to study the fate of mycotoxins during thermal food processing. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 2020, 412(1), 9-16 [cit. 2022-02-24]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-019-02101-9>
21. RAI, Prabhat Kumar, Sang Soo LEE, Ming ZHANG, Yiu Fai TSANG a Ki-Hyun KIM. Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management. Environment International [online]. 2019, 125, 365-385 [cit. 2022-02-25]. ISSN 01604120. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412018327971?via%3Dihub>
22. AGRIOPOULOU, Sofia, Eygenia STAMATELOPOULOU a Theodoros VARZAKAS. Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. Foods [online]. 2020, 9(4) [cit. 2022-03-22]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32326063/>
23. ZHANG, Lei, Xiao-Wen DOU, Cheng ZHANG, Antonio LOGRIECO a Mei-Hua YANG. A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. Toxins [online]. 2018, 10(2) [cit. 2022-03-22]. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29393905/>
24. MAHONEY, Noreen a Russell J. MOLYNEUX. Rapid Analytical Method for the Determination of Aflatoxins in Plant-Derived Dietary Supplement and Cosmetic Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2010, 58(7), 4065-4070 [cit. 2022-04-16]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf9039028>

25. FAN, Yingying, Fengjuan LIU, Weizhong HE, Qiaomei QIN, Dongqiang HU, Aibo WU, Weibo JIANG a Cheng WANG. Screening of multi-mycotoxins in fruits by ultra-performance liquid chromatography coupled to ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Food Chemistry [online]. 2022, 368 [cit. 2022-04-16]. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814621018641>
26. TOURNAS, V.H., C. SAPP a M.W. TRUCKSESS. Occurrence of aflatoxins in milk thistle herbal supplements [online]. 2012, 29(6), 994-999 [cit. 2022-04-16]. ISSN 1944-0049. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22439650/>
27. MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, Gerardo, Roberto ROMERO-GONZÁLEZ a Antonia GARRIDO FRENICH. Determination of toxic substances, pesticides and mycotoxins, in ginkgo biloba nutraceutical products by liquid chromatography Orbitrap-mass spectrometry. Microchemical Journal [online]. 2015, 118, 124-130 [cit. 2022-04-16]. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X14001787>
28. VIDAL, Arnau, Sonia MARÍN, Antonio J. RAMOS, German CANO-SANCHO a Vicente SANCHIS. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. Food and Chemical Toxicology [online]. 2013, 53, 133-138 [cit. 2022-04-16]. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23201447/>
29. PALLARÉS, Noelia, Josefa TOLOSA, Jordi MAÑES a Emilia FERRER. Occurrence of Mycotoxins in Botanical Dietary Supplement Infusion Beverages. Journal of Natural Products [online]. 2019, 82(2), 403-406 [cit. 2022-04-16]. ISSN 0163-3864. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30688071/>
30. MEERPOEL, Celine, Arnau VIDAL, José Diana DI MAVUNGU, Bart HUYBRECHTS, Emmanuel K. TANGNI, Mathias DEVREESE, Siska CROUBELS a Sarah DE SAEGER. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of citrinin and ochratoxin a in a variety of feed and foodstuffs. Journal of Chromatography A [online]. 2018, 1580, 100-109 [cit. 2022-04-22]. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30384965/>
31. LHOTSKÁ, Ivona, Aneta KHOLOVÁ, Andrea MACHYŇÁKOVÁ, Katarína HROBOŇOVÁ, Petr SOLICH, František ŠVEC a Dalibor ŠATÍNSKÝ. Preparation of citrinin-selective

- molecularly imprinted polymer and its use for on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2019, 411(11), 2395-2404 [cit. 2022-04-29]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-019-01682-9>
32. VACLAVIK, Lukas, Marta VACLAVIKOVA, Timothy H. BEGLEY, Alexander J. KRYNITSKY a Jeanne I. RADER. Determination of Multiple Mycotoxins in Dietary Supplements Containing Green Coffee Bean Extracts Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, 61(20), 4822-4830 [cit. 2022-04-22]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23631685/>
33. JIA, Wei, Lin SHI, Feng ZHANG, Cheng FAN, James CHANG a Xiaogang CHU. Multiplexing data independent untargeted workflows for mycotoxins screening on a quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry platform. *Food Chemistry* [online]. 2019, 278, 67-76 [cit. 2022-04-22]. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814618319940?via%3Dihub>
34. YUAN, Xudong, Robert L. CHAPMAN a Zhiqian WU. Analytical methods for heavy metals in herbal medicines. *Phytochemical Analysis* [online]. 2011, 22(3), 189-198 [cit. 2022-04-23]. ISSN 09580344. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21341339/>
35. Limity pro těžké kovy v suplementech. Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. 2008 [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/limity-pro-tezke-kovy-v-suplementech.aspx>
36. ARJOMANDI, Mojtaba a Hamid SHIRKHANDLOO. A review: Analytical methods for heavy metals determination in environment and human samples. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal* [online]. 2019(2), 97-126 [cit. 2022-04-23]. ISSN 2645-5382. Dostupné z: <http://amecj.ir/Journal/index.php/AMECJ-01/article/view/73>
37. SENILA, Marin, Oana CADAR a Ion MIU. Development and Validation of a Spectrometric Method for Cd and Pb Determination in Zeolites and Safety Evaluation. *Molecules* [online]. 2020, 25(11) [cit. 2022-04-24]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32498463/>

38. ARAUJO-BARBOSA, Uenderson, Elena PEÑA-VAZQUEZ, Maria Carmen BARCIELA-ALONSO, Sergio Luis COSTA FERREIRA, Ana Maria PINTO DOS SANTOS a Pilar BERMEJO-BARRERA. Simultaneous determination and speciation analysis of arsenic and chromium in iron supplements used for iron-deficiency anemia treatment by HPLC-ICP-MS. *Talanta* [online]. 2017, 170, 523-529 [cit. 2022-04-24]. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28501206/>
39. PINHEIRO, Fernanda Costa, Diego Victor BABOS, Ariane Isis BARROS, Edenir Rodrigues PEREIRA-FILHO a Joaquim Araújo NÓBREGA. Microwave-assisted digestion using dilute nitric acid solution and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2019, 174, 471-478 [cit. 2022-04-24]. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31228850/>
40. SENILA, Marin, Oana CADAR, Lacrimioara SENILA, Alexandra HOAGHIA a Ion MIU. Mercury Determination in Natural Zeolites by Thermal Decomposition Atomic Absorption Spectrometry: Method Validation in Compliance with Requirements for Use as Dietary Supplements. *Molecules* [online]. 2019, 24(22) [cit. 2022-04-24]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/22/4023/htm>
41. FILIPIAK-SZOK, Anna, Marzanna KURZAWA a Edward SZŁYK. Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2015, 30, 54-58 [cit. 2022-04-24]. ISSN 0946672X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X14001886?via%3Dihub>
42. RING, Gavin, Aisling SHEEHAN, Mary LEHANE a Ambrose FUREY. Development, Validation and Application of an ICP-SFMS Method for the Determination of Metals in Protein Powder Samples, Sourced in Ireland, with Risk Assessment for Irish Consumers. *Molecules* [online]. 2021, 26(14) [cit. 2022-04-24]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/14/4347>
43. FIBIGR, Jakub, Dalibor ŠATÍNSKÝ a Petr SOLICH. Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2018, 1036, 1-15 [cit. 2022-05-09]. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267018309541>