

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Veronika Venclová

STANOVENÍ VYBRANÝCH PRVKŮ V OBILNÝCH MOUKÁCH
A JEJICH BEZLEPKOVÝCH ALTERNATIVÁCH

Determination of selected elements in cereal flours and their
gluten-free alternatives

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2023

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. srpna 2023

Veronika Venclová

Poděkování

Děkuji RNDr. Jakobovi Hraníčkoví, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a cenné rady. Dále děkuji Mgr. Tomáši Hrbkoví za pomoc se statistickým zpracováním pomocí vícerozměrné analýzy. Nakonec děkuji své rodině za podporu v průběhu studia.

Abstrakt

Tato práce se věnuje stanovení vápníku, hořčíku, fosforu, draslíku, sodíku, železa, zinku, mědi, manganu a molybdenu v obilných lepkových moukách a jejich bezlepkových alternativách. Vzorčky mouky byly rozkládány pomocí mikrovlnného zařízení a prvky v roztocích byly následně stanovovány pomocí hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem. Před samotným stanovením prvků byla provedena optimalizace rozkladu vybraných druhů mouk. Cílem práce bylo stanovení uvedených prvků ve vzorcích mouk a vytvořit základní přehled prvkového složení různých druhů mouk. Tento přehled a porovnání jednotlivých druhů mouk má pomoci lidem s celiakií při výběru bezlepkových alternativ za pšeničnou mouku.

Klíčová slova

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, mikrovlnný rozklad, vápník, hořčík, fosfor, draslík, sodík, železo, zinek, měď, mangan, molybden, pšeničná mouka, bezlepkové mouky, celiakie

Abstract

This study deals with the determination of calcium, magnesium, phosphorus, potassium, sodium, iron, zinc, copper, manganese and molybdenum in cereal gluten flours and its gluten-free alternatives. The flour samples were digested using a microwave device and the elements in solution were subsequently determined using an inductively coupled plasma mass spectrometer. Optimization of the digestion of the selected flours was performed prior to the actual determination of the elements. The aim of the work was to determine the above listed elements in the flour samples and to establish a basic overview of the elemental composition of the different flours. This overview and comparison of the different flours is intended to help the people with celiac disease to choose gluten-free alternatives to wheat flour.

Keywords

Inductively coupled plasma mass spectrometry, microwave digestion, calcium, magnesium, phosphorus, potassium, sodium, iron, zinc, copper, manganese, molybdenum, wheat flour, gluten-free flours, celiac disease

Obsah

1 ÚVOD.....	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Celiakie a bezlepková dieta	11
2.2 Lepek	12
2.3 Význam stanovovaných prvků pro lidský organismus	12
2.4 Doporučený denní příjem prvků	15
2.5 Nutriční stav celiaků – hodnocení prvků	15
2.6 Prvkové složení bezlepkových výrobků	16
2.7 Obohacování mouky o prvky	17
2.8 Faktory ovlivňující prvkové složení	18
2.9 Obiloviny, luštěniny, ořechy a semínka.....	20
2.10 Denní příjem mouky	20
2.11 Rozklad v uzavřených nádobách	21
2.12 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).....	23
2.13 Stanovované prvky – ICP-MS	30
2.14 Stanovení prvků v potravinách pomocí ICP-MS	33
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1 Používané přístroje a zařízení	36
3.2 Používané chemikálie	36
3.3 Použité vzorky	36
3.4 Pracovní postup.....	39
3.4.1 Optimalizace rozkladu reprezentativních vzorků	39
3.4.2 Stanovení prvků v praktických vzorcích	42
3.4.3 Blanky.....	43
3.5 Statistická analýza.....	44

4 VÝSLEDKY A DISKUSE	46
4.1 Výběr reprezentativních vzorků.....	46
4.2 Optimalizace rozkladu	46
4.3 Průběh rozkladu	47
4.4 Kalibrační přímky	48
4.5 Příprava blanků	51
4.6 Základní charakteristiky stanovení prvků.....	51
4.7 Výsledné koncentrace prvků ve vzorcích mouk	52
4.8 Procentuální příspěvek k dennímu příjmu prvků z pšeničné mouky.....	56
4.9 Porovnání prvkového složení mouk	57
4.10 Vícerozměrná analýza dat.....	64
5 ZÁVĚR.....	67
6 CITOVANÁ LITERATURA.....	68

Seznam zkratek a symbolů

AAS	atomová absorpční spektrometrie
BEC	koncentrace ekvivalentní pozadí
CPS	počet signálů za sekundu
DL	detekční limit
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
PC	hlavní komponenta
RM	referenční materiál
a, b	parametry fitu
c	koncentrace (mg g^{-1})
CI	konfidenční interval
n	počet opakovaných měření
p	tlak (bar)
P	výkon (%)
R	korelační koeficient
t	čas (min)
T	teplota ($^{\circ}\text{C}$)
V	objem (ml)

1 ÚVOD

Celiakie je chronické autoimunní onemocnění způsobené nesnášenlivostí lepku u geneticky predisponovaných jedinců. Bezlepková dieta je jedinou dostupnou léčbou tohoto onemocnění [1]. Celiaci musí vyřadit ze své stravy pšeničnou mouku, která je nejčastěji konzumovanou moukou v České republice [2]. Zároveň se celiaci musí vzdát i dalších druhů mouk, jako je například často konzumovaná špaldová nebo žitná mouka [3].

Přestože bezlepková dieta je v populaci čím dál více rozšířená, údaje o prvkovém složení bezlepkových mouk a směsí nejsou detailně prozkoumané a veřejně známé [4]. Pro lidi s celiakií může být matoucí se v bezlepkových alternativách zorientovat a zařadit je do stravy. Z tohoto důvodu bylo hlavním cílem této diplomové práce stanovení vybraných prvků ve vzorcích mouk a vytvoření přehledu prvkového složení různých druhů mouk a bezlepkových směsí. Stanovovány byly prvky, u nichž byl předpokládán nedostatek sníženým příjmem v bezlepkových potravinách a zhoršeným vstřebáváním těchto prvků u lidí s celiakií. Mezi analyzovanými vzorky mouky byly běžně používané obilné lepkové mouky, přirozeně bezlepkové mouky a bezlepkové směsi dostupné v České republice. Přestože mouka není posuzována jako dostatečný zdroj všech stanovovaných prvků, vzhledem k vysoké spotřebě pšeničné mouky v České republice nezanedbatelně přispívá k dennímu příjmu různých prvků [5]. Proto bylo další součástí práce zhodnocení příspěvku pšeničné mouky k dennímu příjmu prvků. Dalším cílem této práce bylo porovnat prvkové složení bezlepkových alternativ s prvkovým složením pšeničné mouky.

Výsledky této diplomové práce mohou sloužit jako přehled pro porovnání jednotlivých druhů mouk z hlediska prvkového zastoupení a zároveň mohou sloužit jako návod, jak mouky vzájemně míchat a obohatit tak výsledný pokrm o potřebné prvky.

Shrnutí dílčích cílů této diplomové práce

- Vypracování rešerše doporučené literatury a dalších zdrojů o současném stavu problematiky
- Optimalizace rozkladu reprezentativních vzorků mouk
- Rozklad vybraných druhů mouk a příprava vzorků k analýze
- Stanovení vybraných prvků ve vzorcích mouk a bezlepkových směsí technikou ICP-MS (optimalizace a kalibrace přístroje, zjištění základních charakteristik stanovení)
- Vyhodnocení výsledků analýz vybraných druhů mouk
- Vzájemné porovnání prvkového složení mouk

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Celiakie a bezlepková dieta

Celiakie je chronické autoimunní onemocnění způsobené nesnášenlivostí lepku u geneticky predisponovaných jedinců. Při onemocnění dochází k atrofii klků tenkého střeva s následnou malabsorpcí. Malabsorpční syndrom vede k nutričním nedostatkům týkajících se makro i mikroživin [1]. Závažnost těchto nedostatků může být ovlivněna délkou trvání onemocnění, než bylo diagnostikováno, rozsahem a lokalizací poškození tenkého střeva, stupněm malabsorpce nebo i samotnou léčbou celiakie. Nutriční nedostatky související s celiakií tak mohou být způsobeny samotnou celiakií nebo mohou být důsledkem dodržování bezlepkové diety [6].

Dodržování celoživotní bezlepkové diety je jedinou dostupnou léčbou celiakie [6]. Požití i malého množství lepku může u osob s celiakií způsobit závažné poruchy [7]. Pokud je bezlepková dieta přísně dodržována, dochází ke zlepšení symptomů, laboratorní nálezy se mohou vrátit k normálu a u většiny pacientů dochází k poklesu rizika výskytu komplikací souvisejících s celiakií [1] [6]. Studie [8] uvádí, že i když pacienti s celiakií dodržovali bezlepkovou dietu, nebyla u nich pozorována úplná obnova střevní mikroflóry.

Předpokládalo se, že dodržování bezlepkové diety vede k vyřešení malabsorpce. Studie v posledních dvou desetiletích však prokázaly, že přísné dodržování bezlepkové diety může způsobovat nutriční nedostatky a nerovnováhu. [4] [6] [9]. Studie prokázaly, že bezlepková dieta nezaručuje dostatečný nutriční příjem a že i po dlouhodobé léčbě pomocí bezlepkové diety po dobu osmi až dvanácti let byly popsány nutriční nedostatky. Nejčastěji se jednalo o nedostatek železa, vápníku, zinku a hořčíku [3] [9].

Studie dospěly k závěru, že hlavním určujícím faktorem nutričního deficitu u pacientů s celiakií je výběr potravin. Bylo zjištěno, že většina bezlepkových potravin, především průmyslově zpracovaných, obsahuje nízké množství výše zmíněných prvků [4] [9].

Celiakie postihuje 0,5 – 1 % světové populace. Předpokládá se, že 75 % celiaků není diagnostikovaných. Tím se vystavují riziku poškození klků tenkého střeva, neboť bezpečná dávka lepku pro lidi s celiakií je pouhých 10 mg lepku za den [10]. Příjem lepku

z běžné stravy vysoce přesahuje tuto hodnotu [11]. Navíc, mimo celiakii existují další onemocnění vyžadující také dodržování bezlepkové diety, jako je alergie na pšenici a neceliakální intolerance lepku [12].

Bezlepková dieta je v současnosti velice populární. Hlavní příčinou popularity bezlepkové diety přitom není větší výskyt poruch souvisejících s lepkem, ale módní trendy ve výživě. V článku [4] se můžeme dočíst, že ve Spojených Státech Amerických více než 100 milionů lidí konzumuje bezlepkové produkty, přičemž většina těchto lidí nemá žádné poruchy související s lepkem. I přes velké množství prodávaných bezlepkových produktů není jejich prvkové složení detailně prozkoumané a veřejně známé [4].

2.2 Lepek

Lepek je hlavní zásobní bílkovinou pšeničných zrn. Pšeničné zrno obsahuje 8–15 % bílkovin, z nichž 85–90 % představuje lepek. Různé odrůdy pšenice mají různý obsah a složení lepkových bílkovin. Předpokládá se, že průměrný denní příjem lepku v západní stravě je 5–20 g/den. Lepek je tepelně stabilní a má schopnost působit jako pojivo [11].

Lepek označuje směs stovek příbuzných, ale odlišných bílkovin, především gliadinu a gluteninu. Bílkoviny gliadinu a gluteninu se označují jako prolaminy, představují bílkoviny nerozpustné ve vodě, vyznačují se vysokým obsahem glutaminu a prolinových zbytků. Vlastnosti lepku závisí na poměru gliadinů a gluteninů. Gliadiny přispívají více k viskozitě a roztažnosti těsta. Gluteniny přispívají k pevnosti a pružnosti těsta [11].

Obiloviny obsahující lepek jsou pšenice, žito, ječmen a oves. Podobné bílkoviny jako gliadin v pšenici se vyskytují v žitě jako sekalin, v ječmeni jako hordein a v ovsu jako avenin, všechny se také označují jako lepek. Všechny tyto bílkoviny nazvané jako lepek byly identifikovány jako látky schopné vyvolat celiakii [11].

2.3 Význam stanovovaných prvků pro lidský organismus

Některé prvky jsou nezbytné pro fungování lidského organismu. Těchto prvků je dvaadvacet a rozlišujeme je na makroprvky a mikroprvky (stopové prvky). Mezi makroprvky patří vápník, hořčík, fosfor, draslík a sodík. Mezi mikroprvky patří železo, zinek, měď, mangan, molybden a další. Jejich příjem ovlivňuje složení stravy [13] [14].

MAKROPRVKY

Vápník

Více než 99 % vápníku v dospělém lidském těle je v kostech a zubech [15]. Dodává jim jejich tvrdost a mechanickou odolnost. Vápník je nezbytný pro srážení krve a svalovou kontrakci. Nedostatek vápníku může způsobit vznik osteoporózy, může také způsobovat křeče a lámavost nehtů [13] [14].

Hořčík

Hořčík je druhý nejčastější intracelulární kationt v lidském těle. Je součástí velkého množství enzymů a molekul ATP a ADP. Hořčík se u lidí vstřebává převážně v tenkém střevě. Nedostatek hořčíku způsobuje psychické deprese, svalovou slabost, křeče zejména dolních končetin a zvýšenou únavnost [14].

Fosfor

Fosfor je nezbytný pro transport a zásoby energie v buňkách. Podílí se na svalové kontrakci a vedení nervového vzruchu. Deficit fosforu ve stravě bývá vzácný. Nedostatek fosforu se projevuje slabostí, bolestmi svalů, poruchami periferních nervů a poruchami centrální nervové soustavy [14].

Draslík

Draslík je jedním z nejrozšířenějších prvků v lidském těle. Jedná se intracelulární iont, 98 % draslíku se nachází uvnitř buněk. Draslík slouží k udržování osmotického tlaku, elektrolytové homeostázy a acidobazické rovnováhy. Mezi příznaky deficitu draslíku nebo přesunu draslíku z extracelulárního prostoru do intracelulárního patří poruchy srdečního rytmu, svalová slabost a svalová paralýza končetin [14] [16].

Sodík

Sodík je extracelulární kation. Sodík udržuje transmembránové potenciály, buněčný objem a homeostázu tělních tekutin. Většina 80 – 90 % přijímaného sodíku je k potravinám přidávána formou kuchyňské soli. Ve vyspělých zemích se setkáváme s nadměrným příjmem sodíku, který je spojován s vysokým procentem výskytu vysokého krevního tlaku [14] [17].

MIKROPRVKY

Železo

Železo je nezbytnou součástí hemoglobinu a myoglobinu, slouží k transportu kyslíku. Nedostatek železa může způsobit anémii, těžkou únavu, bledost, poruchy regulace tepla, sníženou rezistenci proti infekci [14] [15].

Zinek

Zinek je stopový prvek nutný pro aktivitu více než 200 enzymů. Nedostatek zinku způsobuje psychosomatické a psychomotorické poruchy, záněty kůže a kožní ekzémy, trávicí potíže, poruchy buněčné imunity, poruchy smyslového vnímání [14].

Měď

Měď je důležitou součástí enzymů. Většina těchto enzymů, v nichž je měď obsažena, hraje významnou roli v přenosu kyslíku. Měď se vstřebává v tenkém střevě a v malém množství v žaludku. Nedostatek mědi se projevuje anémií, leukopenií, osteoporózou a předčasným šedivěním vlasů [14].

Mangan

Mangan je prvek nezbytný pro činnost několika enzymů [18] a je důležitý pro syntézu cholesterolu. [14] Pokud je mangan přijímán ve velkém množství, je toxický. Bezpečná dávka, kterou lze konzumovat denně, byla stanovena na 10 mg/den. Informace o nedostatku manganu jsou značně omezené, hlášeno bylo pouze několik případů nedostatku manganu [18].

Molybden

Molybden je nezbytný pro správnou funkci řady enzymů. Nedostatek molybdenu má za následek tachykardii a mentální poruchy. Molybden je ve stravě potřebný pouze ve velmi nízkém množství. Při vyšších dávkách může být pro člověka toxický, uvádí se příjem 150 µg na kg hmotnosti. Toxické účinky jsou nízké. Nadbytek molybdenu snižuje vstřebávání mědi a vede k jejímu deficitu [14] [19].

2.4 Doporučený denní příjem prvků

V *Tab. 2.1* nalezneme doporučený denní příjem makroprvků (sodík, draslík, vápník, hořčík a fosfor) pro zdravé dospělé jedince. Doporučený denní příjem mikroprvků (stopových prvků) nalezneme v *Tab. 2.2*. [14]

Tab. 2.1: Doporučený denní příjem sodíku, draslíku, vápníku, hořčíku a fosforu [14] [20]

Prvek	Na [mg/den]	K [mg/den]	Ca [mg/den]	Mg [mg/den]	P [mg/den]
Muži	3000–5000	3100	1000	420	1 600–2 400
Ženy	3000–5000	3100	1000	320	1 200–1 600

Tab. 2.2: Doporučený denní příjem zinku, mědi, železa, manganu a molybdenu [14] [19]

Prvek	Zn [mg/den]	Cu [mg/den]	Fe [mg/den]	Mn [mg/den]	Mo [μg/den]
Muži	12–15	1,5–3	10	2–5	25
Ženy	12–15	1,5–3	15	2–5	25

2.5 Nutriční stav celiaků – hodnocení prvků

U celiaků se nejčastěji setkáváme s nedostatkem železa, zinku, vápníku a hořčíku, což dokazují i následující studie.

Některé studie uvádí, že deficit železa se vyskytuje u 28–50 % pacientů s celiakií, jiné studie uvádí, že výskyt nedostatku železa u celiakie se pohybuje až v rozmezí 12–69 % [9] [3]. Nedostatek železa se často vyskytuje u nově diagnostikovaných pacientů. Některé studie uvádí nedostatek železa i u pacientů dodržujících přísnou bezlepkovou dietu [9].

Nedostatek železa u celiaků je primárně důsledkem zhoršeného vstřebávání železa. Nedostatek železa může být způsoben i sníženým příjmem železa při dodržování bezlepkové diety nebo může také docházet k okultním ztrátám krve v gastrointestinálním traktu. Ve studii [21] je uvedeno, že okultní gastrointestinální krvácení bylo zjištěno u 25 % a 54 % pacientů s celiakií. Novější studie však naznačují, že okultní krvácení do trávicího traktu může být mnohem méně časté [9] [21].

Studie [22] se zabývala stavem nově diagnostikovaných dospělých pacientů s celiakií. Přibližně u 67 % pacientů s celiakií byl zjištěn nedostatek zinku, 32 % pacientů mělo anémii a 46 % mělo nedostatečné zásoby železa.

Studie [23] provedená v Austrálii zjišťovala příjem hořčíku, vápníku, železa a zinku. Nedostatečný příjem hořčíku, vápníku a železa byl zjištěn u více než desetiny žen nově diagnostikovaných s celiakií i u žen dodržujících bezlepkovou dietu nejméně dva roky. Nedostatečný příjem hořčíku, vápníku a zinku byl zjištěn u více než desetiny nově diagnostikovaných mužů. Nedostatečný příjem hořčíku se vyskytoval v celé australské populaci, ne pouze u celiaků.

K nedostatku vápníku a fosforu může docházet v důsledku malabsorpce a vyhýbání se mléčným výrobkům. Poškozené klky u pacientů s celiakií vedou k intoleranci laktózy, kvůli snížené produkci laktázy, což může mít za následek právě nedostatek fosforu a vápníku [3] [24].

Další studie se zaměřovala na nízký příjem potřebných prvků při bezlepkové dietě. Příjem hořčíku, železa, zinku, manganu a selenu byl v této studii u žen s celiakií nižší než u srovnatelné populace konzumující stravu obsahující lepek. Průměrný příjem vápníku u pacientek na bezlepkové dietě byl v této studii vyšší než u srovnatelné populace konzumující stravu obsahující lepek. Nicméně doporučený příjem vápníku splňovalo pouze 32 % pacientek s celiakií mladších 55 let a jen 18 % pacientek starších 55 let. [25]

Nedostatek mědi je vzácně hlášenou komplikací celiakie. Prevalence nedostatku mědi u pacientů s celiakií není známa. Studie [26] uvádí, že u všech pacientů s celiakií a přidruženým nedostatkem mědi se vyskytly neurologické komplikace.

2.6 Prvkové složení bezlepkových výrobků

O podrobném složení bezlepkové stravy je známo pouze omezené množství informací. Některé informace udávají studie [9] [25] [27] [28]. Studie [29] uvádí, že 64 z 83 bezlepkových produktů mělo nižší obsah železa než jejich lepkové varianty.

Jedna ze studií se zaměřila na posouzení obsahu prvků u bezlepkových chlebů, vloček a těstovin a porovnání je s příslušnými protějšky obsahující lepek. Nižší obsah železa byl nalezen ve všech třech skupinách produktů. Nižší množství manganu bylo zjištěno pouze

v těstovinách. U obsahu zinku a mědi v této studii nebyly nalezeny významné rozdíly oproti lepkovým protějškům [30].

Studie [27] stanovovala As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, V, Zn v sedmnácti vzorcích bezlepkových potravin. V rámci studie bylo zjištěno, že výsledné koncentrace některých stopových prvků jsou nedostatečné ve srovnání s doporučeným denním příjmem, poskytují pouze 1,1 % až 53 % doporučené denní dávky esenciálních kovů. Závěry studie jsou ve shodě s autory, kteří potvrzují, že komerční bezlepkové potraviny vyrobené z bezlepkových mouk a škrobů mají nižší nutriční hodnotu ve srovnání s protějšky z pšenice.

Studie [28] se zabývala celkovou stravou v Brazílii, přičemž byla založená na množství zkonsumovaných potravin. Studie udává koncentrace Ca, Cr, Fe, K, Na a Zn a jejich celkové přijaté množství za den vzhledem k celkovému dennímu příjmu prvků. Mezi potraviny, které představovaly nejvyšší podíl prvků na denním příjmu patřily i chleby, které obsahovaly 46,4 % chromu a 36,9 % železa. Studie pracovala s údajem, že množství zkonsumovaného chleba je 42,5 g/den. Na celkovém příjmu železa se nejvíce podílely produkty obsahující pšeničnou mouku a luštěniny. Průměrný denní příjem každého prvku byl vypočten vynásobením koncentrace každého prvku příslušnou hmotností potraviny v g/den.

2.7 Obohacování mouky o prvky

Obohacování hojně konzumovaných potravin má podle odborníků potenciál zlepšit nutriční složení potravin. Obohacování potravin navíc nevyžaduje změny ve stravovacích návycích populace. Světová zdravotnická organizace vydala doporučení pro obohacování pšeničné a kukuřičné mouky, z prvků se jednalo o zinek a železo. Protože pšeničná a kukuřičná mouka jsou rozšířené a hojně konzumované potraviny, může jejich obohacování zlepšit nutriční stav velké části populace [31].

Po celém světě je ročně semleto více než 600 milionů tun pšeničné a kukuřičné mouky. Předpokládá se, že podíl obohacované mouky je 97 % v Americe, 31 % v Africe, 21 % v jihovýchodní Asii a 6 % v Evropě. Dobrovolné nebo povinné obohacování mouky závisí na rozhodovacích orgánech dané země. [31].

Podmínky přidávání prvků do potravin v České republice upravuje Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1925/2006 [32]. Nařízení oznamuje, že minerální látky mohou výrobci přidávat na základě svého rozhodnutí nebo je musí přidávat na základě zvláštních předpisů. Mezi prvky, které mohou být přidávány do potravin patří Ca, Mg, Fe, Cu, I, Zn, Mn, Na, K, Se, Cr, Mo, F, Cl, P. Potravinu obohacené o minerální látky výrobci většinou propagují. Přidávané minerální látky do potravin nesmí přesáhnout určitá množství [33]. Bezlepkové výrobky na rozdíl od běžných výrobků většinou nebývají obohaceny prvky [7].

Příkladem studie zabývající se danou problematikou je studie [34], jejíž cílem bylo porovnáním existujících dat posoudit výskyt anémie u dětí v zemích, které obohacují pšeničnou mouku (nebo v kombinaci s kukuřičnou moukou) a zemí, které tak nečiní. Výsledky naznačují, že by obohacování mouky mohlo snížit výskyt anémie v populaci, protože bylo pozorováno snížení výskytu anémie pouze v zemích, které mouku obohacují.

2.8 Faktory ovlivňující prvkové složení

Řada studií potvrdila, že prvkové složení látek se může měnit s různými faktory [5] [35]. Jedním z hlavních faktorů může být místo původu. Ve studii [5] bylo zjištěno, že na množství prvků v pšeničných zrnech může mít vliv kromě lokality také genotyp a podmínky hospodaření. Přídavek hnojiva za účelem získání vysokého výnosu neměl vliv na koncentraci prvků v zrnech pšenice.

Studie [5] se zabývala příspěvkem prvků z pšenice k jejich celkovému doporučenému dennímu příjmu a vlivem lokality pěstování na koncentraci prvků v pšeničce. Jednalo se o zrna pšenice namleté na mouku, tedy o mouku celozrnnou. Většina mouk měřených v této práci nejsou celozrnné, obaly zrn v nich nejsou obsaženy. Kvůli tomu není možné přímo porovnávat samotné hodnoty koncentrace prvků mezi moukami ve studii [5] a moukami zkoumanými v této práci. Studie [5] však dobře vystihuje vliv závislosti koncentrace prvků na lokalitě pěstování mouky. Rozdíl v koncentraci prvků mezi lokalitami jsou vedeny v *Tab. 2.3*. Byly zjištěny rozdíly v koncentracích prvků. Alnarp vykazoval vysoký obsah fosforu a molybdenu, Bohuslän nízkou koncentraci mědi a významně vyšší obsah manganu. Pro Uppsalu byl charakteristický vysoký obsah železa,

vysoký obsah zinku, nízký obsah molybdenu. Závěrem studie bylo, že rozdíly v prvkovém složení mohou záviset na charakteristikách půdy konkrétní lokality.

Tab. 2.3: Stanovené koncentrace prvků v různých lokalitách

mg kg ⁻¹	Cu	Fe	Mg	Zn	Ca	Mn	Mo	P	K
Alnarp	5,29	38,4	1300	39,9	382	24,2	2,19	4470	4180
Bohuslän	3,79	38,2	1190	35,8	330	41,2	1,33	3300	3390
Gotland	5,34	33,1	1220	36,2	369	17,0	1,13	3800	4070
Uppsala	5,66	49,6	1210	43,4	411	17,0	0,71	3500	3890

Ve studii [36] bylo hodnoceno minerální složení pšeničné mouky konzumované v Brazílii. Celkem bylo zkoumáno 54 vzorků z 15 měst. Cílem práce bylo otestovat homogenitu výsledných koncentrací. Stanovované prvky byly vápník, měď, hořčík, mangan, železo, fosfor, draslík a zinek. Rozsahy výsledných koncentrací makroprvků v pšeničné mouce udává Tab. 2.4. Koncentrační rozsahy mikroprvků uvádí Tab. 2.5. Analýza hlavních komponent a hierarchická shluková analýza poskytly užitečné informace o podobnosti mezi vzorky. Analýza prvkového složení odhalila tři různé skupiny vzorků.

Tab. 2.4: Rozsahy koncentrací u makroprvků [36]

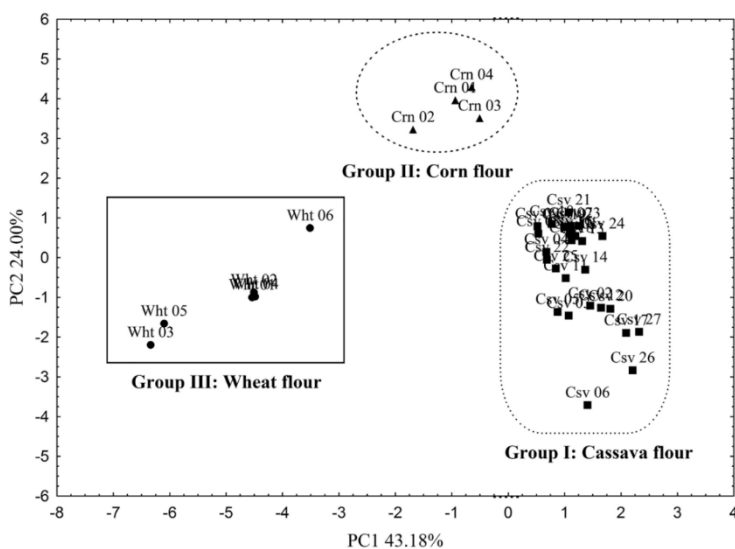
Prvek	Vápník	Hořčík	Draslík	Fosfor
Koncentrační rozsah mg g ⁻¹	0,11 – 1,96	0,19 – 0,51	0,76 – 3,16	0,81 – 7,15

Tab. 2.5: Rozsahy koncentrací u mikroprvků [36]

Prvek	Měď	Železo	Mangan	Zinek
Koncentrační rozsah µg g ⁻¹	1,00 – 2,80	10,5 – 146,6	3,9 – 14,7	5,1 – 13,9

Další studie se zabývala stanovením prvků v maniokové, kukuřičné a pšeničné mouce. Vzorky mouk byly následně klasifikovány pomocí analýzy hlavních komponent a

hierarchické shlukové analýzy. Byly zjištěny tři odlišné typy vzorků mouk podle složení 13 prvků. Tyto zjištěné skupiny odpovídaly jednotlivým druhům mouky. Zřetelné oddělení maniokové, kukuřičné a pšeničné mouky je vidět v diagramu na Obr. 2.1. [35] V případě této práce má tedy druh mouky výrazně větší vliv na její prvkové složení než samotná lokalita pěstování.



Obr. 2.1: Diagram skóre pro rozdělení vzorků mezi PC1 a PC2 [35]

2.9 Obiloviny, luštěniny, ořechy a semínka

Mouka vzniká rozemletím zrna, luštěnin, ořechů nebo semen. Mouku lze podle toho, z čeho byla namleta rozdělit do čtyř skupin (ořechy, luštěniny, semena, obiloviny).

Mezi obiloviny patří pšenice, žito, ječmen, oves, rýže, kukuřice, čirok, jáhly. Mezi pseudoobiloviny patří pohanka, amarant a quinoa. Pseudoobiloviny jsou chemickým složením podobné obilovinám. Hrách a cizrna se řadí mezi luštěniny [37]. Mandle a kokosový ořech patří mezi ořechy [38]. Konopné semínko a lněné semínko patří mezi semena [39].

2.10 Denní příjem mouky

Obiloviny jsou základní složkou výživy. Je třeba si uvědomit, že pro část lidské populace jsou obiloviny jediným trvalým zdrojem některých prvků [37]. Nejčastěji konzumovanou obilovinou v České republice je pšenice. Průměrná spotřeba pšeničné

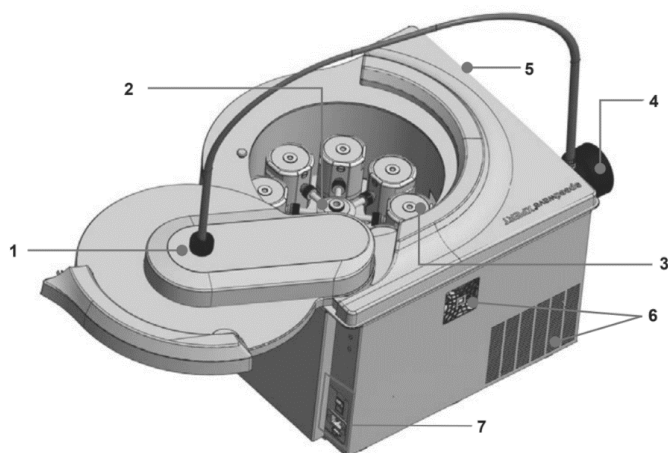
mouky v České republice v roce 2020 byla 94,9 kg na obyvatele za rok, což odpovídá průměrné spotřebě pšeničné mouky 260 g na osobu za den [2].

2.11 Rozklad v uzavřených nádobách

Kritickým krokem pro většinu analytických metod pro stanovení prvků ve vzorcích potravin je rozklad vzorku. Jednou z možností je rozklad vzorku kyselinami v uzavřených nádobách v systémech mikrovlnných rozkladných zařízeních, který zajistí rychlý a účinný rozklad vzorku a jeho současné převedení do roztoku. Použití uzavřených rozkladných nádob obecně sníží čas potřebný pro převedení vzorku do roztoku. Další výhodou tohoto způsobu rozkladu vzorku je, že je prakticky vyloučeno riziko kontaminace vzorku a ztráty analytu odpařováním. Kyselý rozklad vzorků v uzavřených nádobách pomocí mikrovlnného záření a příslušných minerálních kyselin se tak stává často používanou technikou přípravy vzorků. Přetrvávajícím problémem zůstává neúplný rozklad obtížně rozložitelných látek [40] [41] [42].

Rozkladné mikrovlnné zařízení [43]

K rozkladu vzorků v této diplomové práci bylo použito rozkladné mikrovlnné zařízení Speedwave Xpert firmy Berghof. Toto zařízení je určeno k tlakovému rozkladu při teplotách do 260 °C. Jedná se o mikrovlnnou troubu vyrobenou z nerezové oceli s povlakem z paraformaldehydu. Zařízení je vybaveno bezpečnostním víkem a elektronickým blokováním. Zařízení má vnitřní kruhovou komoru, do které se vkládá karusel pro rozkladné patrony se vzorky pro rovnoměrné rozložení procházejících mikrovln. Technické zobrazení přístroje je zobrazeno na *Obr. 2.2*.

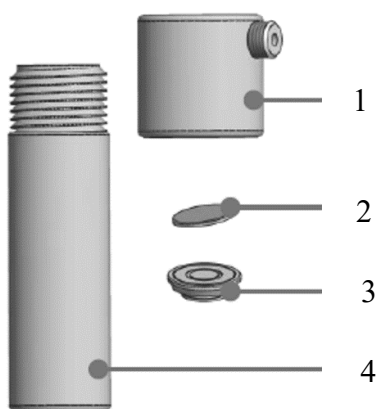


Obr. 2.2: 1 – otočné víko, 2 – rotor, 3 – tlaková rozkladná nádoba, 4 – pripojení odsávání, 5 – nouzové odemčení, 6 – větrací mřížky, 7 – elektrické připojení, vypínač, konektor (převzato a upraveno) [43]

Patrony jsou vybaveny průrazným diskem navrženým tak, že v případě nadměrného tlaku v rozkladné nádobě dojde k protržení disku a uvolnění par. Rozkladné nádoby jsou připojeny k systému zajišťující odvádění horkých a žíravých par při protržení průrazného disku. Tento systém odvádění par je umístěn uprostřed mikrovlnné trouby a je napojen na odsávání. Přístroj je vybaven mechanickým odemknutím zařízení, které umožňuje v nouzových případech otevření víka. Součástí přístroje je i speciální ventilátor a větrací mřížky zajišťující dostatečné chlazení přístroje.

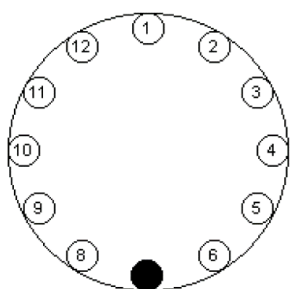
V uvedeném rozkladném zařízení je zabudován systém monitorující teplotu uvnitř i vně rozkladné patrony měřením infračerveného záření. Tím, jak se rozkladné patrony spolu s karuselem otáčejí, je umožněno monitorování teploty postupně u všech patron v karuselu. Informace o teplotě uvnitř patron jsou použity k regulaci výkonu magnetronu, který umožňuje měnit svůj výkon a tím i aktuální teplotu (a tlak) uvnitř rozkladné patrony. Systém DIRC (Direct IR Control) využívá infračervené čidlo umístěné na dně vnitřního prostoru a snímá postupně záření prostupující dno všech patron a měří tak teplotu rozkladné směsi uvnitř patrony. Systém OTC (Optical Temperature Cut-off) využívá další infračervené čidlo pro sledování teploty vnějšího povrchu patrony. Pokud je extrémně překročena nastavená teplota, rozkladné zařízení Speedwave Xpert se automaticky vypne [43].

K ovládání mikrovlnného rozkladného zařízení se používá samostatná řídicí jednotka s dotykovým displejem. Vzorky jsou rozkládány v uzavřených nádobách. Popis částí rozkladné patrony DAP-60 používané pro rozklad v mikrovlnném zařízení je na Obr. 2.3.



Obr. 2.3: Popis patrony: 1 – teflonový uzávěr, 2 – průrazný disk, 3 – teflonové víčko, 4 – tělo patrony (převzato a upraveno) [43]

Patrony DAP-60 jsou odolné vůči všem běžným minerálním kyselinám (HNO_3 , HF). Zařízení je konstruováno pro dvanáct patron. Pokud je potřebné provést rozklad s méně než dvanácti patronami, je potřeba zvolit umístění patron v rotoru podle návodu výrobce. Na Obr. 2.4 je zobrazeno uspořádání pro rozklad s jedenácti patronami, použité v této práci.



Obr. 2.4: Rozmístění patron při použití jedenácti patron při rozkladu (převzato) [43]

2.12 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je víceprvková analytická technika, která kombinuje indukčně vázané plazma sloužící jako zdroj iontů a hmotnostní spektrometrii, která ionty separuje a deteguje [44] [45]. Technika byla

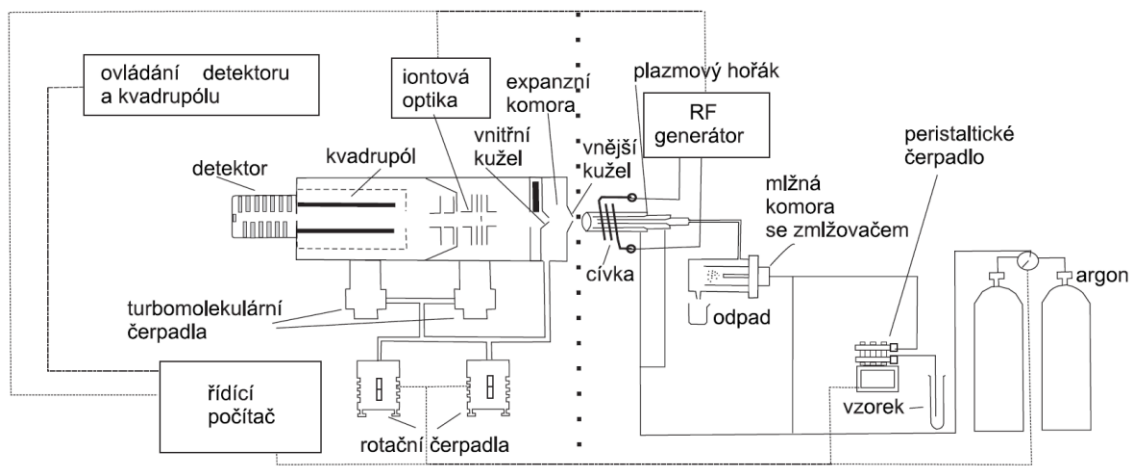
komerčně zavedena v roce 1983. Jedná se o jednu z nejefektivnějších metod stanovení vícero prvků současně v roztocích. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem se stala nenahraditelným nástrojem pro stanovení stopových prvků v potravinách. Touto technikou lze dosáhnout pro téměř všechny prvky nízkých detekčních limitů a zároveň vykazuje široký lineární dynamický rozsah. Koncentrace většiny analyzovaných prvků lze stanovit na úrovni ppb či dokonce ppt [45] [46] [47].

Princip metody

Kapalný vzorek je pomocí autosampleru, peristaltické pumpy, zmlžovače a mlžné komory převeden na aerosol, který je následně vnášen do plazmové hlavice, ve které je ve vysokofrekvenčním elektromagnetickém poli udržováno argonové plazma o teplotě 6 000 až 10 000 K. V plazmatu je jemný aerosol vzorku odpařen a jednotlivé sloučeniny jsou disociovány, atomizovány a ionizovány. Přednostně dochází k ionizaci do prvního stupně. Ionty jsou z plazmatu za atmosférického tlaku vedeny přes interface do hmotnostního spektrometru, kde je udržováno velmi nízké vakuum. Svazek iontů z iontové optiky vstupuje do analyzátoru, který ionty rozdělí dle poměru náboj/hmotnost. Po průchodu analyzátozem dopadají vyselektované ionty na detektor, který převádí proud iontů na elektrický signál [45] [48].

Instrumentace

Základ přístroje tvoří zařízení pro přívod analyzovaného vzorku, iontový zdroj, rozhraní mezi iontovým zdrojem a hmotnostním spektrometrem, iontová optika, analyzátor, detektor a řídicí jednotka [45]. Schéma hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem je zobrazeno na *Obr. 2.5*.

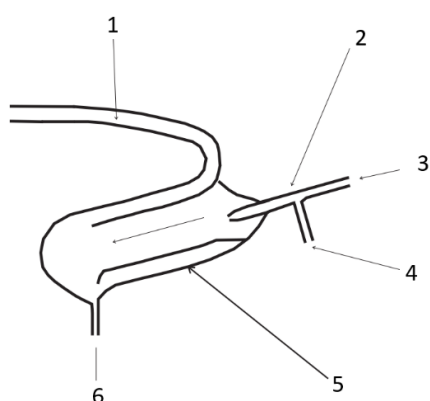


Obr. 2.5: Schéma hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (převzato a upraveno) [44]

System zavádění vzorku

Kapalný vzorek je zmlžován pomocí zmlžovače a mlžné komory a je vnášen do plazmatu ve formě aerosolu [45]. Vznik aerosolu je způsoben kinetickou energií argonu proudícího z trysky vyšší rychlostí, než je rychlost proudění kapalného vzorku. Transport kapalného vzorku je řízen peristaltickým čerpadlem. Ideálně je potřeba získat aerosol s nízkou distribucí velikostí částic a zároveň obsahující částice s průměrem menším než 10 μm . K tomuto účelu slouží mlžné komory. U většiny systémů je do požadované velikosti částic převedeno jen asi 1 až 5 % vzorku. Zbytek vzorku je odveden do odpadu [47] [48].

Pevné vzorky jsou nejčastěji převáděny přímo nebo mineralizací do roztoků [45]. Schéma mlžné komory se zmlžovačem je uvedeno na Obr. 2.6.

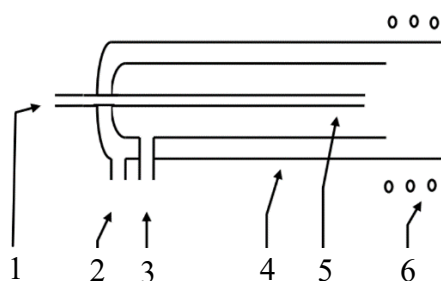


Obr. 2.6: Schéma mlžné komory se zmlžovačem: 1 – zmlžený vzorek, 2 – zmlžovač, 3 – roztok vzorku, 4 – argon do zmlžovače, 5 – mlžná komora, 6 – odpad (převzato a upraveno) [44]

Indukčně vázané plazma

Plazma je ionizovaný plyn, který se skládá z kladně nabitých iontů a volných elektronů. Úkolem plazmatu v ICP-MS je ionizovat vzorek. Indukčně vázané plazma je považováno za tvrdou ionizační techniku, protože zcela atomizuje většinu molekul ve vzorku. Přístroje ICP-MS používají až na výjimky argonové plazma [49].

Plazma se tvoří na konci tří koncentrických křemenných trubic. Všemi třemi křemennými trubicemi proudí argon. Vnější křemennou trubicí proudí hlavní zdroj argonu označovaný jako plazmový, který slouží jako chladicí vrstva a chrání stěny plazmové hlavice před roztavením. Soustřednou křemennou trubicí je veden proud argonu nazývaný jako pomocný, který má za úkol chránit špičku injektoru před plazmatem. Vnitřní trubice se nazývá injektor a obsahuje aerosol vzorku v proudu argonu. Indukční cívka, která je připojena k radiofrekvenčnímu generátoru, vytváří elektromagnetické pole. Aplikovaný výboj ionizuje atomy argonu a vytváří ionty a elektrony, které jsou ovlivňovány elektromagnetickým polem. Ionty a elektrony se srážejí, ionizují další atomy, vytváří obrovské množství tepla. Plazma má tvar prstence a dosahuje teploty až 10 000 K, většinou se teplota pohybuje mezi 7 000 – 8 000 K. Na Obr. 2.7 je zobrazeno schéma plazmové hlavice [48] [49].



Obr.2.7: Schéma plazmové hlavice: 1- vzorek s argonem, 2 – plazmový argon, 3 – pomocný argon, 4 – křemenná trubice, 5 – injektor, 6 – závití indukční cívky (převzato a upraveno) [48]

Ionizace

Zmlžený vzorek je unášen proudem argonu do plazmatu. Vzorek je v plazmatu odpařen, atomizován a ionizován. Stupeň ionizace závisí na teplotě plazmatu a ionizačním potenciálu prvku. Většina prvků má první ionizační potenciál nižší než argon, lze je tak účinně ionizovat. Indukčně vázané plazma je tak velmi účinný zdroj iontů

s vysokou účinností atomizace a téměř stoprocentní účinností ionizace většiny prvků [45] [49].

Rozhraní

Spojení mezi indukčně vázaným plazmatem a hmotnostním spektrometrem tvoří tzv. interface. Ten je tvořen dvojicí kuželů, které slouží jako děliče tlaku. První kužel je v kontaktu s plazmatem a nazývá se vnější kužel (sampler), druhý kužel je označován jako vnitřní (skimmer). Ve vrcholech kuželů jsou otvory o průměru kolem 1 mm. Kužely jsou snadno demontovatelné. Nejčastěji používaným materiálem je nikl nebo platina. Rozhraní je nejvíce namáhanou částí přístroje, protože je v přímém kontaktu s plazmatem. V rozhraní dochází k oddělení hlavního toku argonu od toku atomů a iontů analyzovaného vzorku [44] [45] [49].

Ionty, fotony a neutrální částice jsou z plazmatu odebírány za atmosférického tlaku. V prostoru mezi vnějším a vnitřním kuželem je udržován tlak okolo 500 Pa. Po průchodu vnějším kuželem se vzorek dostává do hmotnostního spektrometru, kde je udržován tlak 10^{-4} Pa. Vakuum zajišťuje dostatečnou střední volnou dráhu atomů, která je delší než délka kvadrupólového analyzátoru. Tímto způsobem je omezeno množství vzájemných srážek v analyzátoru [45] [48].

Iontová optika

Úkolem iontové optiky je před vstupem do hmotnostního analyzátoru získat svazek iontů, který nebude obsahovat fotony, elektroneutrální částice a části iontů, které by mohly zvyšovat šum. Elektricky neutrální částice neovlivňuje elektromagnetické pole, k jejich odstranění tak stačí do jejich dráhy umístit mechanickou překážku, která působí jako pohlcovač a o kterou se elektricky neutrální částice zastaví. Analyzované ionty se vychýlí elektrickým polem mimo osu tak, aby se vyhnuly překážce [45] [49].

Hmotnostní analyzátor

Analyzátor iontů se využívá k rozdělení jednotlivých iontů podle poměru hmotnosti a náboje. Spektrometr Agilent 7900 používá kvadrupólový analyzátor [45].

Kvadrupólový analyzátor (kvadrupól) se skládá ze čtyř kovových tyčí. Tyto tyče jsou umístěny rovnoběžně ve stejné vzdálenosti od osy analyzátoru. Kvadrupólový analyzátor

pracuje jako filtr. Ionty jsou v kvadrupólovém analyzátoru rozkmitány a dochází k pohybu iontů k detektoru. Určitá frekvence na elektrodách a mění se amplituda napětí na tyčích umožňuje průchod iontu v závislosti na jeho náboji a hmotnosti. Poměr hmotnosti a náboje je lineárně závislý na elektrickém potenciálu elektrod. Ionty prošlé kvadrupólem dopadají na detektor [44] [45] [48].

Detektor

Iont dopadající na první dynodu detektoru způsobí emisi několika elektronů z povrchu, které následně dopadnou na další dynodu a uvolní další elektrony. Vzniká zvyšující se tok elektronů, který je zaznamenán jako výsledný signál. Výsledný signál je dále zpracován [44] [48] [49].

Interference

U ICP-MS se setkáváme s interferencemi spektrálními danými překryvem izobarických iontů ve spektru a interferencemi nespektrálními způsobenými zejména složením matrice [44].

Mezi spektrální interference patří izobarický překryv, který nastává, pokud mají dva izotopy různých prvků prakticky stejnou hmotnost. Jedná se o částice početně se vyskytující v argonovém plazmatu jako je Ar^+ nebo ArAr^+ , které komplikují stanovení například K, Ca a Se. Izobarické interference lze eliminovat tím, že je měřen signál izotopu, který interference nevykazuje nebo se provede matematická korelace. Spektrální interference způsobuje i vznik polyatomických částic. Prvky matrice nebo nosného plynu se spojují do polyatomických částic. Jedná se především o polyatomické částice vznikajícími kombinací Ar, O, C, N, H. Typickými příklady jsou ArOH^+ , ArH^+ , N_2H^+ , CO_2^+ a další. Tyto interference lze eliminovat použitím heliové cely [44] [48].

Nespektrální interference mohou být způsobeny velkým množstvím rozpuštěných látek, které zahlcují otvory kuželů a způsobují posun signálu nebo mohou být vyvolány matričními prvky. Vlivem velkého množství snadno ionizovatelných prvků dochází ke změně intenzity signálu stanovovaného prvku. Potlačit interference lze ředěním vzorků, pomocí interního standardu nebo použitím vnitřního standardu [44] [48].

Výhody ICP-MS

Ve srovnání s atomovou absorpční spektrometrií (AAS) umožňuje ICP-MS a optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) stanovení více prvků současně s dobrou citlivostí při širokém lineárním dynamickém rozsahu. Široký lineární dynamický rozsah umožňuje stanovit hlavní a stopové prvky při stejném nástřiku vzorku. Výhodou ICP-MS oproti ICP-OES je stanovení prvků s velmi nízkými detekčními limity. Navíc ve srovnání s ICP-OES poskytuje ICP-MS jednodušší spektrální interpretaci a izotopové údaje [42] [49].

Další výhodou ICP-MS je krátká doba stanovení, která umožňuje během několika sekund změřit koncentrace široké škály prvků [44]. Díky vysoké teplotě indukčně vázaného plazmatu se při měření pomocí ICP-MS vyskytuje minimum matricových interferencí oproti ostatním technikám. K hmotnostnímu spektrometru s indukčně vázaným plazmatem lze připojit specializované systémy pro zavádění vzorků, jako jsou laserová ablace, generátory hydridů a chromatografické systémy [47].

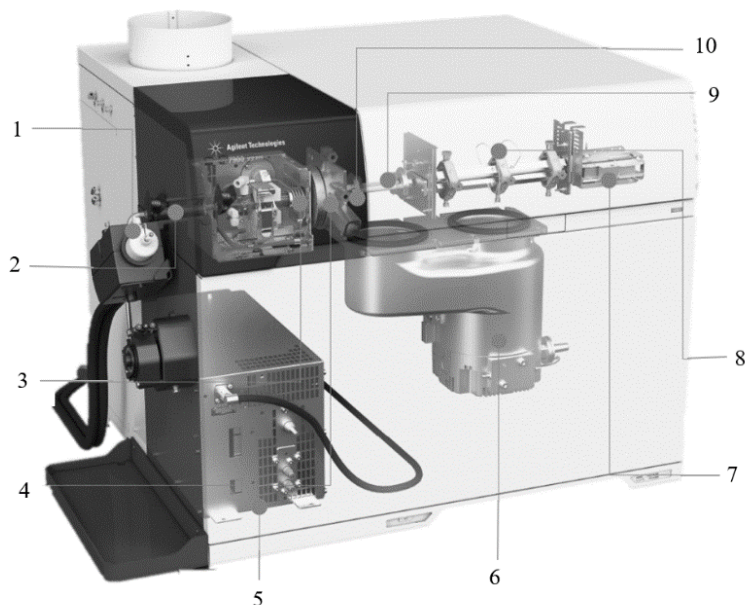
Omezení ICP-MS při stanovení prvků v potravinách

Omezením ICP-MS je, že při stanovení prvků ve vzorcích potravin dochází kvůli vysoké koncentraci organické matrice k interferencím. Interference lze minimalizovat nebo odstranit použitím vhodných alternativních izotopů nebo rovnic pro korelaci interferencí.

Dalším důležitým aspektem je, že vzorky musí být před stanovením pomocí ICP-MS rozloženy vhodnými metodami a převedeny tak do kapalného stavu (roztoku) [42]. Vzorek nesmí obsahovat vysoké koncentrace kyselin, které by způsobily korozi vnějšího kužele rozhraní, případně i dalších částí hmotnostního spektrometru [44]. Bylo zjištěno, že použití zředěných kyselin při mikrovlnném rozkladu je dobrou alternativou místo použití koncentrovaných kyselin. Použití zředěných kyselin zlepšuje hodnoty pro slepé vzorky a tím snižuje meze stanovitelnosti, množství vzniklého odpadu a poškození rozhraní ve srovnání s použitím koncentrovaných kyselin [35]. Vzorek nesmí obsahovat velké množství solí, které by mohly způsobit zanesení otvoru ve vnějším kuželu a změnit tím parametry měření [44].

Při rutinní analýze pomocí ICP-MS se doporučuje používat interní standardy, aby se kompenzoval možný drift při dlouhodobém provozu. [42]

Na *Obr. 2.8* je zobrazen hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Agilent 7900. [50]



Obr. 2.8: 1 - systém zavádění vzorku (zmlžování vzorku), 2 - přívod vzorku do plazmatu, 3 - ICP hlavice, 4 - interface, 5 - vysokofrekvenční generátor, 6 - turbomolekulární pumpa, 7 - detektor, 8 - kvadrupólový analyzátor, 9 - kolizní / reakční cela, 10 - iontová optika (převzato a upraveno) [50]

2.13 Stanovované prvky – ICP-MS

MAKROPRVKY

Vápník

Vápník má šest stabilních izotopů ^{40}Ca , ^{42}Ca , ^{43}Ca , ^{44}Ca , ^{46}Ca , ^{48}Ca . První ionizační energie vápníku je 6,11 eV. Nejhojněji vyskytujícím izotopem se zastoupením 96,9 % je vápník ^{40}Ca . Hlavní izotop ^{40}Ca je ale přímo překryt hlavním píkem ^{40}Ar z plazmatu, což způsobuje, že je vápník obtížné stanovit ve stopových množstvích. Dalším nejhojněji se vyskytujícím izotopem je ^{44}Ca , který má 2,1% zastoupení a poskytuje tak nízkou citlivost. Nedostatečná citlivost většinou nebývá problémem, protože vápník se obvykle stanovuje

na úrovních ppb nebo ppm. Vápník je ionizován v argonovém plazmatu přibližně z 99 % a je stabilní v mírně kyselých roztocích. [51]

Izotop ^{44}Ca podléhá interferenci iontů CO_2 . Tuto interferenci lze účinně odstranit použitím kolizní cely s heliem (tzv. heliový mód). [51]

Hořčík

Hořčík má tři stabilní izotopy ^{24}Mg , ^{25}Mg a ^{26}Mg . Nejhojněji vyskytujícím se izotopem je izotop ^{24}Mg , který představuje 78,99 % přirozeného výskytu. Hořčík je stabilní v mírně kyselých roztocích a doporučuje se skladovat v plastových nádobách. První ionizační energie hořčíku je 7,65 eV. V plazmatu argonu je ionizován přibližně z 90 %. Problémem při stanovení hořčíku může být kontaminace. Přítomnost uhlíku ve vzorcích může vést k interferencím CC a CO . Ionty Ti^{++} mohou interferovat při stanovení stopového množství s hořčíkem, ale pouze pokud je titan hlavní složkou vzorku. [51]

Fosfor

Fosfor je monoizotopický prvek, stabilním izotopem je ^{31}P . První ionizační energie fosforu je 10,49 eV. Fosfor je obtížné stanovit ve stopových množstvích, protože je ionizován pouze ze 7,5 %. Fosfor podléhá interferencím NO a NOH , navíc snadno tvoří oxidy, a tak vzorky obsahující velké množství fosforu mohou vést k interferencím PO a POH na titanu. [51]

Draslík

Draslík má tři stabilní izotopy ^{39}K , ^{40}K , ^{41}K . Draslík je téměř 100% ionizován v argonovém plazmatu. První ionizační energie draslíku je 4,34 eV. Hlavní izotop ^{39}K , který zaujímá 93,26 %, podléhá silným interferencím ArH , proto je obtížné draslík stanovit ve stopových množstvích. Draslík je stabilní v mírně kyselém roztoku. [51]

Sodík

Sodík je monoizotopický prvek, jeho stabilní izotop je ^{23}Na . První ionizační potenciál sodíku je 5,14 eV. Sodík prudce reaguje s vodou a rozpouští se v ní. Jeho vysoká rozpustnost může vést k vysokým hladinám pozadí, proto se nedoporučuje jako vnitřní standard. V argonové plazmě je téměř 100% ionizován. Může se slučovat v argonu

za vzniku NaAr, který interaguje s ^{63}Cu . Sodík je stabilní v mírně kyselých roztocích a měl by se skladovat v plastových nádobách. [51]

MIKROPRVKY

Železo

Železo má čtyři stabilní izotopy ^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe a ^{58}Fe . Výskyt izotopu ^{56}Fe je 91,8 % a izotopu ^{54}Fe je 5,9 %. První ionizační energie železa je 7,9 eV. Roztoky železa jsou stabilní ve zředěné kyselině dusičné. Železo je v argonovém plazmatu ionizováno asi z 86 %. Železo je obtížně stanovitelné, protože všechny izotopy železa jsou zatíženy izobarickými překryvy nebo polyatomickými interferencemi. U ^{54}Fe a ^{56}Fe lze interference typu ArN a ArO a matricové interference, jako je například CaO, odstranit pomocí režimu heliové cely. [51]

Zinek

Zinek má pět stabilních izotopů ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn a ^{70}Zn . První ionizační energie zinku je 9,39 eV. Nejrozšířenějším izotopem se zastoupením 48,3 % je izotop ^{64}Zn . V argonovém plazmatu je zinek ionizován pouze z 33 %. Zinek je stabilní ve zředěných roztocích kyseliny dusičné. Přítomnost sloučenin síry ve vzorku může vést k interferencím SS a SO_2 , které lze odstranit použitím režimu heliové cely. U izotopu ^{64}Zn může docházet k interferencím typu MgAr. [51]

Měď

Měď má dva izotopy ^{63}Cu a ^{65}Cu . Rozšířenějším izotopem je ^{63}Cu zaujímající 69,15 % celkového výskytu. U obou izotopů se vyskytují interference s oxidy vápníku a titanu. U ^{63}Cu se vyskytují interference typu NaAr. První ionizační energie mědi je 7,73 eV. Měď je stabilní ve zředěné kyselině dusičné. Měď je téměř z 90 % ionizovaná v argonovém plazmatu. [51]

Mangan

Mangan je monoizotopický, jediným stabilním izotopem je ^{55}Mn . První ionizační energie manganu je 7,43 eV. Mangan je v argonovém plazmatu ionizován přibližně z 93 %. Jedná se o prvek stabilní ve zředěném roztoku kyseliny dusičné. Vysoká

koncentrace draslíku způsobuje interferenci KO na mangan, kterou lze snadno odstranit pomocí režimu heliové cely [51].

Molybden

Molybden má sedm stabilních izotopů ^{92}Mo , ^{94}Mo , ^{95}Mo , ^{96}Mo , ^{97}Mo , ^{98}Mo a ^{100}Mo . První ionizační energie molybdenu je 7,09 eV. Molybden je v argonovém plazmatu ionizován z více než 95 %. Formy molybdenu, v nichž je navázán kyslík se mohou překrývat s izotopy kadmia. Režim heliové cely může minimalizovat tvorbu MoO [51].

2.14 Stanovení prvků v potravinách pomocí ICP-MS

Stanovením prvků a optimalizací metod pro stanovení prvků v potravinách pomocí ICP-MS se zabývaly různé studie. Následující přehled uvádí studie zabývající se stanovením prvků v pšeničné mouce, bezlepkových moukách a jiných potravinách. Uvedeny jsou pracovní postupy, použité izotopy a závěry optimalizace metod pro stanovení relevantní pro tuto diplomovou práci.

Stanovení prvků v pšeničné mouce [52]

Příkladem studie zabývající se stanovením prvků v pšeničné mouce je studie [52], která se zabývá optimalizací a ověřením metody pro stanovení více prvků v obilných moukách metodou ICP-MS. Mezi stanovovanými prvky byly Mg, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Mo. Rozklad vzorků pšeničné mouky byl proveden v uzavřených nádobách pomocí rozkladného zařízení.

V rámci studie bylo testováno množství koncentrované kyseliny dusičné a peroxidu vodíku pro rozklad. Bylo zjištěno, že při použití 1,0; 2,0 nebo 2,5 ml koncentrované kyseliny dusičné na 0,5 g vzorku zůstaly v roztocích nerozložené částice. Dále bylo zjištěno, že účinnost rozkladu se zlepšila při přidání peroxidu vodíku. Studie používala chemikálie s nejvyšším stupněm čistoty, použití peroxidu vodíku způsobovalo problémy s kontaminací nečistotami v něm obsaženými. Autoři studie nakonec zvolili pro rozklad pouze 5 ml 65% kyseliny dusičné.

Ke stanovení prvků ve studii byl použit systém Agilent Technologies 7500cx ICP-MS. Izotopy použité pro stanovení studie neuvádí. Systém ICP-MS byl kalibrován metodou externích standardů s rhodiem a luteciem jako vnitřními standardy. Kalibrační křivky

byly získány použitím víceprvkových kalibračních roztoků. Pro kontrolu kontaminace obsahovala každá série slepý pokus s činidlem. Závěrem studie je, že metoda ICP-MS uvedená v této studii umožňuje přesné stanovení obsahu více prvků v pšeničné mouce.

Stanovení prvků v zrnech pšenice rozemletých na mouku [5]

Jednou z použitých technik ke stanovení prvků v další studii byla technika ICP-MS. Přístroj byl kalibrován na základě čtyř směsných standardů. Z těchto čtyř standardů byly tři připraveny z jednoprvkového standardu a jeden z víceprvkového standardu. Rhodium bylo přidáno ke všem vzorkům jako vnitřní standard. Jediným stanovovaným prvkem pomocí ICP-MS, kterým se zabývá i tato diplomová práce, byl molybden (měřeným izotopem byl ^{95}Mo). Druhou použitou technikou bylo ICP-OES, kterým byly stanoveny mimo jiné i prvky Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P a Zn.

Stanovení prvků v amarantové a pohankové mouce [53]

Součástí studie zabývající se stopovými prvky bylo stanovení celkového obsahu prvků. Studie se zaměřovala na prvky (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, P, Zn) v amarantové a pohankové mouce. Pevné vzorky mouky byly rozkládány tlakovým mikrovlnným rozkladem v teflonových nádobách s 3 ml 65 % kyseliny dusičné po dobu 10 min. Stanovení prvků bylo provedeno pomocí ICP-MS s externí kalibrací. Měřené izotopy byly ^{59}Co , ^{65}Cu , ^{57}Fe , ^{55}Mn , ^{95}Mo , ^{58}Ni , ^{47}PO , ^{66}Zn .

Stanovení prvků v maniokové, kukuřičné a pšeničné mouce [35]

V rámci této práce byla optimalizována úprava vzorků mikrovlnným rozkladem a podmínky pro stanovení 17 prvků v maniokové, pšeničné a kukuřičné mouce pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Mezi stanovovanými prvky byly i Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, Zn. Celkem bylo stanovováno 37 vzorků od každého druhu mouky. Z prvků byly pomocí hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem zjišťovány izotopy ^{53}Cr , ^{98}Mo , ^{63}Cu , ^{57}Fe , ^{55}Mn , ^{66}Zn a další, kterými se tato diplomová práce nezabývá.

Stanovení prvků v bezpečkových potravinách [27]

Další studie se zabývala stanovením koncentrací prvků (As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, V, Zn) v bezpečkových potravinách určených pro lidi s celiakií. Prvky byly stanoveny pomocí ICP-MS. Pro rozklad vzorků byla použita mikrovlnná trouba s vysokotlakým rotorem. Asi 0,2 g homogenizovaných vzorků bylo naváženo a převedeno do teflonových nádob. Přidány byly 2 ml 69% kyseliny dusičné a 1 ml 30% peroxidu vodíku. O ponechání rozkládaného vzorku v klidu po přidání reagensů se studie nezmiňuje. Stanovení byla provedena externí kalibrací. Jako slepý pokus byl použit roztok 2% kyseliny dusičné. Monitorované izotopy byly ^{65}Cu , ^{56}Fe , ^{55}Mn , ^{95}Mo , ^{68}Zn .

Stanovení prvků ve vzorcích potravin [42]

Cílem další práce bylo vyvinout vhodnou metodu pro stanovení hlavních a stopových prvků v různých vzorcích potravin pomocí techniky ICP-MS. Mezi vzorky patřila i rýže a pšenice. Stanovováno bylo šestnáct prvků, mezi něž patřily i Se, Mn, Zn, Cu, Mo, Mg, Cr. Rozklad vzorku byl proveden v teflonových nádobách, do kterých bylo přidáváno 100-250 mg práškových vzorků. K nim byly přidávány 4 ml 20% kyseliny dusičné a 2 ml 30% peroxidu vodíku. Rozklad vzorků byl proveden v mikrovlnném rozkladném systému. Pro stanovení prvků byl použit ICP-MS. Stanovované izotopy byly ^{82}Se , ^{66}Zn , ^{63}Cu , ^{24}Mg , ^{55}Mn , ^{98}Mo , ^{53}Cr a další. Pro srovnání metod byla použita atomová absorpční spektrometrie v grafitové peci.

Součástí práce bylo i hodnocení různých směsí pro rozklad vzorků v systémech s uzavřenými nádobami. Bylo zjištěno, že směs kyseliny dusičné s peroxidem vodíku jsou účinnější než jiné směsi kyselin, a to i při použití nízkých koncentrací kyseliny dusičné. Ve studii byly dále hodnoceny tři interní standardy, používané při stanovení pomocí ICP-MS, a to rhodium, iridium a yttrium. Nejlepších výsledků pro šestnáct stanovovaných analytů bylo dosaženo s rhodiem.

V rámci studie byla zjištěna dobrá shoda mezi stanovenými hodnotami a hodnotami certifikovaných referenčních materiálů, což vypovídalo o účinné výtěžnosti analytů po rozkladu a přesné detekci.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Používané přístroje a zařízení

- Rozkladné mikrovlnné zařízení Speedwave Xpert (Berghof, Německo), rozkladné patrony z teflonu DAP-60
- Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem 7900 ICP-MS (Agilent, USA)
- Zařízení pro úpravu deionizované vody Milli-Q Plus (Millipore, USA)
- Analytické váhy (Sartorius, ČR)

3.2 Používané chemikálie

- Kyselina dusičná $\geq 65\%$, Semiconductor grade (Honeywell, Německo)
- Kyselina chlorovodíková 34-37%, ANALPURE (Analytika, spol. s. r. o., ČR)
- Peroxid vodíku 30%, p. a.+ (Analytika, spol. s. r. o., ČR)
- Deionizovaná voda o vodivosti $0,055 \mu\text{Scm}^{-1}$ získaná z přístroje Milli-Q Plus
- Interní standard Astasol INT-MIX01-250 (Bi, In, Sc, Tb, Y) o koncentraci analytů 10 mg dm^{-3} (Analytika, spol. s. r. o., ČR)
- Certifikovaný referenční materiál Astasol AN9091MN-100 (Ca, K, Mg, Na) o koncentraci analytů 1000 mg dm^{-3} (Analytika, spol. s. r. o., ČR)
- Kalibrační roztok Astasol (P) o koncentraci 1000 mg dm^{-3} (Analytika, spol. s. r. o., ČR)
- Certifikovaný referenční materiál AN9094MFN-250, mix 23 prvků (As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, Tl, V, Zn) každý analyt o koncentraci 100 mg dm^{-3} , v 5% HNO_3 + 0,2% HF (Analytika, spol. s. r. o., ČR)

3.3 Použité vzorky

K analýze bylo použito 40 vzorků mouky. Vzorky mouky byly zakoupeny v originálních balení běžně dostupných v internetových a kamenných obchodech v České republice. Zakoupené vzorky byly převedeny do 50ml centrifugačních zkumavek se šroubovacím uzávěrem a takto byly skladovány při laboratorní teplotě. Vzorky mouk byly rozděleny na bezlepkové směsi, mouky obsahující lepek a přirozeně bezlepkové mouky.

Kromě směsí, které byly stanovovány jednotlivě, byly vždy u každého druhu mouky poskytnuty dva a více vzorků od různého výrobce. Použité druhy mouky jsou uvedeny v tabulce *Tab. 3.1*, *Tab. 3.2* a *Tab. 3.3*.

Tab. 3.1: Přehled vzorků bezlepkových směsí

Vzorek	Druh mouky	Výrobce
1	Jizerka zlatá	Jizerské Pekárny
2	Mix per Pane	Nutrifree
3	Univerzální směs	Labeta
4	Mix B	Schär
5	Samokypřící směs bílá	Doves Farm
6	Univerzal-Backmischung	K-free
7	Mix per Pane Integrale	Nutrifree
8	Chlebová směs tmavá	Doves Farm
9	Směs na pečení	Nature's Promise

Tab. 3.2: Přehled vzorků přirozeně bezlepkových mouk

Vzorek	Druh mouky	Výrobce
10	Rýžová mouka	iPlody
11	Rýžová mouka	Green Apotheke
12	Hrachová mouka	iPlody
13	Hrachová mouka	Zdraví z přírody
14	Pohanková mouka	iPlody
15	Pohanková mouka	Zdraví z přírody
16	Lněná mouka	iPlody
17	Lněná mouka	Zdraví z přírody
18	Kukuřičná mouka	iPlody
19	Kukuřičná mouka	Zdraví z přírody
20	Cizrnová mouka	iPlody
21	Cizrnová mouka	Zdraví z přírody
22	Jáhlová mouka	iPlody
23	Jáhlová mouka	Zdraví z přírody
24	Čiroková mouka	iPlody
25	Čiroková mouka	Zdraví z přírody
26	Konopná mouka	iPlody
27	Konopná mouka	Zdraví z přírody
28	Kokosová mouka	iPlody
29	Kokosová mouka	Country Life
30	Mandlová mouka	Alika
31	Mandlová mouka	Natural Jihlava JK
32	Pohanková celozrnná m.	Pohankový mlýn Šmajstra
33	Rýžová mouka	Zdraví z přírody

Tab. 3.3: Přehled vzorků mouk obsahující lepek

Vzorek	Druh mouky	Výrobce
34	Pšeničná mouka hladká	Mlýn Havlíčkův Brod
35	Pšeničná mouka hladká	Malitas
36	Žitná mouka	iPlody
37	Žitná mouka	Pernerka
38	Špaldová mouka	Bonavita
39	Špaldová mouka	Pernerka
40	Celozrnná mouka špaldová	Bonavita

3.4 Pracovní postup

Nejprve byla provedena optimalizace rozkladu reprezentativních vzorků. Ze všech praktických vzorků bylo vybráno šest reprezentativních vzorků, které reprezentovaly různé skupiny druhů mouk. Vybrané vzorky byla hladká pšeničná mouka (nejčastěji konzumovaná mouka), Jizerka (bezlepkové směsi), rýžová mouka (obilné bezlepkové mouky), pohanková mouka (mouky z pseudoobilovin), hrachová mouka (luštěninové mouky) a lněná mouka (mouky z ořechů a semen). Po optimalizaci bylo provedeno stanovení prvků ve všech praktických vzorcích.

Všechno použité chemické nádobí bylo před použitím třikrát promyto deionizovanou vodou.

3.4.1 *Optimalizace rozkladu reprezentativních vzorků*

Rozklad vzorků byl proveden v uzavřených patronách DAP-60 pomocí rozkladného mikrovlnné zařízení Speedwave Xpert.

Čištění patron

Před rozkladem vzorků bylo provedeno čištění rozkladných teflonových patron, aby se zamezilo případné kontaminaci vzorků znečištěnými patronami. Do každé z 12 patron bylo přidáno 5 ml koncentrované kyseliny dusičné a 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Patrony byly uzavřeny teflonovým víčkem a průrazným diskem. Nakonec byly na patrony našroubovány teflonové uzávěry. Všechny 12 patron bylo vloženo do mikrovlnného zařízení Speedwave Xpert. Následně byl spuštěn rozklad podle

nastaveného teplotního programu, který je zaznamenán v *Tab. 3.4*. Po ukončení rozkladného programu byl obsah patron vylit a patrony byly dvakrát vymyty deionizovanou vodou. Patrony byly sušeny přes noc.

Tabulka 3.4: Parametry teplotní programu pro čištění patron

Krok	T [°C]	p [bar]	t_1 [min]	t_2 [min]	P [%]
1	170	35	5	5	90
2	200	35	1	15	90
3	50	25	1	10	0

T - nastavená teplota; p - nastavený tlak; t_1 - čas dosažení teploty T ; t_2 - čas udržování teploty T ; P - výkon magnetronu

Rozklad reprezentativních vzorků

Po vyčištění patron bylo vybráno 6 reprezentativních vzorků ze všech praktických vzorků. Reprezentativní vzorky byly pšeničná mouka, Jizerka, rýžová mouka, hrachová mouka, pohanková mouka a lněná mouka, jak je uvedeno výše.

Před vážením byly vzorky důkladně protřepány v jednotlivých centrifugačních zkumavkách, aby byla zajištěna dostatečná homogenita. Vzorky byly váženy na analytických vahách pomocí filtračního papíru. Hmotnost vážených homogenizovaných vzorků byla v rozmezí od 0,35 do 0,36 g. Filtrační papír s naváženým vzorkem přehnut a převeden do rozkladných patron pomocí pinzety tak, aby části vzorku nezůstaly přilepeny na stěnách patrony.

Tyto vzorky byly rozkládány ve čtyřech sériích při různých poměrech 65% kyseliny dusičné a 30% peroxidu vodíku. Poměry nalezneme v *Tab. 3.5*. Po přidání 65% kyseliny dusičné byla patrona ponechána 5 min v klidu v digestoři a poté po přidání 30% peroxidu vodíku 15 min, aby se zamezilo případným samovolným reakcím.

Poté byly patrony uzavřeny víčkem, průrazným diskem a uzávěrem. Po vložení patron do rozkladného mikrovlnného zařízení byly vzorky rozloženy podle teplotního programu s parametry uvedenými v *Tab. 3.6*.

Tab. 3.5: Poměry 65% kyseliny dusičné a 30% peroxidu vodíku u jednotlivých sérií měření

Série rozkladu	$V(\text{HNO}_3)$, [ml]	$V(\text{H}_2\text{O}_2)$, [ml]
A	5	2
B	4	3
C	3	4
D	2	5

Tab. 3.6: Parametry teplotního programu pro rozklad reprezentativních vzorků

Krok	T [°C]	p [bar]	t_1 [min]	t_2 [min]	P [%]
1	170	30	2	5	80
2	190	35	5	15	90
3	50	25	1	10	0

T - nastavená teplota; p - nastavený tlak; t_1 - čas dosažení teploty T ; t_2 - čas udržování teploty T ; P - výkon magnetronu

Po skončení rozkladu a ochlazení patron byly patrony vyjmuty z rozkladného zařízení. Čirý bezbarvý roztok z patron byl převeden do 50ml centrifugačních zkumavek se šroubovacím uzávěrem, které byly doplněny deionizovanou vodou na objem 50 ml. Patrony byly po každé sérii měření naplněny 5% kyselinou dusičnou a ponechány tak do druhého dne. Následně byly několikrát propláchnuty deionizovanou vodou a byly tak připraveny k dalšímu použití.

Stanovení prvků v reprezentativních vzorcích

Ke stanovení byly připraveny kalibrační roztoky o koncentraci 1,6; 8,0; 40; 200; 1000 $\mu\text{g dm}^{-3}$ jednotlivých prvků do 50ml centrifugačních zkumavek s uzávěrem. Připraveny byly z certifikovaného referenčního materiálu AN9094MFN-250. Každý prvek v RM měl koncentraci 100 mg dm^{-3} . Koncentrace 200; 1000 $\mu\text{g dm}^{-3}$ byly získány zředěním přímo z RM. Roztoky o koncentraci 8,0; 40,0 $\mu\text{g dm}^{-3}$ byly připraveny z kalibračního roztoku o koncentraci 1000 $\mu\text{g dm}^{-3}$. Kalibrační roztok 1,6 $\mu\text{g dm}^{-3}$ byl připraven z kalibračního roztoku 40 $\mu\text{g dm}^{-3}$.

Prvky v reprezentativních vzorcích byly stanoveny pomocí ICP-MS Agilent 7900. Měřené izotopy byly ^{24}Mg , ^{31}P , ^{43}Ca , ^{44}Ca , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{95}Mo , ^{52}Cr , ^{77}Se , ^{78}Se ,

⁸²Se. Jako interní standardy byly použity ⁴⁵Sc a ⁸⁹Y. Prvky byly stanovovány v režimu bez kolizního / reakčního plynu, tak i použitím He v kolizní cele.

3.4.2 Stanovení prvků v praktických vzorcích

Před rozkladem praktických vzorků byly všechny praktické vzorky protřepány tak, aby byly co nejvíce homogenní.

Rozklad praktických vzorků

Hmotnost navážených vzorků byla v rozmezí od 0,259 g do 0,269 g. Rozklad praktických vzorků probíhal obdobným postupem jako rozklad reprezentativních vzorků. Pro rozklad byl použit pouze poměr 3 ml 65% kyseliny dusičné a 4 ml 30% peroxidu vodíku. Pro rozklad byl zvolen totožný teplotní program, jako v případě optimalizace rozkladu reprezentativních vzorků, uvedený v *Tab. 3.6*. K rozkladu bylo použito vždy 11 patron. Protože byl rotor uzpůsoben na 12 patron, bylo potřeba zvolit vhodné uspořádání. Podle doporučení výrobce zůstalo volné místo proti patroně s nejvyšší navázkou, která byla umístěna do pozice 1. Jedenáctá patrona při každé sérii rozkladu obsahovala pouze 3 ml 65% kyseliny dusičné a 4 ml 30% peroxidu vodíku a sloužila jako blank (slepý vzorek).

Stanovení prvků v praktických vzorcích

Prvky ve vzorcích byly stanoveny pomocí hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem. Byla provedena dvě měření, ke každému byla připravena jiná kalibrace.

První kalibrace byla připravena ke stanovení sodíku, draslíku, vápníku, fosforu a hořčíku. Kalibrace byla tvořena šesti kalibračními roztoky o koncentraci 0; 0,080; 0,40; 2,0; 10; 50 mg dm⁻³. Byla připravena z referenčního materiálu AN9091MN-100 a z kalibračního roztoku fosforu o koncentraci 1000 mg dm⁻³.

Druhá řada kalibračních roztoků byla připravena pro stanovení manganu, železa, mědi, zinku, molybdenu. Kalibrace se skládala z šesti kalibračních roztoků o koncentracích 0; 0,0016; 0,0080; 0,040; 0,20; 1,0 mg dm⁻³. Roztoky byly připraveny do 50ml centrifugačních zkumavek. Kalibrační roztok 1,0 mg dm⁻³ byl připraven z víceprvkového

referenčního materiálu AN9094MFN-250. Ostatní kalibrační roztoky byly postupně připraveny následným ředěním.

Nastavení přístroje Agilent 7900 ICP-MS a parametry měření jsou uvedeny v *Tab. 3.7*. Přístroj pracoval v klimatizované laboratoři o teplotě 21°C.

Tab. 3.7: Nastavení přístroje a parametry měření

Parametry	
Plazmový režim	General Purpose
Radiofrekvenční výkon	1550 W
Hloubka vzorkování	10,0 mm
Průtok plynu zmlžovačem	1,03 l/min
Průtok plazmového plynu	15,0 l/min
Průtok pomocného plynu	0,90 l/min
Teplota mlžné komory	2 °C
Rychlost otáčení peristaltické pumpy	0,10 rps
Mód kolizní cely	no-gas/heliový mód

Monitorované izotopy a použité vnitřní standardy pro kompenzaci případné nestability signálu jsou uvedeny v *Tab. 3.8*.

Tab. 3.8: Monitorované izotopy a interní standardy

Měření	Monitorované izotopy						Interní standardy
1	²³ Na	³⁹ K	²⁴ Mg	³¹ P	⁴³ Ca	⁴⁴ Ca	⁴⁵ Sc
2	⁶⁶ Zn	⁵⁶ Fe	⁶³ Cu	⁵⁵ Mn	⁹⁵ Mo		⁴⁵ Sc ⁸⁹ Y

3.4.3 *Blanky*

K získání blanků byly použity 3 ml 65% kyseliny dusičné a 4 ml 30% peroxidu vodíku. Rozklad byl obdobný postupu při rozkladu reprezentativních vzorků, pouze nebyl k patronám přidán vzorek mouky. Teplotní program byl zvolen stejný jako při rozkladu reprezentativních vzorků, je uveden v *Tab. 3.6*. Poté, co byl proveden rozklad pomocí mikrovlnného zařízení, byly blanky převedeny do 50ml centrifugačních zkumavek a doplněny deionizovanou vodou na celkový objem 50 ml.

Celkem byly provedeny 2 série rozkladů blanků. První série byla rozkládána v patronách po skončení rozkladu reprezentativních vzorků. Druhá série byla rozložena po vyčištění patron. Patrony byly vyčištěny stejným postupem jako před začátkem rozkladu reprezentativních vzorků (Tab. 3.4).

3.5 Statistická analýza

Vzorky byly analyzovány ve třech opakováních. Výsledné koncentrace jsou uvedeny jako průměry koncentrací \pm konfidenční intervaly s hladinou významnosti 0,05.

Aritmetický průměr (\bar{x})

Aritmetický průměr je odhadem střední hodnoty souboru výsledků. Pro aritmetický průměr platí vztah (4.1)

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (4.1)$$

kde x_i jsou individuální výsledky souboru měření a n označuje počet měření [54] [55].

Konfidenční interval (CI)

Konfidenční interval umožňuje definovat rozsah hodnot kolem výsledku měření, v němž se nalézá skutečná střední hodnota s určitou pravděpodobností. Pro výpočet CI platí uvedený vztah (4.2)

$$CI = \bar{x} \pm \frac{z \cdot \sigma}{\sqrt{n}} \quad (4.2)$$

kde σ označuje směrodatnou odchylku, n odpovídá počtu měření, v této práci se jednalo o hodnotu 3. V této práci se $z = 1,96$, tato hodnota odpovídá zvolené 95% konfidenční úrovni [54].

Vícerozměrná analýza

Vícerozměrné analýzy dat, jako je analýza hlavních komponent a hierarchická shluková analýza se používají ke zpracování velkých souborů dat a pomáhají s interpretací výsledků [35].

Analýza hlavních komponent umožňuje snížit počet původních proměnných a zároveň zachovat co nejvíce variability ze souboru dat. Redukcí původních proměnných se získá malý počet latentních proměnných. Latentní proměnné jsou kombinací původních proměnných a nazývají se hlavní komponenty (PC), indexované rostoucími čísly. Největší variabilitu dat udává PC1, následováno PC2, PC3 apod. Variabilitu původních dat lze popsat pomocí menšího počtu nových proměnných (PC), přičemž zanedbáváme PC s menším významem. Latentní proměnné slouží k vyhodnocení vztahů mezi sledovanými proměnnými, k vytvoření grafů pro detekci trendů, seskupování a zjištění odchylek [56].

Analýzu hlavních komponent lze doplnit hierarchickým shlukováním. Při hierarchickém shlukování je každému vzorku nejdříve přiřazena třída a postupně jsou vzorky z různých tříd slučovány do větších tříd, dokud všechny vzorky nejsou ve stejné třídě [56].

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Výběr reprezentativních vzorků

Stanovovány byly prvky, u nichž se předpokládal nedostatek u lidí s celiakií vlivem zhoršeného vstřebávání těchto prvků nebo sníženým příjmem způsobený nedostatkem těchto prvků v bezpečných potravinách. Navíc byly stanovovány i další prvky nezbytné pro fungování lidského organismu.

4.2 Optimalizace rozkladu

Byla provedena optimalizace rozkladu reprezentativních vzorků. Pro optimalizaci rozkladu byly použity vybrané reprezentativní vzorky. Bylo potřeba zvolit optimální poměr koncentrované kyseliny dusičné a peroxidu vodíku pro rozklad praktických vzorků. V této práci byly zkoumány čtyři různé poměry obou činidel (kyseliny dusičné a peroxidu vodíku). Jednotlivé testované poměry jsou uvedeny v *Tab. 3.5*. Poměr A (5 ml 65% kyseliny dusičné a 2 ml 30% peroxidu vodíku) vycházel z doporučení v aplikačním listu výrobce mikrovlnného zařízení pro rozklad mouky.

Při všech použitých poměrech došlo k úplnému rozložení vzorků. Snahou bylo, aby zastoupení kyseliny dusičné bylo co nejmenší a nedocházelo k zatěžování přístroje touto kyselinou při měření vzorků. Proto bylo postupně snižováno zastoupení kyseliny dusičné oproti peroxidu vodíku. Objem roztoku přidávaný ke vzorku musel být minimálně 7 ml, tento objem byl zachován pro všechny poměry. Minimální objem 7 ml byl dán výrobcem pro patроны DAP-60 kvůli snímání senzory.

U reprezentativních vzorků bylo stanovováno 10 prvků (hořčík, fosfor, vápník, železo, mangan, měď, molybden, zinek, chrom a selen). Pro každý prvek bylo zjišťováno, zda se lišily výsledné koncentrace prvků při různých poměrech kyseliny dusičné a peroxidu vodíku, zda naměřené koncentrace neležely nad nebo pod krajními hodnotami kalibrační přímky, zda se lišily naměřené koncentrace v různých módech měření.

Poměr kyseliny dusičné a peroxidu vodíku

V rozkladných poměrech A, B, C se výsledné koncentrace nelišily nebo pouze nepatrně. V sérii D byly výsledky odlišné oproti koncentracím získaných u poměrů A, B, C, a proto byl jako optimální poměr pro rozklad praktických vzorků zvolen rozklad C

(3 ml 65% kyseliny dusičné a 4 ml 30% peroxidu vodíku) obsahující minimální objem kyseliny.

Navážka vzorku a kalibrace

Dále bylo potřeba určit optimální navážku vzorků a zvolit optimální rozsah kalibrace pro měření reprezentativních vzorků. U optimalizace rozkladu reprezentativních vzorků byla použita kalibrace s krajními hodnotami $0,0016 \text{ mg dm}^{-3}$ až $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$. U žádného z prvků nebyla naměřená koncentrace nižší než nejnižší koncentrace kalibrační přímky $0,0016 \text{ mg dm}^{-3}$. U molybdenu, manganu, zinku, mědi, železa neležely stanovené koncentrace nad krajními hodnotami kalibrační přímky $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$. U hořčíku nejvyšší koncentrace přesáhla krajní hodnotu $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$ třicetkrát, u fosforu šedesátkrát, u vápníku devětkrát. Selen ani chrom v daném kalibračním rozsahu nebyly detegovány, proto bylo rozhodnuto, že jejich vliv na denní příjem je minimální a u praktických vzorků již nebyly měřeny.

Pro praktické vzorky tak byla upravena potřebná navážka i rozsah kalibrace. Pro navážku vzorků byla zvolena hodnota cca 0,26 g. První kalibrace byla zvolena pro makroprvky (Ca, Mg, P, K, Na) s koncentracemi kalibračních roztoků 0; 0,080; 0,40; 2,0; 10; 50 mg dm^{-3} . Druhá kalibrace byla zvolena pro mikroprvky (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo) s koncentracemi kalibračních roztoků 0; 0,0016; 0,0080; 0,040; 0,20; $1,0 \text{ mg dm}^{-3}$.

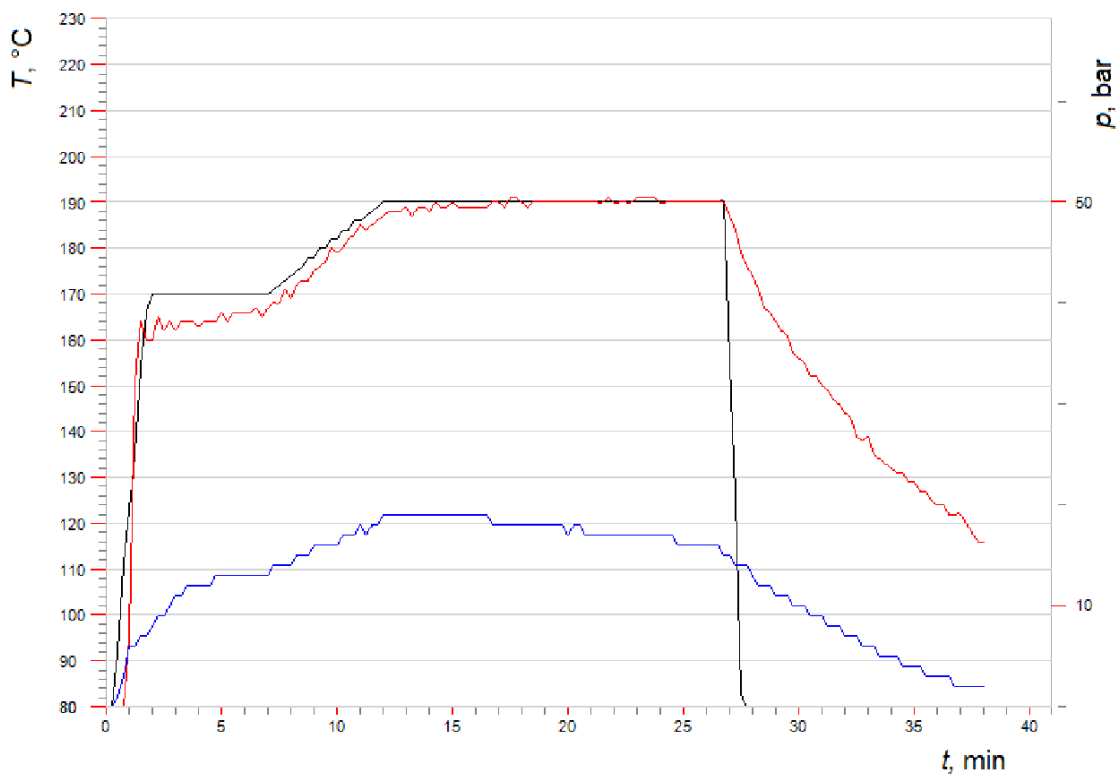
Módy měření

Prvky v reprezentativních vzorcích byly stanovovány pomocí ICP-MS ve dvou módech. Naměřené koncentrace v no-gas módu a heliovém módu se u většiny prvků téměř nelišily. Avšak u některých prvků bylo pozorováno, že dochází k odchýlkám (maximálně do 5%), a vzhledem k riziku možných interferencí u některých prvků bylo rozhodnuto, že praktické vzorky budou měřeny v obou módech a výsledky budou následně porovnány.

4.3 Průběh rozkladu

Následující graf průběhu rozkladu zobrazuje reálnou teplotu uvnitř patron a tlak uvnitř první patrony. Na *Obr. 4.1* můžeme vidět průběh rozkladu konkrétního vzorku. Křivka černé barvy zobrazuje hodnoty teploty nastavené podle teplotního programu uvedeného

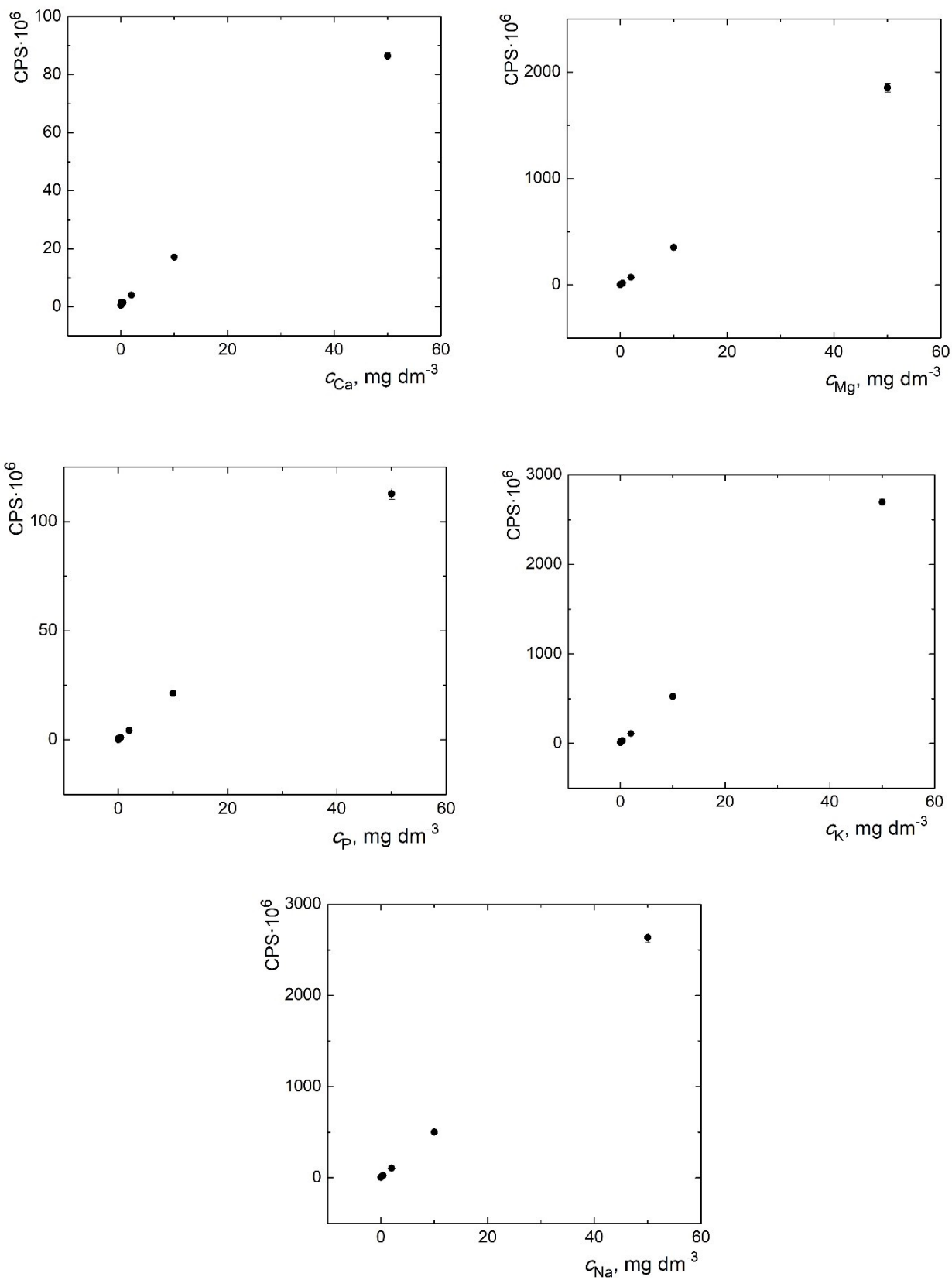
v Tab. 3.6. Červená křivka zobrazuje skutečnou teplotu roztoku vzorku uvnitř patrony. Modrá křivka zobrazuje tlak v první patroně. Z přiloženého grafu a parametrů teplotního programu lze vyčíst, že reálná teplota dosahovala maximálních hodnot, tlak v průběhu rozkladu nepřesáhl 20 bar.



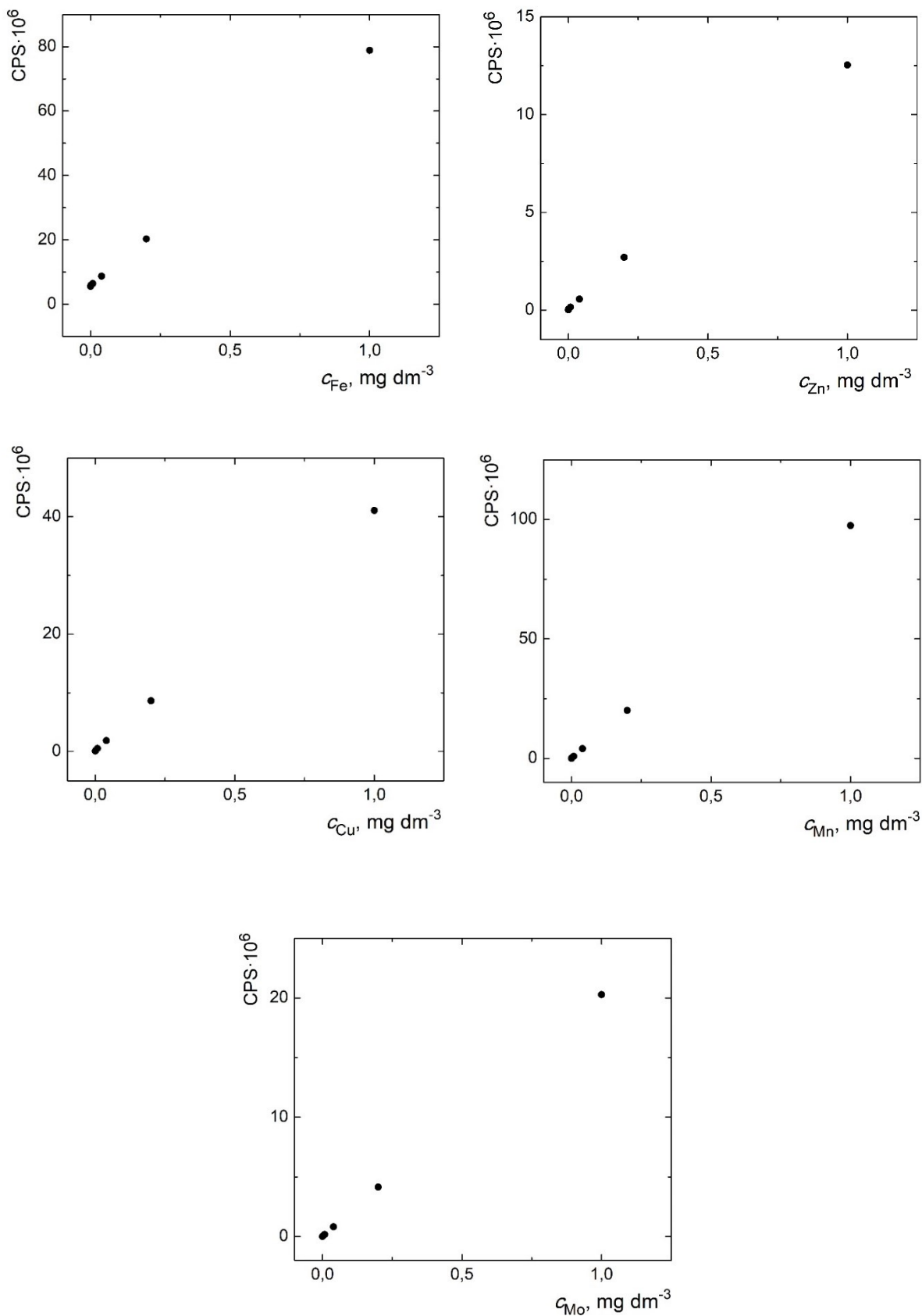
Obr. 4.1: Průběh rozkladu: černá křivka – nastavená teplota, červená křivka – skutečná teplota, modrá křivka – skutečný tlak

4.4 Kalibrační přímky

Kalibrační závislosti jednotlivých stanovovaných prvků zobrazuje pro makroprvky Obr. 4.2 a pro mikroprvky Obr. 4.3. Z důvodu kontroly kontaminace obsahovala každá série blank.



Obr.4.2 Kalibrační závislost vápníku, hořčíku, fosforu, draslíku a sodíku



Obr.4.3: Kalibrační závislost železa, zinku, mědi, manganu a molybdenu

4.5 Příprava blanků

Byly provedeny 2 série rozkladů blanků. První série blanků byla rozkládána v patronách po dokončení rozkladu reprezentativních vzorků. Druhá série blanků byla rozkládána po vyčištění patron. Cílem bylo porovnat série a ověřit, že čištění patron má vliv na odstranění možných kontaminací z předchozího měření. U žádného roztoku blanku nebyla naměřena koncentrace vyšší, než byla úroveň šumu. Bylo tak zjištěno, že případná kontaminace patron způsobená předchozím rozkladem nemohla po vyčištění patron mít vliv na následující rozklad, resp. na kontaminaci vzorku následně rozkládaného vzorku.

U blanků první série byly u některých prvků (sodík, draslík, fosfor) naměřeny koncentrace, které byly vyšší než mez detekce. Ze vzájemného srovnání, lze tedy konstatovat, že čištění patron má vliv na odstranění kontaminací.

4.6 Základní charakteristiky stanovení prvků

Základní charakteristiky pro stanovované prvky uvádí *Tab. 4.1*. V tabulce nalezneme zjištěný detekční limit a koncentrace na úrovni šumu jednotlivých stanovovaných prvků. Charakteristiky byly odečteny pomocí softwaru k přístroji ICP-MS.

Tab. 4.1: Detekční limity jednotlivých analytů a jejich koncentrace na úrovni šumu

Prvek	$a \cdot 10^6$	$b \cdot 10^6$ [mg dm ⁻³]	R	DL [μg dm ⁻³]	BEC [μg dm ⁻³]
³¹ Na	52,5	4,17	1,000	0,83	79,3
³⁹ K	53,7	9,48	1,000	1,9	177
²⁴ Mg	37,0	1,00	1,000	0,74	27,0
⁴⁴ Ca	1,72	0,517	1,000	7,2	301
³¹ P	2,25	0,165	1,000	2,8	73,6
⁵⁶ Fe	73,9	5,54	1,000	3,3	74,9
⁶⁶ Zn	13,4	0,0238	1,000	0,085	1,78
⁶³ Cu	43,1	0,0581	1,000	0,045	1,35
⁵⁵ Mn	100	0,0277	1,000	0,020	0,275
⁹⁵ Mo	20,3	0,00206	1,000	0,0089	0,101

Čím vyšší je hodnota a , tím bylo stanovení citlivější. Nízká citlivost vápníku souvisí s nízkým zastoupení měřeného izotopu vápníku. Z *Tab. 4.1.* je dále patrné, že nejnižší ideální meze detekce (DL) byly získány pro molybden a mangan. Reálně je však nutné brát v potaz hodnoty koncentrací odpovídající pozadí (BEC). Ty jsou i tak nejnižší pro oba zmíněné prvky. Na druhou stranu, nejvyšších limitů (BEC) bylo dosaženo pro draslík a vápník, což je odůvodnitelné jejich přítomností např. v matrici kalibračních roztoků nebo pomocných činidel.

4.7 Výsledné koncentrace prvků ve vzorcích mouk

Výsledné koncentrace vápníku, hořčíku, fosforu a draslíku v praktických vzorcích mouk udává *Tab. 4.2.* Výsledné koncentrace sodíku, železa, zinku a mědi ve vzorcích udává *Tab. 4.3.* Výsledné koncentrace manganu a molybdenu ve vzorcích udává *Tab. 4.4.* Uvedené koncentrace jsou naměřené v no-gas módu. Nejdříve jsou uváděny makroprvky a poté mikroprvky, prvky jsou v těchto dvou skupinách seřazeny postupně podle významnosti pro lidi s celiakií. U výsledků označených v tabulkách hvězdičkou nemohla být výsledná koncentrace vyhodnocena, protože koncentrace naměřená v kapalných praktických vzorcích se nacházela pod detekčním limitem. Je vhodné dodat, že výsledné hodnoty zastoupení jednotlivých prvků (v mg g^{-1}) v pevných vzorcích mouk vyjádřených v níže uvedených tabulkách vycházejí z naměřených koncentrací jednotlivých prvků (mg dm^{-3}) pomocí hmotnostního spektrometru a jsou korigovány na koncentrace zjištěné v roztocích blanku, přepočteny přes ředící faktory a vztaženy na konkrétní navážky vzorků. Jako výchozí koncentrace byly použity ty, které byly měřeny v no-gas módu, protože se u všech vzorků mouk významně nelišily od hodnot naměřených v He módu.

Tab. 4.2: Výsledné koncentrace vápníku, hořčíku, fosforu a draslíku

Vzorek	$c(\text{Ca}) \text{ mg g}^{-1}$	$c(\text{Mg}) \text{ mg g}^{-1}$	$c(\text{P}) \text{ mg g}^{-1}$	$c(\text{K}) \text{ mg g}^{-1}$
1	$0,0945 \pm 0,0002$	$0,124 \pm 0,001$	$0,579 \pm 0,005$	$0,830 \pm 0,018$
2	$0,0808 \pm 0,0005$	$0,0763 \pm 0,0005$	$0,306 \pm 0,001$	$0,495 \pm 0,003$
3	$0,983 \pm 0,013$	$0,202 \pm 0,002$	$1,32 \pm 0,01$	$0,967 \pm 0,008$
4	$0,136 \pm 0,001$	$0,126 \pm 0,002$	$0,488 \pm 0,005$	$0,951 \pm 0,012$
5	$3,00 \pm 0,04$	$0,249 \pm 0,003$	$4,81 \pm 0,04$	$0,884 \pm 0,011$
6	$0,226 \pm 0,026$	$0,581 \pm 0,055$	$1,33 \pm 0,13$	$1,60 \pm 0,13$
7	$0,179 \pm 0,001$	$0,511 \pm 0,005$	$1,11 \pm 0,01$	$1,42 \pm 0,03$
8	$0,585 \pm 0,005$	$0,506 \pm 0,008$	$1,46 \pm 0,02$	$1,96 \pm 0,03$
9	$0,168 \pm 0,002$	$0,075 \pm 0,001$	$0,410 \pm 0,004$	$0,329 \pm 0,004$
10	*	$0,216 \pm 0,001$	$0,905 \pm 0,005$	$0,910 \pm 0,010$
11	$0,134 \pm 0,357$	$0,461 \pm 0,159$	$1,43 \pm 0,49$	$1,16 \pm 0,40$
12	$0,653 \pm 0,259$	$1,04 \pm 0,06$	$3,83 \pm 0,22$	$9,68 \pm 0,46$
13	$0,724 \pm 0,056$	$1,24 \pm 0,01$	$4,24 \pm 0,03$	$10,4 \pm 0,1$
14	$0,124 \pm 0,130$	$1,16 \pm 0,02$	$2,19 \pm 0,29$	$2,75 \pm 0,35$
15	$0,168 \pm 0,019$	$1,77 \pm 0,01$	$3,13 \pm 0,02$	$4,01 \pm 0,04$
16	$3,22 \pm 0,17$	$4,66 \pm 0,11$	$8,36 \pm 0,14$	$11,5 \pm 0,2$
17	$2,98 \pm 0,28$	$4,58 \pm 0,08$	$7,63 \pm 0,18$	$10,3 \pm 0,3$
18	*	$0,369 \pm 0,074$	$1,01 \pm 0,22$	$1,77 \pm 0,35$
19	$0,0254 \pm 0,0006$	$0,426 \pm 0,002$	$1,20 \pm 0,01$	$1,98 \pm 0,01$
20	$1,02 \pm 0,73$	$1,13 \pm 0,15$	$3,36 \pm 0,41$	$9,32 \pm 1,09$
21	$0,951 \pm 0,090$	$1,34 \pm 0,01$	$3,88 \pm 0,04$	$10,8 \pm 0,3$
22	*	$0,880 \pm 0,005$	$2,03 \pm 0,01$	$1,43 \pm 0,01$
23	$0,107 \pm 0,006$	$1,02 \pm 0,02$	$2,35 \pm 0,01$	$1,79 \pm 0,03$
24	$0,0771 \pm 0,0455$	$0,985 \pm 0,062$	$2,25 \pm 0,15$	$3,28 \pm 0,12$
25	$0,0650 \pm 0,0130$	$1,21 \pm 0,04$	$2,68 \pm 0,09$	$3,62 \pm 0,06$
26	$1,76 \pm 2,10$	$4,53 \pm 0,97$	$9,20 \pm 1,94$	$9,50 \pm 2,02$
27	$1,63 \pm 2,58$	$4,71 \pm 1,41$	$9,78 \pm 2,87$	$8,89 \pm 2,57$
28	$0,378 \pm 0,053$	$2,48 \pm 0,05$	$4,48 \pm 0,10$	$19,1 \pm 0,1$
29	$0,383 \pm 0,084$	$2,18 \pm 0,07$	$4,87 \pm 0,18$	$18,6 \pm 0,8$
30	$2,56 \pm 0,21$	$2,58 \pm 0,03$	$4,45 \pm 0,05$	$6,19 \pm 0,13$
31	$1,97 \pm 0,28$	$2,48 \pm 0,06$	$4,69 \pm 0,09$	$6,89 \pm 0,17$
32	$0,578 \pm 0,034$	$1,61 \pm 0,01$	$2,51 \pm 0,01$	$3,92 \pm 0,02$
33	*	$0,440 \pm 0,149$	$1,47 \pm 0,48$	$1,20 \pm 0,38$
34	$0,218 \pm 0,009$	$0,204 \pm 0,002$	$0,925 \pm 0,009$	$1,32 \pm 0,01$
35	$0,188 \pm 0,015$	$0,268 \pm 0,004$	$1,03 \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,02$
36	$0,211 \pm 0,010$	$0,362 \pm 0,001$	$1,22 \pm 0,01$	$2,31 \pm 0,02$
37	$0,245 \pm 0,311$	$0,712 \pm 0,131$	$2,05 \pm 0,37$	$4,17 \pm 0,70$
38	$0,163 \pm 0,012$	$0,238 \pm 0,003$	$1,08 \pm 0,01$	$1,42 \pm 0,01$
39	$0,191 \pm 0,044$	$0,198 \pm 0,008$	$0,817 \pm 0,032$	$1,33 \pm 0,07$
40	$0,270 \pm 0,008$	$0,926 \pm 0,005$	$2,47 \pm 0,01$	$3,49 \pm 0,04$

Tab. 4.3: Výsledné koncentrace sodíku, železa, zinku a mědi

Vzorek	$c(\text{Na}) \text{ mg g}^{-1}$	$c(\text{Fe}) \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$	$c(\text{Zn}) \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$	$c(\text{Cu}) \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$
1	$0,162 \pm 0,003$	*	$1,51 \pm 0,14$	$2,84 \pm 0,27$
2	$6,62 \pm 0,09$	*	$1,52 \pm 0,02$	$0,380 \pm 0,007$
3	$0,0273 \pm 0,0009$	$8,80 \pm 0,21$	$5,80 \pm 0,07$	$0,936 \pm 0,004$
4	$3,51 \pm 0,02$	*	$3,76 \pm 0,01$	$0,940 \pm 0,005$
5	$3,55 \pm 0,02$	*	$7,76 \pm 0,09$	$1,51 \pm 0,02$
6	$4,93 \pm 0,35$	$14,0 \pm 0,1$	$12,1 \pm 0,2$	$2,68 \pm 0,05$
7	$4,65 \pm 0,07$	$8,86 \pm 0,13$	$5,84 \pm 0,05$	$1,13 \pm 0,02$
8	$0,356 \pm 0,002$	$27,2 \pm 0,6$	$9,70 \pm 0,14$	$2,61 \pm 0,04$
9	$11,6 \pm 0,1$	*	$1,12 \pm 0,08$	$0,374 \pm 0,032$
10	$0,0176 \pm 0,0002$	*	$12,2 \pm 0,1$	$2,06 \pm 0,01$
11	*	*	$15,2 \pm 0,2$	$2,62 \pm 0,03$
12	*	$33,9 \pm 4,0$	$26,4 \pm 2,3$	$6,79 \pm 0,61$
13	*	$72,7 \pm 1,1$	$35,3 \pm 0,2$	$6,80 \pm 0,08$
14	*	$15,2 \pm 0,3$	$16,7 \pm 0,2$	$4,50 \pm 0,04$
15	*	$26,2 \pm 0,5$	$24,3 \pm 0,1$	$5,46 \pm 0,02$
16	$0,471 \pm 0,034$	161 ± 2	$74,8 \pm 0,3$	$18,9 \pm 0,2$
17	$0,614 \pm 0,091$	$98,3 \pm 1,3$	$77,4 \pm 0,4$	$19,7 \pm 0,1$
18	*	$14,0 \pm 0,1$	$6,62 \pm 0,04$	$0,757 \pm 0,007$
19	*	$10,9 \pm 0,1$	$7,54 \pm 0,11$	$1,32 \pm 0,02$
20	$0,0177 \pm 0,0191$	$82,6 \pm 0,3$	$31,1 \pm 0,2$	$9,22 \pm 0,02$
21	*	$58,7 \pm 1,4$	$39,6 \pm 0,9$	$9,28 \pm 0,08$
22	*	$26,3 \pm 0,3$	$24,6 \pm 0,6$	$3,76 \pm 0,06$
23	*	$24,5 \pm 0,2$	$22,7 \pm 0,1$	$4,46 \pm 0,04$
24	*	$22,6 \pm 3,1$	$14,2 \pm 1,4$	$2,09 \pm 0,21$
25	*	$35,9 \pm 0,6$	$17,5 \pm 0,2$	$2,79 \pm 0,04$
26	*	147 ± 3	$86,2 \pm 0,3$	$20,9 \pm 0,1$
27	*	168 ± 3	$92,6 \pm 1,6$	$17,0 \pm 0,1$
28	$0,225 \pm 0,024$	$72,3 \pm 1,0$	$32,9 \pm 0,3$	$21,0 \pm 0,1$
29	$0,323 \pm 0,061$	$78,7 \pm 1,5$	$37,8 \pm 0,6$	$19,5 \pm 0,4$
30	$0,0327 \pm 0,0037$	$30,1 \pm 2,9$	$25,7 \pm 1,6$	$9,52 \pm 0,56$
31	$0,0274 \pm 0,0005$	$34,8 \pm 1,0$	$30,6 \pm 0,6$	$8,70 \pm 0,26$
32	*	$73,4 \pm 1,1$	$25,1 \pm 0,2$	$6,84 \pm 0,06$
33	*	*	$14,6 \pm 0,1$	$2,50 \pm 0,01$
34	*	$8,85 \pm 0,29$	$6,73 \pm 0,12$	$1,54 \pm 0,04$
35	*	$13,0 \pm 0,2$	$7,82 \pm 0,05$	$1,49 \pm 0,02$
36	*	$13,4 \pm 0,5$	$12,1 \pm 0,2$	$1,87 \pm 0,04$
37	*	$24,6 \pm 0,2$	$20,6 \pm 0,1$	$3,00 \pm 0,02$
38	*	$11,8 \pm 0,1$	$7,31 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,01$
39	*	$6,67 \pm 0,09$	$6,48 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,02$
40	*	$33,8 \pm 0,4$	$28,6 \pm 0,8$	$3,55 \pm 0,05$

Tab. 4.4: Výsledné koncentrace manganu a molybdenu

Vzorek	$c(\text{Mn}) \mu\text{g g}^{-1}$	$c(\text{Mo}) \mu\text{g g}^{-1}$
1	$1,14 \pm 0,10$	$0,568 \pm 0,065$
2	$1,90 \pm 0,04$	$0,190 \pm 0,003$
3	$3,93 \pm 0,03$	$0,374 \pm 0,006$
4	$3,38 \pm 0,04$	$0,376 \pm 0,011$
5	$6,24 \pm 0,06$	$0,378 \pm 0,010$
6	$6,71 \pm 0,09$	$0,192 \pm 0,005$
7	$9,99 \pm 0,09$	$0,188 \pm 0,004$
8	$12,3 \pm 0,1$	$0,559 \pm 0,006$
9	$1,12 \pm 0,08$	*
10	$10,1 \pm 0,1$	$0,375 \pm 0,002$
11	$10,7 \pm 1,0$	$0,562 \pm 0,012$
12	$12,1 \pm 5,3$	$1,51 \pm 0,12$
13	$12,6 \pm 1,5$	$3,96 \pm 0,02$
14	$9,18 \pm 0,67$	$0,562 \pm 0,015$
15	$14,1 \pm 0,9$	$0,565 \pm 0,004$
16	$32,6 \pm 2,5$	$0,573 \pm 0,007$
17	$33,7 \pm 1,6$	$0,767 \pm 0,020$
18	$1,89 \pm 0,09$	$0,189 \pm 0,002$
19	$2,45 \pm 0,10$	$0,188 \pm 0,002$
20	$24,1 \pm 1,0$	$2,63 \pm 0,03$
21	$46,0 \pm 3,6$	$0,189 \pm 0,004$
22	$5,64 \pm 0,34$	$0,188 \pm 0,005$
23	$8,00 \pm 0,54$	$0,186 \pm 0,001$
24	$12,7 \pm 6,3$	$0,570 \pm 0,039$
25	$15,4 \pm 0,8$	$0,744 \pm 0,006$
26	114 ± 9	$0,580 \pm 0,011$
27	155 ± 20	$0,747 \pm 0,009$
28	$40,8 \pm 2,2$	$0,577 \pm 0,003$
29	$56,6 \pm 7,0$	$0,382 \pm 0,006$
30	$17,5 \pm 6,6$	$0,381 \pm 0,034$
31	$24,8 \pm 2,7$	$0,567 \pm 0,010$
32	$22,8 \pm 1,1$	$0,380 \pm 0,011$
33	$13,1 \pm 0,5$	$0,384 \pm 0,005$
34	$4,43 \pm 0,31$	$0,192 \pm 0,001$
35	$7,26 \pm 0,66$	$0,186 \pm 0,004$
36	$15,9 \pm 0,6$	$0,187 \pm 0,001$
37	$22,1 \pm 1,2$	$0,188 \pm 0,004$
38	$8,80 \pm 0,53$	$0,187 \pm 0,009$
39	$6,10 \pm 0,18$	$0,191 \pm 0,003$
40	$33,6 \pm 1,6$	$0,373 \pm 0,008$

4.8 Procentuální příspěvek k dennímu příjmu prvků z pšeničné mouky

Z výsledných koncentrací naměřených ve vzorcích hladké pšeničné mouky (*Tab. 4.2, Tab. 4.3 a Tab. 4.4*) byla pro každý prvek spočítána průměrná koncentrace, která byla použita k vyhodnocení procentuálního příspěvku pšeničné mouky k doporučenému dennímu příjmu prvků. Procentuální příspěvek pšeničné mouky k dennímu příjmu makroprvků udává *Tab. 4.5* a mikroprvků *Tab. 4.6*.

Průměrná koncentrace použitá pro určení procentuálního příspěvku byla pro kontrolu porovnána s výsledky z jiných studií, s nimiž byla ve shodě. Spotřeba pšeničné mouky 260 g na den potřebná k vyhodnocení byla převzata z literatury [2]. Získaný odhadovaný denní příjem byl porovnán s hodnotami v *Tab. 2.1* a *Tab. 2.2*.

Tab. 4.5: Příspěvek pšeničné mouky k dennímu příjmu vápníku, hořčíku, fosforu a draslíku

Prvek *	Ca	Mg	P	K
Průměrná koncentrace [mg g^{-1}]	0,20	0,24	1,0	1,4
Odhadovaný denní příjem [mg]	53	61	260	360
Procentuální příspěvek k doporučenému dennímu příjmu pro muže [%]	5	15	16	11
Procentuální příspěvek k doporučenému dennímu příjmu pro ženy [%]	5	19	21	11

* Koncentraci sodíku nebylo možné v pšeničné mouce vyhodnotit

Tab. 4.6: Příspěvek pšeničné mouky k dennímu příjmu železa, zinku, mědi, manganu, molybdenu

Prvek	Fe	Zn	Cu	Mn	Mo
Průměrná koncentrace [$\mu\text{g g}^{-1}$]	11	7,3	1,5	5,8	0,2
Odhadovaný denní příjem [mg]	2,8	1,9	0,39	1,5	0,05
Procentuální příspěvek k doporučenému dennímu příjmu pro muže [%]	28	16	26	76	200
Procentuální příspěvek k doporučenému dennímu příjmu pro ženy [%]	19	16	26	76	200

Bylo zjištěno, že hladká pšeničná mouka přispívá k celkovému doporučenému dennímu příjmu prvků 5 % vápníku, 15 % hořčíku pro muže a 19 % hořčíku pro ženy, 16 % fosforu pro muže a 21 % fosforu pro ženy, 11 % draslíku, 28 % železa pro muže a

19 % železa pro ženy, 16 % zinku, 26% mědi, 76 % manganu. Množství molybdenu přesáhlo doporučenou denní dávku.

Zjištěné procentuální příspěvky k dennímu příjmu prvků slouží jako základní přehled, který může pomoci celiakům s úpravou jídelníčku poté, co musí ze své stravy vyřadit pšeničnou mouku a nahradit ji bezpečnými alternativami.

4.9 Porovnání prvkového složení mouk

Následující grafy uvádí porovnání prvkového složení mouk a bezpečkových směsí. Prvky jsou rozděleny na makroprvky a mikroprvky. Ke každému prvku je přiložen graf zobrazující průměrné koncentrace jednotlivých druhů mouk a stanovené koncentrace v bezpečkových směsích. Hodnoty v grafech jsou vyjma bezpečkových směsí a celozrnných mouk průměrem stanovených koncentrací daných druhů mouky uvedených v *Tab. 4.2, Tab. 4.3, Tab. 4.4*. Chybové úsečky udávají rozsah koncentrací. Zkratky použité v grafech udávají jednotlivé druhy mouky: R – rýžová, K – kukuřičná, PH – pohanková, PHC – pohanková celozrnná, J – jáhlová, Č – čiroková, C – cizrnová, H – hrachová, KP – konopná, L – lněná, KS – kokosová, M – mandlová, PŠ – pšeničná, Ž – žitná, Š – špaldová, ŠC – špaldová celozrnná, S1 až S9 – bezpečkové směsi. Grafy jsou rozlišeny i barevně. Modře jsou označeny obilné mouky bez lepku, zeleně mouky z luštěnin, červeně mouky z ořechů nebo semen, žlutě obilné mouky obsahující lepek a černě bezpečkové směsi.

MAKROPRVKY

Vápník

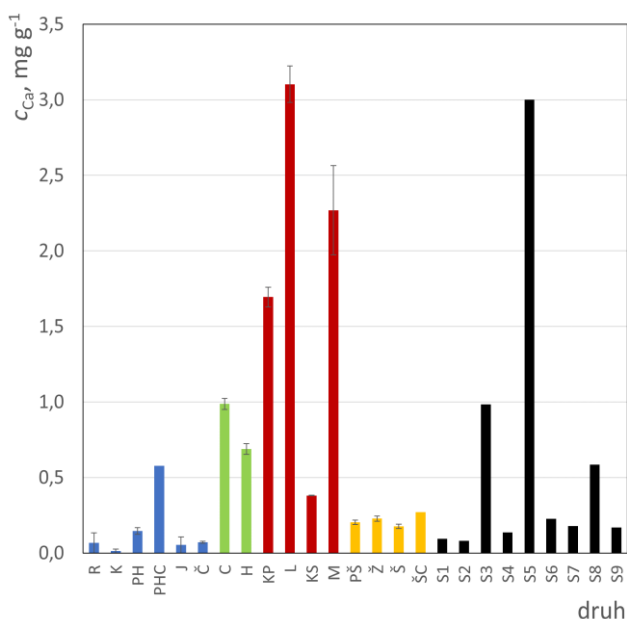
Velmi vysoké koncentrace vápníku oproti ostatním vzorkům byly stanoveny u konopné, mandlové a lněné mouky (1,6 – 3,2 mg g⁻¹) a u bezpečkové směsi DOVES FARM samokypřící směs (3,0 mg g⁻¹). Vysoké koncentrace obsahovaly i hrachová, cizrnová a celozrnná pohanková mouka (0,58 – 1,0 mg g⁻¹) a bezpečkové směsi Labeta a DOVES FARM chlebová směs.

Velmi nízké koncentrace byly naopak stanoveny v rýžové, kukuřičné, jáhlové, čirokové mouce a některých bezpečkových směsích. Výsledné koncentrace vápníku zobrazuje graf na *Obr. 4.4*.

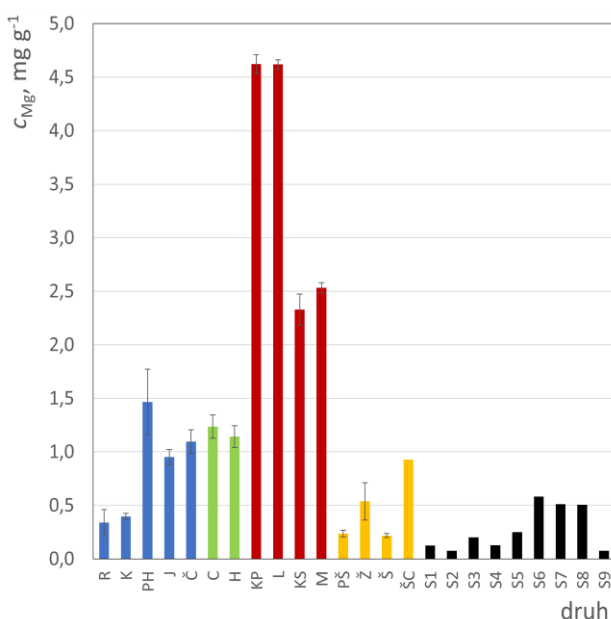
Hořčík

Kromě rýžové a kukuřičné mouky ($0,22 - 0,46 \text{ mg g}^{-1}$), jejichž výsledné koncentrace hořčíku byly srovnatelné nebo mírně vyšší oproti koncentracím stanovenými v pšeničné mouce, byly ve všech přirozeně bezlepkových moukách stanoveny vysoké koncentrace hořčíku. Velmi vysoké koncentrace hořčíku byly stanoveny v konopné a lněné mouce ($4,5 - 4,7 \text{ mg g}^{-1}$).

Vyšší koncentrace hořčíku byla stanovena v celozrnné špaldové mouce ($0,93 \text{ mg g}^{-1}$).
Výsledné koncentrace zobrazuje *Obr.4.5*.



Obr. 4.4: Výsledné koncentrace vápníku



Obr.4.5: Výsledné koncentrace hořčíku

Fosfor

Velmi vysoké koncentrace fosforu byly stanoveny v konopné a lněné mouce ($7,6 - 9,8 \text{ mg g}^{-1}$). Vysoké koncentrace byly stanoveny v luštěninových moukách, ořechových moukách a v bezlepkové směsi DOVES FARM samokypřící směs ($3,4 - 4,8 \text{ mg g}^{-1}$). Podle složení na obalu DOVES FARM samokypřící směs obsahuje hydrogenfosforečnan vápenatý, což odpovídá vysokému obsahu fosforu.

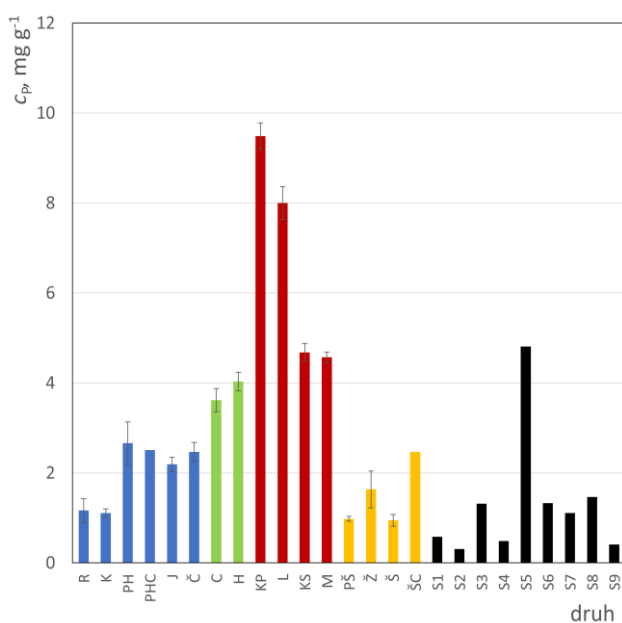
Vyšší koncentrace fosforu přesahující 2 mg g^{-1} byly stanoveny také v pohankové, celozrnné pohankové, jáhlové, čirokové a celozrnné špaldové mouce. Čtyři vzorky bezlepkových směsí měly vyšší koncentrace fosforu ($1,1 - 1,5 \text{ mg g}^{-1}$) než pšeničná mouka, ve čtyřech vzorcích bezlepkových směsí byla stanovena nižší koncentrace fosforu

(0,6 – 0,3 mg g⁻¹) než v pšeničné mouce. Výsledné koncentrace jsou znázorněné pomocí grafu na Obr. 4.6.

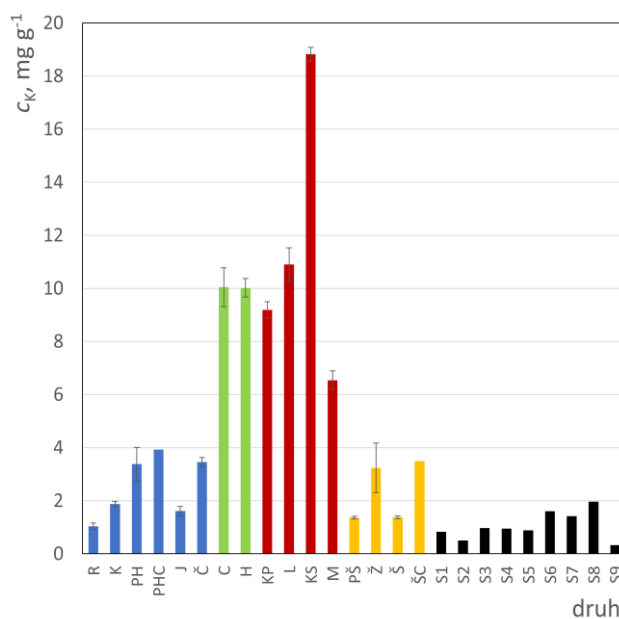
Draslík

Výsledné koncentrace draslíku jsou graficky porovnány v Obr. 4.7. Velmi vysoké koncentrace draslíku přesahující hodnotu 6 mg g⁻¹ byly stanoveny v luštěninových moukách, semínkových a ořechových moukách (6,2 – 19 mg g⁻¹). Nejvyšší koncentrace byly stanoveny v kokosové mouce, její hodnoty draslíku byly oproti ostatním těmto moukám v některých případech až dvojnásobné.

Koncentrace nad 2 mg g⁻¹ byly stanoveny v pohankové, celozrnné pohankové, širokové, žitné a celozrnné špaldové mouce (2,8 – 4,2 mg g⁻¹). Koncentrace zbylých druhů mouk byly pod 2 mg g⁻¹. Z nichž vyšší koncentrace než u hladké pšeničné mouky, byly stanoveny u kukuřičné, jáhlové mouky a u tří vzorků bezlepkových směsí.



Obr. 4.6: Výsledné koncentrace fosforu

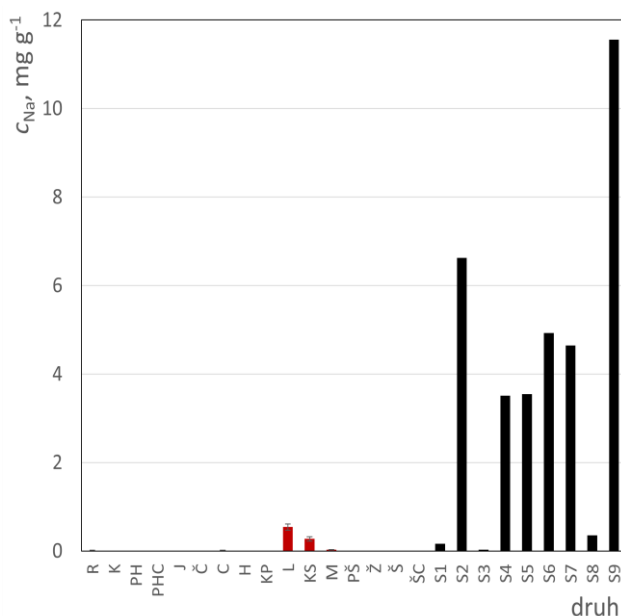


Obr. 4.7: Výsledné koncentrace draslíku

Sodík

Ve většině vzorcích mouk nebylo kvůli nízké koncentraci možné sodík stanovit. Velmi nízké koncentrace do 0,62 mg g⁻¹ byly stanoveny v rýžové, cizrnové, lněné, mandlové a kokosové mouce.

Ve všech bezpečkových směsích byl sodík stanoven. Krom tří vzorků bezpečkových směsí byly ve směsích stanoveny vysoké koncentrace sodíku. Důvodem bude složení, kdy u některých směsí je ve složení přímo uvedena kuchyňská sůl. Výsledné koncentrace jsou graficky znázorněny v *Obr. 4.8*.



Obr. 4.8: Výsledné koncentrace sodíku

MIKROPRVKY

Železo

Velmi vysoké koncentrace železa oproti ostatním vzorkům byly naměřeny u konopné a lněné mouky (98 – 168 $\mu\text{g g}^{-1}$), lze je považovat za vhodné k částečnému nahrazení jiných druhů mouk a obohacení výsledného pokrmu o železo. Vysoké koncentrace železa byly stanoveny i u cizrnové, kokosové mouky a celozrnné pohankové mouky (59 – 79 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Výrazně vyšší koncentrace železa oproti pšeničné mouce a bezpečkovým směsím vykazovala bezpečková směs DOVES FARM chlebová směs (27 $\mu\text{g g}^{-1}$), lze předpokládat, že byla obohacena. Tento předpoklad potvrzuje složení na obalu mouky, které uvádí, že mouka obsahuje i cizrnovou a pohankovou mouku.

Vzorky rýžové mouky a většina bezpečkových směsí obsahovaly nízké koncentrace železa, které se nacházely pod koncentrací úrovně šumu. Kukuřičná mouka, ostatní

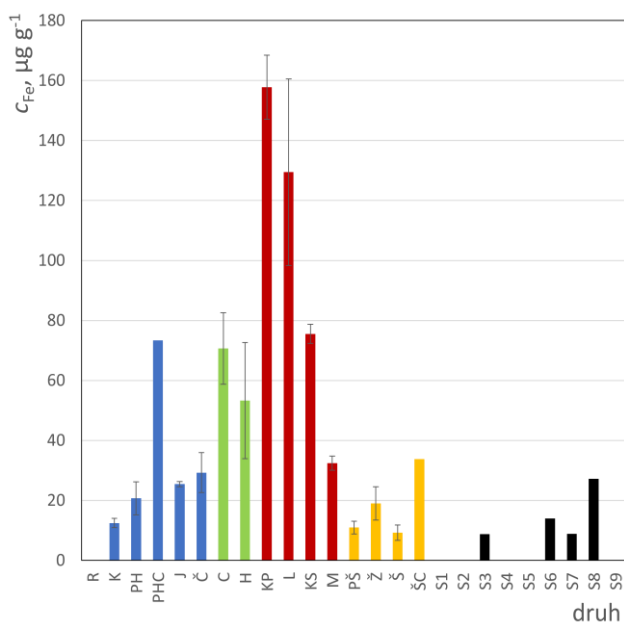
bezlepkové směsi, pšeničná a špaldová mouka obsahovaly nízké koncentrace železa oproti ostatním druhů mouky ($6,7 - 14 \mu\text{g g}^{-1}$).

K porovnání byly zařazeny celozrnné alternativy špaldové a pohankové mouky, z výsledných koncentrací vyplývá, že celozrnné alternativy obsahovaly výrazně vyšší koncentrace železa a blížily se až trojnásobné hodnotě koncentrací stanovených v necelozrnných variantách. Výsledné koncentrace železa převedené do grafu zobrazuje *Obr. 4.9*.

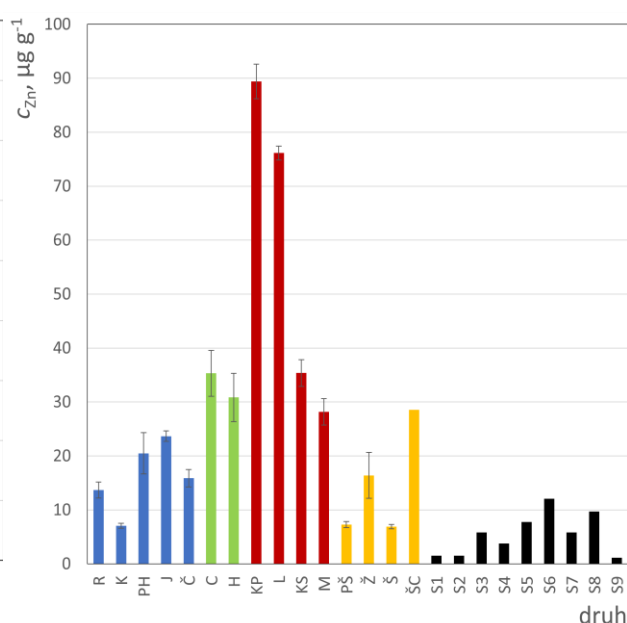
Zinek

Vysoké koncentrace zinku výrazně převyšující koncentrace stanovené u ostatních vzorků mouk byly stanoveny v konopné a lněné mouce ($92 - 75 \mu\text{g g}^{-1}$). Nízké koncentrace zinku (koncentrace byly nižší než $10 \mu\text{g g}^{-1}$) byly zjištěny v kukuřičné, pšeničné a špaldové mouce a ve většině bezlepkových směsí.

V celozrnné špaldové mouce byla stanovena čtyřikrát vyšší koncentrace zinku než v klasické špaldové mouce. Překvapivým zjištěním bylo, že celozrnná pohanková mouka neobsahovala výrazně vyšší koncentrace zinku. Stanovené koncentrace zinku zobrazuje sloupcový graf na *Obr. 4.10*.



Obr. 4.9: Výsledné koncentrace železa



Obr. 4.10: Výsledné koncentrace zinku

Měď

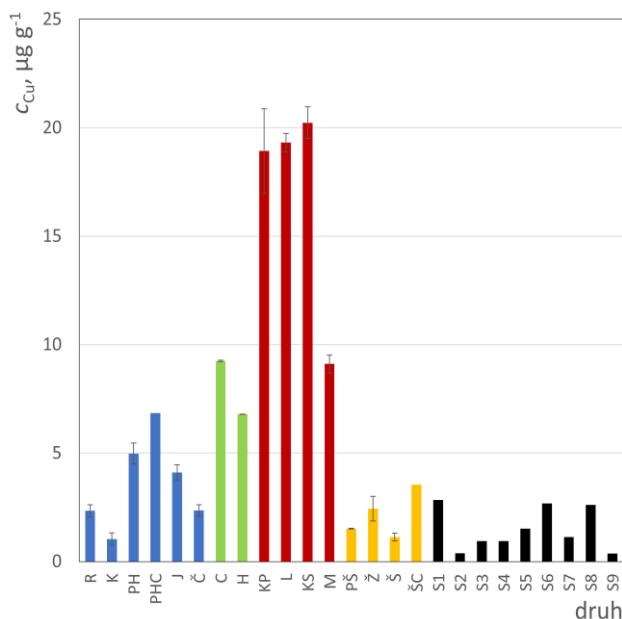
Velmi vysoké koncentrace mědi byly stanoveny v konopné, lněné a kokosové mouce ($17 - 21 \mu\text{g g}^{-1}$). Vysoké koncentrace mědi byly stanoveny v luštěninových moukách, mandlové mouce a celozrnné pohankové mouce ($6,8 - 9,5 \mu\text{g g}^{-1}$). Kromě kukuřičné mouky bylo ve všech přirozeně bezpečkových moukách stanoveno více mědi než v hladké pšeničné mouce ($1,5 \mu\text{g g}^{-1}$).

Ve třech vzorcích bezpečkových směsích (Jizerka, Univerzal K-FREE, DOVES FARM chlebová) byly stanoveny značně vyšší koncentrace mědi než v hladké pšeničné mouce ($2,6 - 2,8 \mu\text{g g}^{-1}$). Ve dvou vzorcích bezpečkových směsí byly stanoveny velmi nízké koncentrace mědi ($0,37 - 0,38 \mu\text{g g}^{-1}$). Výsledné koncentrace mědi jsou zobrazeny na *Obr. 4.11*.

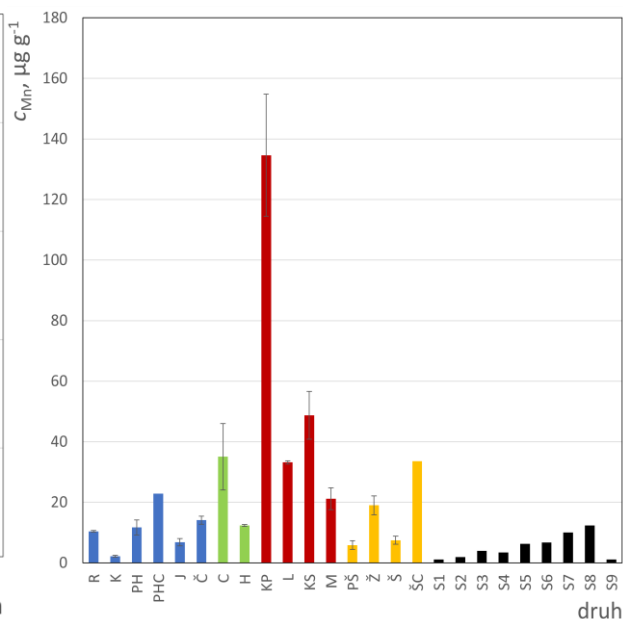
Mangan

Výrazně vysoká koncentrace, až několikrát vyšší než u ostatních vzorků, byla stanovena v konopné mouce ($114; 155 \mu\text{g g}^{-1}$). Vyšší koncentrace než $3 \mu\text{g g}^{-1}$ byly stanoveny v lněné, kokosové a cizrnové mouce ($24 - 57 \mu\text{g g}^{-1}$).

Koncentrace stanovené v bezpečkových směsích byly nízké a krom jednoho vzorku směsi nepřesáhly hodnotu $10 \mu\text{g g}^{-1}$. Nižší koncentrace než $10 \mu\text{g g}^{-1}$ byly stanoveny i v pšeničné, špaldové, jáhlové a kukuřičné mouce. Výsledné koncentrace jsou zobrazeny v grafu na *Obr. 4.12*.



Obr. 4.11: Výsledné koncentrace mědi

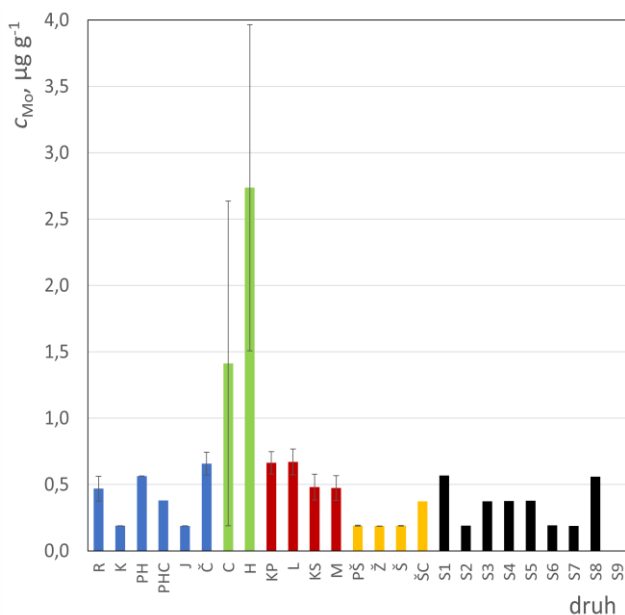


Obr. 4.12: Výsledné koncentrace manganu

Molybden

Výsledné koncentrace molybdenu jsou zobrazeny na Obr.4.13. Vysoké koncentrace a zároveň i vysoké rozsahy naměřených hodnot koncentrací byly stanoveny v luštěninových moukách, důvodem by v tomto případě mohla být kontaminace. U ostatních druhů mouk se nevyskytovaly velké rozsahy naměřených koncentrací.

U ostatních vzorků lze pozorovat dvě skupiny. První skupinou byly vzorky, jejichž naměřené koncentrace byly vyšší než $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$. Druhou skupinou byly vzorky se stanovenou koncentrací nižší než $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$, jednalo se o kukuřičnou, jáhlovou mouku, většinu bezlepkových směsí a o obilné lepkové mouky vyjma celozrnné špaldové mouky. V jednom vzorku bezlepkové směsi ležela výsledná koncentrace pod detekčním limitem.

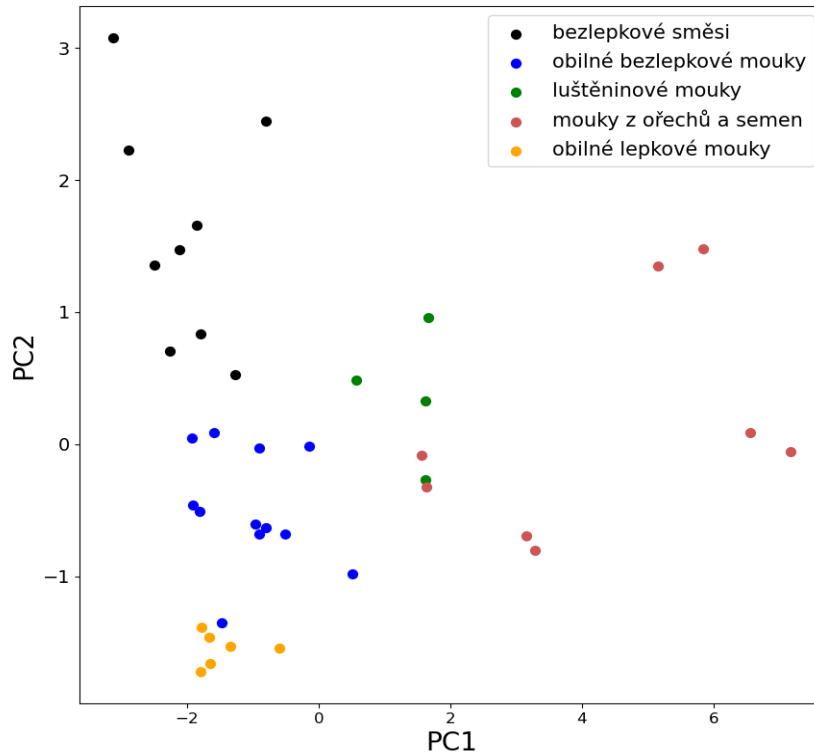


Obr. 4.13: Výsledné koncentrace molybdenu

4.10 Vícerozměrná analýza dat

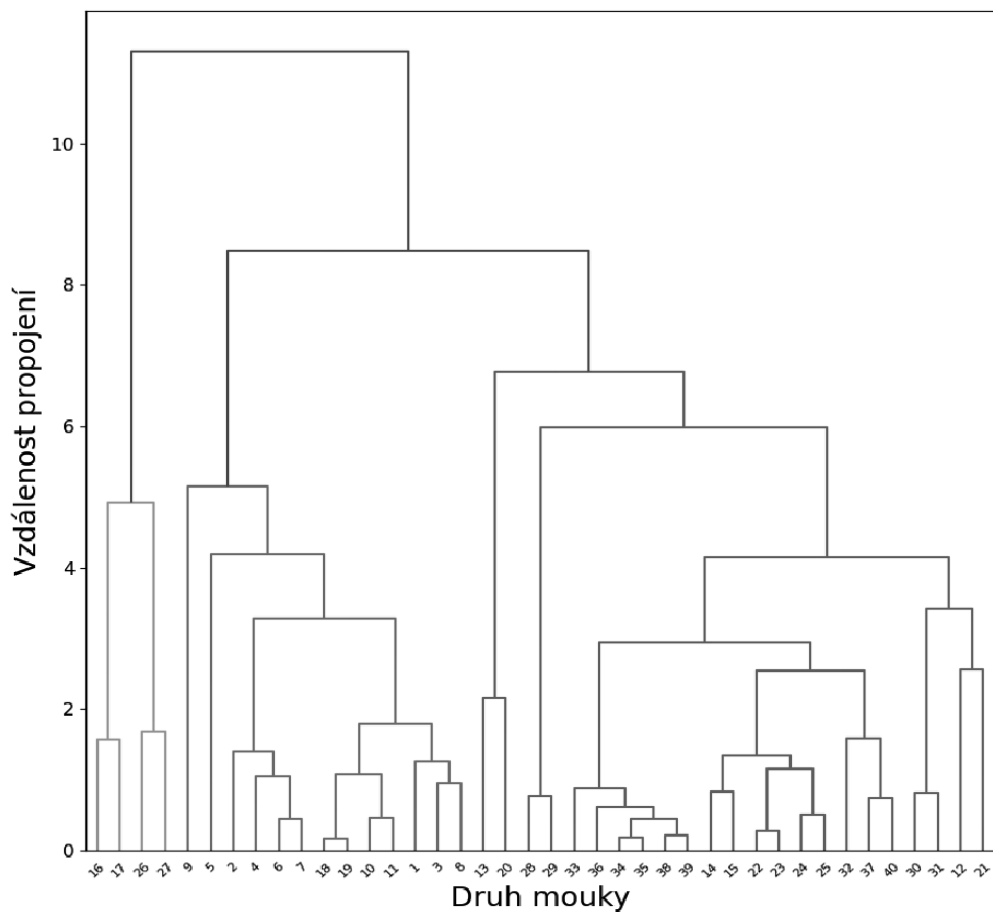
Ze studií bylo zjištěno, že na vliv prvkového složení může mít vliv lokalita pěstování. Předpokladem vyplývajícím ze studií bylo, že druh mouky má výrazně větší vliv na její prvkové složení, než samotná lokalita pěstování. Tento předpoklad byl potvrzen i v této diplomové práci, což demonstrují *Obr. 4.14 a Obr. 4.15*. Pro modelování výsledných dat byly použity dvě hlavní komponenty. První dvě hlavní komponenty vysvětlovaly 73 % variability dat, přičemž PC1 představovala 60 % a PC2 13 % této variability. Z *Obr. 4.14* je patrné, že výsledné koncentrace mouk se na základě vzájemné podobnosti rozdělily do shluků, které odpovídají uvedeným druhům mouky.

Dalším faktorem, který mohl ovlivnit výsledky, bylo obohacování potravin o prvky. Jelikož je obohacování mouky o prvky v České republice dobrovolné, výrobci se chlubí přidáním prvků. Na originálních balení mouky nebyly uvedeny žádné informace o obohacení. Tato práce předpokládá, že výsledné hodnoty nebyly obohacením ovlivněny.



Obr.4.14: Analýza hlavních komponent prvkového složení naměřených mouk

Na *Obr. 4.15* jsou zřetelné tři skupiny mouk, které jsou si prvkovým složením více podobné než ostatní. První skupinu tvoří lněná a konopná mouka. Druhou skupinu tvoří bezlepkové směsi, většina rýžových mouk a kukuřičná mouka. Třetí a zároveň největší skupinu tvořily ostatní druhy mouk.



Obr.4.15: Hierarchická shluková analýza. Druh mouky odpovídá číselnému kódu z Tab. 3.1, Tab. 3.2 a Tab. 3.3.

5 ZÁVĚR

Byla provedena optimalizace rozkladu reprezentativních vzorků. Jako optimální pro rozklad praktických vzorků byl zvolen poměr 3 ml 65% kyseliny dusičné a 4 ml 30% peroxidu vodíku. Dále byly stanoveny koncentrace vápníku, hořčíku, fosforu, draslíku, sodíku, železa, zinku, mědi, manganu a molybdenu ve 40 vzorcích mouk pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.

Porovnáním prvkového složení bylo zjištěno, že velmi vysoké koncentrace prvků oproti ostatním vzorkům byly stanoveny v konopné a lněné mouce. Luštěninové a ořechové mouky byly bohatší na porovnávané prvky než pšeničná mouka a obilné mouky obsahující lepek.

V přirozeně bezlepkových obilných moukách byly ve většině případech stanoveny vyšší nebo podobné koncentrace prvků jako v pšeničné mouce. Výjimkou byly nízké koncentrace vápníku stanovené v obilných bezlepkových moukách a velmi nízká koncentrace železa, kterou nebylo možné stanovit, u rýžové mouky. Toto zjištění je důležité pro celiaky, kteří používají tyto alternativy, aby obohatili stravu jinými zdroji těchto prvků, například konopnou nebo lněnou moukou.

Prvkové složení bezlepkových směsí bylo různé a záleželo na výrobci. Nebylo zjištěno, že bezlepkové směsi jsou obecně chudé na minerály oproti pšeničné mouce. Ve většině bezlepkových směsí byly ale stanoveny nízké koncentrace železa, které je pro celiaky nedostatkové. Zároveň většina bezlepkových směsí obsahovala vysoké koncentrace sodíku, který ostatní druhy mouk neobsahovaly.

6 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] Theethira, T. G.; Dennis M.; Leffler, D. A.: Nutritional consequences of celiac disease and the gluten-free diet. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* **8**:2, 123–129 (2014).
- [2] Český statistický úřad: *Spotřeba potravin a nealkoholických nápojů (na obyvatele za rok)*, 2011. Dostupné z URL: < <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2021>> [cit. 15.7.2023]
- [3] Saturni, L.; Ferretti, G.; Bacchetti, T.: The Gluten-Free Diet: Safety and Nutritional Quality. *Nutrients* **2**:1, 16-34 (2010).
- [4] Rybicka, I.: The Handbook of Minerals on a Gluten-Free Diet. *Nutrients* **10**:11, 1683 (2018).
- [5] Hussain, A.; Larsson, H.; Kuktaite R. a další: Mineral Composition of Organically Grown Wheat Genotypes: Contribution to Daily Minerals Intake. *International Journal of Environmental Research Public Health* **7**:9, 3442-3456 (2010).
- [6] Di Nardo, G.; Villa, M. P.; Conti, L. a další: Nutritional Deficiencies in Children with Celiac Disease Resulting from a Gluten-Free Diet: A Systematic Review. *Nutrients*, **11**:7, 1588 (2019).
- [7] Miranda, J.; Lasa, A.; Bustamante, M. A. a další: Nutritional Differences Between a Gluten-free Diet and a Diet Containing Equivalent Products with Gluten. *Plant Foods Human Nutrition*, **69**:3, 182–187 (2014).
- [8] Kaliciak, I.; Drogowski, K.; Garczyk, A. a další: Influence of Gluten-Free Diet on Gut Microbiota Composition in Patients with Coeliac Disease: A Systematic Review. *Nutrients* **14**:10, 2083 (2022).
- [9] Theethira, T. G.; Dennis, M.: Celiac Disease and the Gluten-Free Diet: Consequences and Recommendations for Improvement. *Digestive Diseases* **33**:2, 175–182 (2015).

- [10] Frühauf, P.; El-Lababidi, N.; Rubínová, B.: *Celiakie dětí a dospívajících 2021*. Praha, Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví 2022.
- [11] Biesiekierski, J. R.: What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **32**, 78-81 (2017).
- [12] Mudler, C. J. J.; van Wanrooij, R. L. J.; Bakker, S. F. a další: Gluten-Free Diet in Gluten-Related Disorders. *Digestive Diseases* **31**:1, 57-62 (2013).
- [13] Kleinová, A.: Minerální látky a stopové prvky ve výživě. *PharmaNEWS*. Dostupné z URL: < <https://www.pharmanews.cz/clanek/mineralni-latky-a-stopove-prvky-ve-vyzive/>> [cit. 15.7.2023]
- [14] Kladenský, J.: Vliv vitamínů, minerálů a stopových prvků na lidské zdraví s podrobnějším zaměřením na urogenitální systém. Jaká rizika přináší jejich deficit či předávkování? – 2.část. *Urologie pro praxi* **18**:3, 109–114 (2017).
- [15] Gupta, U. C.; Gupta S. C.: Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition A Review. *Pedosphere* **24**:1, 13–38 (2014).
- [16] Strohm, D.; Ellinger, S. a další: Revised Reference Values for Potassium Intake. *Annals of Nutrition and Metabolism* **71**:1, 118-124 (2017).
- [17] Freitas F. E. D. A.; Batista, M. A. C. a další: The gut-brain axis and sodium appetite: Can inflammation-related signaling influence the control of sodium intake. *Appetite* **175** (2022).
- [18] Finley, J. W.; Davis C. D.: Manganese deficiency and toxicity: Are high or low dietary amounts of manganese cause for concern? *BioFactors* **10**:1, 15-24 (1999).
- [19] Holzinger, S.; Ankea, M. a další: Molybdenum intake of adults in Germany and Mexico. *Analyst* **123**:3, 447-450 (1998).
- [20] Bednář, J.; Vranová, V.: Úloha sodíku v prevenci a léčbě hypertenze – praktická realizace. *Interní medicína pro praxi* **13**:2, 88-89 (2011).

- [21] Halfdanarson, T. R.; Litzow, M. R. a další: Hematologic manifestations of Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood* **109**:2, 412-421 (2007).
- [22] Wierdsma, N. J.; van Bokhorst-de van der Schueren, M. A. E. a další: Vitamin and Mineral Deficiencies Are Highly Prevalent in Newly Diagnosed Celiac Disease Patients. *Nutrients* **5**:10, 3975-3992 (2013).
- [23] Shepherd, S.J.; Gibson, P. R.: Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently-diagnosed and long-term patients with coeliac disease. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* **26**:4, 349–358 (2013).
- [24] Hosseini, S. M.; Soltanizadeh, N. a další: Gluten-free products in celiac disease: Nutritional and technological challenges and solutions. *Journal of Research in Medical Sciences* **23**, 109 (2018).
- [25] Wild, D.; Robins, G. G. a další: Evidence of high sugar intake, and low fibre and mineral intake, in the gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther* **32**:4, 573–581, (2010)
- [26] Halfdanarson, T. R.; Kumar, N. a další: Copper Deficiency in Celiac Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* **43**:2, 162-164 (2009).
- [27] Orecchio, S.; Amorello, D. a další: Determination of trace elements in gluten-free food for celiac people by ICP-MS. *Microchemical Journal* **116**, 163-172 (2014).
- [28] Avegliano, R. P.; Maihara, V. A. a další: A Brazilian Total Diet Study: Evaluation of essential elements. *Journal of Food Composition and Analysis* **24**:7, 1009-1016 (2011).
- [29] Thompson, T.: Folate, iron, and dietary fiber contents of the gluten-free diet. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetic* **100**:11, 1389-1396 (2000).
- [30] Larretxi, I.; Txurruka, I. a další: Micronutrient Analysis of Gluten-Free Products: Their Low Content Is Not Involved in Gluten-Free Diet Imbalance in a Cohort of Celiac Children and Adolescent. *Foods* **8**:8, 321 (2019).

- [31] World Health Organization: *Recommendations on Wheat and Maize Flour Fortification*, 2009. Dostupné z URL: <<https://apps.who.int/>> [cit. 10.7.2023].
- [32] Ministerstvo zemědělství: *Vyhláška o doplňcích stravy a složení potravin*, 2018. Dostupné z URL: <<https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-58>> [cit. 16.7.2023]
- [33] Úřední věstník Evropské unie: *Nářízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1925/2006*, 2006. Dostupné z URL: <<https://eur-lex.europa.eu>> [cit. 16.7.2023]
- [34] Barkley, J. S.; Wheeler, K. S. a další: Anaemia prevalence may be reduced among countries that fortify flour. *British Journal of Nutrition* **114**:2, 265-273 (2015).
- [35] Correia, F. O.; Silva, D. S. a další: Optimization of microwave digestion and inductively coupled plasma-based methods to characterize cassava, corn and wheat flours using chemometrics. *Microchemical Journal* **135**, 190-198 (2017).
- [36] Araujo, R. G. O.; Macedo, S. M. a další: Mineral Composition of Wheat Flour Consumed in Brazilian Cities. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **19**:5, 935-942 (2008).
- [37] Sluková, M.; Skřivan P. a další: Jak poznáme kvalitu? *OBILOVINY A LUŠTĚNINY*. Praha, Potravinářská komora České republiky 2016.
- [38] Státní zemědělská a potravinářská inspekce: *Ořechy a oříšky*, 2020. Dostupné z URL: <<https://www.szpi.gov.cz/>> [cit. 9.7.2023]
- [39] Mikus, M.; Galus, S. a další: Development and Characterization of Novel Composite Films Based on Soy Protein Isolate and Oilseed Flours. *Molecules* **26**:12 (2021).
- [40] Mincey, D.; Williams, R. a další: Temperature controlled microwave-oven digestion systém. *Analytica Chimica Acta* **264**:1, 97-100 (1992).
- [41] Reid, H. J.; Greenfield, S. a další: Investigation of Decomposition Products of Microwave Digestion of Food Samples. *Analyst* **120**:5, 1543-1548 (1995).

- [42] Nardi, E. P.; Evangelista, F. S. a další: The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry* **112**:3, 727-732 (2009).
- [43] Berghof: *Speedwave Xpert Microwave Digestion System. User manual*. 2017.
- [44] Michaljevič, M.; Strnad, L. a další: Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy* **98**, 123-130 (2004).
- [45] Otruba, V.: *8. kurz ICP - MS/OES*. Brno, Spektroskopická společnost Jana Marka Marci 2015.
- [46] Chan, K. C.; Yip, Y. C. a další: High-Throughput Determination of Seven Trace Elements in Food Samples by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **89**:2, 469-479 (2006).
- [47] Al-Hakkani, M. F.: Guideline of inductively coupled plasma mass spectrometry “ICP–MS”: fundamentals, practices, determination of the limits, quality control, and method validation parameters. *SN Applied Sciences* **1**:7 (2019).
- [48] O. Mestek, *Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2010.
- [49] Wilschefski, S. C. a další: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *The Clinical Biochemist Reviews* **40**:3, 115-133 (2019).
- [50] Agilent technologies: *Agilent 7900 ICP-MS*. Dostupné z URL: <<https://www.agilent.com/cs/library/posters/public/7900%20ICP-MS%20wall%20poster%20v03.pdf>> [cit. 9.6.2023]
- [51] Agilent technologies: *Ovládací software k 7900 ICP-MS: MassHunter 4.6*. Agilent Technologies Inc., USA, 2016.

- [52] Vrček, V.; Vrček, I. V.: Metals in organic and conventional wheat flours determined by an optimised and validated ICP-MS method. *International Journal of Food Science and Technology* **47**:8, 1777–1783 (2012).
- [53] Mestek, O.; Polák, J. a další: Analysis of element species fractions in buckwheat and amaranth flours by SEC/ICP-MS and MALDI-MS. *European Food Research and Technology* **225**, 895–904 (2007).
- [54] Skoog, D. A.: *Analytická chemie*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2019.
- [55] Záruba, K.: *Analytická chemie (2. díl)*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2016.
- [56] Nie, b.; Du, J. Q.: Crowds' Classification Using Hierarchical Cluster, Rough Sets, Principal Component Analysis and Its Combination. *International Forum on Computer Science-Technology and Applications* (2009).