

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Fakulta chemicko-inženýrská

Příspěvek k prvkové speciální analýze

Habilitační práce

Ing. Antonín Kaňa, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

Předkládanou práci jsem vypracoval samostatně. V textu jsem řádně uvedl odpovídající citace na práce jiných autorů.

Obsah

1. Úvod	5
2. Speciační analýza	6
2.1 Speciační analýza nízkomolekulárních specií	8
2.1.1. Vývoj metod.....	8
2.1.2 Robustnost metod.....	10
2.1.3. Aplikace metod	13
2.2 Analýza nanočástic	15
2.2.1 Vývoj metod.....	17
2.2.2 Robustnost metod.....	20
2.2.3 Aplikace metod	22
3. Závěr.....	23
4. Literatura	24
5. Seznam publikací	29
6. Přílohy	31

1. Úvod

Analytická chemie hraje v lidské společnosti významnou roli, například ve výrobě léčiv¹, řízení procesů v průmyslu, monitorování životního prostředí², lékařské diagnostice³, výrobě potravin⁴ nebo forenzních vyšetřováních⁵. Má také velký význam v různých oblastech výzkumu. Analytická chemie je tak zaměřena především na vytváření a aplikaci nových analytických metod v reakci na rostoucí nároky či nové požadavky různých odvětví. Jednou z oblastí analytické chemie je prvková analýza. Její význam nespočívá jen ve stanovování celkového obsahu chemických prvků, ale zaměřuje se také na stanovení jednotlivých forem daných prvků, tzv. specií. Pojem „speciační analýza“ definuje IUPAC jako analytickou činnost identifikace a/nebo měření množství jedné nebo více chemických specií ve vzorku, přičemž chemickou specii definuje jako specifickou formu prvku definovanou izotopovým složením, elektronovým nebo oxidačním stavem a/nebo strukturou molekuly či komplexu.⁶ Pod pojem specie tak spadají kromě různých sloučenin prvků také nanočástice, které se ve speciační analýze objevily teprve nedávno. Stanovení jednotlivých specií je důležité kvůli jejich rozdílným vlastnostem. Chemická forma prvku určuje jeho mobilitu v životním prostředí, biologickou dostupnost nebo toxicitu. Protože se tyto vlastnosti mezi jednotlivými speciemi často velmi liší, určení zastoupení specií prvků umožňuje mnohem lépe hodnotit vlastnosti analyzovaného vzorku než pouhé stanovení celkového obsahu prvků.

Habilitační práce vychází z mých odborných znalostí a z výsledků mé výzkumné práce prováděné na Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha, kde se dlouhodobě věnuji vývoji nových metod pro speciační analýzu a jejich aplikacím. Práce je zaměřena na dvě oblasti, z nichž první pokrývá téma speciační analýzy nízkomolekulárních specií selenu a arsenu a druhá se pak věnuje poměrně nové skupině specií, kterými jsou nanočástice. Jednotlivé části jsou uvedeny krátkým seznámením se stavem problematiky v době, kdy byla daná problematika řešena a následuje stručný text psaný formou komentářů k publikovaným výsledkům. Cílem habilitační práce je shrnout autorův přínos k dané problematice.

2. Speciační analýza

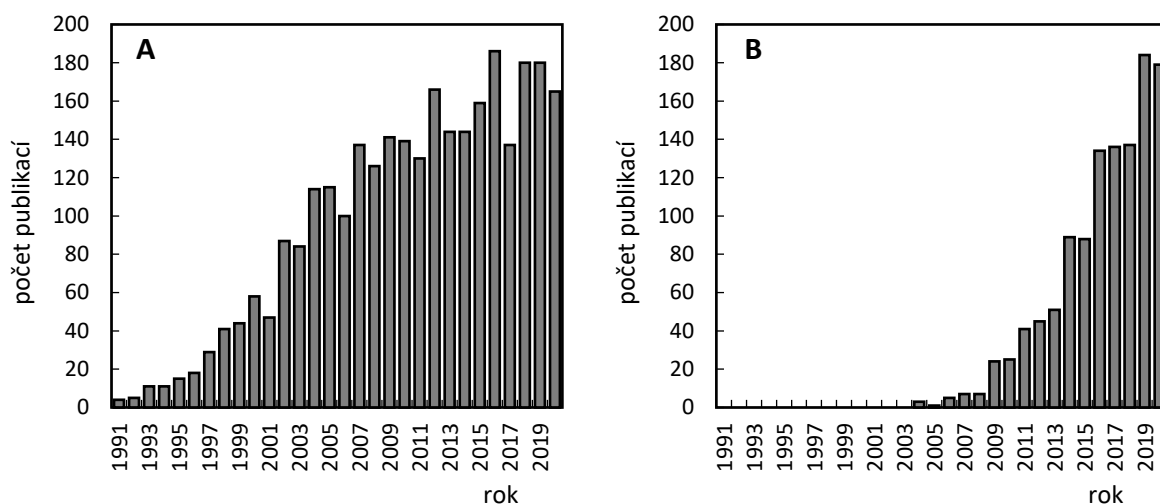
Koncept prvkové speciace se objevil koncem padesátých let 20. století a od té doby byla vyvinuta řada metod pro stanovení různých specií. Jen velmi málo technik však umožňuje speciační analýzu přímo bez separace specií. Patří sem například Mössbauerova spektroskopie⁷, rentgenová fotoelektronová spektroskopie⁸, nukleární magnetická rezonance⁹, nebo tandemová hmotnostní spektrometrie¹⁰.

V současnosti jsou nejběžnějšími metodami pro speciační analýzu kombinace separačních technik spojených s vysoce citlivými prvkově selektivními detektory. Ze souboru dostupných separačních technik hraje hlavní roli kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie, ale v menší míře se používají i jiné nechromatografické techniky, jako je kapilární elektroforéza¹¹, dialýza a ultrafiltrace¹² či frakcionace polem¹³. Vzhledem k tomu, že speciační analýza je většinou využívána ke stanovení specií stopových a ultrastopových prvků, lze k jejich detekci využít pouze citlivé techniky, jako jsou atomová fluorescence, optická emisní spektrometrie nebo hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).¹⁴

Právě v osmdesátých letech, kdy se začala psát historie komerčně dostupných ICP-MS nastal bouřlivý rozvoj speciační analýzy. Tyto přístroje se staly nejuniverzálnějšími a nejcitlivějšími prvkově selektivními detektory, které umožňují měření stopových množství jednotlivých specií. Od té doby došlo k rychlému rozvoji metod prvkové speciační analýzy, v nichž dominantní roli jako prvkově selektivní detektor hraje právě ICP-MS, nejčastěji ve spojení s HPLC, která je nejuniverzálnější separační metodou. Současně s tím byly metody speciační analýzy rozšířeny od analýzy jednoduchých iontů prvků ve vodných roztocích přes malé molekuly, až po biomolekuly ve složitých biologických matricích. Rozvoj metod speciační analýzy však začal zpomalovat kolem roku 2008 (Obr. 1A). Tento vývoj má dvě příčiny. Zaprvé nedošlo k očekávanému masivnějšímu rozšíření metod speciační analýzy do rutinních laboratoří a tím vývoj nových metod začal stagnovat, zadruhé se pozornost obrátila k nové skupině specií prvků, a to k nanočásticím (Obr. 1B). Od roku 2009 tak dochází k nárůstu publikovaných prací zaměřených na metodu ICP-MS v režimu měření jednotlivých částic (single particle ICP-MS; sp-ICP-MS), přičemž tento růst stále trvá.

S produkcí nanočástic v průmyslovém měřítku a jejich přidávání do běžně používaných produktů, např. kosmetických přípravků¹⁵ či potravin¹⁶, přichází také potřeba jejich stanovení jak pro kontrolu výrobních procesů, tak pro monitoring jejich osudu v životním prostředí či organismech. Kromě toho bylo zjištěno, že nanočástice různých prvků mohou být také

metabolitem řady mikroorganismů a mohou se tak vyskytovat v přírodě přirozeně^{17,18}. V současnosti by tak stanovení nanočástic mělo být vedle obvyklého stanovení anorganických a organických sloučenin chápáno jako nedílná součásti speciální analýzy.



Obrázek 1: Počet publikací týkajících se speciální analýzy s využitím ICP-MS (A) a analýzy nanočástic metodou sp-ICP-MS (B) do roku 2020. Zdroj: Web Of Science, 2021.

Jak již bylo zmíněno, speciální analýza zatím nenašla širší uplatnění v rutinních laboratořích. Je to v menší míře tím, že techniky speciální analýzy jsou často komplexní a obtížně se adaptují pro rutinní použití, ale hlavním důvodem je absence požadavku ze strany legislativy na stanovení jednotlivých forem prvků. Chybí tak hybná síla vytvořená z právních požadavků a vývoj nových metod je poháněn spíše zkoumáním technických možností než tržními silami. V současné době začíná být důležitost speciální analýzy zákonodárci vnímána především díky rozsáhlé podpoře specializační analýzy v rámci akademických výzkumných skupin, které rozšiřují stávající znalosti o speciaci prvků a upozorňují na možná toxikologická rizika spojená s bezpečností potravin, ochrany zdraví i životního prostředí apod. Na základě toho již byla některá stanovení do legislativy zařazena, například byla stanovena maximální úroveň anorganických specií arsenu v rýži¹⁹, šestimocného chromu v hračkách²⁰ nebo organických sloučenin cínu ve směsích a předmětech dodávaných pro širokou veřejnost²¹. Oblast regulace nanočástic se teprve vyvíjí a jsou zavedena zatím pouze dílčí opatření týkající se jejich použití a označování.²² Budoucnost speciální analýzy tedy kromě výzkumného sektoru, kde hraje nezastupitelnou roli při základním výzkumu, spočívá také v další podpoře získávání dat pro tvorbu legislativních požadavků a následné uplatnění speciální analýzy v běžné laboratorní praxi.

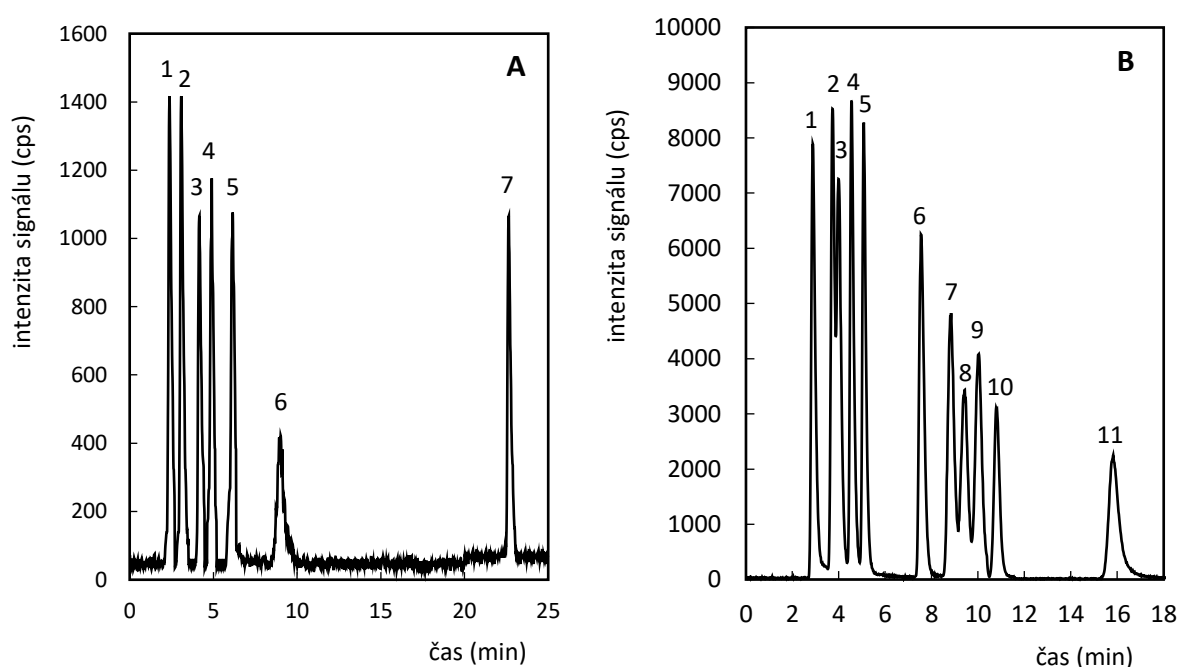
2.1 Speciační analýza nízkomolekulárních specií

I přestože vývoj nových metod speciační analýzy malých molekul již není tak bouřlivý, stále jsou nové metody vyvíjeny a v dohledné budoucnosti se dá očekávat, že mnoho laboratoří bude nuceno legislativou a/nebo ekonomickými hledisky speciační analýzy provádět. Při výběru vhodných metod budou parametry, jako je čas, náklady a automatizace, hrát mnohem důležitější roli než dnes. Pro rutinní použití jsou tak výhodné metody umožňující analýzy co největšího množství specií v jedné analýze. Vzhledem k univerzálnosti použití jsou nejčastěji specie separovány pomocí HPLC, která nabízí nesrovnatelně větší množství kombinací stacionárních a mobilních fází než ostatní chromatografické metody. V této oblasti se objevují dva perspektivní směry: víceprvkové speciační analýzy a jednoprvkové speciační analýzy se zaměřením na co největší počet separovaných specií²³. U víceprvkových speciačních analýz jsou popsány metody umožňující v jedné analýze stanovení specií až šesti prvků současně²⁴, avšak vzhledem k různorodosti sloučenin jednotlivých prvků lze tyto metody použít zpravidla jen pro velmi omezený počet kombinací specií²⁵. Ve druhé kategorii se pro stanovení co největšího počtu specií jednoho prvku využívá speciálních režimů HPLC, jako je například iontově párová chromatografie. Ta umožňuje vhodnou volbou iontově párových činidel separovat současně specie s různými vlastnostmi, zejména co se týče náboje. Iontově párová chromatografie na reverzní fázi tak umožňuje v jedné analýze stanovit jak kationty, tak anionty i neutrální látky, čímž se odlišuje od většiny ostatních módů HPLC. Právě tento přístup, tedy separace široké škály specií biologicky či toxikologicky významných prvků v jedné analýze, bude demonstrován na analýze specií selenu a arsenu.

2.1.1. Vývoj metod

Příkladem prvku tvořícího celou řadu nízkomolekulárních specií může být selen. Selen se řadí mezi důležité biogenní prvky a v biologických systémech tvoří celou řadu sloučenin. Důležitou roli hrají především selenoproteiny, v nichž je selen vázán ve formě selenocysteinu, který se ve volném stavu vyskytuje jako dimer selenocystin (SeCys_2). Dalšími významnými formami selenu jsou například selenomethionin (SeMet), Se-methyselenocystein (MeSeCys), selenan (Se^{VI}) či seleničitan (Se^{IV}).²⁶ V současnosti je však popsáno již několik desítek specií selenu vyskytujících se v organismech.²⁷ Je zřejmé, že uvedené sloučeniny jsou jak organického, tak anorganického charakteru, jejich náboj se liší a závisí na pH prostředí. Pro jejich stanovení v biologických materiálech metodou HPLC-ICP-MS bylo popsáno mnoho různých možností separace, z nichž většina je založena na iontově-výměnné chromatografii nebo iontově párové chromatografii na reverzní fázi²⁸. Pro separaci sedmi specií selenu (SeMet ,

MeSeCys, Se^{VI} , Se^{IV} , kationtu trimethylselenonia, selenomočoviny a selenoethioninu), bylo využito HPLC kolony s reverzní fází C8 v kombinaci s kationtově- i aniontově-párovými činidly.²⁹ Mobilní fáze obsahovala 2,5 mmol/l butan-1-sulfonátu sodného, 8 mmol/l hydroxidu tetramethylamonného, 4 mmol/l kyseliny malonové a 0,05 % (v/v) methanolu, a výsledné pH bylo upraveno pomocí HCl na hodnotu 3,0. Uvedené specie byly separovány během 25 minut (Obr. 2A), přičemž během této doby byla kromě standardů separována také řada dalších neidentifikovaných specií vyskytujících se ve vzorcích potravinových doplňků obsahujících selen. Ukazuje se tak potenciál metody separovat další specie a do budoucna tak ještě mnohem více rozšířit její využití.



Obrázek 2: Chromatogram standardů specií selenu (A) [1-seleničitan, 2-selenan, 3-selenomočovina, 4-kationt trimethylselenonia, 5-Se-methylselenocystein, 6-selenomethionin, 7-selenoethionin] a arsenu (B) [1-arseničnan, 2-arsenitan, 3-methylarseničná kyselina, 4-dimethylarseničná kyselina, 5-arsenobetain 6-oxid trimethylarseničný, 7-kation tetramethylarsonia, 8-arsenochilin, 9- thiomethylarseničná, 10-dithiodimethylarseničná kyselina, 11-sulfid trimethylarseničný].

Nejběžnější separační technikou pro stanovení specií arsenu je aniontově-párová HPLC s kolonou Hamilton PRP-X100. Je to z toho důvodu, že toxikologicky nejvýznamnější jsou anorganické formy arsenu jako např. arseničnany nebo arsenitany.³⁰ Mezi běžné specie arsenu přítomné v biologických vzorcích se však řadí také methylarseničná kyselina, dimethylarseničná kyselina, arsenobetain, arsenocholin, kation tetramethylarsonia a oxid trimethylarseničný^{30, 31}. Pro separaci těchto specií, které se liší nábojem i strukturou, byl využit

stejný princip separace jako v případě selenu³². Ukázalo se, že ačkoliv jsou výše zmíněné specie arsenu strukturně odlišné od specií selenu a nezahrnují například aminokyseliny, jejich chování je z hlediska separace velmi podobné. Byla proto použita stejná HPLC kolona i stejné složky mobilní fáze, u nichž se pouze změnila koncentrace: 6,2 mmol/l butan-1-sulfonátu sodného, 1,2 mmol/l hydroxidu tetramethylamonného, 4 mmol/l malonové kyseliny a 0,05% (v/v) methanolu, pH mobilní fáze (3,0) dodatečně upravováno nebylo. Během 18 minut trvající analýzy (Obr. 2B) bylo separováno osm nejběžnějších specií arsenu uvedených výše včetně jejich tří sirných analogů (thiomethylarseničná kyselina, dithiodimethylarseničná kyselina a sulfid trimethylarseničný). Metoda tak jako jediná pokrývá všechny běžně stanovované specie arsenu a také poměrně nově studované sirné specie arsenu, jejichž stanovení je pomocí tradiční aniontově-párové chromatografie problematické, protože jsou méně polární a vykazují vysokou retenci ústící v dlouhé retenční časy a deformované píky³³.

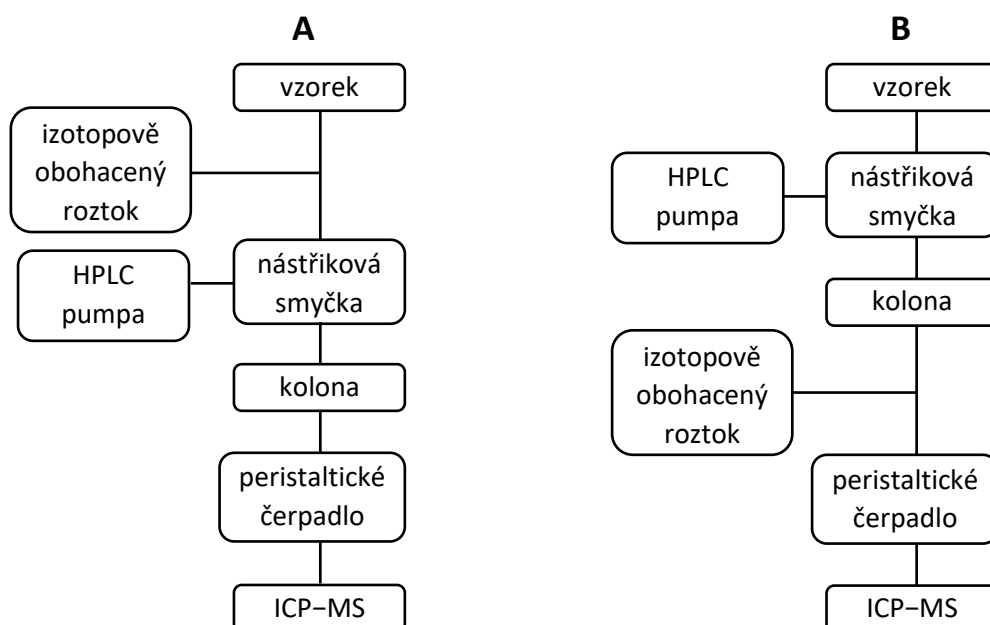
2.1.2 Robustnost metod

Kromě časové náročnosti je důležitým procesem pro rutinní použití analytických metod také prokázání vhodnosti pro daný účel neboli validace. Jedním z nejdůležitějších parametrů, vzhledem k rozmanitosti analyzovaných vzorků, je robustnost. Robustnost je parametr, který charakterizuje schopnost analytické metody poskytovat spolehlivé výsledky i při malých změnách v experimentálních podmínkách.³⁴ Nejčastějším a také nejběžnějším problémem při speciální analýze metodou HPLC-ICP-MS je vliv matrice, který se projevuje jako nespektrální interference. Nespektrální interference lze rozdělit na reverzibilní, které jsou přechodné a dochází k nim pouze během měření vzorku (změna účinnosti zmlžování, vliv matrice na intenzitu signálu apod.), a na nereverzibilní způsobující trvalý vliv na stanovení, například depozice solí ve zmlžovači a na vzorkovacích kónech.³⁵ Jejich eliminace je důležitá především z hlediska toho, že jejich vliv na výsledek analýz je u neznámých vzorků s neznámou maticí nepředvídatelný. Chyby spojené s nespektrálními interferencemi lze eliminovat vhodnými kalibračními postupy³⁶, přípravou vzorku nebo omezením množství vzorku dodaného do zmlžovače, například aplikací průtokové vstřikovací analýzy.³⁷

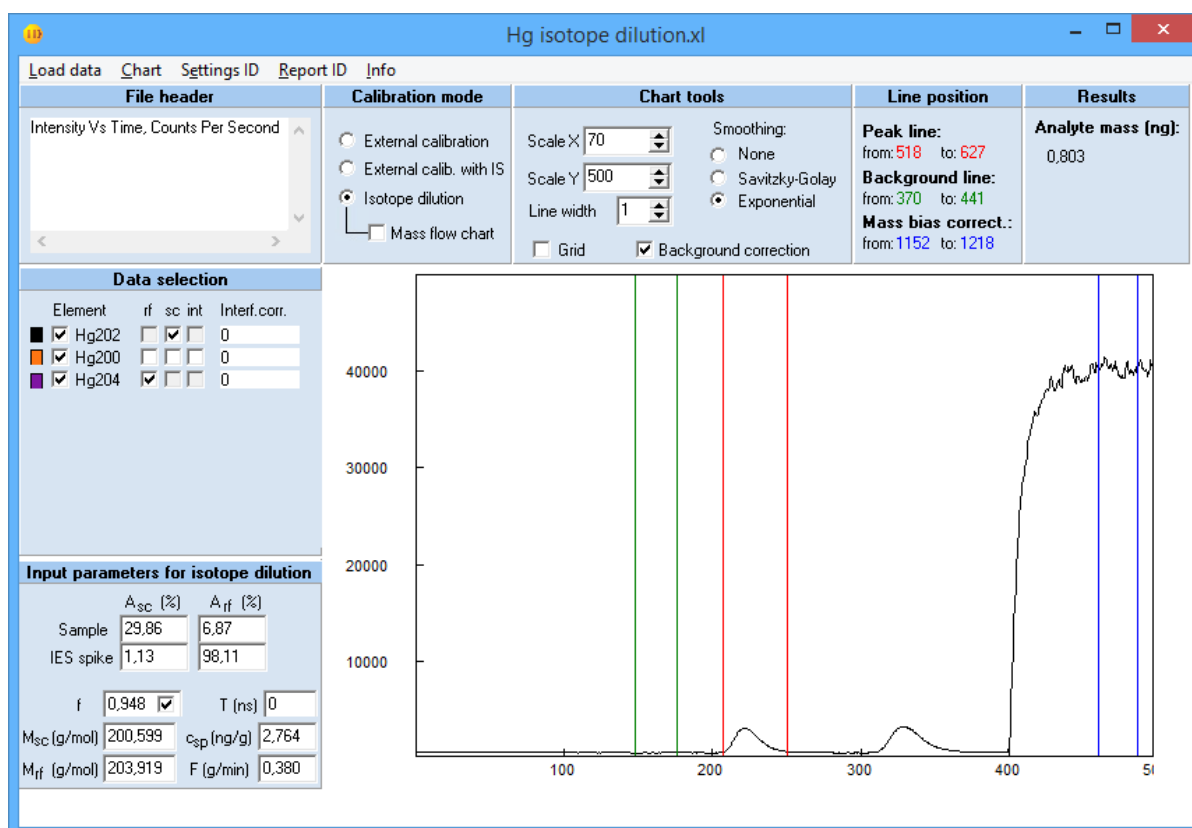
Jednou z možností je kalibrace s využitím vnitřní standardizace. Ta spočívá v přidání známé koncentrace referenčního prvku zvaného vnitřní standard ke všem vzorkům a kalibračním standardům a měření poměru signál analytu a vnitřního standardu namísto prostého měření signálu analytu. Vnitřní standard by měl být v ideálním případě během měření ovlivňován stejnými procesy jako analyt, a poměr signálu analytu a vnitřního standardu by měl být konstantní. Tím se minimalizuje vliv kolísání signálu v důsledku matričních

či instrumentálních vlivů.³⁸ Nespektrální interference jsou při analýze biologických vzorků metodou HPLC-ICP-MS nejčastěji způsobeny přítomností většího množství solí v extraktech vzorků, které zpravidla vedou ke snížení intenzity signálu v důsledku změn ionizační rovnováhy v plazmatu. Na příkladu arsenu byl ukázán nejen vliv solí na pokles signálu, ale i opačný vliv přítomnosti sloučenin uhlíku na zesílení detekovaného signálu.³⁹ V této práci byl na rozdíl od klasicky používaných kovů (např. Rh, In, Y...) ⁴⁰ použit jako vnitřní standard selen, čímž bylo docíleno téměř ideální shody parametrů analytu a vnitřního standardu (relativní atomová hmotnost $A_{\text{rel,As}}=74,9216$ g/mol a $A_{\text{rel,Se}}=78,96$ g/mol; první ionizační potenciál $U_{1,\text{As}}=9,81$ eV a $U_{1,\text{Se}}=9,752$ eV).⁴¹ To umožnilo během speciační analýzy korigovat nárůst signálu arsenu až do koncentrace uhlíku v roztoku 3 g/l a podhodnocení signálu způsobené ionty sodíku až do koncentrace 9 g/l chloridu sodného, což odpovídá fyziologickému roztoku. Metoda tak umožňuje speciační analýzu arsenu i v nezředěných tělních tekutinách či extraktech biologických vzorků.

Další možností eliminace nespektrálních interferencí je kalibrace pomocí izotopového zředování, které se řadí mezi primární metody.⁴² Jedná se o vůbec nejpresnější variantu kalibrace, avšak je experimentálně nejnáročnější a vyžaduje měření alespoň dvou izotopů analytu, což není možné u mononuklidických prvků. Způsoby provedení speciační analýzy s využitím izotopového zředování jsou při spojení HPLC a ICP-MS dva: speciově-specifický a speciově-nespecifický (Obr. 3).⁴³ Je-li použito speciově-specifické izotopové zředování, ke vzorku jsou před separací na HPLC koloně přidány izotopově obohacené specie, které budou stanovovány, přičemž ostatní stanovit nelze. Naopak speciově-nespecifické izotopové zředování spočívá v kontinuálním mísení výstupu z HPLC kolony s roztokem obsahujícím libovolnou izotopově obohacenou specii daného prvku, čímž lze stanovit veškeré separované specie.⁴⁴ Druhý režim je velmi výhodný také z hlediska toho, že izotopově obohacené sloučeniny různých prvků jsou obtížně dostupné a zde postačí přidavek roztoku jakékoli izotopově obohacené běžné anorganické sloučeniny analyzovaného prvku. Nevýhodou je však obtížnější následné vyhodnocení výsledků. Naměřený poměr izotopů se mění v průběhu celého chromatografického píku a chromatogramy se musí vyhodnocovat bod po bodu. Tento způsob vyhodnocení komerční software u přístrojů ICP-MS vůbec nenabízí a data se tak musí vyhodnocovat externě. Z tohoto důvodu byl vyvinut software, který takové vyhodnocení umožňuje.⁴⁵ Program (Obr. 4) nabízí kromě základního vyhodnocení chromatogramů i korekce spektrálních interferencí a jevů specifických pro izotopové zředování – korekce mrtvého času detektoru a korekce hmotnostní diskriminace izotopů. Práci pak usnadňuje také integrovaná databáze přirozených izotopových zastoupení všech prvků s automatickou detekcí analytu.



Obrázek 3: Schéma přidavku izotopově obohaceného roztoku pro speciově-specifické izotopové zřed'ování (A) a speciově-nespecifické izotopové zřed'ování (B) u metody HPLC-ICP-MS.



Obrázek 4: Okno programu s ukázkou chromatogramu při analýze rtuti.

2.1.3. Aplikace metod

Popsané metodiky jsou díky možnosti stanovení velkého počtu specií aplikovatelné na širokou škálu biologických vzorků. Aplicační potenciál metod je demonstrován na speciální analýze selenu v rostlinách, živočišných tkáních a mikroorganismech, v nichž je speciace selenu rozmanitá.

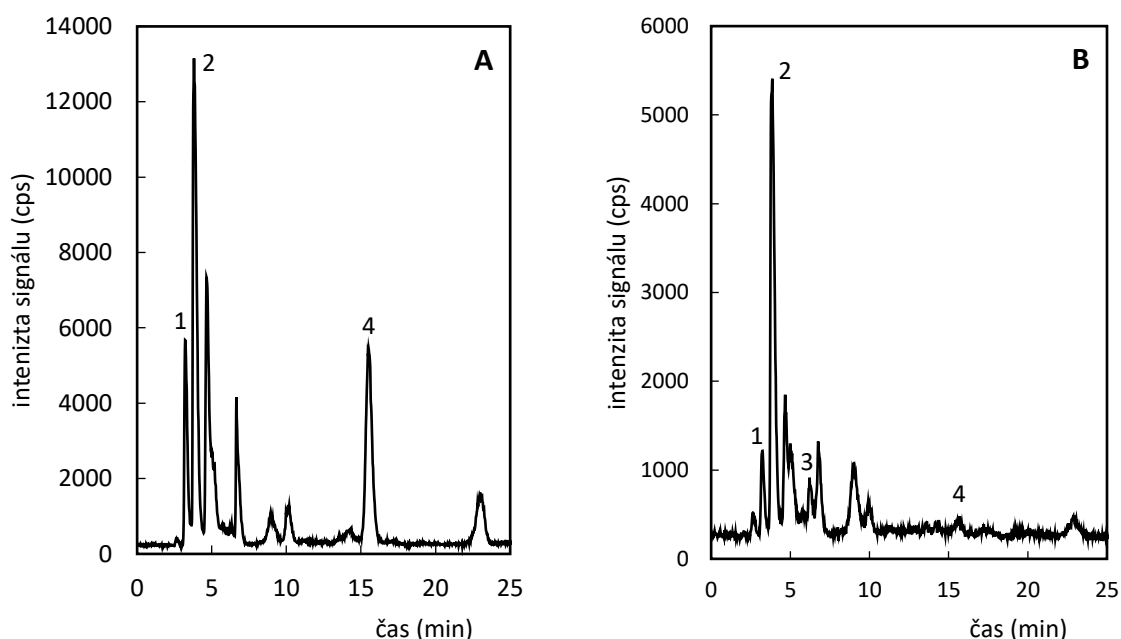
Selen je pro živočichy základním mikronutrientem, jehož nadměrný příjem však může vést až k toxickým účinkům. U zvířat se selen vyskytuje především ve formě specií zmíněných již v kapitole 2.1.1. Hlavním zdrojem selenu v potravě živočichů jsou rostliny. V nich se kromě těchto specií vyskytuje ve formě mnoha dalších sloučenin, například dimethylselenid, dimethyldiselenid, Se-methylselenomethionin, oxid selenomethioninu a γ -glutamyl-selenomethylselenocystein, přesto není role selenu v rostlinách stále zcela objasněna. Je však prokázáno, že selen v nízkých dávkách chrání rostliny před různými abiotickými stresy, jako je chlad, sucho a vysychání, nebo stresem indukovanou tvorbou reaktivních forem kyslíku.⁴⁶ Rostliny mohou hrát zásadní roli při překonávání nutričního nedostatku selenu v různých oblastech světa, proto je pro navrhování účinných strategií biofortifikace rostlin selenem nezbytné studium metabolismu Se v rostlinách a následný osud specií selenu při jejich konzumaci živočichy. Aktuální je také myšlenka nutričního doplnění selenu prostřednictvím selenu obohacených mikroorganismů využívaných v průmyslovém měřítku⁴⁷. Nejčastěji se tak jedná o kvasinky⁴⁸ nebo bakterie mléčného kvašení⁴⁹, v nichž se selen vyskytuje kromě již všech uvedených specií selenu také jako například selenohomocystein, selenohomolanthionin, N-acetylselenocystathionin či methylselenoglutathion, a oproti rostlinám a živočichům také ve formě nanočástic elementárního selenu^{27, 49, 50}. Výhoda obohacení stravy organickými sloučeninami selenu je oproti potravinovým doplňkům obsahujícím anorganické formy selenu ta, že organické sloučeniny selenu mají vyšší biodostupnost než anorganické.

První studie byla věnována posouzení reakce vybraných druhů travních porostů na aplikaci roztoku seleničitanu formou postřiku⁵¹. V případě akumulace selenu travinami a jeho metabolismu na organické sloučeniny by mohly být takto obohacené rostliny vhodným zdrojem selenu pro dobytek spásající travní porosty a maso těchto hospodářských zvířat pak zdrojem selenu pro konzumenty. Zkoumány byly jak jednoděložné traviny, tak dvouděložné luční rostliny, přičemž zjištěná akumulace selenu byla u všech testovaných druhů trav podobná. Z hlediska speciace však byly zaznamenány rozdíly. Jednoděložné traviny obsahovaly větší podíl MeSeCys než dvouděložné rostliny, které naopak obsahovaly více SeCys₂. Kromě těchto dvou sloučenin byla zaznamenána také větší množství Se^{VI} a SeMet, a malá množství dalších šesti neidentifikovaných specií selenu. Zde však žádné výrazné trendy

v jejich zastoupení nebyly pozorovány. Jedná se vůbec o první studii, která se systematicky věnovala rozdílu v metabolismu selenu mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami. Druhá studie⁵² týkající se obohacení rostlin selenem byla zaměřena na fortifikaci rostlin určených k přímé konzumaci spotřebiteli bez potřeby mezikroku s hospodářskými zvířaty. Jako modelová rostlina byla vybrána brokolice, která patří do čeledi brukvovitých rostlin. Ty jsou známé dobrou schopností akumulace selenu.⁵³ Postřik roztokem seleničitanu v množství odpovídajícím 25 g/ha a 50 g/ha selenu vedl k účinnému zvýšení obsahu selenu u všech testovaných odrůd brokolice. Aplikace selenu vedla k nárůstu obsahu především organických sloučenin selenu, jako jsou SeCys₂, SeMet a MeSeCys. Kromě nich bylo pozorováno také třináct neidentifikovaných sloučenin, jejichž obsah byl však spíše minoritní. To ukazuje na skutečnost, že i při aplikaci roztoku seleničitanu na list je selen rostlinou účinně metabolizován do mnoha organických sloučenin.

Další možností, jak doplnit potraviny o selen, je využití mikroorganismů. Metabolismus mikroorganismů je velmi rychlý a pestrý co se týče množství různých organických sloučenin selenu. Metabolismus selenu byl popsán pro mikroorganismy využívané v pekařství⁵⁴, vinařství⁵⁵, pivovarnictví⁵⁶ a mlékárenském průmyslu^{50, 57}. Mikroorganismy používané v mlékárenském průmyslu nabízí největší perspektivu, protože počet kmenů používaných mikroorganismů je mnohem větší než v ostatních oblastech potravinářství.⁵⁸ Výhodou je také skutečnost, že například na rozdíl od vína nebo piva jsou mléčné výrobky dostupné pro všechny věkové kategorie. Schopnost mikroorganismů selen akumulovat a metabolizovat byla zkoumána na dvou kmenech bakterií mléčného kvašení *Streptococcus thermophilus* a *Enterococcus faecium*, používaných při fermentaci jogurtů⁵⁹. Ukázalo se, že oba kmeny jsou schopny tolerovat seleničitan sodný v růstovém médiu až do koncentrace 50 mg/l a selen také v buňkách akumulovat (až 7 g/kg Se). Speciační analýza prokázala podobné chování obou kmenů z hlediska metabolismu selenu, přičemž pozorováno bylo pouze jiné zastoupení jednotlivých specií (Obr. 5). Uvedené dva kmeny bakterií mléčného kvašení obohacených selenem byly dále studovány z hlediska jejich potenciálu zlepšit zdraví konzumentů⁶⁰. Sledován byl zejména přínos selenizace mikroorganismů oproti jejich přirozeným benefitům, jako je imunomodulace nebo snižování hladiny cholesterolu. Účinky zařazení selenizovaných mikroorganismů do stravy byly sledovány na potkanech (kmen CD[®] IGS). Ve skupinách, kterým byly do stravy přidány selenizované mikroorganismy, byl zaznamenán nárůst celkového obsahu selenu v játrech a mírný nárůst také v ledvinách, avšak speciace selenu se mezi kontrolními skupinami a skupinami se selenem obohacenou stravou nelišila. Také ostatní biochemické parametry (např. hladina cholesterolu, proteinů oxidativního stresu atd.) se

mezi skupinami nelišily. Byl tak prokázán pozitivní vliv suplementace selenu prostřednictvím mikroorganismů na hladinu selenu v těle bez negativních vedlejších účinků na organismus.



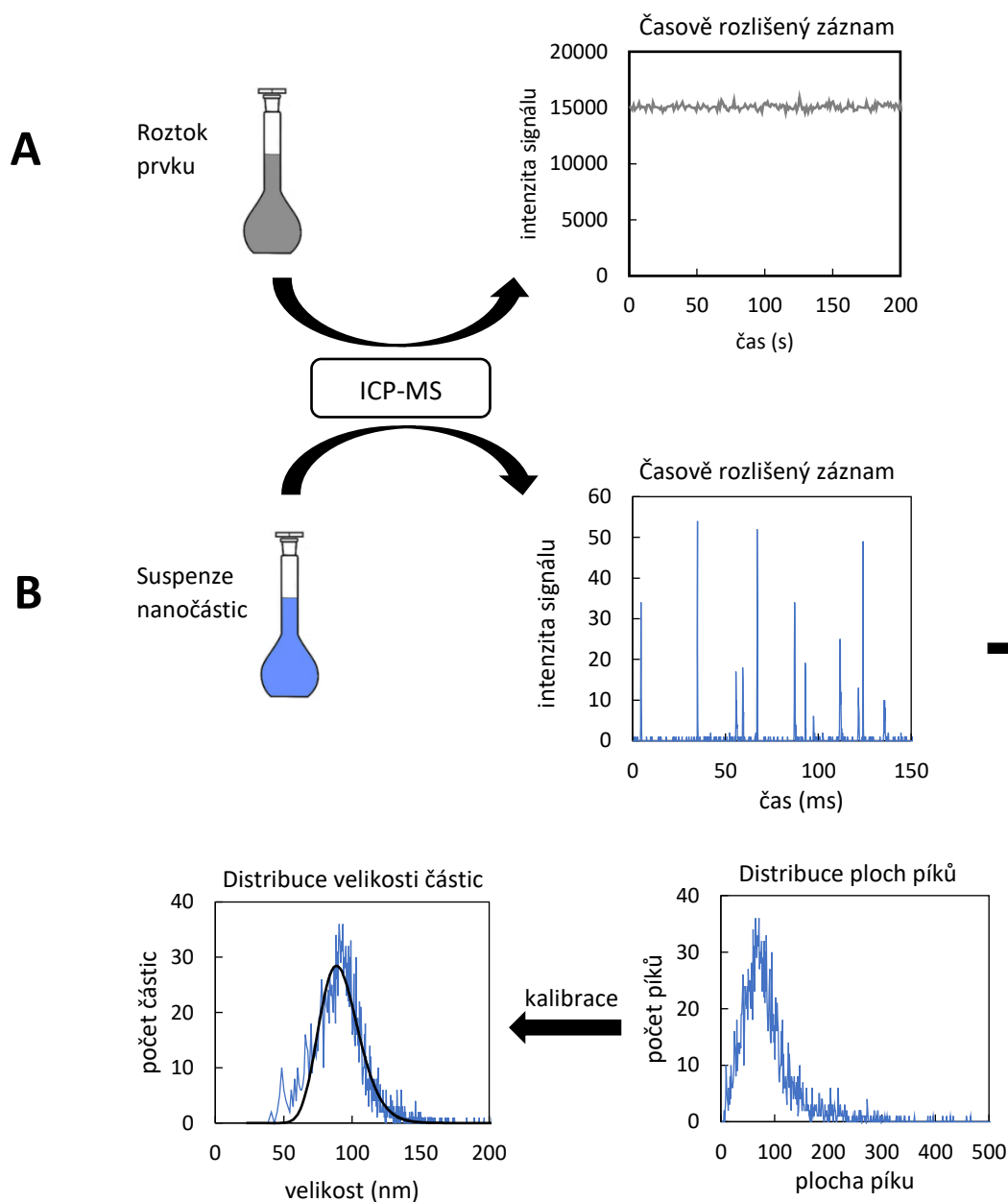
Obrázek 5: Chromatogram extraktu *Streptococcus thermophilus* (A) a *Enterococcus faecium* (B) rostoucích v médiu obsahujícím 10 mg/l seleničitanu: 1-seleničitan, 2-selenocystin, 3-Se-methylselenocystein, 4-selenomethionin.

2.2 Analýza nanočástic

Analýza nanočástic prvků může být realizována mnoha způsoby. Využít lze jak metody optické (například dynamický rozptyl světla) a spektroskopické (například UV-VIS spektrometrie, rentgenová difrakce, Mössbauerova spektroskopie), tak různé druhy elektronové mikroskopie. Kompletní přehled metod charakterizace nanočástic uvádí Mourdikoudis a kol.⁶¹ Z metod využívajících spojení separačních metod s metodami atomové spektrometrie lze uvést příklad analýzy nanočástic platiny pomocí HPLC-ICP-MS⁶², spojení asymetrické frakcionace palem s ICP-MS pro analýzu nanočástic stříbra⁶³ nebo spojení kapilární elektroforézy s ICP-MS taktéž pro analýzu nanočástic stříbra⁶⁴. Všechny tyto metody mají společné to, že pomocí nich mohou být měřeny vždy pouze vybrané vlastnosti nanočástic.

V roce 2003 byla poprvé popsána technika umožňující přímé stanovení anorganických nanočástic metodu ICP-MS. Degueldre a kol.⁶⁵ prokázal, že pomocí ICP-MS mohou být kvantitativně detekovány jednotlivé částice v suspenzi a zavedl koncept ICP-MS v režimu

měření jednotlivých částic označovaný zkratkou sp-ICP-MS. V dnešní době je metoda sp-ICP-MS již úspěšně používána pro charakterizaci anorganických nanočástic a pro studium jejich dopadu na životní prostředí⁶⁶ a živé systémy^{67, 68}, ale její aplikace nejsou omezeny pouze na tyto oblasti. Metoda sp-ICP-MS umožňuje, oproti jiným metodám měření nanočástic, stanovení jak velikosti částic a jejich koncentrace, tak i koncentrace rozpuštěných forem daného prvku v jedné analýze. Zatímco v klasické metodě ICP-MS je do plazmatu zaváděn aerosol obsahující rozpuštěnou formu analytu a je tak detekován signál analytu stabilní v čase, v metodě sp-ICP-MS je do plazmatu zaváděn aerosol suspenze nanočástic, obvykle o koncentraci 10^5 až 10^6 částic/ml, a signál odpovídající nanočásticím je zaznamenán jako rychlý přechodový signál (pík) (Obr. 6). Spojité oblasti záznamu, které neobsahují píky pak odpovídají koncentraci analytu v rozpuštěné formě, podobně jako v případě klasické metody ICP-MS. Hmotnostní analyzátor musí být schopen měřit velmi rychle, protože šířka jednotlivých píků se pohybuje v řádu desetin až jednotek milisekund. Z tohoto důvodu mohou běžné kvadrupólové analyzátory měřit v jedné analýze pouze jeden izotop. Plocha každého píku je úměrná velikosti částice a počet píků je úměrný koncentraci částic ve vzorku. Převod zaznamenané plochy píku na hmotnost prvku a tím na velikost částice a převod počtu píků na koncentraci částic vyžadují správnou kalibraci. Nejjednodušší a nejpresnější kalibrace je založená na použití standardů nanočástic, ale často není možné ji využít z důvodu nedostupnosti těchto materiálů. Proto Pace a kol.⁶⁹ navrhli alternativní postup kalibrace s použitím standardů rozpuštěných forem prvků jako při klasickém měření metodou ICP-MS založený na protokolu pro stanovení účinnosti transportu částic a účinnosti detekce.



Obrázek 6: Srovnání principů metody ICP-MS (A) a sp-ICP-MS (B).

2.2.1 Vývoj metod

Stanovení nanočástic metodou sp-ICP-MS, podobně jako stanovení celkového obsahu prvků metodou ICP-MS, ovlivňuje celá řada parametrů: transportní účinnost vzorku, citlivost signálu, ale také stabilita vlastních nanočástic ve vzorku.

U nanočástic stříbra, které byly použity pro demonstraci vlivu podmínek měření na výsledek stanovení, byla pozorována velmi rychlá degradace nanočástic v suspenzích připravených pouze v demineralizované vodě⁷⁰. Zatímco v demineralizované vodě se

nanočástice stříbra začaly rozpouštět již po několika desítkách minut, v roztoku 0,05% želatiny nedocházelo ani po sedmi hodinách k viditelným změnám ve stabilitě⁷¹. Na takto stabilizované suspenzi nanočástic stříbra byl ukázán vliv podmínek měření:

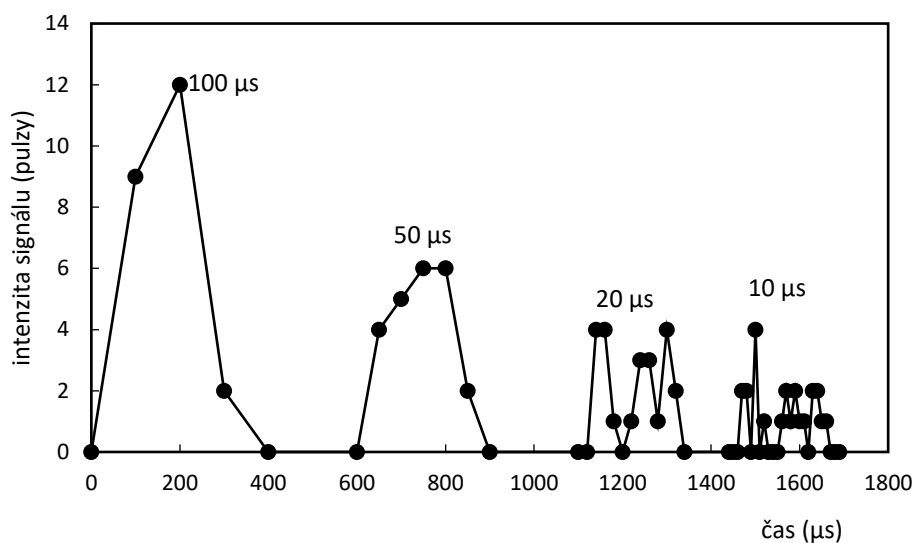
- vyšší příkon do plazmatu vede ke snížení signálu odpovídajícího nanočásticím na rozdíl od jiných autorů, kteří pozorovali nárůst signálu např. u nanočástic zlata⁷². To je způsobeno nižším prvním ionizačním potenciálem stříbra ve srovnání se zlatem, které není při nižších příkonech ionizováno zcela. Při vyšších příkonech tak u stříbra, na rozdíl od zlata, dochází k rychlejší ionizaci již v oblastech plazmatu dále od vstupních kónů do vakua a tím k horšímu transportu iontů.
- průtok argonu zmlžovačem má vliv na tvorbu aerosolu a tím na účinnost transportu vzorku do plazmatu. Účinnost transportu rychle rostla na úroveň přibližně 7 % až do průtoku 0,75 l/min argonu a při vyšších průtocích již byla stabilní. Naopak intenzita signálu vykazovala ostré maximum při průtoku 0,85–0,90 l/min.
- průtok vlastního vzorku do zmlžovače také ovlivňuje transportní účinnost. Vyšší průtok vzorku sice vede dle očekávání k vyššímu množství detekovaných nanočástic, avšak reálná transportní účinnost se snižuje. Tyto jevy jdou proti sobě a je nutné najít kompromis mezi transportní účinností a množstvím detekovaných nanočástic.
- analýza příliš koncentrovaných suspenzí nanočástic, stejně jako analýza příliš malých nanočástic, vede k chybnému stanovení nižší transportní účinnosti, než je skutečná.

Použití metody sp-ICP-MS tedy není z hlediska nastavení ICP-MS příliš robustní a pro správné stanovení velikosti a koncentrace nanočástic je potřeba uvedené parametry řádně optimalizovat.

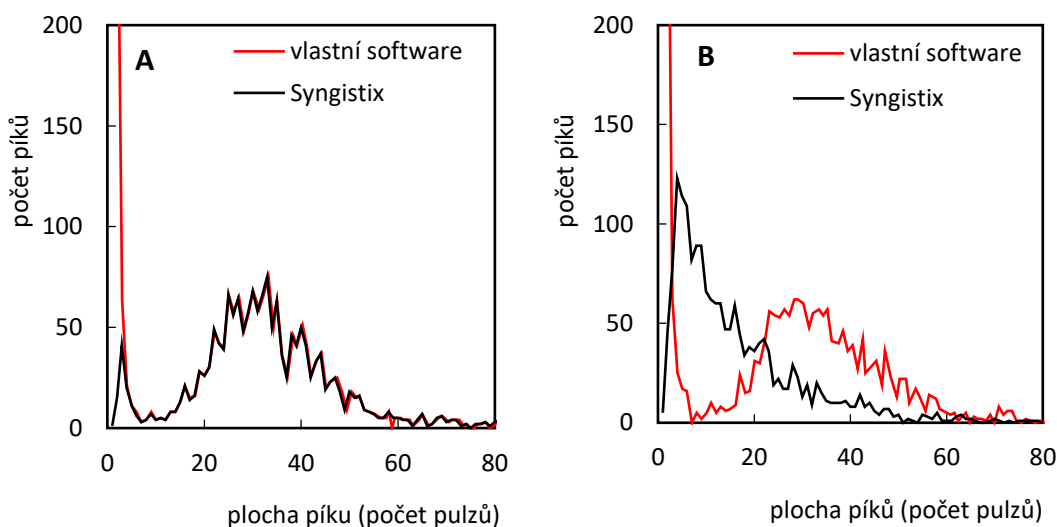
Parametrem, který zásadně ovlivňuje kvalitu naměřených dat je čas snímání signálu, tj. doba měření jednoho bodu časově rozlišeného záznamu. Aby každý pík odpovídal pouze jedné částici a nedocházelo tak ke zkreslení dat vlivem splynutí signálů více částic, musí být analyzovány zředěné suspenze částic nebo musí hmotnostní analyzátor detekovat signály s vysokou frekvencí, aby byly blízké signály rozlišeny. Druhý přístup by měl být výhodnější jak v možnosti analýzy koncentrovanějších suspenzí částic, tak z hlediska detekčních limitů. Hineman et al.⁷³ tvrdí, že rychlejší sběr dat (doba měření jednoho bodu 100 μ s a méně) umožňuje měřit menší částice ve srovnání s daty získanými pomocí delších časů měření díky zvýšení poměru signál/pozadí, což by mohlo vést ke snížení detekčních limitů z hlediska velikosti částic. Dosud však byla publikována pouze měření s časy snímání 50 μ s a více. Měření s časy až 10 μ s, tedy s frekvencí 10^5 Hz, které je dostupné u nových generací ICP-MS firmy PerkinElmer, zatím nebylo důkladněji popsáno a byly tak poprvé studovány důsledky ultrarychlého měření na kvalitu dat získaných metodou sp-ICP-MS.

Nejprve byl sledován vliv rychlosti snímání na tvar výsledného signálu (Obr. 7). Ukázalo se, že celkový signál (plocha píku) jedné nanočástice se při vyšší rychlosti snímání dělí mezi více bodů záznamu a pro jednotlivé body jsou tak naměřeny významně nižší intenzity signálu. Čím je částice menší, tedy čím nižší je celková intenzita signálu, tím delší snímací časy musí být použity, aby nedošlo k deformacím signálu. Při vysokých rychlostech snímání signálu totiž dojde k takové deformaci píku, že se objevují nulové intenzity signálu i tam, kde by měl být signál odpovídající částici (viz Obr. 7, čas snímání 10 μ s). To bohužel vede k tomu, že software Syngistix™ Nano, dodávaný k přístrojům ICP-MS firmy PerkinElmer, identifikuje takto deformovaný pík jako signál několika malých nanočástic namísto jedné větší. Na příkladu nanočástic stříbra bylo ukázáno, že přístroj při ultrarychlém snímání (pod 20 μ s) tedy neumožňuje správné vyhodnocení velikosti nanočástic o velikosti 40 nm a menších. S deformovanými píky si neporadí ani další softwarové moduly vyvinuté pro vyhodnocení měření sp-ICP-MS, kterými jsou Single Particle Calculation Tool⁷⁴ nebo Nanocount⁷⁵. Z tohoto důvodu byl vyvinut vlastní software⁷⁶. Software již během načítání souboru umožňuje dle zvolených parametrů filtraci dat, která nenesou informaci, čímž se významně sníží objem zpracovávaných dat, kdy v časově rozlišeném záznamu může být až 6 000 000 naměřených bodů. Také jsou ihned detekovány jednotlivé píky, u nichž jsou vypočteny parametry jako šířka u základny a plocha. Software již tedy při dalším zpracování nepracuje s primárními daty, čímž se celý proces významně zrychlí. Také umožňuje variabilní nastavení délky nulového signálu (či pozadí), který odděluje signály jednotlivých nanočástic, čímž definuje míru deformace píku identifikovanou jako signál částice. Podařilo se tak dosáhnout významného zlepšení vyhodnocení dat (Obr. 8) při měření menších nanočástic (40 nm) i při rychlém snímání signálu (10 μ s). Tím se otevřela cesta k ověření možnosti snížení detekčních limitů při rychlém snímání signálu.

Vliv rychlosti snímání signálu na mez detekce z hlediska velikosti nanočástic byl sledován opět pro nanočástice stříbra a k vyhodnocení byl použit vlastní software. Ukázalo se však, navzdory předpokladům v literatuře, že snižování času snímání signálu pod 100 μ s již zlepšení detekčních limitů nepřináší a ty jsou srovnatelné (10–11 nm).⁷⁷ U malých nanočástic bylo navíc ukázáno, že v důsledku transportních jevů je účinnost jejich detekce nižší. Pouze 5 % nanočástic stříbra o průměru 14 nm dosáhne detektoru, zatímco u částic o velikosti 20 nm je tento podíl 44 % a teprve 30 nm částice dosáhly detektoru všechny, přičemž tyto podíly nebyly ovlivněny rychlostí snímání signálu. Přínos ultrarychlého snímání signálu je tedy u metody sp-ICP-MS značně omezený, a to jak z hlediska potřeby vyhodnocení signálu, tak z hlediska výsledných parametrů metody.



Obrázek 7: Profil signálu nanočástice stříbra (40 nm) měřený při časech snímání jednotlivých bodů 100 μ s, 50 μ s, 20 μ s a 10 μ s.



Obrázek 8: Histogram ploch píků získaný metodou sp-ICP-MS pro nanočástice stříbra o velikosti 40 nm při čase snímání signálu 100 μ s (A) a 10 μ s (B). Porovnání vyhodnocení komerčním softwarem Syngistix a vlastním softwarem.

2.2.2 Robustnost metod

Demineralizovaná voda je rozpouštědlem nejkompatibilnějším s metodou ICP-MS, avšak takto ideální vzorky zpravidla k dispozici nejsou. Analýzu nanočástic metodou sp-ICP-MS lze samozřejmě provést také ve složitějších maticích, avšak to vyžaduje, aby vyvinuté metody byly robustní vůči matričním vlivům. Velkým problémem u metody sp-ICP-MS jsou,

podobně jako při stanovení celkového obsahu prvků nebo při speciální analýze s využitím metody ICP-MS, nespektrální interference. Ty mají stejný původ jako při tradiční ICP-MS, avšak mírně odlišné důsledky. Nejzásadnější rozdíl je ten, že pokles či zesílení signálu daný nespektrálními interferencemi se na stanoveném průměru nanočástic projeví v menší míře. Ve výpočtu průměru nanočástic totiž vystupuje třetí odmocnina intenzity signálu. Z tohoto důvodu je vliv nespektrálních interferencí u metody sp-ICP-MS menší než u tradičního stanovení prvků metodou ICP-MS a byl tak dlouhou dobu přehlížen. Ukázalo se však, že v řadě případů nelze vliv matrice ignorovat, zvláště při analýze nezředitelných vzorků.

Při analýze nanočástic v biologických vzorcích se významně projevuje vliv přítomnosti chloridu sodného, který je součástí všech biologických tekutin. Nespektrální interference vlivem solí nastávají jak při zmlžování vzorku v důsledku změny iontové síly roztoku, tak v důsledku ovlivnění ionizační rovnováhy v plazmatu.⁷⁸ Již poměrně malé množství chloridu sodného (450 mg/l, tj. 20× zředěný fyziologický roztok) vede k podhodnocení velikosti nanočástic stříbra o 15 %, přičemž k významnému zkreslení číselné koncentrace nanočástic dochází až při koncentraci 4500 mg/l NaCl.⁷⁹ Podobně byl zaznamenán vliv povrchově aktivních látek (proteiny, lipidy apod.) a sloučenin uhlíku přítomných ve vzorcích na přesnost stanovení. Zde byly tyto látky simulovány roztokem methanolu, v jehož přítomnosti docházelo k nadhodnocení velikosti nanočástic stříbra o 6 % při koncentracích methanolu 2 % (v/v) a vyšších.

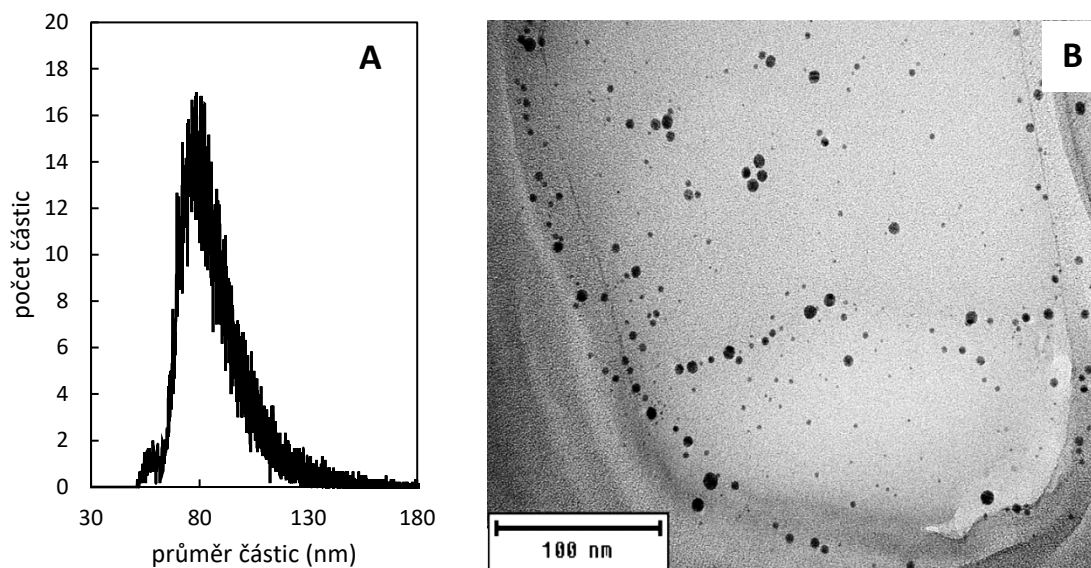
Jak již bylo uvedeno, kvůli rychlosti snímání signálu lze měřit metodou sp-ICP-MS pouze jeden izotop v jedné analýze a nelze tak využít eliminaci nespektrálních interferencí metodou vnitřního standardu. Jedinou možností eliminace těchto interferencí pomocí kalibrace tak zůstává využití kalibračních roztoků s modelovou maticí, což lze aplikovat pouze za předpokladu známé matrice u vzorků. Není-li matrice vzorku dobře definována, lze vliv matrice redukovat v nejjednodušším případě jejím dostatečným naředěním. Ředění vzorku je omezeno pouze zachováním dostatečné číselné koncentrace nanočástic. V případě, že vzorek obsahuje příliš málo nanočástic a nelze ho dostatečně naředit, se nabízí ještě možnost nanočástice ze vzorku extrahovat a matici tak odstranit. Je však nutné zajistit, aby vlastní extrakční činidla nepůsobila další nespektrální interference. Vliv použití roztoků methanolu, ethanolu a dodecylsulfátu sodného (SDS) jako extrakčních činidel byl sledován na příkladu stanovení nanočástic stříbra.⁸⁰ Nespektrální interference v tomto případě nastávají jak ovlivněním ionizační rovnováhy v plazmatu v důsledku vyšší tenze par organických rozpouštědel či přenosu náboje prostřednictvím iontů uhlíku, tak v důsledku ovlivnění účinnosti zmlžování a transportu vlivem změny povrchového napětí roztoku^{78, 81}. Vliv nespektrálních

interferencí se projevuje již při nízkých koncentracích činidel a pro dosažení přesnosti stanovení jak velikosti, tak číselné koncentrace nanočástic bez použití kalibrace s přidavkem modelové matrice bylo možno použít jako matrici pouze roztok methanolu do koncentrace 0,1 %. Pro tuto matrici byla stanovena mez detekce 33 nm z hlediska velikosti nanočástic stříbra a přibližně 5300 částic/ml z hlediska jejich číselné koncentrace.

2.2.3 Aplikace metod

Optimalizovaná metodika sp-ICP-MS byla aplikována na analýzu neředěné říční vody z Vltavy⁷¹. Bylo zjištěno, že nanočástice na různých místech odběru tvořily 2–15 % podíl na celkovém obsahu stříbra a průměrná velikost nanočástic se pohybovala od 42 do 72 nm. Je však nutné poznamenat, že výsledky jsou zatíženy poměrně velkou nejistotou z důvodu nízké číselné koncentrace nanočástic, která byla pouze 340 ± 140 až 1670 ± 250 částic/ml vody. Výsledky však demonstrují, že metodu sp-ICP-MS lze s úspěchem použít i na přímou analýzu velmi zředěných vzorků, ve kterých by bylo nemožné jinými metodami velikost a číselnou koncentraci nanočástic stanovit. U metod, které umožňují současné stanovení jak velikosti, tak počtu nanočástic, se detekční limity pohybují od 10^5 až 10^6 částic/ml v případě nejcitlivější optické metody detekce laserem indukovaného zániku (LIBD)⁸², přes 10^{11} částic/ml v případě metody distribuce velikosti částic (PSD)⁸³, až po 10^8 až 10^{15} částic/ml v případě běžně používaných metod dynamického rozptylu světla⁸⁴. V případě zakoncentrování vzorku, například extrakcí s využitím zákalu micelárních roztoků, lze číselné koncentrace v řádu desítek až stovek částic/ml stanovit v říční vodě také atomovou absorpční spektrometrií s elektrotermickou atomizací, avšak tato metoda neumožňuje stanovení velikosti těchto nanočástic.⁸⁵

Nanočástice byly metodou sp-ICP-MS stanoveny také v kosmetických přípravcích, na jejichž obale bylo uvedeno, že obsahují nanočástice stříbra.⁸⁰ Matrice těchto vzorků jsou ve srovnání s říční vodou mnohem složitější a komplikací je také obsah většího množství lipidů v řadě kosmetických přípravků. Ty byly proto rozpuštěny a naředěny 0,1% (v/v) methanolem v poměru 1:100 (hmotnost vzorku:objem roztoku methanolu). Průměrná velikost nalezených nanočástic se pohybovala od 47 do 80 nm, avšak distribuce velikostí byly poměrně široké a velikost všech částic se pohybovala mezi 30–170 nm (Obr. 9A). Nanočástice stříbra však nebyly detekovány ve všech vzorcích, a to zejména kvůli detekčnímu limitu metody sp-ICP-MS, který byl přibližně 30 nm. V ostatních vzorcích byla transmisí elektronovou mikroskopií prokázána přítomnost nanočástic stříbra o velikosti pouze pod 10 nm (Obr. 9B).



Obrázek 9: Histogram velikosti nanočástic stříbra získaný metodou sp-ICP-MS měřením vzorku balzámu po holení (A) a snímek z transmisního elektronového mikroskopu vzorku plet'ového tonika (B).

3. Závěr

V habilitační práci je shrnut současný stav prvkové speciační analýzy a jsou v ní popsány dosažené příspěvky k tématu. Použitím iontově-párové kapalinové chromatografie bylo dosaženo separace souboru nejčastěji stanovovaných specií selenu a arsenu, přičemž byl ukázán potenciál rozšíření metody na řadu dalších specií. Kromě analýzy anorganických a organických specií byly rozšířeny možnosti analýz anorganických nanočástic metodou ICP-MS, kde byly vyvinuty metody pro zpracování dat získaných ultrarychlým snímáním signálu. U všech vyvinutých metodik metod byly také zmapovány nespektrální interference pro vývoj robustních metod. Všechny byly aplikovány na různé typy vzorků, na nichž byla prokázána praktická využitelnost. Závěrem lze říci, že i přes dlouhý rozvoj metodik speciační analýzy stále zbývají oblasti k řešení, aby se podařilo dosáhnout rutinního použití těchto metod.

4. Literatura

1. Siddiqui, M. R.; AlOthman, Z. A.; Rahman, N., Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S1409-S1421.
2. Calabria, D.; Calabretta, M. M.; Zangheri, M.; Marchegiani, E.; Trozzi, I.; Guardigli, M.; Michelini, E.; Di Nardo, F.; Anfossi, L.; Baggiani, C.; Mirasoli, M., Recent Advancements in Enzyme-Based Lateral Flow Immunoassays. *Sensors-Basel* **2021**, *21*, 3358.
3. Hernandez, F.; Bakker, J.; Bijlsma, L.; de Boer, J.; Botero-Coy, A. M.; de Bruin, Y. B.; Fischer, S.; Hollender, J.; Kasprzyk-Hordern, B.; Lamoree, M.; Lopez, F. J.; ter Laak, T. L.; van Leerdam, J. A.; Sancho, J. V.; Schymanski, E. L.; de Voogt, P.; Hogendoorn, E. A., The role of analytical chemistry in exposure science: Focus on the aquatic environment. *Chemosphere* **2019**, *222*, 564-583.
4. Naviglio, D.; Gallo, M., Application of Analytical Chemistry to Foods and Food Technology. *Foods* **2020**, *9* (9), 1296.
5. Castillo-Peinado, L. S.; de Castro, M. D. L., An overview on forensic analysis devoted to analytical chemists. *Talanta* **2017**, *167*, 181-192.
6. Nordberg, M.; Duffus, J. H.; Templeton, D. M., Glossary of terms used in toxicokinetics - (IUPAC Recommendations 2003). *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76* (5), 1033-1082.
7. Yamauchi, S.; Sakai, Y.; Aimi, H., Iron speciation in iron-rich wood by Mössbauer spectroscopy. *J. Wood Sci.* **2011**, *57* (6), 549-552.
8. Fu, B.; Hower, J. C.; Dai, S.; Mardon, S. M.; Liu, G., Determination of Chemical Speciation of Arsenic and Selenium in High-As Coal Combustion Ash by X-ray Photoelectron Spectroscopy: Examples from a Kentucky Stoker Ash. *ACS Omega* **2018**, *3* (12), 17637-17645.
9. Nanganoa, L. T.; Njukeng, J. N., Phosphorus Speciation by ³¹P NMR Spectroscopy in Leaf Litters and Crop Residues from Para Rubber, Cocoa, Oil Palm, and Banana Plantations in the Humid Forest Zone of Cameroon. *J. Appl. Chem.* **2018**, 6290236.
10. Chassaigne, H.; Vacchina, V.; Łobiński, R., Elemental speciation analysis in biochemistry by electrospray mass spectrometry. *TrAC Trends Analyt. Chem.* **2000**, *19* (5), 300-313.
11. Liu, Y.-M.; Cheng, J.-K., Elemental speciation analysis in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2003**, *24* (1213), 1993-2012.
12. Batley, G. E.; Apte, S. C., Elemental Speciation | Waters, Sediments, and Soils. In *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, Worsfold, P.; Poole, C.; Townshend, A.; Miró, M., Eds. Academic Press: Oxford, 2019; pp 23-30.
13. Dubascoux, S.; Le Hécho, I.; Hassellöv, M.; Von Der Kammer, F.; Potin Gautier, M.; Lespes, G., Field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometer coupling: History, development and applications. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25* (5), 613-623.
14. Michalski, R.; Jabłońska-Czapla, M.; Łyko, A.; Szopa, S., Hyphenated Methods for Speciation Analysis. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd. **2013**, 1-17.
15. Fytianos, G.; Rahdar, A.; Kyzas, G. Z., Nanomaterials in Cosmetics: Recent Updates. *Nanomaterials (Basel)* **2020**, *10* (5), 979.
16. Singh, T.; Shukla, S.; Kumar, P.; Wahla, V.; Bajpai, V. K., Application of Nanotechnology in Food Science: Perception and Overview. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1501.
17. Siddiqi, K. S.; Husen, A.; Rao, R. A. K., A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 14.

18. Jimenez-Lamana, J.; Abad-Alvaro, I.; Bierla, K.; Laborda, F.; Szpunar, J.; Lobinski, R., Detection and characterization of biogenic selenium nanoparticles in selenium-rich yeast by single particle ICPMS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2018**, 33 (3), 452-460.
19. Evropská komise, Nařízení komise (EU) 2015/1006.
20. Evropská komise, Nařízení komise (EU) 2018/725.
21. Evropská komise, Nařízení komise (EU) 276/2010.
22. Evropský parlament a rada Evropské unie, Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009.
23. Wolle, M. M.; Conklin, S. D.; Wittenberg, J., Matrix-induced transformation of arsenic species in seafoods. *Anal. Chim. Acta* **2019**, 1060, 53-63.
24. Mulugeta, M.; Wibetoe, G.; Engelsens, C. J.; Lund, W., Optimization of an anion-exchange high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometric method for the speciation analysis of oxyanion-forming metals and metalloids in leachates from cement-based materials. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217 (40), 6186-6194.
25. Marcinkowska, M.; Baralkiewicz, D., Multielemental speciation analysis by advanced hyphenated technique - HPLC/ICP-MS: A review. *Talanta* **2016**, 161, 177-204.
26. Mehdi, Y.; Hornick, J. L.; Istasse, L.; Dufrasne, I., Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules* **2013**, 18 (3), 3292-3311.
27. LeBlanc, K. L.; Mester, Z., Compilation of selenium metabolite data in selenized yeasts. *Metallomics* **2021**, 13 (6), mfab031.
28. Pedrero, Z.; Madrid, Y., Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 634 (2), 135-152.
29. Eichler, Š.; Kaňa, A.; Kalousová, M.; Vosmanská, M.; Korotvička, M.; Zima, T.; Mestek, O., Speciation analysis of selenium in human urine by liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for monitoring of selenium in body fluids. *Chem. Spec. Bioavail.* **2015**, 27 (3), 127-138.
30. Reid, M. S.; Hoy, K. S.; Schofield, J. R. M.; Uppal, J. S.; Lin, Y. W.; Lu, X. F.; Peng, H. Y.; Le, X. C., Arsenic speciation analysis: A review with an emphasis on chromatographic separations. *TrAC Trend Anal. Chem.* **2020**, 123, 115770.
31. Kaňa, A.; Klimšová, Z.; Sedlecká, L.; Mestek, O., Analysis of Cationic Species of Arsenic in Seafood. *Chem. Listy* **2018**, 112 (9), 575-582.
32. Kaňa, A.; Sadowska, M.; Kvíčala, J.; Mestek, O., Simultaneous determination of oxo- and thio-arsenic species using HPLC-ICP-MS. *J. Food Compos. Anal.* **2020**, 92, 103562.
33. Raml, R.; Goessler, W.; Francesconi, K. A., Improved chromatographic separation of thio-arsenic compounds by reversed-phase high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1128 (1-2), 164-170.
34. Ferreira, S. L. C.; Caires, A. O.; Borges, T. D.; Lima, A. M. D. S.; Silva, L. O. B.; dos Santos, W. N. L., Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs. *Microchem. J.* **2017**, 131, 163-169.
35. Balaram, V., Strategies to overcome interferences in elemental and isotopic geochemical analysis by quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry: A critical evaluation of the recent developments. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **2021**, 35 (10), e9065.
36. Mestek, O.; Kaňa, A.; Eichler, S.; Hofmanová, E., The use of inductively coupled plasma mass spectrometry for the evaluation of the mobility of iodine in bentonite. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2014**, 94 (3), 255-268.
37. Holdship, P.; Bonnand, P.; Price, D.; Watson, P., Micro flow injection ICP-MS analysis of high matrix samples: an investigation of its capability to measure trace elements in iron meteorites. *J. Anal. At. Spectrom.* **2018**, 33 (11), 1941-1953.

38. Carter, J. A.; Barros, A. I.; Nobrega, J. A.; Donati, G. L., Traditional Calibration Methods in Atomic Spectrometry and New Calibration Strategies for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 504.
39. Kaňa, A.; Klimšová, Z.; Mestek, O., Internal standardisation for arsenic and its species determination using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **2019**, *192*, 86-92.
40. Korvela, M.; Andersson, M.; Pettersson, J., Internal standards in inductively coupled plasma mass spectrometry using kinetic energy discrimination and dynamic reaction cells. *J. Anal. At. Spectrom.* **2018**, *33* (10), 1770-1776.
41. Vohlídal, J.; Julák, A.; Štulík, K., *Chemické a analytické tabulky*. Grada Publishing, spol.s.r.o.: Praha, 1999.
42. Vogl, J.; Pritzkow, W., Isotope Dilution Mass Spectrometry - A Primary Method of Measurement and Its Role for RM Certification. *Mapan-J. Metrol. Soc. I* **2010**, *25* (3), 135-164.
43. Rodriguez-Gonzalez, P.; Marchante-Gayon, J. M.; Alonso, J. I. G.; Sanz-Medel, A., Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. *Spectrochim. Acta B* **2005**, *60* (2), 151-207.
44. Krata, A. A.; Wojciechowski, M.; Karasinski, J.; Bulska, E., Comparative study of high performance liquid chromatography species-specific and species-unspecific isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. A case study of selenomethionine and the origin of its oxidized form. *Microchem. J.* **2018**, *143*, 416-422.
45. Kaňa, A.; Koplík, R.; Eichler, Š.; Mestek, O., Software Solution for Post-Column Isotope Dilution Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Lett.* **2013**, *46* (15), 2430-2443.
46. Gupta, M.; Gupta, S., An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. *Front. Plant. Sci.* **2016**, *7*, 2074.
47. Adadi, P.; Barakova, N. V.; Muravyov, K. Y.; Krivoschapkina, E. F., Designing selenium functional foods and beverages: A review. *Food Res. Int.* **2019**, *120*, 708-725.
48. Juniper, D. T.; Phipps, R. H.; Ramos-Morales, E.; Bertin, G., Effect of dietary supplementation with selenium-enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in beef cattle. *J. Anim. Sci.* **2008**, *86* (11), 3100-3109.
49. Martinez, F. G.; Moreno-Martin, G.; Pescuma, M.; Madrid-Albarran, Y.; Mozzi, F., Biotransformation of Selenium by Lactic Acid Bacteria: Formation of Seleno-Nanoparticles and Seleno-Amino Acids. *Front. Bioeng. Biotech.* **2020**, *8*, 506.
50. Alzate, A.; Canas, B.; Perez-Munguia, S.; Hernandez-Mendoza, H.; Perez-Conde, C.; Gutierrez, A. M.; Camara, C., Evaluation of the inorganic selenium biotransformation in selenium-enriched yogurt by HPLC-ICP-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (24), 9776-9783.
51. Drahoňovský, J.; Száková, J.; Mestek, O.; Tremlová, J.; Kaňa, A.; Najmanová, J.; Tlustoš, P., Selenium uptake, transformation and inter-element interactions by selected wildlife plant species after foliar selenate application. *Environ. Exp. Bot.* **2016**, *125*, 12-19.
52. Šindelářová, K.; Száková, J.; Tremlová, J.; Mestek, O.; Praus, L.; Kaňa, A.; Najmanová, J.; Tlustoš, P., The response of broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*) varieties on foliar application of selenium: uptake, translocation, and speciation. *Food Addit. Contam. A* **2015**, *32* (12), 2027-2038.
53. Revelou, P.-K.; Xagoraris, M.; Kokotou, M. G.; Constantinou-Kokotou, V., Cruciferous vegetables as functional foods: effects of selenium biofortification. *Int. J. Veg. Sci.* **2021**, 1-20.

54. Lazo-Vélez, M. A.; Chávez-Santoscoy, A.; Serna-Saldivar, S. O., Selenium-Enriched Breads and Their Benefits in Human Nutrition and Health as Affected by Agronomic, Milling, and Baking Factors. *Cereal Chem.* **2015**, 92 (2), 134-144.
55. Pérez-Corona, M. T.; Sánchez-Martínez, M.; Valderrama, M. J.; Rodríguez, M. E.; Cámara, C.; Madrid, Y., Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments. *Food Chem.* **2011**, 124 (3), 1050-1055.
56. Sánchez-Martínez, M.; Da Silva, E. G. P.; Pérez-Corona, T.; Cámara, C.; Ferreira, S. L. C.; Madrid, Y., Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC–ICP-MS. *Talanta* **2012**, 88, 272-276.
57. Alzate, A.; Pérez-Conde, M. C.; Gutiérrez, A. M.; Cámara, C., Selenium-enriched fermented milk: A suitable dairy product to improve selenium intake in humans. *Int. Dairy J.* **2010**, 20 (11), 761-769.
58. García-Burgos, M.; Moreno-Fernández, J.; Alférez, M. J. M.; Díaz-Castro, J.; López-Aliaga, I., New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. *J. Funct. Foods* **2020**, 72, 104059.
59. Krausová, G.; Kaňa, A.; Hyršlová, I.; Mrvíková, I.; Kavková, M., Development of Selenized Lactic Acid Bacteria and their Selenium Bioaccumulation Capacity. *Fermentation-Basel* **2020**, 6 (3), 91.
60. Krausová, G.; Kaňa, A.; Vecka, M.; Hyršlová, I.; Staňková, B.; Kantorová, V.; Mrvíková, I.; Huttel, M.; Malínská, H., In Vivo Bioavailability of Selenium in Selenium-Enriched *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium* in CD IGS Rats. *Antioxidants-Basel* **2021**, 10 (3), 463.
61. Mourdikoudis, S.; Pallares, R. M.; Thanh, N. T. K., Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* **2018**, 10 (27), 12871-12934.
62. Yang, Y.; Luo, L.; Li, H.-P.; Wang, Q.; Yang, Z.-G.; Qu, Z.-P.; Ding, R., Analysis of metallic nanoparticles and their ionic counterparts in complex matrix by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICP-MS. *Talanta* **2018**, 182, 156-163.
63. Taboada-López, M. V.; Bartczak, D.; Cuello-Núñez, S.; Goenaga-Infante, H.; Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A., AF4-UV-ICP-MS for detection and quantification of silver nanoparticles in seafood after enzymatic hydrolysis. *Talanta* **2021**, 232, 122504.
64. Michalke, B.; Vinković-Vrček, I., Speciation of nano and ionic form of silver with capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2018**, 1572, 162-171.
65. Degueldre, C.; Favarger, P. Y., Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study. *Colloid Surf. A* **2003**, 217 (1-3), 137-142.
66. Flores, K.; Turley, R. S.; Valdes, C.; Ye, Y. Q.; Cantu, J.; Hernandez-Viezas, J. A.; Parsons, J. G.; Gardea-Torresdey, J. L., Environmental applications and recent innovations in single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS). *Appl. Spectrosc. Rev.* **2021**, 56 (1), 1-26.
67. Ishizaka, T.; Nagano, K.; Tasaki, I.; Tao, H.; Gao, J. Q.; Harada, K.; Hirata, K.; Saito, S.; Tsujino, H.; Higashisaka, K.; Tsutsumi, Y., Optimization and Evaluation of Pretreatment Method for sp-ICP-MS to Reveal the Distribution of Silver Nanoparticles in the Body. *Nanoscale Res. Lett.* **2019**, 14, 180.
68. Monikh, F. A.; Chupani, L.; Zuskova, E.; Peters, R.; Vancova, M.; Vijver, M. G.; Porcal, P.; Peijnenburg, W. J. G. M., Method for Extraction and Quantification of Metal-Based Nanoparticles in Biological Media: Number-Based Biodistribution and Bioconcentration. *Environ. Sci. Technol.* **2019**, 53 (2), 946-953.

69. Pace, H. E.; Rogers, N. J.; Jarolimek, C.; Coleman, V. A.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F., Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2011**, 83 (24), 9361-9369.
70. Loeschner, K.; Navratilova, J.; Købler, C.; Mølhave, K.; Wagner, S.; Von Der Kammer, F.; Larsen, E. H., Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405 (25), 8185-8195.
71. Loula, M.; Kaňa, A.; Koplík, R.; Hanuš, J.; Vosmanská, M.; Mestek, O., Analysis of Silver Nanoparticles Using Single-Particle Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS): Parameters Affecting the Quality of Results. *Anal. Lett.* **2019**, 52 (2), 288-307.
72. Kinnunen, V.; Perämäki, S.; Matilainen, R., Optimization of instrumental parameters for improving sensitivity of single particle inductively-coupled plasma mass spectrometry analysis of gold. *Spectrochim. Acta B* **2021**, 177, 106104.
73. Hineman, A.; Stephan, C., Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality. *J. Anal. At. Spectrom.* **2014**, 29 (7), 1252-1257.
74. Wageningen Food Safety Research: Single Particle Calculation tool. <http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Research-Institutes/rikilt/show/Single-Particle-Calculation-tool.htm> (accessed 31.8.2021).
75. Cornelis G.: Nanocount. <http://blogg.slu.se/nanocount/category/description/> (accessed 31.8.2021).
76. Kaňa, A.; Loula, M.; Koplík, R.; Vosmanská, M.; Mestek, O., Peak bordering for ultrafast single particle analysis using ICP-MS. *Talanta* **2019**, 197, 189-198.
77. Mestek, O.; Loula, M.; Kaňa, A.; Vosmanská, M., Can ultrafast single-particle analysis using ICP-MS affect the detection limit? Case study: Silver nanoparticles. *Talanta* **2020**, 210, 120665.
78. Wilschefske, S.; Baxter, M., Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin. Biochem. Rev.* **2019**, 40 (3), 115-133.
79. Loula, M.; Kaňa, A.; Mestek, O., Non-spectral interferences in single-particle ICP-MS analysis: An underestimated phenomenon. *Talanta* **2019**, 202, 565-571.
80. Kantorová, V.; Loula, M.; Kaňa, A.; Mestek, O., Determination of silver nanoparticles in cosmetics using single particle ICP-MS. *Chem. Pap.* **2021**, 75, 5895–5905
81. Nakazawa, T.; Suzuki, D.; Sakuma, H.; Furuta, N., Comparison of signal enhancement by co-existing carbon and by co-existing bromine in inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2014**, 29 (7), 1299-1305.
82. Bundschuh, T.; Knopp, R.; Kim, J. I., Laser-induced breakdown detection (LIBD) of aquatic colloids with different laser systems. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, 177 (1), 47-55.
83. Clement, S.; Gardner, B.; Razali, W. A. W.; Coleman, V. A.; Jämting, Å. K.; Catchpoole, H. J.; Goldys, E. M.; Herrmann, J.; Zvyagin, A., Quantification of nanoparticle concentration in colloidal suspensions by a non-destructive optical method. *Nanotechnology* **2017**, 28 (47), 475702.
84. Austin, J.; Minelli, C.; Hamilton, D.; Wywijas, M.; Jones, H. J., Nanoparticle number concentration measurements by multi-angle dynamic light scattering. *J. Nanopart. Res.* **2020**, 22 (5), 108.
85. Wimmer, A.; Markus, A. A.; Schuster, M., Silver Nanoparticle Levels in River Water: Real Environmental Measurements and Modeling Approaches—A Comparative Study. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2019**, 6 (6), 353-358.

5. Seznam publikací

Přehled publikací v časopisech, z nichž publikace použité v habilitační práci jsou zvýrazněny tučným písmem a jejich kopie jsou uvedeny v kapitole 6. Řazení publikací je chronologické od nejnovějších.

- [1] **Krausová, G.; Kaňa, A.; Vecka, M.; Hyršlová, I.; Staňková, B.; Kantorová, V.; Mrvíková, I.; Huttel, M.; Malínská, H., In Vivo Bioavailability of Selenium in Selenium-Enriched *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium* in CD IGS Rats. *Antioxidants-Basel* 2021, 10 (3), 463.**
- [2] Popov, M.; Zemanová, V.; Säcký, J.; Pavlík, M.; Leonhardt, T.; Matoušek, T.; Kaňa, A.; Pavlíková, D.; Kotrba, P., Arsenic accumulation and speciation in two cultivars of *Pteris cretica* L. and characterization of arsenate reductase PcACR2 and arsenite transporter PcACR3 genes in the hyperaccumulating cv. *Albo-lineata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021, 216, 112196.
- [3] **Kantorová, V.; Loula, M.; Kaňa, A.; Mestek, O., Determination of silver nanoparticles in cosmetics using single particle ICP-MS. *Chem. Pap.* 2021, 75, 5895–5905.**
- [4] Hyršlová, I.; Krausová, G.; Smolová, J.; Staňková, B.; Branyik, T.; Malínská, H.; Huttel, M.; Kaňa, A.; Čurda, L.; Doskočil, I., Functional Properties of *Chlorella vulgaris*, Colostrum, and *Bifidobacteria*, and Their Potential for Application in Functional Foods. *Appl. Sci.-Basel* 2021, 11 (11), 93.
- [5] Hyršlová, I.; Krausová, G.; Michlová, T.; Kaňa, A.; Čurda, L., Fermentation Ability of Bovine Colostrum by Different Probiotic Strains. *Fermentation-Basel* 2020, 6 (3).
- [6] **Mestek, O.; Loula, M.; Kaňa, A.; Vosmanská, M., Can ultrafast single-particle analysis using ICP-MS affect the detection limit? Case study: Silver nanoparticles. *Talanta* 2020, 210, 120665.**
- [7] **Kaňa, A.; Sadowska, M.; Kvíčala, J.; Mestek, O., Simultaneous determination of oxo- and thio-arsenic species using HPLC-ICP-MS. *J. Food Compos. Anal.* 2020, 92, 103562.**
- [8] **Krausová, G.; Kaňa, A.; Hyršlová, I.; Mrvíková, I.; Kavková, M., Development of Selenized Lactic Acid Bacteria and their Selenium Bioaccumulation Capacity. *Fermentation-Basel* 2020, 6 (3), 91.**
- [9] **Loula, M.; Kaňa, A.; Koplík, R.; Hanuš, J.; Vosmanská, M.; Mestek, O., Analysis of Silver Nanoparticles Using Single-Particle Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS): Parameters Affecting the Quality of Results. *Anal. Lett.* 2019, 52 (2), 288-307.**
- [10] **Kaňa, A.; Loula, M.; Koplík, R.; Vosmanská, M.; Mestek, O., Peak bordering for ultrafast single particle analysis using ICP-MS. *Talanta* 2019, 197, 189-198.**
- [11] **Loula, M.; Kaňa, A.; Mestek, O., Non-spectral interferences in single-particle ICP-MS analysis: An underestimated phenomenon. *Talanta* 2019, 202, 565-571.**
- [12] **Kaňa, A.; Klimšová, Z.; Mestek, O., Internal standardisation for arsenic and its species determination using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 2019, 192, 86-92.**
- [13] Beneš, V.; Leonhardt, T.; Kaňa, A.; Säcký, J.; Kotrba, P., Heterologous expression of Zn-binding peptide RaZBP1 from *Russula bresadolae* does not overcome Zn and Cd

detoxification mechanisms in *Hebeloma mesophaeum*. *Folia Microbiol.* **2019**, *64* (6), 835-844.

- [14] Kaňa, A.; Klimšová, Z.; Sedlecká, L.; Mestek, O., Analysis of Cationic Species of Arsenic in Seafood. *Chem. Listy* **2018**, *112* (9), 575-582.
- [15] Melčová, M.; Száková, J.; Mlejnek, P.; Zidek, V.; Fučíková, A.; Praus, L.; Zídková, J.; Mestek, O.; Kaňa, A.; Mikulík, K.; Tlustoš, P., The effect of zinc and/or vitamin E supplementation on biochemical parameters of selenium-overdosed rats. *Pol. J. Vet. Sci.* **2018**, *21* (4), 731-740.
- [16] Rýdlová, M.; Runová, K.; Száková, J.; Fučíková, A.; Hakenová, A.; Mlejnek, P.; Zidek, V.; Tremlová, J.; Mestek, O.; Kaňa, A.; Zídková, J.; Melčová, M.; Truhlářová, K.; Tlustoš, P., The Response of Macro- and Micronutrient Nutrient Status and Biochemical Processes in Rats Fed on a Diet with Selenium-Enriched Defatted Rapeseed and/or Vitamin E Supplementation. *Biomed Res. Int.* **2017**, 6759810.
- [17] Drahoňovský, J.; Száková, J.; Mestek, O.; Tremlová, J.; Kaňa, A.; Najmanová, J.; Tlustoš, P., Selenium uptake, transformation and inter-element interactions by selected wildlife plant species after foliar selenate application. *Environ. Exp. Bot.* **2016**, *125*, 12-19.
- [18] Loula, M.; Kaňa, A.; Vosmanská, M.; Koplík, R.; Mestek, O., Transfer of thallium from rape seed to rape oil is negligible and oil is fit for human consumption. *Food Addit. Contam. A* **2016**, *33* (4), 668-673.
- [19] Eichler, Š.; Kaňa, A.; Kalousová, M.; Vosmanská, M.; Korotvička, M.; Zima, T.; Mestek, O., Speciation analysis of selenium in human urine by liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for monitoring of selenium in body fluids. *Chem. Spec. Bioavail.* **2015**, *27* (3), 127-138.
- [20] Hrubá, L.; Kaňa, A.; Mestek, O., Quantitative Analysis of Iodine Species in Biological Samples using Size Exclusion Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Chem. Listy* **2015**, *109* (3), 223-228.
- [21] Kaňa, A.; Hrubá, L.; Vosmanská, M.; Mestek, O., Analysis of iodine and its species in animal tissues. *Chem. Spec. Bioavail.* **2015**, *27* (2), 81-91.
- [22] Šindelářová, K.; Száková, J.; Tremlová, J.; Mestek, O.; Praus, L.; Kaňa, A.; Najmanová, J.; Tlustoš, P., The response of broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*) varieties on foliar application of selenium: uptake, translocation, and speciation. *Food Addit. Contam. A* **2015**, *32* (12), 2027-2038.
- [23] Mestek, O.; Kaňa, A.; Eichler, Š.; Hofmanová, E., The use of inductively coupled plasma mass spectrometry for the evaluation of the mobility of iodine in bentonite. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2014**, *94* (3), 255-268.
- [24] Kaňa, A.; Koplík, R.; Eichler, Š.; Mestek, O., Software Solution for Post-Column Isotope Dilution Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Lett.* **2013**, *46* (15), 2430-2443.
- [25] Kaňa, A.; Mestek, O., Determination of Iron in Biological Materials by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Chem. Listy* **2012**, *106* (3), 211-216.
- [26] Kaňa, A.; Mestek, O., The Use of Dynamic Reaction Cell for Determination of Iron by Icp-MS. *Chem. Listy* **2011**, *105*, S27-S29.
- [27] Kaňa, A.; Mestek, O., The Use of Dynamic Reaction Cell for Elimination of Spectral Interferences in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-DRC-MS). *Chem. Listy* **2011**, *105* (12), 930-937.
- [28] Kaňa, A.; Mestek, O., Determination of Phosphorus by Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Chem. Listy* **2011**, *105* (3), 212-216.

6. Přílohy

Vlastní publikace zařazené do habilitační práce