

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Stanovení kovů v čokoládě

Diplomová práce

Autor: Tomáš Hanák

Studijní obor: Analytická chemie

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

Olomouc 2022

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Tomáš Hanák

Název práce: Stanovení kovů v čokoládě

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

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

Rok odevzdání práce: 2022

Anotace: Diplomová práce se věnuje stanovení vybraných kovů As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb a Zn ve vzorcích čokolád a kakaových hmot dvěma různými metodami, AAS a ICP-MS. V teoretické části je popsána problematika rozdělení kakaovníků, proces výroby čokolády, přehled zákonů k čokoládě a po teoretické stránce jsou rozebrány obě metody stanovení kovů. Na konci teoretické části je přehled vědeckých článků k dané problematice a teorie k validaci a nejistotě. Experimentální část je zaměřená na validaci obou metod s využitím nového certifikovaného referenčního materiálu ERM-BD512 (hořká čokoláda) a na samostatné stanovení uvedených kovů ve vzorcích čokolád a kakaových hmot.

Klíčová slova: stanovení kovů, čokoláda, kakaová hmota, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn, F-AAS, ET-AAS, ICP-MS, ERM-BD512, validace metody,

Počet stran: 80

Počet příloh: 9

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Thomas Hanak

Title: Determination of heavy metals in chocolate

Type of thesis: Diploma's

Department: Department of analytical chemistry

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

The year of submission: 2022

Annotation: The Diploma thesis deals with determination of selected metals As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn in samples of chocolate and cocoa mass by two different methods AAS and ICP-MS. The theoretical section of diploma thesis describes the issue of distribution of theobroma cacao, process of chocolate production, an overview of the laws for chocolate and theoretically, both methods are discussed. At the end of the theoretical section is an overview of scientific articles and some theory connected to validation of methods and uncertainty. The experimental section of diploma thesis is focused on the validation of both methods using new certified reference material ERM-BD512 (dark chocolate) and on determination of given metals in samples of chocolate and cocoa mass.

Key words: determination of metals, chocolate, cocoa mass, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn, F-AAS, ET-AAS, ICP-MS, ERM-BD512, method validation,

Number of pages: 80

Number of attachments: 9

Language: Czech

PROHLÁŠENÍ:

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

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

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování:

Chtěl bych tímto poděkovat hlavně svojí rodině za stálou podporu během mého studia na vysoké škole, ale i mimo něj.

Dále bych chtěl poděkovat svému vedoucímu doc. Ing. Davidovi Mildemu Ph.D. za ochotu, schovívavost, trpělivost, nadšení a za velkou pomoc a plno cenných rad během psaní mé diplomové práce.

V neposlední řadě bych chtěl veřejně poděkovat svým dvěma kamarádům Ing. Petrovi Brzeznému a Ing. Břetislavu Crhovi za cenné rady a kritiku během psaní mé diplomové práce. Silně věřím, že díky jejich úsilí je v mé diplomové práci mnohem méně chyb.

Obsah

1	Úvod	1
2	Teoretická část	2
2.1	Čokoláda	2
2.1.1	Klasifikace kakaá	2
2.1.2	Morfologické a odrůdové charakteristiky kakaá	2
2.1.3	Výroba samotné čokolády	3
2.2	Legislativa týkající se čokolády	6
2.2.1	Vyhláška č. 76/2003 Sb.	6
2.2.2	Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích	8
2.2.3	Nařízení komise (ES) č. 1881/2006	8
2.3	Stanovení kovů	9
2.4	Vhodné metody pro stanovení kovů	12
2.5	Atomová absorpční spektrometrie	13
2.5.1	Plamenová atomová absorpční spektrometrie	14
2.5.2	Elektrotermická atomizace	17
2.5.3	Interference matrice	20
2.6	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	21
2.6.1	Instrumentace	22
2.6.2	Princip metody	22
2.6.3	Vzniku iontů	23
2.6.4	Plazmová hlavice	24
2.6.5	Vznik ICP výboje	25
2.6.6	Rozhraní mezi ICP a MS	26
2.6.7	Iontová optika	27
2.6.8	Hmotnostní analyzátory	28
2.6.9	Detektory	30
2.6.10	Interference u ICP-MS	31
2.7	Přehled vědeckých článků	33
2.8	Validace	37
2.8.1	Výkonnostní charakteristiky	37
2.9	Nejistota měření	40
3	Experimentální část	42
3.1	Chemikálie	42
3.2	Materiály a přístroje	42

3.3	Vzorky	43
3.4	Příprava a rozklad vzorků	43
3.5	Příprava kalibrace pro F-AAS, ET-AAS a ICP-MS	44
3.6	Stanovení kovů metodami AAS a ICP-MS.....	45
3.6.1	F-AAS	45
3.6.2	ET-AAS	45
3.6.3	ICP-MS	46
4	Výsledky a diskuze	48
4.1	Validace postupů měření.....	48
4.1.1	AAS.....	48
4.1.2	ICP-MS	53
4.2	Vyhodnocení nejistoty měření	59
4.2.1	F-AAS, ET-AAS a ICP-MS.....	59
4.3	Souhrn výsledků	61
4.3.1	AAS.....	62
4.3.2	ICP-MS	64
4.3.3	Porovnání a diskuze.....	65
5	Závěr	69
6	Seznam použité literatury:	71
7	Přílohy.....	75
7.1	Obrázky některých analyzovaných vzorků	75
7.2	Data z měření vzorků čokolád a kakaových hmot.....	78

Seznam použitých zkratek

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AC	Střídavý proud
amu	atomová hmotnostní jednotka
ASV	Anodická rozpouštěcí voltametrie
CPS	Počet za sekundu
CRM	Certifikovaný referenční materiál
DC	Stejnoseměrný proud
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELC	Kyveta s prodlouženou životností
ERM	Evropský referenční materiál
ET-AAS	Elektrotermická atomová absorpční spektrometrie
EU	Evropská unie
F-AAS	Plamenová atomová absorpční spektrometrie
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
K	Kelvin
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MR	Mikrovlnný rozklad
MLS	Milestone (firma)
NIST	Národní institut standardů a technologie
RF	Radiofrekvenční
RNA	Ribonukleová kyselina
RPS	Otáčky za sekundu
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
TOF	Analyzátor doby doletu
TPC	Kyveta vyrobená z pyrolytického uhlíku
VIM	Mezinárodní metrologický slovník

1 Úvod

Čokoláda je jedna z nejpobulárnějších sladkostí na světě. Slovo čokoláda pochází z aztéckého výrazu *xocolātl*, který volně přeloženo znamená „hořké pití“. Kakao, které je hlavní ingrediencí v každé hořké čokoládě, se vyrábí z kakaovníku pravého, což je tropický strom pocházející z oblasti amazonského deštného pralesa. Kakao bylo považováno místním lidem za dar od bohů. Mayové a Aztékové pěstovali kakaové boby už 2000-4000 let před španělskými zámořskými objevy. Kakaové boby využívali jako platidlo a základ do svých hořkých nápojů tzv. chocolatlů. Tyto chocolatly připravovali tak, že opražili a rozdrtili kakaové boby na mnohem menší velikost zrna a následně je smíchali s vodou a dalšími ingrediencemi, např. s vanilkou či s různým exotickým kořením. Výsledkem byl velmi hořký nápoj, který Evropanům, právě pro svou hořkost nechutnal, a tak si ho sladili medem. [1]

Jedním z hlavních důvodů, proč je kvalitní čokoláda tak populární, je její pozitivní vliv na zdraví díky kakau, které je hlavní ingrediencí každé vysokoprocenní hořké čokolády (70 % a výše). V mnoha studiích [2-3] bylo dokázáno, že každodenní konzumace kvalitní hořké čokolády má mnoho zdravotních benefitů, jako je např. prevence infarktu, zlepšené celkové prokrvení těla a zlepšení krevního tlaku, snížení rizika cukrovky, snížení tělesné hmotnosti, stimulace mozku, a dokonce prevence Alzheimerovy choroby. Tato všechna pozitiva jsou způsobená vysokou koncentrací antioxidantů v kakau spolu s vysokým množstvím vlákniny a biogenních prvků, jako je např. Cu, Fe, Mg a Mn. V jedné 100 g tabulce 70 % hořké čokolády je obsaženo asi 89 % doporučené denní dávky Cu, 67 % Fe, 58 % Mg a 98 % Mn. Protože čokoláda je poměrně kalorická, doporučuje se denně konzumovat nejvýše 30 g takovéto kvalitní 70 % hořké čokolády. [4]

Cílem této diplomové práce bylo stanovit množství As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb a Zn ve vzorcích čokolád od bílé čokolády až po 100 % hořkou čokoládu a v kakaových hmotách pomocí 2 různých metod (AAS a ICP-MS). Dalším cílem bylo statisticky porovnat všechny výsledky stanovené těmito metodami, porovnat naměřená data s již publikovanými vědeckými články, zkusit vyhledat legislativní limity pro kovy v čokoládě a porovnat, zda nějaký vzorek čokolády či kakaové hmoty tento legislativní limit nepřekročuje.

2 Teoretická část

2.1 Čokoláda

2.1.1 Klasifikace kakaa

Kakaovník pravý (*Theobroma cacao*) patří do rodu *Theobroma* a je řazen do podčeledi *Sterculioidea* z čeledi *Malvaceae*. Kakao bylo spolu s kolovým ořechem kdysi řazeno do dnes již zastaralé čeledi *Sterculiaceae*. [1]

Existuje 22 známých druhů, přiřazených do rodu *Theobroma*. Z těchto druhů je *Theobroma cacao* jediným druhem široce pěstovaným mimo svoji původní oblast a uvádí se, že je to jediný hospodářsky významný druh. Těchto 22 druhů se dále dělí na šest sekcí na základě jejich morfologických znaků:

1. *Andropetalum* (*T. mammosum*), 2. *Glossopetalum* (*T. angustifolium*, *T. canumanense*, *T. chochoense*, *T. cirmolinae*, *T. gradiflorum*, *T. hylaeum*, *T. nemorale*, *T. obovatum*, *T. simiarum*, *T. sinuosum*, *T. stipulatum*, *T. subincanum*), 3. *Oreanthes* (*T. bernouillii*, *T. glaucum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. velutinum*), 4. *Rhytidocarpus* (*T. bicolor*), 5. *Telmatocarpus* (*T. gileri*, *T. microcarpum*), 6. *Theobroma* (*T. cacao*).

Těchto 22 druhů se pěstuje v Brazílii kromě druhů *Andropetalum* (*T. mammosum*), *T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. subincanum*, *T. microcarpum*, *T. bicolor* a *T. cacao* pocházejí z brazilské Amazonské pánve. [5]

2.1.2 Morfologické a odrůdové charakteristiky kakaa

V této kapitole budou kakaovníky rozděleny podle svých charakteristik (geografie, barva lusku, tvar lusku aj.).

Samotný kakaovník

Kakaovník je relativně malý strom, který je vysoký 4-8 m. Ve stínu velkých lesních stromů může dosahovat výšky až 10 m. Stonek je rovný, jeho dřevo je světlé a kůra stromu je tenká hladká a hnědá. Kakaové lusky dosahují délky 15-25 cm. Zralý lusk se skládá z poměrně silné slupky obsahující 30-50 semen (bobů), uložených v husté slizovité dužině. Všechny kultivované kakaovníky vykazují velkou variabilitu a panuje obecná shoda, že je lze dělit v rámci druhu. Hlavní odrůdy kakaovníku jsou:

1. *Forastero* pocházející z oblasti Amazonie, pěstuje se hlavně na západě Afriky,
2. *Criollo*, pěstované zřídka kvůli náchylnosti k chorobám,

3. *Trinitario*, kříženec *Forastero* a *Criollo*,

4. *Nacional* s jemnou chutí, vypěstovaný v Ekvádoru.

Odrůdy *Forastero* tvoří většinu „hromadného“ trhu s kakaem. Přehled základních charakteristik kakaovníků uvádí tabulka I. [1]

Tabulka I Základní *charakteristiky různých druhů kakaovníku* [5-12]

	Charakteristika	Criollo	Forastero	Trinitario
Skořápka lusku	Textura Barva	Jemná, vrásčitá Červená	Tvrdá, hladká Zelená	Tvrdá Různá
Boby	Průměrný počet lusků Barva dělohy	20-30 Bílá, slonová, lehce fialová	30 a více Od mdlé do výrazně fialové	30 a více Různá, bílé boby jsou vzácné
Zemědělské parametry	Odolnost stromu Citlivost na škůdce a nemoci	Slabá Citlivá	Silná Mírná	Střední Střední
Kvalita	Doba fermentace Chuť Obsah tuků Hmotnost bobů (v g/100 bobů)	1-3 dny Slabě čokoládová, ořechová Malý 85	5 dnů Čokoládová Vysoký 94	4-5 dnů Čokoládová, výrazně kakaová Střední 91

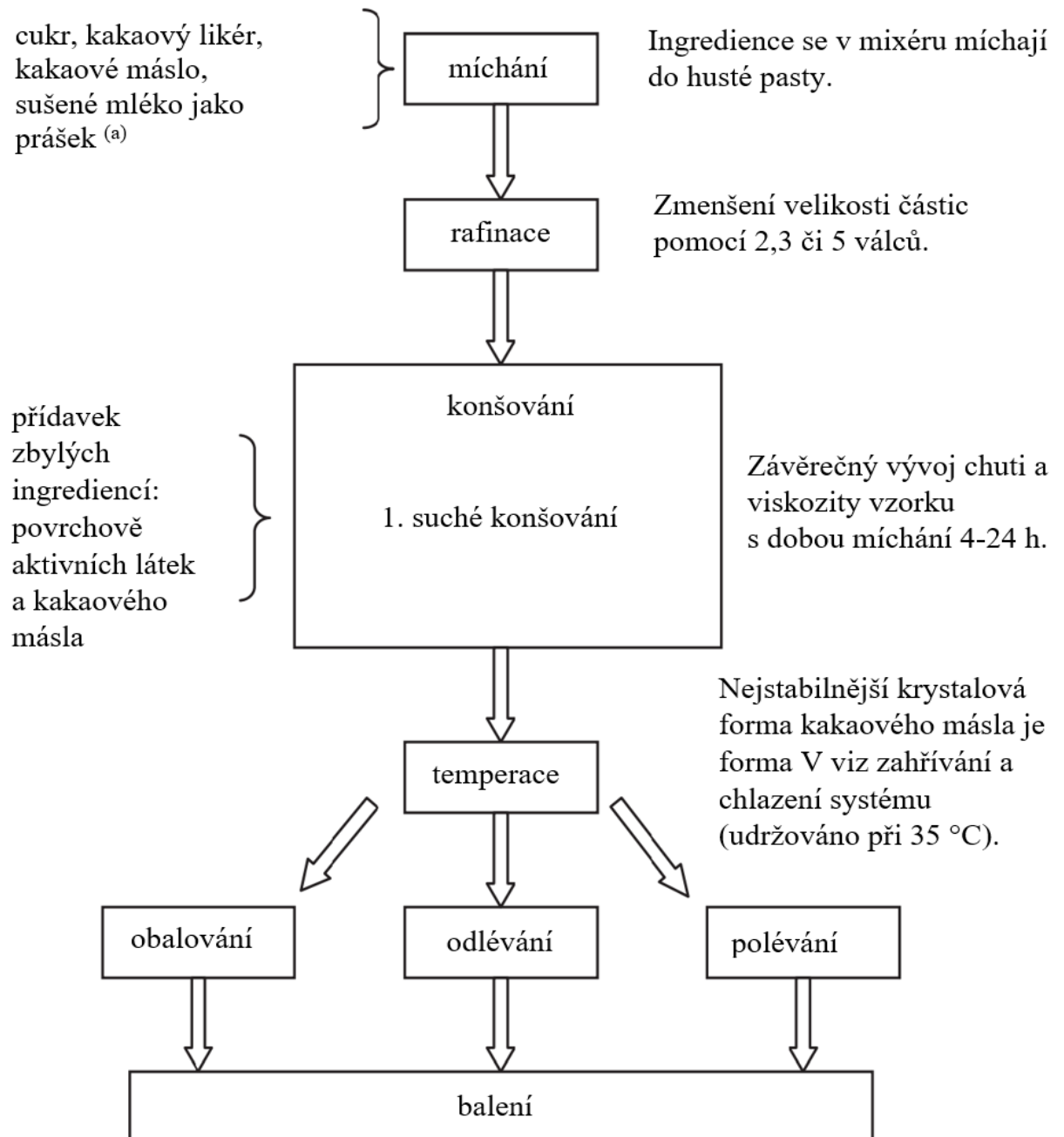
2.1.3 Výroba samotné čokolády

Výroba čokolády zahrnuje několik fyzikálních a chemických procesů, které vyžadují četné technologické operace a k dosažení požadovaných sensorických vlastností a kvality se přidávají různé ingredience. Takto vytvořený produkt je komplexní emulze, kterou lze transformovat na pevný produkt. Jedná se o polotuhou suspenzi jemných pevných částic z cukru, kaka a sušeného mléka (v závislosti na typu čokolády), celkem asi 70 % v kontinuální tukové fázi, většinou z kakaového másla. Celosvětová obliba čokolády pramení z toho, že je považována za luxusní potravinu, která při konzumaci vyvolává řadu podnětů, které aktivují centra potěšení v lidském mozku. Tyto podněty poskytují obecný pocit spokojenosti, štěstí, radosti a v některých případech i sexuální stimulace.

Ústředním bodem hodnocení kvality čokolády je její správné chování při dané teplotě, při okolní teplotě zůstává v pevném stavu a po vložení do úst se působením ústní sliznice a zvýšené teploty roztaví a my můžeme zhodnotit její texturu. Důležitou vlastností čokolády je distribuce velikostí částic a distribuce jednotlivých ingrediencí, to vše formuje reologické

chování čokolády a její sensorické vnímání [13]. Kvalita čokolády se neustále zlepšuje díky vylepšenému a transparentnějšímu řízení dodavatelského řetězce, strategií šlechtění odrůd kakaava, novým technologiím vývoje produktů, vývoji specializovaných produktů prémiové kvality a díky lepšímu porozumění kvalitě procesu a produktu.

Obrázek 1 Výroba čokolády po jednotlivých krocích, upraveno z [1]



pozn. a) sušené odstředěné mléko se používá pouze při výrobě mléčné čokolády

Různé procesy výroby čokolády mají některé společné kroky: 1. *míchání*, 2. *rafinace*, 3. *konšování čokoládové pasty*, 4. *temperování a krystalizace lipidů*, 5. *odlévání a modelování*, 6. *chlazení a vyjímání z formy* a 7. *obalování a zabalování*.

Hledaným výsledkem je hladká textura čokolády, která je považována za žádoucí v moderním cukrářství, a hlavně eliminace orálních vjemů krupice. Primární kategorie čokolády jsou *hořká*, *mléčná* a *bílá*, tyto kategorie se liší obsahem kakaové sušiny, mléčného tuku a kakaového másla. Výsledkem je různý poměr sacharidů, tuků a bílkovin. Schématický proces výroby čokolády je znázorněn na obrázku 1. [1]

Rafinace

Rafinace čokolády je velice důležitý krok pro vznik hladké textury čokolády, což je v moderních čokoládových cukrovinkách žádoucí. Směs cukru, kakaového likéru (a mléčné sušiny v závislosti na typu čokolády) při celkovém obsahu tuku 8-24 % je zjemněná na velikost částic <30 μm pomocí kombinace dvou a následně pěti válcových rafinérů. Konečná velikost částic rozhodujícím způsobem ovlivňuje reologické a senzorycké vlastnosti. [1]

Konšování

Konšování je považováno za konečnou operaci při výrobě čokolády, ať už mléčné či hořké. Jde o základní proces, který přispívá k úpravě viskozity, konečné textury a chuti. Provádí se mícháním čokolády při teplotě vyšší než 50 °C po dobu několika hodin. V počátečních fázích je vlhkost snížena odstraněním určitých nežádoucích chuťově aktivních těkavých látek, jako je např. kyselina octová, a následně jsou podporovány interakce mezi disperzní fází. Navíc proces konšování podporuje rozvoj chuťového profilu v důsledku prodlouženého míchání za zvýšených teplot, to dodává částečně karamelizovanou příchut' v nemléčné drobené čokoládě. Proces také napomáhá snížení viskozity rafinační pasty během procesu a zmenšení velikosti částic.

Doba konšování a teploty se obvykle liší: Pro mléčnou strouhanku je to 10-16 h při 49-52 °C, u sušených mléčných výrobků je to 16-24 h při teplotě do 60 °C a u hořkých čokolád je to 16-24 h od teploty 70-82 °C. Pokud se nahradí plnotučný mléčný prášek za odstředěný mléčný prášek a máslový tuk, může se pracovat při teplotě do 70 °C. Aby čokoláda získala vhodnou viskozitu (byla kapalnější), lze přidat další podíl kakaového másla a lecitinu, ale až ke konci míchání před temperačním krokem. [1]

Temperování a krystalizace lipidů

Temperování zahrnuje předkrystalizaci malého podílu triglyceridů, přičemž krystaly tvoří jádra (celkem 1-3 %) pro zbývající lipidy k přeorientování do správné formy. Temperování má čtyři klíčové kroky: 1. závěrečné roztavení (při 50 °C), 2. ochlazení na bod krystalizace (při 32 °C), 3. krystalizace (při 27 °C) a 4. konverze jakýchkoliv nestabilních krystalů při teplotě 29-31 °C.

Temperovací sekvence záleží na použité receptuře, použitém vybavení a konečném cíli, kterého chce výrobce čokolády dosáhnout. Před použitím temperovacích strojů bývala čokoláda ručně temperovaná, tuto metodu stále občas používají malí výrobci čokolády (na vybroušených mramorových deskách).

Dobře temperovaná čokoláda bude mít tyto vlastnosti: správný tvar, barvu, lesk, smrštění z formy, lepší kontrolu hmotnosti, bude tvrdší, stabilnější a odolnější vůči teplu (méně otisků prstů během balení) a bude mít delší trvanlivost. [1]

2.2 Legislativa týkající se čokolády

V této kapitole je uvedený přehled základní legislativy, která se přímo pojí s čokoládou a kakaem.

2.2.1 Vyhláška č. 76/2003 Sb.

Touto vyhláškou se stanovují požadavky na přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Dále vyhláška definuje základní pojmy, které se týkají čokolády, např. kakaový bob, kakaové máslo, kakaový prášek, směsi kakaa s cukrem, čokoláda, bílá čokoláda, mléčná čokoláda, hořká čokoláda, plněná čokoláda, čokoládový bonbon aj. Pro účely diplomové práce jsou důležité definice hořké, mléčné a bílé čokolády.

Hořká čokoláda je potravina vyrobená z kakaových součástí, přírodních sladidel, sladidel nebo jejich kombinací (dále jen „sladidel“), přídatných látek nebo látek určených k aromatizaci, popřípadě z dalších složek, a která vyhovuje požadavkům uvedeným v tabulce II. Mléčná čokoláda je potravina vyrobená z kakaových součástí, sladidel, mléka nebo mléčných výrobků, popřípadě z dalších složek, a která vyhovuje požadavkům uvedeným v tabulce II. Bílá čokoláda je potravina vyrobená z kakaového másla, mléka nebo mléčných výrobků, sladidel, popřípadě z dalších složek, a která vyhovuje požadavkům uvedeným v tabulce II.

V oddíle 5 § 21 „Označování“ vyhláška dále definuje pravidla pro označování čokolády, např.: dle § 21 odst. 1a): V názvu čokolád se uvede druh, popř. skupina, dle § 21 odst. 1b): V názvu čokolád se uvede název složky, která výrobek charakterizuje, např. mandle, lískové ořechy, sušené ovoce aj., pokud byla složka použita. Dle § 21 odst. 9): Vyšší jakost výrobku čokoláda (hořká čokoláda), mléčná čokoláda a čokoládové polevy z těchto čokolád může být na obalu vhodně vyjádřena například slovy „extra“, „vysoká jakost“ apod. a doplněna popisem nebo informacemi o příslušných jakostních parametrech, a to za podmínky, že a) čokoláda (hořká čokoláda) obsahuje nejméně 43 % celkové kakaové sušiny a nejméně 26 % kakaového másla, b) mléčná čokoláda obsahuje nejméně 30 % celkové kakaové sušiny a nejméně 18 % mléčné sušiny a nejméně 4,5 % mléčného tuku v mléčné sušině, získané ze zahuštěného nebo sušeného plnotučného mléka, polotučného nebo odstředěného mléka, smetany nebo zahuštěné, případně sušené smetany, másla nebo mléčného tuku, c) čokoládová poleva obsahuje nejméně 16 % tukuprosté kakaové sušiny.

Vyhláška dále obsahuje požadavky na jakost čokolády a čokoládových bonbonů, fyzikální a chemické požadavky na jakost jsou přehledně uvedeny v tabulce II (údaje převzaty z Tabulky 1 - Fyzikální a chemické požadavky na jakost, Přílohy č. 9 k vyhlášce č. 76/2003 Sb.).

Tabulka II Fyzikální a chemické požadavky na jakost, hodnoty jsou v hmotnostních %, vztahených na sušinu, upraveno z [14]

Druh	Obsah kakaového másla	Obsah tukuprosté kakaové sušiny	Obsah celkové kakaové sušiny	Obsah mléčného tuku	Obsah celkového tuku	Obsah mléčné sušiny
Hořká č.	18	14	35	-	-	-
Mléčná č.	-	2,5	25	3,5	25	14
Bílá č.	20	-	-	3,5	-	14

Vedle kakaového másla lze do hořké čokolády, mléčné čokolády, bílé čokolády přidávat jiné rostlinné tuky uvedené v příloze č. 10 vyhlášky; jejich podíl však dle § 22 odst. 2): nesmí být vyšší než 5 % ve výrobku po odečtení celkové hmotnosti všech použitých jiných jedlých složek a nesmí být snížen minimální obsah kakaového másla nebo celkové kakaové sušiny.

Do hořké čokolády, mléčné čokolády a bílé čokolády, mohou být přidány jen takové látky určené k aromatizaci, které nenapodobují chuť čokolády nebo mléčného tuku.

Do všech druhů čokolád podle přílohy č. 8 a čokoládových bonbonů je zakázáno přidávat a) živočišné tuky, které nepocházejí výhradně z mléka, b) mouky, granulované nebo práškové škroby.

Dle § 22 odst. 6) se výpočet procentických podílů stanovených složek a jejich hodnot v čokoládových výrobcích provádí tímto způsobem: a) procentický obsah stanovených složek ve výrobcích hořká čokoláda, mléčná čokoláda a bílá čokoláda se vypočte po odečtení hmotnosti přidaných jedlých složek, b) u výrobků čokoláda plněná a čokoládové bonbony se procentický obsah stanovených složek vypočte po odečtení hmotnosti přidaných jedlých složek a hmotnosti náplně, c) procentický obsah použitého druhu čokolády u výrobků uvedených v písmenu b) se vypočte ve vztahu k celkové hmotnosti konečného výrobku, včetně náplně. [14]

2.2.2 Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích

Dle § 9 odst. 2): Pokud se jedná o balenou potravinu, uvede provozovatel potravinářského podniku při uvádění potraviny na trh označení šarže na obal potraviny nebo na etiketu, která je k němu připojena.

Dle § 9 odst. 4): Povinnost označit potravinu označením šarže se nevztahuje na obaly, jejichž největší plocha je menší než 10 cm². [15]

2.2.3 Nařízení komise (ES) č. 1881/2006

Toto nařízení je pro účely diplomové práce velice důležité, protože stanovuje limity pro kadmium v různých druzích čokolád (bílá, mléčná, hořká) a v kakau. Limity pro jednotlivé produkty převzaté z oddílu 3: Kovy Přílohy „Maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách“ k tomuto nařízení jsou přehledně uvedeny v tabulce číslo III. [16]

Tabulka III *Limity pro Cd v čokoládě a v kakau* [16]

Druh produktu	Cd [mg·kg ⁻¹]
Mléčná čokoláda s obs. kakaové sušiny ≤30 %	0,10
Čokoláda s obs. kakaové sušiny 30-50 %	0,30
Čokoláda s obs. kakaové sušiny ≥50 %	0,80
Kakaový prášek prodávaný konečnému spotřebiteli	0,60

pozn. maximální limity pro kadmium v mg·kg⁻¹ se vztahují k čerstvé hmotnosti

2.3 Stanovení kovů

V čokoládě se budou stanovovat následující kovy: As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb a Zn. V následující kapitole bude ke každému kovu uvedeno několik základních informací.

Arsen

V potravinách existuje asi 50 různých sloučenin arsenu. Arsen je blahodárný pro dobré zdraví a zdravý životní styl. Jde o tzv. ultra stopový prvek, který je nutný pro červenou řasu, savce a člověka. Velice důležité je stanovení anorganického arsenu ($\text{As}^{\text{III}} + \text{As}^{\text{V}}$), protože anorganický arsen je oproti organickému vysoce toxický. Anorganický arsen a jeho sloučeniny jsou po vstupu do potravního řetězce postupně metabolizovány procesem metylace. Nedostatek arsenu může způsobit zpomalený růst. Některé druhy bakterií využívají sloučeniny arsenu jako dýchací metabolity. Mnoho sloučenin arsenu, např. AsH_3 , As_2O_3 , K_3AsO_3 a Na_3AsO_4 jsou uznány jako karcinogeny, teratogeny a mutageny. S vysokou toxicitou arsenu je spojována vysoká afinita oxidů As^{III} k thiolům ($-\text{SH}$ skupina, aktivní část mnoha enzymů). Přítomnost arsenu v pitné vodě (AsO_3^{-4} a AsO_4^{-3}) způsobuje nemoc tzv. arsenózu. Doporučená denní dávka arsenu je 0,04-1,40 mg, toxická dávka je 5-50 mg a smrtící dávka je 50-340 mg. [17-20]

Kadmium

Kadmium je pro mnoho organismů včetně zvířat a člověka neesenciální a toxický kov. Schopnost kadmia interagovat s thiolovou ($-\text{SH}$) funkční skupinou ve struktuře enzymů má za následek nedostatek esenciálních prvků, kvůli jejich „soutěživosti“ na aktivních místech v biologicky důležitých molekulách. Příjem kadmia savci a člověkem probíhá hlavně požitím, mnohem méně dýcháním, kadmium se kumuluje v ledvinách a játrech. Kadmium a jeho sloučeniny jsou uznané karcinogeny a jsou také nebezpečné pro životní prostředí. Dlouhodobé vystavení kadmiu z kontaminovaného jídla a vody může mít za následek vznik rakoviny prsu, aterosklerózy a hypertenze, poslední dvě nemoci mohou vést ke kardiovaskulárním onemocněním. Doporučený denní příjem kadmia je 0,012-0,150 mg, toxická dávka je 3-330 mg a smrtící dávka je 1,5-9,0 g. [17-20]

Kobalt

Kobalt je esenciální prvek pro všechny živé organismy, je součástí vitamínu B₁₂ a v jeho formě je nutný pro všechna vyšší zvířata a člověka. Kobalt v anorganické formě je nutrient pro bakterie, houby a řasy. I když potřebné množství kobaltu je velice malé, jeho nedostatek způsobuje zhoubnou chudokrevnost. Na druhé straně jeho nadbytečné užívání je mnohem nebezpečnější. Expozice kobaltovému prášku poškozuje plíce, srdce a kůži. Kobalt je rovněž uznaným karcinogenem. Doporučená denní dávka je 40-50 µg, toxická dávka je 500 mg a smrtící dávka je 20 g. [17-20]

Chrom

Chrom není esenciálním prvkem pro rostliny, ale pro zvířata a člověka ano. V jejich organismu plní důležitou roli v glukózovém metabolismu, u některých proteinů a tuků. Nedostatečné množství chromu se projevuje hyperglykemií, ztrátou hmotnosti, ataxií a neuropatií periferních nervů. Jako doplněk stravy je sporný hlavně proto, že ovlivňuje funkci inzulínu. Ve větších dávkách či jiných formách může být toxický a karcinogenní. Cr^{VI} je 100-1000× toxičtější než Cr^{III}. Dnes je uznán názor, že přirozený obsah všech antioxidantů v potravinách brání tvorbě Cr^{VI}. Cr^{VI} zpomaluje růst rostlin a může dráždit kůži a dýchání, způsobovat ulceraci a rakovinu plic. Doporučená denní dávka je 10-100 µg, toxická dávka je 200 mg a smrtící dávka je >3 g. [17-20]

Měď

Měď plní v živých organismech důležitou fyziologickou a metabolickou funkci. U lidí vede nedostatek mědi k anémii, poruše nervového a oběhového systému. Vysoké dávky mědi vedou k poškození jater, ledvin, mozkové tkáně a koronárních cév. Stanovení oxidačních stavů mědi v oříšcích, semínkách, kakau a v tkáních mořských živočichů ukazuje, že převažující oxidační stav mědi je v drtivé většině případů Cu^I. Doporučená denní dávka mědi je 3 mg a toxická dávka je 250 mg. [17-20]

Železo

Železo tvoří komplexy s molekulárním kyslíkem v hemoglobinu a myoglobinu, také napomáhá mnohým důležitým redoxním enzymům při buněčném dýchání a obecně oxidačně-redukčním procesům v tělech živočichů a v rostlinách. Proteiny železa se vyskytují ve všech živých organismech. Tvoří klastry železa a síry, které jsou všudy prostupující a zahrnují nitrogenázu a enzymy zodpovědné za biologickou fixaci dusíku. Příznaky

nedostatku železa jsou anémie, zánětlivé procesy a náchylnosti k parazitózám. Akutní předávkování železem se projevuje korozí žaludeční a střevní sliznice, cévní dilatací, selháním srdce a odumíráním jaterních buněk, které může vést až k selhání jater, krvácení, poškození centrálního nervového systému, ledvin, erytropoéze, a dokonce i ke smrti. Doporučená denní dávka železa je 13-18 mg, toxická dávka je 200 mg a smrtící dávka je 12,6-21,0 g. [17-20]

Hořčík

Hořčík je biogenní prvek, který potřebují rostliny, zvířata i lidé. Tvoří základ chlorofylů, a tedy hraje zásadní roli v procesech fotosyntézy. Nedostatečný příjem hořčíku u člověka je spojen např. s nervosvalovou dráždivostí, srdeční arytmií a zvýšeným svalovým napětím. Nízká množství hořčíku v lidském těle vedou k rozvoji cukrovky, astmatu a osteoporózy, hořčík není toxický prvek, ale vyšší dávky mohou vést k průjmům. Historicky se využíval k léčbě mnoha nemocí. Doporučený denní příjem je 250-300 mg a toxická dávka je množství přes 2,5 g. [17-20]

Mangan

Mangan je esenciální prvek pro všechny živé organismy. U rostlin je důležitý při fotosyntetické evoluci kyslíku v chloroplastech rostlin. U zvířat a rostlin funguje jako kofaktor pro mnoho enzymů. Příznaky nedostatku manganu jsou dermatitida, epilepsie, osteoporóza a cukrovka. Sloučeniny manganu mají nízkou toxicitu, otrava narušuje motorické a poznávací dovednosti. Sloučeniny Mn^{VII} mají vyšší toxicitu než sloučeniny Mn^{II} . Silné oxidační vlastnosti vedou k odumírání sliznice, jen malá množství manganistanu jsou absorbována ve střevech, ale i tyto množství mají závažné účinky na ledviny, játra, plíce a rozmnožovací orgány. Doporučená denní dávka je 2,7-3,7 mg, toxická dávka je 10-20 mg a smrtící dávka je 10 g. [17-20]

Nikl

Nikl hraje významnou roli v biologii mikroorganismů a rostlin. Enzymy některých mikroorganismů, rostlin a zvířat obsahují nikl jako centrální atom, v této formě je pro ně kov esenciální nutrient. Nedostatek niklu způsobuje snížení koncentrace hemoglobinu a narušení funkce jater u zvířat a lidí. Nikl je alergen, který způsobuje kožní zánět. Páry a prach NiS a dalších sloučenin niklu jsou karcinogenní. Tetrakarbonyl niklu $[Ni(CO)_4]$ je extrémně

toxický a na vzduchu výbušný. Doporučená denní dávka niklu je 300 µg a toxická dávka je 50 mg (u myši). [17-20]

Olovo

Olovo nemá biologickou roli. Po požití je olovo vysoce toxický kov, méně nebezpečný je při kožním kontaktu. Požité olovo postupuje v těle bez toho, aby bylo absorbované. Skoro všechno nadýchané olovo je absorbované do krevní plazmy a buněk. Olovo prochází přes krevně-mozkovou bariéru do nervového systému a kumuluje se v jemné tkáni a kostech. Ovlivňuje střeva, centrální nervový systém, kardiovaskulární a imunitní systém. Intoxikace olovem může způsobit encefalopatii, ataxii, kóma a křeče. Expozice velkého množství olova vede k těžkému poškození mozku, ledvin a ke smrti. Olovo a jeho sloučeniny (hlavně rozpustné soli a silné oxidanty PbO₂) jsou škodlivé hlavně pro ženy kvůli vysoké toxicitě na plod dítěte. Sloučeniny olova mohou způsobit rakoviny žaludku, ledvin a plic. Doporučený denní příjem olova je 0,06-0,50 mg, toxická dávka je 1 mg a smrtící dávka je 10 g. [17-20]

Zinek

Zinek hraje veledůležitou roli ve všech živých systémech od bakterií až k člověku. Jedná se o esenciální stopový prvek, který je nutný pro rostliny, zvířata a mikroorganismy. Můžeme ho najít v proteinech a všech enzymových třídách. Člověk potřebuje zinek ke správnému růstu, vývoji a reprodukci, zinek dále hraje roli v metabolismu RNA a DNA, transdukcii signálu a genové expresi. Také reguluje apoptózu (jeden z hlavních typů programované buněčné smrti). Nedostatek zinku je spojován s mnoha nemocemi. U dětí způsobuje zpomalený růst, zpomaluje sexuální dospívání, zvyšuje šanci na infekci a průjem. Oxidy zinku, jeho acetáty a glukonáty jsou součástí mnohých vitamínových a minerálních doplňků stravy. Zinek má antioxidační vlastnosti, které zpomalují stárnutí kůže a svalů a které pomáhají zrychlit proces hojení ran. Celková toxicita zinku a jeho sloučenin je nízká, přehnaná konzumace zinku může způsobit ataxii, letargii a nedostatek mědi a železa. Doporučená denní dávka zinku je 8-14 mg, toxická dávka je 150-600 mg a smrtící dávka je 6 g. [17-20]

2.4 Vhodné metody pro stanovení kovů

V analytické praxi existuje mnoho metod pro stanovení kovů v různých rozmanitých matricích vzorku od spektrálních metod až po metody elektroanalytické. Metoda AAS se

využívají pro rozmanité druhy matric od biologických vzorků pro zdravotnické účely až po vzorky pro hodnocení stavu životního prostředí. Výhoda AAS spočívá v jednoduchosti této metody (zejména F-AAS), vysoké selektivitě a dobré provozní a cenové dostupnosti. Nevýhodou je vyšší LOD, pro metodu ET-AAS je LOD o 2-3 řády nižší oproti F-AAS. Metoda ET-AAS ale vyžaduje zkušenost obsluhy. Dalšími analytickými metodami jsou ICP-OES a ICP-MS. Výhodami těchto metod jsou možnosti simultánní analýzy, při níž se analyzuje více prvků najednou a vynikající metrologické parametry: LOD, preciznost, stabilita a LDR. Nevýhodou představují poměrně vysoké pořizovací a provozní náklady.

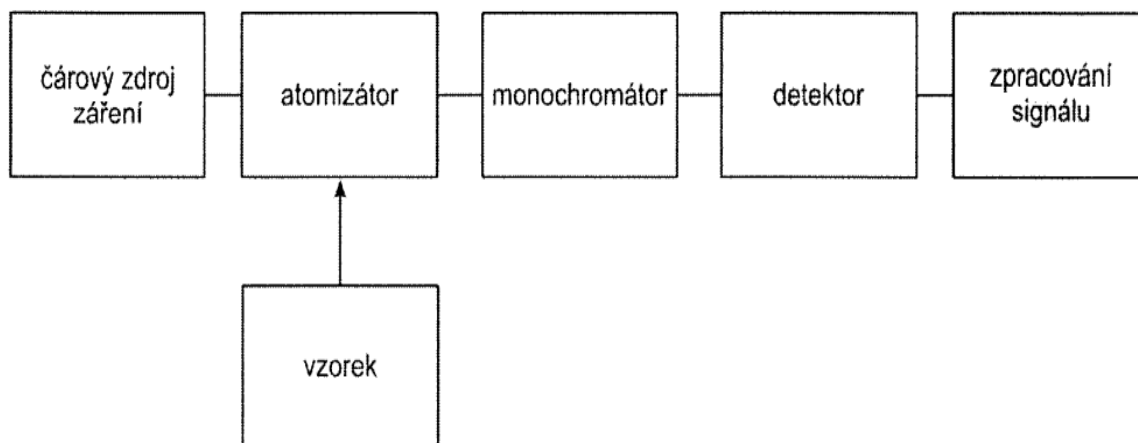
Kromě spektrálních metod jsou velice rozšířené metody elektroanalytické, protože jsou rychlé, levné a mají nízké LOD. Jednou z elektroanalytických metod, která má nízké LOD pro stopovou analýzu kovů je obecně anodická rozpouštěcí voltametrie (ASV). Princip elektroanalytických metod spočívá v měření závislosti elektrochemického chování roztoku na jeho složení či koncentraci. Skrze elektrody se zprostředkuje spojení mezi roztokem a měřicím přístrojem, který sleduje vhodnou elektrickou veličinu (proud I , potenciál E , vodivost G , elektrický náboj Q či kapacitu C). Ve vědecké práci [21] autoři stanovovali vedle sebe Cd , Cu a Pb ve 14 vzorcích čokolád o různých procentuálních množstvích kaka (28-100 %) pomocí čtvercové anodické rozpouštěcí voltametrie. Stanovení Cd bylo u všech vzorků čokolády pod LOD, množství Cu bylo v rozsahu od 4,30 do 138 $mg \cdot kg^{-1}$ a množství Pb bylo v rozsahu od 0,83 do 27,9 $mg \cdot kg^{-1}$. Vypočítané LOD pro Cd , Cu a Pb byly 0,089; 0,059 a 0,018 $mg \cdot kg^{-1}$.

V této diplomové práci budou stanoveny obsahy kovů pomocí metod AAS a ICP-MS, proto bude v následujícím textu těmto metodám věnována zvýšená pozornost. [22-24]

2.5 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) využívá jako analytickou vlastnost absorpci záření volnými atomy sledovaného prvku. Úbytek primárního záření ze zdroje záření (výbojka s dutou katodou či superlampa) je mírou koncentrace volných atomů prvku, který záření absorboval. Blokované schéma metody AAS je znázorněno na obrázku 2. [22-24]

Obrázek 2 *Blokové schéma AAS* [25]

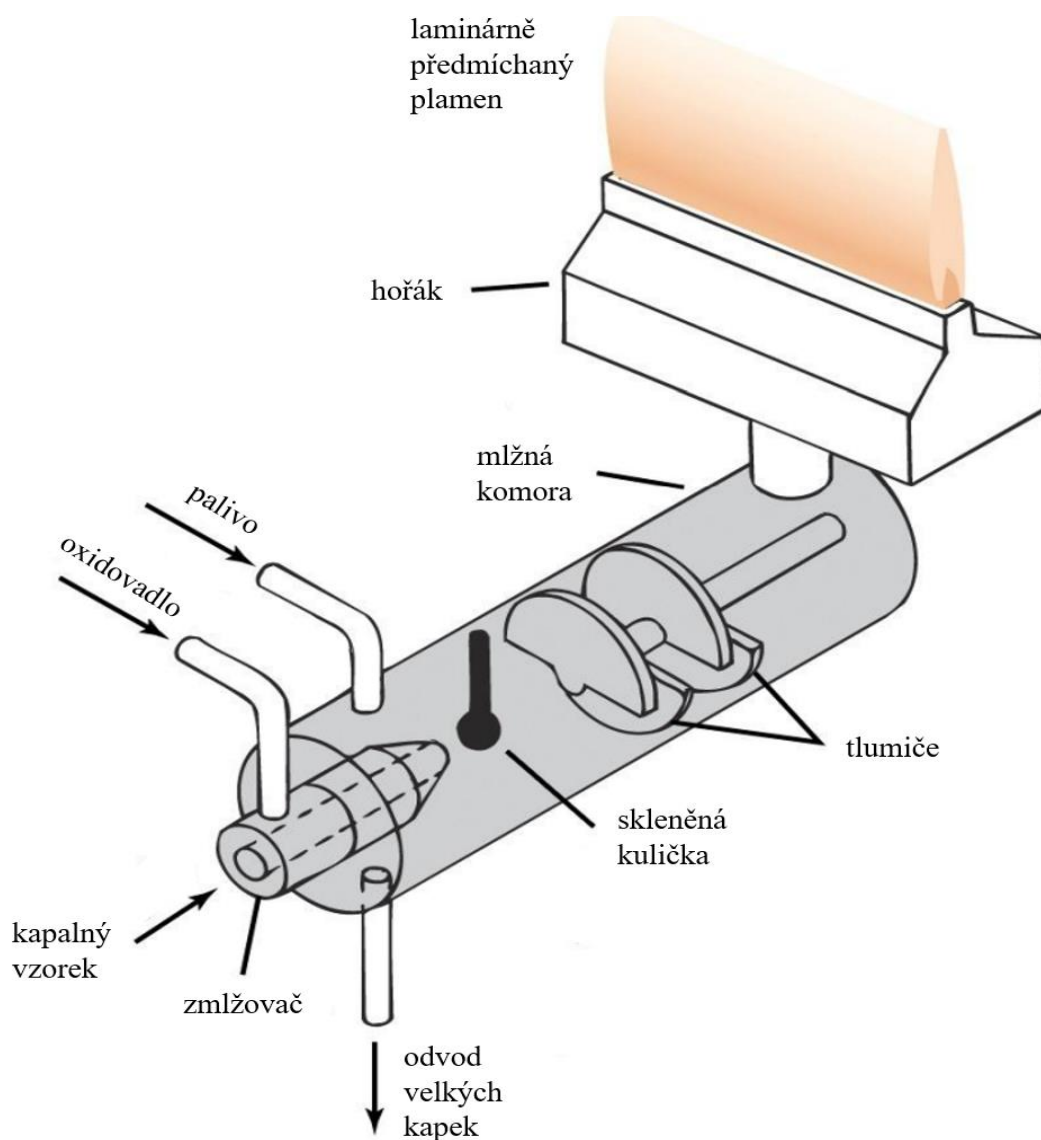


2.5.1 Plamenová atomová absorpční spektrometrie

Nejstarším druhem atomizace je atomizace v plameni. Jejím principem je převedení roztoku na aerosol ve zmlžovači a zavádění tohoto aerosolu do laminárně předmíchaného plamene. Vzorek se zmlží ve zmlžovači, vzniklý aerosol naráží na tzv. zmlžovací kuličku, kde dojde inerčním záchytem k odstranění kapek přesahujících určitou velikost a dále je aerosol smíchán se směsí oxidovadla a paliva. Celý tento proces se odehrává v mlžné komoře, která je vyrobená z inertního materiálu (teflon, polypropylen). Tento celý proces je znázorněn na obrázku 3. Rychlost proudění štěrbinou hořáku přitom musí být 2-3× vyšší než rychlost hoření.

Pro zmlžování se v AAS nejčastěji používá pneumtický zmlžovač, který je cenově nejpřijatelnější, má ale nižší účinnost zmlžování (5-15 %), která je navíc výrazně závislá na viskozitě vzorku. Tyto zmlžovače jsou vyráběny z chemicky odolných materiálů (plast, titan, slitiny Pt/Ir). Pro práci s kyselinou fluorovodíkovou je skleněná kulička nahrazena korundovou nebo plastovou. [22-24]

Obrázek 3 Podrobný popis plamenového atomizátoru, upraveno z [26]



Hořáky jsou konstruovány jako štěrbinové, u novějších spektrometrů vždy pouze s jednou štěrbinou a jsou vyrobeny buď z nerezů nebo lépe z titanu. Jako palivo se nejčastěji používá acetylen. Oxidovadlem je vzduch nebo oxid dusný. Přehled nejčastěji používaných plamenů a dosahovaných teplot v plameni uvádí tabulka IV. [22-24]

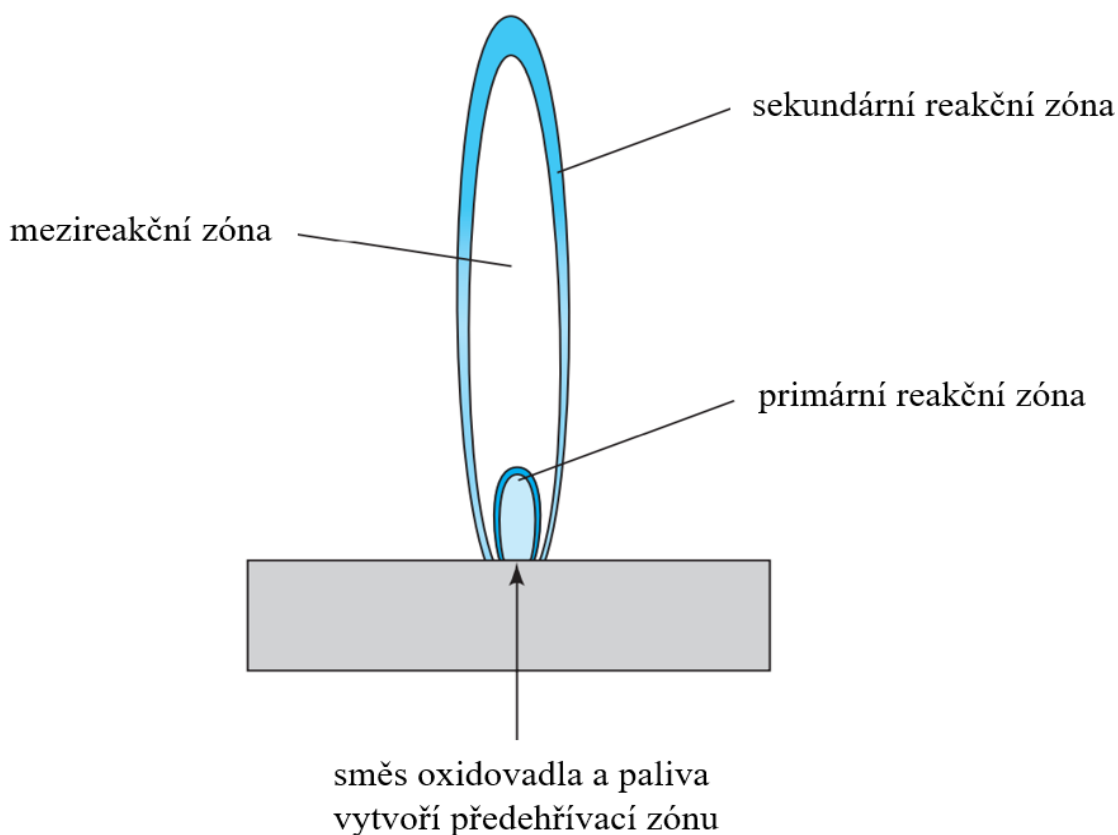
Tabulka IV Charakteristiky běžně používaných typů plamenů [23]

plamen		Stechiometrická reakce	Maximální rychlost hoření [m·s ⁻¹]	Zápalná teplota [K]	Maximální teplota [K]	
palivo	oxidovadlo				vypočtená	experimentální
C ₂ H ₂	vzduch	C ₂ H ₂ +5/2O ₂ +10N ₂ =2CO ₂ +H ₂ O+10N ₂	1,58	623	2523	2500
C ₂ H ₂	N ₂ O	C ₂ H ₂ +5N ₂ O = 2CO ₂ +H ₂ O+5N ₂	1,6	-	3152	2990

V závislosti na typu plamene jsou používány různé typy hořáků, pro plamen acetylen-vzduch mívá hořák délku štěrbinu 100 mm a pro plamen acetylen-oxid dusný 50 mm. Stejně délky bývají i u univerzálních hořáků, které se hodí pro oba typy plamene, mají ale nižší citlivost pro plamen acetylen-vzduch.

Plamen se skládá z několika výrazně ohraničených oblastí, jak je vidět na obrázku 4.

Obrázek 4 Teplotní zóny plamene, upraveno z [27]



Těsně nad štěrbinou hořáku se nachází tenká přehřívací zóna (0,01-0,1 mm), v níž se plyny zahřívají na zápalnou teplotu. Na tuto zónu navazuje primární reakční zóna, ve které dochází k hoření a ke komplikovaným radikálovým reakcím, které jsou zdrojem intenzivní molekulární emise. Tato zóna má normální šířku okolo 0,1 mm, ale výrazně se zvětšuje při nadbytku paliva (tzv. bohatý plamen). Na primární zónu navazuje mezireakční zóna, která je pozorovatelná pouze u uhlovodíkových plamenů. Tato zóna není ještě ovlivněna kyslíkem z okolní atmosféry, ale je v ní již nedostatek oxidovačla, které se spotřebovalo v primární reakční zóně. V této zóně nastávají výrazné redukční podmínky, a proto je tato zóna analyticky využívána pro analýzu prvků tvořících termicky stabilní oxidy. Nad mezireakční zónou se vytváří sekundární zóna, kde dochází k dohořívání, způsobenému difuzí kyslíku z okolní atmosféry.

Z hlediska analytického se nejčastěji využívá oblast reakční zóny, případně oblast těsně nad touto zónou. Pro získání optimálních výsledků je nutné optimalizovat tzv. výšku pozorování, tedy místo, kudy prochází měrný paprsek plamene. Optimalizace se provádí pomocí měření vertikálního rozložení intenzity absorpce, které se označuje jako tzv. plamenový profil. [22-24]

2.5.2 Elektrotermická atomizace

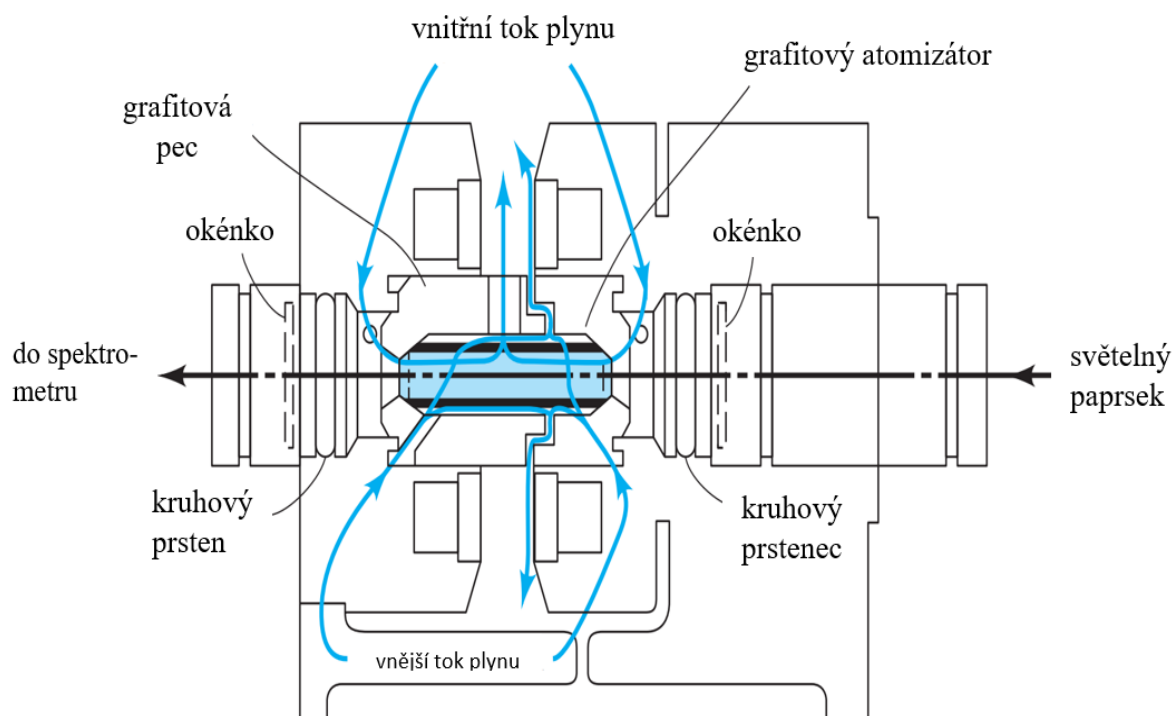
Protože atomizace v plameni nedosahuje dostatečně nízkých LOD, které by byly potřebné pro řešení řady analytických problémů, např. analýzy vzorků pro hodnocení stavu životního prostředí nebo analýzy čistých chemikálií, byly hledány nové způsoby atomizace. Jednou z možností je atomizace vzorku v elektrotermickém atomizátoru.

Elektrotermické atomizátory jsou zařízení, vyhřívána na potřebnou teplotu pomocí elektrického proudu, a to buď působením vloženého napětí (odporově vyhřívané atomizátory) nebo působením opačných elektrických nábojů (kapacitně vyhřívané), eventuálně může být použito indukčního tepla elektromagnetického pole.

Jako materiály atomizátoru se používají převážně různé modifikace grafitu (atomizační teploty do 3000 °C). Pro ochranu atomizátoru před oxidací za vyšších teplot, musí být použita ochranná atmosféra např. argonu o velmi vysoké čistotě 99,995 %. Pro speciální případy je u moderních zařízení možné do ochranné atmosféry přidávat tzv. alternativní plyn, který může v určité fázi analytického procesu hrát významnou roli, např. kyslík při spalování organické matrice vzorku v průběhu jeho termické úpravy. [22-24]

Podle tvaru se elektrotermické atomizátory rozdělují na tzv. otevřené a uzavřené typy. V běžné analytické praxi se setkáváme hlavně s uzavřenými atomizátory, které mají převážně tvar trubek. Volné šíření par je omezoáno stěnami atomizátoru a doba zdržení par analytu v pozorovaném objemu je tak podstatně vyšší. Vlastní atomizátor je podélně uchycená grafitová trubka s dávkovacím otvorem uprostřed. Část atomizátoru, kam je dávkován vzorek, se nazývá podložka vzorku a může být nedílnou součástí atomizátoru, nebo může být výměnná (platforma, sonda, lodička atd.). Uzavřené atomizátory představují poměrně masivní zařízení, které bývá chlazeno vodou. U nejmodernějších typů je pak vnější kovový plášť důkladně chráněn proti korozi a vnější prostor bývá kompletně vyložen grafitem, což prodlužuje životnost vlastního atomizátoru. Průřez typickým uzavřeným atomizátorem Massmanova typu ukazuje obrázek 5. [22-24]

Obrázek 5 Průřez atomizační hlavici, upraveno z [27]



Tok ochranného plynu bývá rozdělen na vnější tok, který chrání atomizátor před oxidací kyslíkem z vnější atmosféry a vnitřní tok, který proudí od krajů atomizátoru směrem doprostřed a odchází dávkovacím otvorem. Jeho hlavní úlohou je odnos zplodin vznikajících v průběhu atomizačního procesu mimo atomizátor.

Dříve byly elektrotermické atomizátory vyráběny pouze z polykrystalického elektrografitu, který je chemicky odolný, mechanicky pevný a snadno dostupný v potřebné

čistotě. Jeho nedostatkem je značná porozita povrchu, která umožňuje vsakování vzorku a difuzi par vzorku do struktury atomizátoru. Hlavní nevýhodou je však značná reaktivita s prvky, které snadno tvoří karbidy (případně karbonitryly, jestliže je používána dusíková atmosféra). Vzniklé karbidy jsou termicky velmi stabilní, takže příslušný prvek není možné stanovit (Ti, Zr, Hf, Ta, W atd.) nebo je jeho stanovení komplikované tzv. paměťovými efekty a nízkou citlivostí (V, Mo, Ba, Si, P, U a prvky vzácných zemin). Paměťové efekty jsou způsobeny nedokonalým odpařením prvku nebo jeho sloučeniny během jednoho atomizačního cyklu, což se projeví zkreslením signálu v následujících atomizačních cyklech. Povrch elektrografitických atomizátorů navíc snadno podléhá korozi, která je způsobená sublimací krystalků grafitů a oxidací kyslíkem přítomným v analyzovaných vzorcích. To způsobuje změny vlastností atomizátoru během jeho života, zejména změny citlivosti stanovení, které výrazně komplikují provádění analýz. [22-24]

Pro zlepšení vlastností elektrografitu se jeho povrch potahuje vrstvou pyrolytického uhlíku. Vrstva je prakticky neporézní a díky tomu, že acenové vrstvy pyrolytického uhlíku jsou orientovány rovnoběžně s povrchem atomizátoru, je výrazně snižena reaktivita povrchu, protože reaktivnější uhlík v prizmatických rovinách se prakticky nedostává do styku s roztokem. Díky tomu lze získat vyšší signály pro prvky tvořící karbidy a snižují se paměťové efekty. Přesto atomizátory s takto upraveným povrchem zpravidla nevykazují podstatné prodloužení životnosti, zvláště v přítomnosti některých látek, jako je NH_4NO_3 , NaNO_3 , HClO_4 , AlCl_3 , H_2SO_4 , H_2O_2 . Jestliže totiž dojde k prokorodování relativně tenké pyrolytické vrstvy, dochází k rapidní změně vlastností atomizátoru. Pro odstranění těchto problémů jsou vyráběny tzv. TPC atomizátory, které jsou celé vyrobeny z pyrolytického uhlíku. Přestože vykazují podstatné prodloužení životnosti, jejich širokému rozšíření brání příliš vysoká cena. Zatím nejúspěšnějším řešením jsou tzv. ELC atomizátory, které používají masivní vrstvy pyrolytického uhlíku. Ty vykazují velmi dlouhou životnost při přijatelné ceně (např. 4000 tzv. odpalů při stanovení Mn v mořské vodě). [22-24]

Další nevýhodou grafitových atomizátorů je omezení maximální rychlosti ohřevu atomizátoru. Ta je dána poměrně značným měrným elektrickým odporem, takže pro vysoké rychlosti ohřevu by byly potřebné příliš velké příkony. Dalším omezujícím faktorem je poréznost grafitu, kdy tepelná expanze plynů v pórech materiálu při vysokých rychlostech ohřevu způsobí mechanickou destrukci atomizátoru. U běžných komerčních grafitových atomizátorů je maximální používaná rychlost $2000 \text{ K}\cdot\text{s}^{-1}$. [22-24]

2.5.3 Interference matrice

Interferenci matrice rozumíme efekt rozdílné velikosti signálu, kterou získáme pro stejnou koncentraci analytu v čistém standardu a za přítomnosti doprovodných složek. Interference mohou způsobovat jak zvýšení, tak i snížení signálu. Pro popis interference je výhodné provést jejich základní členění podle mechanismu vzniku interference. Jestliže je interferent znám, můžeme sestavit tzv. interferenční křivku, což je závislost hodnoty absorbance (pro konstantní obsah analytu) na koncentraci interferentu. Obecně je možné říci, že interference se výrazněji uplatňují u techniky ET-AAS než u F-AAS.

Interference matrice rozlišujeme na spektrální a nespektrální, přičemž spektrální interference jsou závislé na vlnové délce. [22-24]

Spektrální interference

Spektrální interference jsou způsobeny nedokonalou izolací absorpčního signálu analytu od absorpčního signálu interferentu. Právě čárové interference (překryv dvou absorpčních čar) se vyskytují v AAS jen zřídka a z hlediska praktického nemají význam. Podstatně více se v praxi uplatňuje nedostatečná izolace správné čáry z emisního spektra výbojky, zejména u víceprvkových lamp, kde je někdy nutné zvolit jinou absorpční čáru.

Mezi spektrální interference patří také absorpce pozadí. Při stanovení vysokých koncentrací plamenovou technikou je možné většinou absorpci pozadí zanedbat, při analýze nízkých koncentrací a při analýze s využitím ET-AAS je používání korekce pozadí spíše pravidlem. Špatně provedená korekce pozadí může přinést jak pozitivní, tak i negativní chybu. Správné provedení korekce souvisí zejména s tím, vykazuje-li pozadí strukturovanou povahu. V tomto případě je nejvýhodnějším způsobem Zeemanovská korekce. Používání Zeemanovské korekce je možné v určitých spektrálních intervalech, ale je omezeno tím, že i pozadí příslušející matici vykazuje Zeemanovské štěpení (např. NO_x). Některé přístroje s korekcí pomocí kontinuálního zdroje záření, vybavené pouze deuteriovou výbojkou, mohou mít problémy s korekcí nad vlnovou délkou 340 nm, kde je intenzita záření deuteriové výbojky nízká. [22-24]

Nespektrální interference

Mezi nespektrální interference zahrnujeme všechny ostatní vlivy matrice. Aby se nespektrální interference mohla projevit, musí být analyzovaný prvek ve vzorku přítomen. Roztřídění nespektrálních interference pro F-AAS a ET-AAS shrnuje tabulka V. Z ní

vyplývá, že základní dělení je na interference v kondenzované a v plynné fázi. Z hlediska studia interferencí hraje roli ještě rozdělení na fyzikální a chemické interference. Při sestavení interferenční křivky vykazují fyzikální interference monotónní, zpravidla lineární závislost, zatímco interference chemické vykazují náhlé zlomy. [22-24]

Tabulka V Třídění nespektrálních interferencí [23]

F-AAS	ET-AAS
Interference v kondenzované fázi	
interference transportu – změny v rychlosti sání a účinnosti zmlžování rušivé vlivy vypařování kondenzované fáze - vznikem méně těkavé sloučeniny - vznikem těkavější sloučeniny - disperzí analytu v rušící složce s odlišnou těkavostí	-změny rozložení analytu na podložce při dávkování a sušení vzorku (změny povrchového napětí a viskozity vzorku, změny smáčivosti povrchu a nasákivosti materiálu atomizační podložky) -změny vznikem snadno těkavé sloučeniny -změny aktivační energie pro následující přechod do plynné fáze
Interference v plynné fázi	
posun disociační rovnováhy posun ionizační rovnováhy změny prostorového rozložení volných atomů v plameni	posun disociační rovnováhy změny v rychlosti výstupu analytu

2.6 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

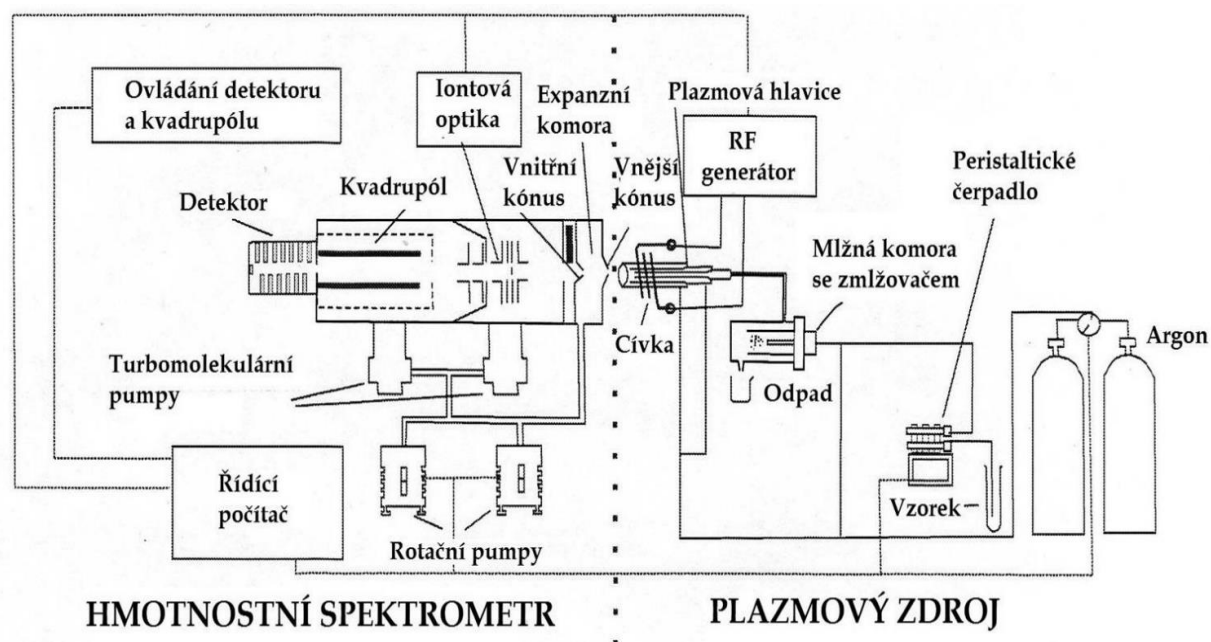
Využití hmotnostní spektrometrie pro anorganickou prvkovou analýzu nabízí celou řadu výhod, především velice jednoduchá spektra, dostačující rozlišovací schopnost a nízké meze detekce. Ideální iontový zdroj by měl zaručovat 100 % disociaci vzorku s vysokým výtěžkem iontů a nízkým podílem molekulárních fragmentů. Je velice výhodné používat iontové zdroje, které pracují za atmosférického tlaku, jako je indukčně vázané plazma. Hlavní přednosti této analytické techniky lze shrnout do těchto bodů: 1. *Velice nízké meze detekce* ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ až $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$), v řadě případů o dva i tři řády nižší než emisní spektrometrie, 2. *široký lineární dynamický rozsah* přesahující až šest řádů (dnes výrobci udávají rozsah 9-10 řádů), 3. *hmotnostní spektra prvků jsou velice jednoduchá a jednoznačná*, protože jsou unikátní, metoda slouží také k rychlé kvalitativní a semikvantitativní analýze, 4. *metoda je schopna měřit izotopové poměry* a umožňuje aplikaci metody izotopového zředování a používání stálých izotopů jako značkovačů. Metoda ICP-MS našla využití ve všech oblastech prvkové analýzy, od analýz v potravinářství, farmacii, biomedicině, environmentálních oborech, metalurgii, geologii až po analýzy v průmyslu. Kromě stanovení celkových obsahů kovů je

tato metoda také často používána jako citlivý a selektivní detektor pro tzv. speciální analýzu, ve které je přístroj ICP-MS on-line spojen nejčastěji s HPLC. Ve spojení s laserovou ablací může také ICP-MS sloužit k citlivé analýze pevných vzorků. [22,28-30]

2.6.1 Instrumentace

Na obrázku 6 je detailně popsán přístroj ICP-MS.

Obrázek 6 Schéma ICP-MS, upraveno z [31]



2.6.2 Princip metody

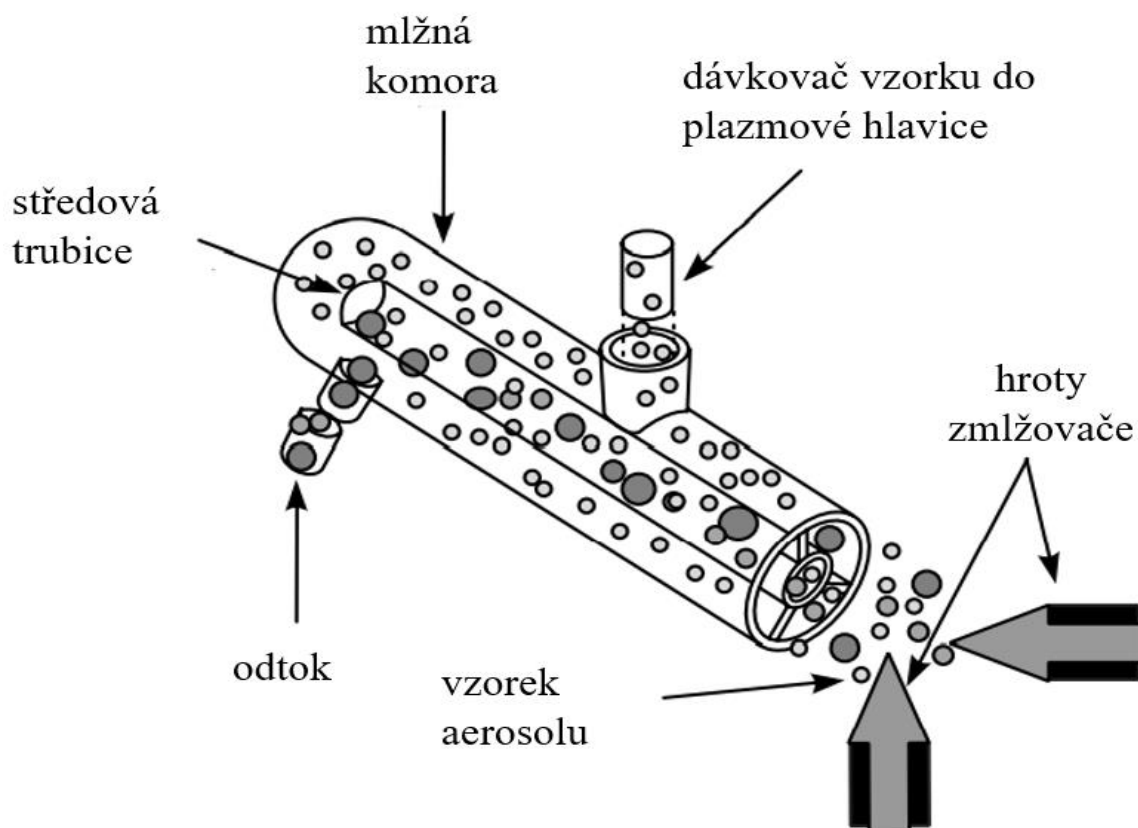
Vzorek, který bývá převážně ve formě roztoku, je čerpán nasávací rychlostí asi $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ pomocí peristaltické pumpy do zmlžovače, kde se mícháním s inertním plynem přemění kapalný vzorek na formu aerosolu. Jemné kapičky aerosolu, které představují pouze 1-2 % objemu vzorku, jsou odděleny od větších kapiček pomocí mlžné komory. Tento jemný aerosol pak vystupuje z výstupní trubice mlžné komory a je transportován do plazmové hlavice prostřednictvím dávkovače vzorku. [22,28-30]

Jakmile vzorek vstoupí do zmlžovače, kapalina se rozptýlí na jemný aerosol pneumatickým působením proudu plynu (asi $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$), kapky se rozbijí na drobné kapky.

Protože plazmový výboj není příliš účinný při disociaci velkých kapek, funkcí mlžné komory je primárně umožnit vstup do plazmové hlavice pouze malým kapičkám. Jejím sekundárním účelem je vyhlazovat pulsy vznikající během procesu zmlžování, zejména z

peristaltického čerpadla. Nejběžnějším typem mlžné komory je dvouprůchodové provedení, kde je aerosol ze zmlžovače nasměrován do centrální trubice po celé délce komory. Kapky pak putují po celé délce této trubice, kde velké kapky (o průměru $>10\ \mu\text{m}$) vypadnou gravitací a vyjdou drenážní trubicí na konci rozprašovací komory. Jemné kapičky (o průměru $<10\ \mu\text{m}$) pak procházejí mezi vnější stěnou a centrální trubicí, kde nakonec vystupují z mlžné komory a jsou transportovány do dávkovače vzorku plazmové hlavice. Zjednodušené schéma procesu použití dvouprůchodové mlžné komory je znázorněno na obrázku 7. [22,28-30]

Obrázek 7 Schéma separace kapek aerosolu v mlžné komoře, upraveno z [28]



2.6.3 Vzniku iontů

Aerosol se z mlžné komory přivede k základně plazmové hlavice a tak, jak prochází různými tepelnými zónami plazmové hlavice, je aerosol vysušen, odpařen, atomizován, a nakonec ionizován. Během této doby se vzorek transformuje z kapalného aerosolu na pevné částice a poté na ionty v plynném stavu. V analytické tepelné zóně plazmové hlavice při teplotách 6000-7000 K představuje vzorek elementární složení jako atomy a ionty v základním stavu. V plazmatu je tedy dostatek energie k odstranění jednoho nebo více

elektronů z jeho orbitalu a k vytvoření volného iontu. Energie, která je dostupná v argonovém plazmatu, činí asi 15,8 eV, což je dostatečně vysoká energie k ionizaci většiny prvků uvedených v periodické tabulce (většina prvků má první ionizační energii v řádu (4-12 eV). Právě toto generování, transport a detekce obrovského množství kladně nabitých iontů poskytuje ICP-MS charakteristické ultrastopové detekční meze. [22,28-30]

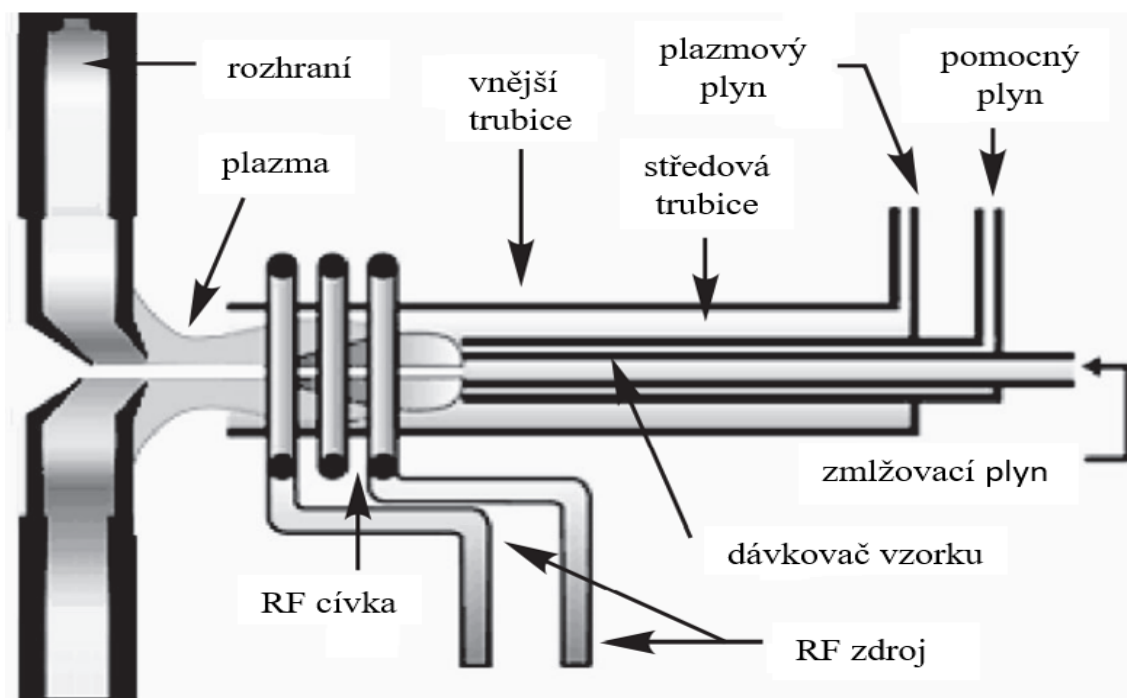
2.6.4 Plazmová hlavice

Indukčně vázané plazma je zdaleka nejběžnějším typem plazmového zdroje používaného v dnešních komerčních ICP-MS. Nebylo tomu tak vždy. V počátečních dobách výzkumu metody, když se vědci pokoušeli najít ideální zdroj plazmatu pro spektrometrické studie, nebylo jasné, který přístup buzení plazmatu se ukáže jako nejúspěšnější. Kromě ICP byly vyvinuty některé další zdroje plazmatu jako např. stejnosměrné plazma nebo mikrovlnně indukované plazma. [22,28-30]

Obrázek 8 ukazuje podrobnější pohled na plazmovou hlavici a RF cívku vzhledem k MS rozhraní. Plazmová hlavice se skládá ze tří soustředných trubic, které se běžně vyrábějí z křemene. Na obrázku 8 jsou znázorněny jako vnější trubice, střední trubice a dávkovač vzorku. Argon, který se používá k vytvoření plazmového plynu, prochází mezi vnější a střední trubicí při průtoku 12-17 l·min⁻¹. Druhý proud plynu (pomocný plyn) prochází mezi střední trubicí a dávkovačem vzorku rychlostí asi 1 l·min⁻¹ a používá se ke změně polohy báze plazmy vzhledem k trubicí a dávkovači. Třetí proud plynu (plyn z rozprašovače) proudí rovněž rychlostí asi 1 l·min⁻¹ a přivádí vzorek ve formě aerosolu s jemnými kapičkami z mlžné komory. [22,28-30]

Dávkovač vzorku je často vyroben z jiných materiálů než křemen, jako je oxid hlinitý nebo platina, pokud je třeba analyzovat vysoce korozivní materiály. Plazmová hlavice je obvykle umístěna vodorovně v RF cívce, přibližně 10-20 mm od rozhraní. [22,28-30]

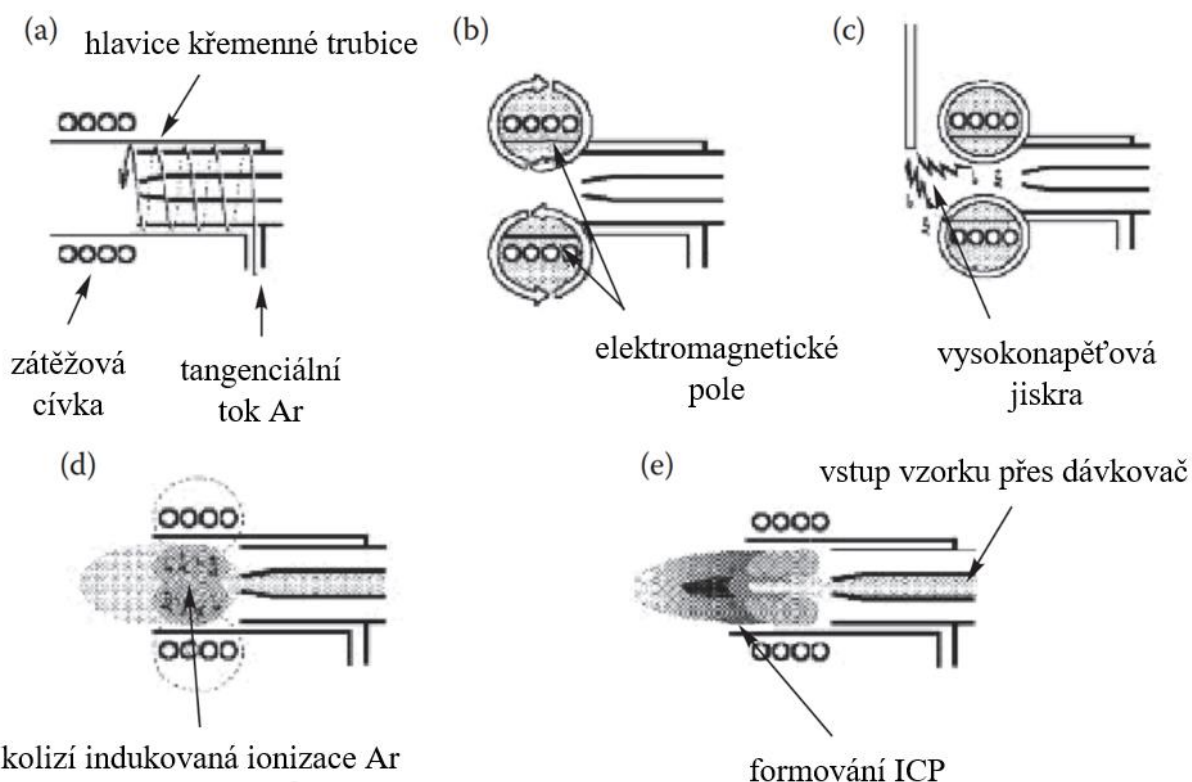
Obrázek 8 Detailní popis ICP hlavice, upraveno z [28]



2.6.5 Vznik ICP výboje

ICP výboj vzniká tak, že je nejprve tangenciální proud argonu nasměrován mezi vnější a střední trubice křemenného hořáku. Vinutá cívka (obvykle měděná) obklopuje horní konec hořáku a je připojená k RF generátoru. Při RF napájení (obvykle 750-1500 W, v závislosti na vzorku) je příkon přiveden na zátěžovou cívku a uvnitř cívky kmitá střídavý proud s frekvencí odpovídající frekvenci generátoru. V drtivé většině ICP generátorů je tato frekvence buď 27 MHz nebo 40 MHz. Tato RF oscilace proudu v cívce způsobuje vznik intenzivního elektromagnetického pole, které se vytvoří v horní části plazmové hlavice. S argonem, proudícím skrze hlavici je na plyn aplikována vysokonapěťová jiskra, která způsobí, že některé elektrony jsou vyraženy z elektronového obalu argonu a vzniká Ar^+ . Tyto elektrony, které jsou zachyceny a urychleny v magnetickém poli, poté interagují s jinými atomy argonu, z nichž se vyrazí ještě více elektronů. Tímto kaskádovým efektem pak vzniká argonové plazma. Krokové formování plazmové hlavice je znázorněno na obrázku 9. [22,28-30]

Obrázek 9 Formování plazmové hlavice (krokově), upraveno z [28]



pozn. (a) tangenciální proud argonu prochází mezi vnější a střední trubicou křemenného hořáku, (b) na zátěžovou cívku je aplikováno vysokofrekvenční napájení, které vytváří intenzivní elektromagnetické pole, (c) vysokonapěťová jiskra produkuje volné elektrony, (d) volné elektrony jsou urychlovány RF polem způsobující srážky a ionizaci plynného argonu, (e) ICP se tvoří na otevřeném konci křemenné trubice, vzorek je zaveden do plazmy přes vzorkový injektor. [22,28-30]

2.6.6 Rozhraní mezi ICP a MS

Úlohou oblasti rozhraní, je efektivní transport iontů z plazmatu (při tlaku 760 torr) do oblasti hmotnostního analyzátoru (6-10 torrů). Toho je dosaženo nasměrováním iontů do oblasti rozhraní. Rozhraní se skládá ze dvou nebo tří kovových kuželů (v závislosti na provedení) s velmi malými otvory, které jsou udržovány ve vakuu (1-2 torrů). Po vytvoření iontů v plazmatu přecházejí ionty skrze první kužel, který má otvor o vnitřním průměru 0,8-1,2 mm. Následně ionty přecházejí skrze druhý kužel, který je obecně menší a špičatější než první kužel a má také menší otvor (typicky 0,4-0,8 mm). V některých provedeních ICP-MS je instalován i třetí kužel, který se používá ke snížení vakua a poskytuje menší rozptyl iontového paprsku. Tyto kužely jsou obvykle vyrobeny z niklu, ale mohou být vyrobeny i z jiných materiálů, jako je platina, která je mnohem odolnější vůči korozivním kapalinám. Ke

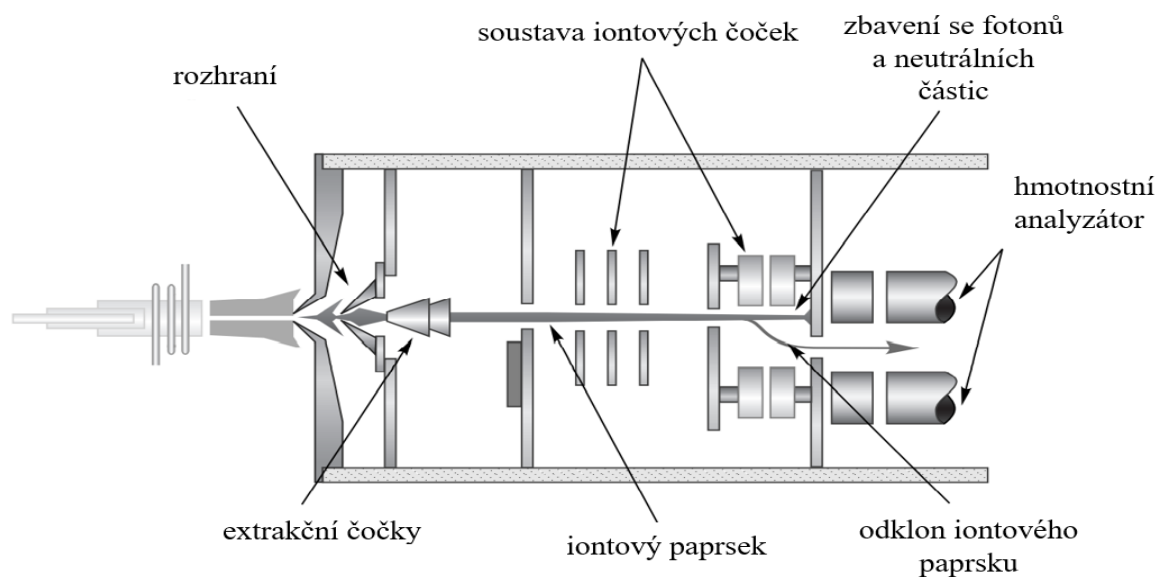
snížení účinků vysokých teplot plazmatu na kužely je kryt rozhraní chlazený vodou a je vyrobený z materiálu, který dobře odvádí teplo, jako je měď nebo hliník. Po výstupu z kuželů jsou ionty nasměrovány přes iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru. [22,28-30]

2.6.7 Iontová optika

Ačkoli je detekční schopnost ICP-MS obecně uznávána jako lepší než jakákoli jiná technika atomové spektrometrie, je pravděpodobně nejcitlivější na složky matrice vzorku. Základní problém spočívá v tom, že ICP-MS je relativně neefektivní – z jednoho milionu iontů generovaných v plazmatu se pouze jeden dostane do detektoru. Jedním z hlavních faktorů přispívajících k nízké účinnosti je vyšší koncentrace matricových prvků ve srovnání s analytem, což má za následek rozostření iontů a změnu přenosových charakteristik iontového paprsku, to může být zvláště závažné, pokud mají matricové ionty větší hmotnost než ionty analytu. Úlohou iontového fokusačního systému je tedy transportovat maximální počet iontů analytu z oblasti rozhraní do hmotnostního analyzátoru, zatímco se po cestě eliminuje co největší počet interferentů. [22,28-30]

Iontová optika, znázorněná na obrázku 10 je umístěna mezi posledním kuželem a hmotnostním analyzátozem. Obvykle se skládá z jedné nebo více elektricky řízených čoček udržovaných ve vakuu (3-10 torrů). Složkám matrice, jako jsou neutrální částice a fotony je zabráněno v dosažení detektoru buď pomocí nějakého druhu fyzické překážky nebo umístěním hmotnostního analyzátoru mimo osu vzhledem k iontovému paprsku nebo elektrostatickému ohýbání paprsku iontů o 90° do hmotnostního analyzátoru. [22,28-30]

Obrázek 10 Iontová optika, upraveno z [28]



2.6.8 Hmotnostní analyzátory

Ačkoli se metoda ICP-MS začala komerčně využívat od roku 1983, prvních 10 let vývoje této metody se využívalo k separaci sledovaných iontů tradičních kvadrupólových hmotnostních analyzátorů. Ty sice fungovaly velmi dobře pro většinu aplikací, ale ukázalo se, že vykazují omezení při separaci těch prvků, které mají tendenci tvořit polyatomické interference, a rovněž při práci se složitějšími matricemi vzorku. To vedlo k vývoji dalších hmotnostních analyzátorů, které rozšířily aplikační rozsah ICP-MS. [22,28-30]

Hmotnostní analyzátor je umístěn mezi iontovou optikou a detektorem a je udržován ve vakuu (6-10 torrů). Za předpokladu, že ionty vystupují z iontové optiky při optimální kinetické energii, jsou připraveny k oddělení podle jejich poměru m/z . V zásadě existují tři různé druhy komerčně dostupných hmotnostních analyzátorů, které dobře fungují s ICP: 1. *kvadrupólové hmotnostní analyzátory*, 2. *magnetické sektorové analyzátory s dvojitou fokusací*, 3. *analyzátory doby doletu*. Ještě existuje 4. možnost, *kolizní/reakční cela*. Ta se ale k provádění hromadné separace iontů nepoužívá samostatně, ale ve spojení s nějakým jiným hmotnostním analyzátozem (většinou kvadrupólem). Toto spojení je výhodné pro snížení dopadu polyatomárních spektrálních interferencí. V následující podkapitole je podrobněji popsán kvadrupólový hmotnostní analyzátor, který byl využit v této diplomové práci. [22,28-30]

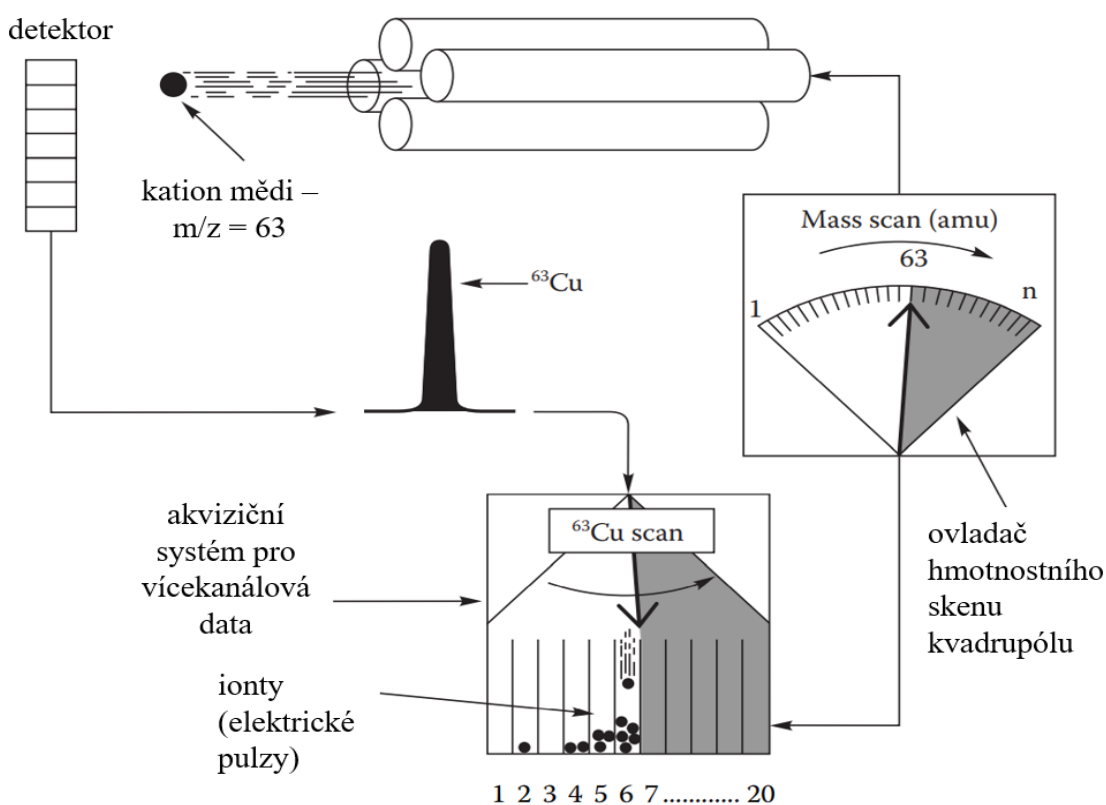
Kvadrupólový hmotnostní analyzátor

Systémy založené na kvadrupólech, vyvinuté na počátku 80. let, představují přibližně 90 % všech dnes používaných ICP-MS spektrometrů. Kvadrupól je obvykle složen ze čtyř válcových nebo hyperbolických kovových tyčí identické délky a průměru. Tyto tyče jsou vyrobeny z nerezové oceli nebo molybdenu a někdy bývají potaženy keramickým nátěrem kvůli zvýšené odolnosti vůči korozi. Při použití v ICP-MS jsou obvykle 15-25 cm dlouhé, asi 1 cm široké a pracují na frekvenci 2-3 MHz. [22,28-30]

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor funguje tak, že se vždy na opačný pár tyčí přivádí stejnosměrný proud (DC) a na druhý pár střídavý proud (AC). Dále se zvolí optimální poměr AC/DC na každém páru tyčí a ionty vybraného poměru m/z se nechají projít tyčemi do detektoru, zatímco ostatní ionty jsou nestabilní a neudrží se v kvadrupólu. Obrázek 11 ukazuje podrobněji příklad separace iontů mědi ($m/z = 63$). Ostatní ionty různých hodnot m/z budou nestabilní, projdou skrze mezery mezi tyčemi a budou vypuzeny z kvadrupólu. Tento skenovací proces se poté opakuje pro další analyty se zcela odlišným poměrem m/z ,

dokud nejsou proměřeny všechny analyty. Teoretická rychlost kvadrupólového skenování je obvykle 2500-5000 amu za sekundu a může pokrýt celý hmotnostní rozsah 0–300 amu za asi 0,1 sekundy. Praktická rychlost analýzy při měření reálných vzorků je však mnohem nižší a v praxi je možno zanalyzovat 25 prvků s dobrou přesností za 2-3 minuty, v závislosti na analytických požadavcích. Rozlišení kvadrupólového hmotnostního analyzátoru je 300-400 (jednotkové). [22,28-30]

Obrázek 11 Příklad separace kationtů mědi, upraveno z [28]



Sektorový analyzátor s dvojitou fokusací a analyzátor doby doletu (TOF)

V této podkapitole bude velice stručně vysvětlen princip těchto dvou hmotnostních analyzátorů, a následně budou porovnány jejich výhody a nevýhody oproti kvadrupólovému hmotnostnímu analyzátoru. [22,28-30]

Hmotnostní analyzátor s dvojitou fokusací se skládá z dvou sektorů: 1. *elektrického sektoru* a za 2. z *magnetického sektoru*. Elektrický sektor separuje ionty podle jejich rozdílné kinetické energie nezávisle na jejich poměru m/z . Naopak magnetický sektor separuje ionty podle jejich poměru m/z tím, že dráha jednoho typu iontů se zakříví, přičemž větší zakřivení dráhy vykazují ionty, které mají nižší hodnotu m/z . To znamená, že dráhy těžších iontů nebudou významně zakřiveny. Výhodou takového přístupu oproti kvadrupólovému

hmotnostnímu analyzátoru je vyšší rozlišovací schopnost okolo 10 000 (oproti 300-400), nevýhodou je cenová náročnost tohoto hmotnostního analyzátoru.

Základní princip analyzátoru doby doletu vyplývá z rovnice, která říká, že kinetická energie iontů je přímo úměrná jejich hmotnosti m a rychlosti v . Pokud je populaci iontů přidělena stejná kinetická energie urychlovacím napětím, rychlosti jednotlivých iontů budou různé, v závislosti na jejich hmotnosti. Tento princip se pak používá k separaci iontů různých poměrů m/z v časové oblasti t na pevné vzdálenosti dráhy doletu d . Z principu vyplývá, že analyzátor doby doletu je schopen naskenovat asi 20 000 spekter za sekundu, což je asi o tři řády vyšší rychlost skenování oproti kvadrupólovému hmotnostnímu analyzátoru. Další velmi významnou výhodou oproti kvadrupólovému hmotnostnímu analyzátoru je vyšší rozlišení 500-2000. Nevýhodou analyzátoru doby doletu je ovšem jeho vysoká pořizovací cena a rovněž jeho neschopnost, separovat některé problematické polyatomické interference právě kvůli nižšímu rozlišení oproti hmotnostnímu analyzátoru s dvojitou fokusací (500-2000 oproti 10 000). [22,28-30]

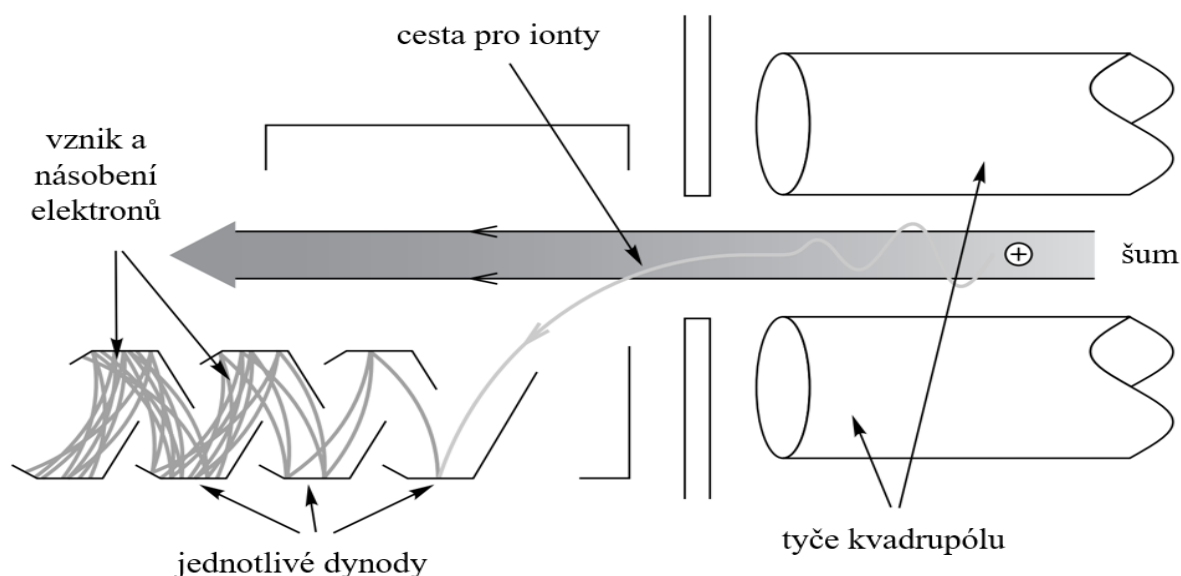
2.6.9 Detektory

Nejrozšířenější detektory pro ICP-MS jsou elektronový násobič pro nízké četnosti počtu iontů a Faradayova klec pro vysoké četnosti počtu iontů. Většina ICP-MS, které se používají pro ultra stopovou analýzu, používají detektory, které jsou založeny na diskretním dynodovém elektronovém násobiči. Jsou to velmi sofistikovaná účinná zařízení, která mění zachycený proud iontů na znásobený elektrický signál. [22,28-30]

Diskrétní elektronový násobič

Diskrétní dynodový elektronový násobič, využívá diskretních dynod k násobení elektronů. Obrázek 12 znázorňuje princip fungování tohoto zařízení. Detektor je umístěn mimo osu, aby se minimalizoval šum na pozadí z rozptýleného záření a neutrálních částic přicházejících z plazmatu. Když z kvadrupólu vyletí iont, prochází zakřivenou cestou a dopadne na první dynodu. Při dopadu se emitují sekundární elektrony. Elektronově-optická konstrukce dynody zrychlí tyto sekundární elektrony k další dynodě, kde se generuje větší množství elektronů. Tento proces se opakuje na každé dynodě a generuje se elektronový pulz, který je nakonec zachycen kolektorem násobiče (anodou).

Obrázek 12 Princip detekce iontů diskrétním elektronovým násobičem, upraveno z [28]



Elektronový násobič je schopen pracovat ve dvou měřicích módech. Při vyšších koncentracích analytu ve vzorku není potřeba využívat všechny dynody z elektronového násobiče, tím se prodlužuje životnost detektoru. [22,28-30]

2.6.10 Interference u ICP-MS

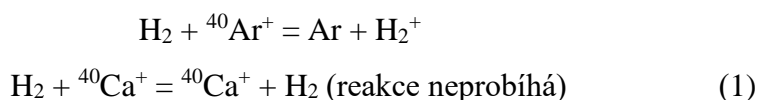
ICP-MS trpí dvěma hlavními typy interferencí: 1. spektrálními a 2. nespektrálními. Spektrální interference vznikají v případě, když interferující iont vykazuje stejnou nominální hodnotu m/z jako sledovaný analyt. Rušivé ionty mohou být buď izotopem jiného prvku (takovéto případy jsou v literatuře dobře popsány, a tudíž snadno řešitelné) nebo vytvořeným molekulárním iontem z prvků v matrici vzorku, plazmového plynu, vody nebo z unášených atmosférických plynů. Molekulární ionty se nedají tak snadno eliminovat, protože se liší v závislosti na povaze matrice vzorku. Mnoho interferencí lze překonat výběrem alternativního izotopu prvku, který je bez rušení, i když může dojít ke snížení citlivosti.

Dnes existují tři základní přístupy k řešení interferencí: 1. tzv. *chladné plazma*, 2. *využití kolizních/reakčních cel*, 3. *separace podle kinetické energie*. [22,28-30]

Mnoho polyatomických iontů vzniká na rozhraní v důsledku sekundárního výboje způsobeného kapacitní vazbou mezi plazmatem a uzemněným rozhraním. Tento výboj lze eliminovat provozováním plazmatu při nízkém výkonu (typicky 600 W) a úpravou plazmové hlavice vložením uzemněného stínění, popř. pomocí vysokofrekvenčních cívek se středovým nebo prokládaným závitem. Za těchto podmínek tzv. „chladného plazmatu“ lze eliminovat mnoho polyatomických iontů. Nevýhody, které se týkají tohoto způsobu provozu

plazmatu jsou: 1. plazma je méně robustní a může trpět více na nespektrální maticové interference, 2. chladné plazma podporuje tvorbu oxidů a dalších žáruvzdorných sloučenin, takže LOD mnoha žáruvzdorných prvků mohou být zvýšeny. [22,28-30]

Přístup využití kolizní/reakční cely, která významně snižuje tvorbu mnoha interferencí ještě před tím, než ionty analytu vstoupí do hmotnostního analyzátoru, je dalším způsobem, jak eliminovat interference. Existuje malý počet prvků, u kterých je zhoršená LOD. Příklady těchto interferencí jsou: 1. $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ při stanovení $^{56}\text{Fe}^+$, 2. $^{38}\text{ArH}^+$ při stanovení $^{39}\text{K}^+$, 3. $^{40}\text{Ar}^+$ při stanovení $^{40}\text{Ca}^+$, 4. $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ při stanovení $^{80}\text{Se}^+$, 5. $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ při stanovení $^{75}\text{As}^+$, 6. $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ při stanovení $^{52}\text{Cr}^+$, 7. $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ při stanovení $^{51}\text{V}^+$. Přístup s využitím chladného plazmatu byl velmi účinný způsob, jak úspěšně vyřešit některé z těchto interferencí. Takový přístup se však obtížně optimalizuje, je náchylný k intenzivnějším účinkům matrice a samotná změna od normální plazmy k chladné a zpět je časově náročná. Tato potíž vedla k vývoji kolizních/reakčních cel. Základní princip kolizní/reakční cely spočívá v nasměrování iontů přes iontovou optiku do příslušné cely, která se nachází před kvadrupólem. Kolizní/reakční plyn (např. He, H₂, NH₃ nebo O₂) je poté přiveden vstupním otvorem do článku obsahující multipól (kvadrupól, hexapól nebo oktapól) obvykle provozovaným pouze v radiofrekvenčním režimu. Pouze RF pole neodděluje hmoty jako tradiční kvadrupól, ale místo toho má účinek fokusace iontů, které se potom srazí/reagují s molekulami plynu. Díky řadě různých srážek iontů a molekul a reakčních mechanismů budou polyatomické interferující ionty jako $^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ a $^{38}\text{ArH}^+$ převedeny na neškodné neinterferující látky nebo bude analyt převeden na jiný ion, který nebude interferovat. Tento proces je ilustrován níže uvedenou rovnicí 1, která ukazuje použití vodíku jako reakčního plynu ke snížení interference $^{40}\text{Ar}^+$ při stanovení $^{40}\text{Ca}^+$. [22,28-30]



Rovnice 1 ukazuje, že molekula vodíku interaguje s interferencí argonu za vzniku atomu argonu a neškodného H₂⁺ iontu. Neexistuje však žádná interakce mezi H₂ a $^{40}\text{Ca}^+$. Výsledkem je, že $^{40}\text{Ca}^+$ bez interference argonu vystupují z kolizní/reakční cely výstupním otvorem a jsou nasměrovány do kvadrupólu. [22,28-30]

Výše uvedená rovnice 1 ukazuje příklad reakce ion-molekula využívající přenosu náboje. Přenosem kladného náboje z $^{40}\text{Ar}^+$ na H₂⁺ vzniká neškodný neutrální atom argonu, který hmotnostní analyzátor neseperuje. Existuje mnoho dalších reakčních a srážkových

mechanismů, které mohou probíhat v kolizní/reakční cele v závislosti na povaze iontu analytu, který interferuje.

Další možné mechanismy, které mohou v kolizní/reakční cele probíhat jsou:

1. *přenos protonu*-interferující víceatomové druhy se vzdávají protonu, který se pak přenesou na molekuly reakčního plynu za vzniku neutrálního atomu, 2. *přenos atomu H₂*-atom H₂ se přenesou na rušící iont, který se přemění na iont o jednu hmotnostní jednotku vyšší,

3. *molekulární asociační reakce*-interferující iont se spojí s neutrálním druhem (atomem nebo molekulou) za vzniku molekulárního iontu,

4. *kolizní fragmentace*-polyatomický iont je rozbit nebo fragmentován procesem mnohočetných srážek s atomy plynu,

5. *srážková retardace*: atomy/molekuly plynu podléhají mnohočetným srážkám s polyatomicky interferujícím iontem za účelem zpomalení nebo snížení jeho kinetické energie. Protože interferující iont má větší velikost oproti iontu analytu, podléhá více srážkám a v důsledku toho může být oddělen od analytu na základě rozdílné kinetické energie,

6. *kolizní fokusace*-ionty analytu ztrácejí energii, když se srazí s molekulami plynu a v závislosti na molekulové hmotnosti plynu bude buď zesílen přenos iontů, pokud ionty migrují směrem ke středové ose kolizní/reakční cely nebo se sníží citlivost, pokud dochází k rozptylu iontů.

Polyatomické ionty se svými většími srážkovými průřezy trpí více na srážky než jednoatomové ionty analytu. To vede k tomu, že polyatomický iont má nižší kinetickou energii a lze jej rozlišit právě na základě odlišné kinetické energie. Například iont ³⁵Cl¹⁶O⁺ (iontový poloměr 230 pm), který se překrývá s ⁵¹V⁺ (iontový poloměr 135 pm), má nižší kinetickou energii. V praxi se jako srážkový inertní plyn používá He. Předpětí pólů mezi kolizním článkem a kvadrupólem má za následek efektivní zpomalovací potenciál asi 2 V, který zabraňuje polyatomickým iontům s nižší kinetickou energií dosáhnout hmotnostního analyzátoru. [22,28-30]

2.7 Přehled vědeckých článků

V této kapitole budou přehledně uvedeny vybrané vědecké články, ze kterých byly při psaní této diplomové práce čerpány užitečné informace. Před samotnou prací v laboratoři mě mimo jiné zajímalo, jaké kovy už autoři analyzovali, odkud se ve vzorcích čokolády tyto kovy berou, jakým způsobem autoři rozložili matici čokolády a kakaové hmoty, jaké trendy

pozorovali a k jakým výsledkům obecně došli. Přehled základních informací získaných z vědeckých článků je uveden v tabulce VI, která je rozdělena do 3 částí.

Tabulka VI Přehled základních informací získaných z vědeckých článků (část 1/3) [32-44]

Metoda stanovení	Analyzované prvky	Způsob rozkladu vzorku	Vyhodnocení dat	Článek
F-AAS, ET-AAS	Cd, Cu, Fe, Ni, Mn, Pb, Mn	K 0,5 g vz. + 5 ml konc. HNO ₃ a směs se zahřála na 70 °C na 1 h. Poté se + 1,5 ml konc. HClO ₄ a směs se zahřála na teplotu 240 °C, do 10 ml odměrné baňky.	Autoři analyzovali 32 vz. čokolád. Obsahy Cd, Fe, Ni a Pb jsou nejvyšší v hořkých čokoládách. Čokoláda je vynikající zdroj Fe a Zn. Obsahy Cu, Mn a Zn přímo koreluje s obsahem mléka.	2012 [32]
F-AAS	Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn	K 2 g vz. + konc. HNO ₃ a roztok se převedl do 50 ml odměrné baňky.	Autoři analyzovali 17 vz. čokolád a kaka. Obsahy Cu, Fe, Mn a Zn rostou se zvyšujícím se obsahem kaka. v čokoládě. Obsah Cd byl u všech vzorků pod legislativním limitem 1,0 mg·kg ⁻¹ , podobně to bylo u Pb s legislativním limitem 3,0 mg·kg ⁻¹ .	2015 [33]
ICP-MS	Cd, Pb	MR, 0,5 g vz. + 5 ml konc. HNO ₃ a 1 ml H ₂ O ₂ , po rozkladu + 2,5 ml 10 % HCl a roztok se převedl do 50 ml odměrné baňky.	Autoři analyzovali 144 vz. čokolád, kaka. a kakaových nibů. K validaci metody byly využity CRM: 1. NIST SRM 2384 čokoláda k pečení, 2. kaka. (FDA). Výtěžky pro CRM byly u Cd a Pb 1. 112 a 103 %, 2. 99 a 111 %. LOD pro Cd a Pb byly 0,408 a 1,20 µg·kg ⁻¹ a LOQ byla 3,71 a 10,9 µg·kg ⁻¹ . Mezi množství kaka. a obsahem Cd a Pb existuje silná korelace. Ve vz. půdy, které jsou bohaté na sopečný prach, jsou vyšší koncentrace Cd. Nejdůležitější parametr, který ovlivňuje biologickou dostupnost Cd pro kakaovník je pH půdy.	2018 [34]
ET-AAS	Cd, Pb	MR, 0,5 g vz. + 6,5 ml 6 molární HNO ₃ a 1,5 ml H ₂ O ₂	Autoři analyzovali 30 vz. čokolád. Obsahy Cd a Pb byly v rozsahu 1,7-107,6 a 21-138,4 µg·kg ⁻¹ . V hořkých čokoládách jsou nejvyšší obsahy Cd a Pb. Bylo zanalyzováno 5 čokolád od stejného výrobce (34-85 %) a sledovala se korelace mezi množstvím kaka. a koncentrací Cd a Pb. Existuje silná korelace, pro Cd (R ² = 0,907) a pro Pb (R ² = 0,955).	2014 [35]
F-AAS, ET-AAS	As, Cd, Cu, Fe, Ni, Hg, Pb, Zn	MR, 0,25 g vz. + 5 ml konc. HNO ₃ a 2 ml H ₂ O ₂	Autor analyzoval 12 čokolád s pistácií. Tyto čokolády jsou bohaté na Cu, Fe, a Zn. Obsah těžkých kovů byl pod limity, pro As 1,00 a pro Pb 0,04 mg·kg ⁻¹ . Dále byly analyzovány ingredience na výrobu čokolády (sušené mléko, pistácie, kaka. a bílý cukr a hydrogenovaný rostlinný olej). Kaka. obsahuje nejvyšší množství Cd, Hg, a Pb. Nejvyšší množství Ni bylo nalezeno v hydrogenovaném rostlinném oleji.	2008 [36]

Tabulka VI Přehled základních informací získaných z vědeckých článků (část 2/3) [32-44]

Metoda stanovení	Analyzované prvky	Způsob rozkladu vzorku	Výhodnocení dat	Článek
F-AAS	Cd, Cu, Ni, Zn	K 0,5 g vz. + 10 ml konc. HNO ₃ , další den se roztok zahřál 130 °C po dobu 6 h, následně se roztok převedl do 25 ml odměrné baňky.	Autoři vyvinuli rutinní metodu pro analýzu kovů v čokoládě a kakaových bobech. K validaci metody byl využit CRM čokoláda k pečení (SRM 2384) pro Cu a Zn s výtěžky 105,9 a 106,5 %.	2014 [37]
ET-AAS	Ni	K 0,5 g vz. + 3 ml konc. HNO ₃ a 1 ml H ₂ O ₂ , po rozkladu se roztok převedl do 10 ml odměrné baňky.	Autoři analyzovali 9 vz. hydrogenovaných rostlinných tuků a cukrářských produktů. LOD byl 1,14 µg·l ⁻¹ a LOQ 3,71 µg·l ⁻¹ . V rostlinných tucích bylo 0,086 mg·kg ⁻¹ či méně Ni, u sladkostí to bylo mnohem více od 0,742 do 3,141 mg·kg ⁻¹ . Vyšší koncentrace Ni pochází z ořechů v polevě. Tato množství Ni nejsou pro člověka nebezpečné.	2017 [38]
F-AAS	Cd	K 0,5 g vz. + 7 ml konc. HNO ₃ , směs na 180 °C po dobu 35 min., po zchlazení + 2 ml H ₂ O ₂ a roztok do 25 ml odměrné baňky.	Autoři analyzovali 14 65 % čokolád z Kolumbie a 7 zahraničních čokolád (47-80 %). U kolumbijských 65 % hořkých čokolád byl průměrný obsah Cd 4,05 mg·kg ⁻¹ , to překročuje limit 0,8 mg·kg ⁻¹ . U zahraničních čokolád byl průměrný obsah Cd 2,40 mg·kg ⁻¹ .	2016 [39]
ICP-MS	Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Mn, Pb	Vzorky byly vysušeny při 100 °C po dobu 48 h, k 6 g vz. + konc. HNO ₃ a směs byla vyzhánána při 550 °C po dobu 4 h, obsah byl převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn 1 molární HNO ₃ .	Autor analyzoval 27 vz. kakaa a čokoládových produktů. Příjem As, Cd, Cr, Hg, Ni, Mn a Pb ze všech vz. je pod legislativním limitem. Kakaové produkty překročují příjmový limit pro Al. Index hazardu pro kakaové produkty byl vypočítán na 1,909, což poukazuje na to, že konzumace většího množství těchto produktů může vést ke zdravotním problémům. K tomuto indexu přispívá z 34,08 % Co. U rizika vývoje rakoviny překročuje limit pouze Ni.	2018 [40]
ICP-MS	As, Cd, Pb, Sb	1 g vz. + 6 ml konc. HNO ₃ a 2 ml H ₂ O ₂ , následně MR a převedení do 50 ml odměrné baňky.	Autoři analyzovali vz. kakaových bobů, kakaa a čokolád. LOD byla 3,2; 0,1; 5,7 a 0,8 µg·kg ⁻¹ pro As, Cd, Sb a Pb a LOQ 10,6; 0,2; 19,0 a 2,5 µg·kg ⁻¹ . Ve více než 90 % kakaových bobů bylo detekováno Cd a Pb, ale velká většina hodnot mediánů byla pod legislativními limity až na jeden vzorek, kde byl obsah Cd 1,27 mg·kg ⁻¹ . Obsah Cd v malajských kakaových bobech byl vyšší než v těch z Dominikánské republiky. Koncentrace As, Cd, Sb a Pb v kakau nejsou zdravoti nebezpečné. U čokolád jsou závěry podobné.	2020 [41]

Tabulka VI Přehled základních informací získaných z vědeckých článků (část 3/3) [32-44]

Metoda stanovení	Analyzované prvky	Způsob rozkladu vzorku	Výhodnocení dat	Článek
ET-AAS, ICP-OES	Ni, Cd, Pb	K 0,25 g vz. + 5 ml konc. HNO ₃ a 2 ml H ₂ O ₂ , po MR byl roztok převeden do 25 ml odměrné baňky.	<p>Autoři prováděli studii, která monitorovala obsahy kovů od vz. kakaových hmot, kakaa a ostatních vstupních surovin až po vyrobenou čokoládu ve 3 různých manufakturách. U výrobce X a Y byl obsah Ni v kakau 12,10 a 11,70 mg·kg⁻¹, u kakaových hmot to byla asi polovina. Nejmenší obsah Ni byl v kakaových bobech z Ekvádoru 2,32 mg·kg⁻¹, kakaové boby z Dominikánské republiky obsahovaly asi 3× více Ni. Obecně během zpracování hmot obsah Cd, Ni a Pb klesá. Nejvíce poklesne během konšování a odstraňování skořápky bobů. Obsah Ni koreluje s množstvím kakaa v čokoládě. Největší množství Pb bylo stanoveno v kakaové hmotě a kakau od výrobce X (0,585 a 0,575 mg·kg⁻¹), u výrobce Y to bylo asi 4× méně. Největší obsah Pb byl v čokoládě od výrobce X (0,279 mg·kg⁻¹), u zbylých 2 čokolád byly obsahy <LOD. Kakaové boby z Ekvádoru obsahovaly 5× více Cd (0,629 mg·kg⁻¹) než ty z Dominikánské republiky, podobně to bylo u kakaa. Největší obsah Cd byl stanoven v čokoládě z Ekvádoru (0,429 mg·kg⁻¹), u čokolády z Dominikánské republiky to bylo asi 4× méně.</p>	2018 [42]
ICP-MS	As, Cd, Cr, Se, Sb, Pb, V	K 1 g vz. + 3 ml konc. HNO ₃ a 5 ml vody a následoval MR.	<p>Autoři analyzovali 145 vz. čokolád a kakaa. Procentuální množství kakaa koreluje s obsahy As, Cd a Pb, nejvíce kovů se vyskytovalo právě v kakau. Nejnížší obsahy kovů byly nalezeny v mléčné čokoládě. Obsah Cd byl pod legislativním limitem (0,6 mg·kg⁻¹). Limity pro Pb a Cd v kakau jsou 1,0 a 0,3 mg·kg⁻¹. Závěrem autoři sdělují, že nalezené obsahy kovů byly celkově nízké a čokoláda je doporučena jako zdravý doplněk stravy.</p>	2018 [43]
ICP-MS	As, Bi, Cd, Co, Cr, Mn, Mo, Pb	K 0,1 g vz + směs H ₂ O ₂ :HNO ₃ v poměru (1:2), vz. se za zvýšené teploty rozložil a přefiltroval, poté se roztok převedl do 10 ml odměrné baňky.	<p>Autoři analyzovali vz. kakaových bobů, kakaového másla a čokolád. Obsahy Cd, Co, Cr, Mn a Mo korelují s procentuálním obsahem kakaové hmoty. Výsledky ukazují, že nejvyšší koncentrace Pb, Bi a As se nacházejí ve skořápce kakaového bobu, v samotném bobu už ne. V kakau a kakaovém bobu je nejvíce zastoupen Mn, a to v množství 36,081 a 12,228 mg·kg⁻¹.</p>	2014 [44]

2.8 Validace

Laboratoř musí používat vhodné postupy měření, tedy takové, které umožňují zvládnout požadavky, jež jsou na měření stanoveny. Doporučuje se používat metody publikované v mezinárodních, regionálních nebo národních normách, od renomovaných odborných organizací nebo z příslušných vědeckých publikací. Tyto metody prošly procesem definujícím analytické požadavky a experimentálně potvrzují, často i formou mezilaboratorní studie, že uvažovaná metoda je způsobilá zvládnout požadavky, které její použití vyžaduje, tedy validaci. Validace postupu měření (metody) tedy prokazuje, že postup je „vhodný pro daný účel“. V rámci validace se vyhodnocují následující výkonnostní charakteristiky. [45]

2.8.1 Výkonnostní charakteristiky

Selektivita

Selektivní metoda (postup měření) je taková metoda, kdy je výsledek stanovení analytu v určité matici nezávislý na přítomnosti omezeného množství určitých příměsí (interferentů). Selektivita metody se mění v závislosti na koncentraci stanovovaného analytu, ostatních komponentách matrice a někdy i v závislosti na nastavení parametrů metody (souvisí s robustností). Podle VIM 3 je selektivita „taková vlastnost měřicího systému používajícího specifikovaný postup měření, pomocí něhož poskytuje naměřené hodnoty veličiny pro jednu nebo více měřených veličin, že hodnoty každé měřené veličiny jsou nezávislé na jiných měřených veličinách nebo jiných veličinách v rámci zkoumaného jevu, těles nebo látky“. Mírou selektivity metody je kvantitativním způsobem vyjádřený vliv matrice, jednotlivé matriční efekty se zahrnují do výpočtu nejistoty výsledku. Míru selektivity určujeme buď metodou plánování pokusů s vyhodnocením analýzou rozptylu, nebo porovnáním výsledků analýzy získaného s čistým analytem a za přítomnosti všech předpokládaných rušivých složek v koncentracích odpovídajících reálné matici. [45]

Kalibrace-pracovní rozsah, linearita

Kalibrace analytické metody je klíčovým krokem v celém analytickém procesu. Kalibrace není zapotřebí jen u přímých primárních analytických metod, jak vyplývá z její definice. Většina instrumentálních analytických metod je nepřímá a vyžaduje aplikaci určitého kalibračního modelu.

Kalibrace je definovaná jako činnost, která za specifických podmínek v prvním kroku stanoví vztah mezi hodnotami veličiny s nejistotami měření poskytnutými etalony (standards) a odpovídajícími indikacemi s přidruženými nejistotami měření, a ve druhém kroku použije tyto informace ke stanovení vztahu pro získání výsledku měření z indikace. V definici se indikacemi míní hodnota analytického signálu.

Matematicky spočívá kalibrace v určení funkční závislosti mezi měřeným signálem a koncentrací (obsahem) analytu. Na výstupu analytického systému nepřímých metod je signál y_A , z jehož intenzity se stanovuje obsah analytu x_A . Toho se dosahuje tak, že se s kalibračními vzorky se známým obsahem analytu x určí odpovídající intenzita signálu y a vyjádří se závislost intenzity signálu y na obsahu analytu x_A .

Pracovní rozsah metody je koncentrační rozsah, ve kterém bylo demonstrováno, že metoda poskytuje výsledky vhodné pro zamyšlený účel. Ohraničení tvoří zdola nejčastěji LOQ. Horní konec se obvykle vyznačuje nedostačující změnou citlivosti (plató). Pracovní rozsah postupu kvantitativní analýzy se stanoví měřením standardů s různou hodnotou obsahu (koncentrace) analytu. Rozsah, ve kterém je odezva přímo úměrná změně koncentrace, nazýváme lineární interval. [45]

LOD a LOQ

Mezi detekce analytického postupu se rozumí nejnížší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni detekovat, ale které není nutně kvantifikovatelné jako exaktní hodnota. Mez stanovitelnosti analytického postupu se chápe jako nejnížší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni stanovit jako exaktní hodnotu se stanovenou přesností. Mez detekce lze odhadnout na základě experimentálního vyhodnocení variability měření slepých vzorků ve formě směrodatné odchylky z opakovaných měření slepých pokusů nebo vzorků s velmi malým obsahem analytu. Pro výpočet LOD a LOQ lze využít rovnice 2 a 3 [45]:

$$LOD = \frac{3,29 \cdot s}{k} \quad (2)$$

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

kde s ... směrodatná odchylka (SD) z opakovaných měření slepých pokusů, k ... směrnice kalibrační přímky ($y = k \cdot x + q$)

Preciznost

Preciznost měření je těsnost shody mezi naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo podobných objektech za specifických podmínek. Preciznost měření je zpravidla vyjádřena číselně mírami nepřeciznosti, jako např. směrodatnou odchylkou, rozptylem nebo variačním koeficientem za specifikovaných podmínek měření. Preciznost měření je používána k definování opakovatelnosti měření, mezilehlé preciznosti a reprodukovatelnosti měření.

Opakovatelnost měření je preciznost měření za podmínek opakovatelnosti. Podmínky opakovatelnosti zahrnují: 1. stejný postup měření, 2. stejný obslužný personál, 3. stejný měřicí systém, 4. stejné pracovní podmínky, 5. stejné místo a opakování měření na stejném nebo podobných objektech v krátkém časovém úseku. [45]

Pravdivost

Pravdivost měření je těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny (střední hodnota základního souboru) a referenční hodnotou veličiny. Pravdivost měření je kvalitativní míra. Kvantitativní míra pravdivosti je vychýlení (bias). Pravdivost měření není veličinou, a tudíž nemůže být vyjádřena číselně. Pravdivost je nepřímo úměrná systematické chybě měření, která může být odhadnuta vychýlením měření (bias). Pravdivost měření vyjadřuje hypotetickou schopnost postupu měření (metody) dosáhnout výsledků blízko očekávané referenční hodnoty veličiny, jako je hodnota certifikovaného referenčního materiálu.

Prakticky se stanovení vychýlení opírá o porovnání průměrné hodnoty výsledků \bar{x} kandidátské metody s vhodnou referenční hodnotou x_{ref} . K tomu se používají tři základní přístupy: 1. analýza referenčních materiálů, 2. zkoumání výtěžnosti za použití standardního přídatku a za 3. porovnání s výsledky získanými jinou metodou.

Výtěžnost je podíl rozdílu mezi údaji měřicího systému při měření vzorku se známým množstvím analytu či složky a vzorku bez přídatku a přidaného množství. Udává míru schopnosti měřicí metody (postupu) postihnout měřeným signálem veškerý analyt přítomný ve vzorku. Matematicky je výtěžnost R_f definovaná podle rovnice 4. [45]

$$R_f(\%) = \frac{c_{obs}}{c_{ref}} \cdot 100 \quad (4)$$

kde c_{obs} ... pozorovaný obsah (koncentrace) a c_{ref} ... skutečná hodnota obsahu (koncentrace) např. z CRM.

2.9 Nejistota měření

Nejistota měření patří spolu s metrologickou návazností a validací postupu měření mezi tři základní pilíře zabezpečení kvality výsledků zkoušek. Její vyhodnocení není rutinní prací ani čistě matematickou záležitostí, ale závisí na detailní znalosti podstaty měřené veličiny, použité metody či metod a postupu měření. Kvalita a užitečnost nejistoty uváděné s výsledkem měření tedy zásadně závisí na pochopení, kritické analýze a souladu všech těch, kteří se podílejí na určení její hodnoty.

Nejistota měření poskytuje kvantitativní údaj o kvalitě výsledků měření. Základním předpokladem použití nejistoty měření je kvantitativní odhad její velikosti podle jednotné metodiky platné pro všechny obory měření. Její definice podle VIM 3 zní: „nezáporný parametr charakterizující rozptýlení hodnot veličiny přiřazených k měřené veličině na základě použité informace“. [45]

V současnosti existují dva základní přístupy k vyhodnocení nejistoty měření, a to přístup „zdola nahoru“ a „shora dolů“. V této diplomové práci se bude pracovat s přístupem „shora dolů“. Tento přístup vychází z údajů, které jsou v laboratoři k dispozici, a lze jej rozdělit do dvou skupin:

1. vnitrolaboratorní: a) použití údajů z validační studie, kde se poměrně často používá analýza CRM a nejistotu měření získáme propagováním údajů o pravdivosti (vychýlení) a preciznosti, b) kombinace údajů z validační studie spolu s údaji o řízení kvality,

2. mezilaboratorní: a) postup s použitím dat z mezilaboratorních zkoumání výkonnosti postupu měření, b) postup s využitím údajů z mezilaboratorních zkoušení způsobilosti.

V případě, že jsou všechny části nejistoty úměrné koncentraci analytu, tak se nejistoty propagují jako RSD (rovnice 5). Pokud jsou některé části nejistoty nezávislé na koncentraci, tak se nejistoty propagují jako směrodatná odchylka (rovnice 6). Nejčastěji se s výsledkem uvádí rozšířená nejistota U . Rozšířená nejistota udává interval, ve kterém se s 95 % pravděpodobností (při $k = 2$) nachází hodnota naměřené veličiny (rovnice 7). [45]

$$\frac{u_c}{c} = \sqrt{\frac{u(p)^2}{p} + \frac{u(q)^2}{q} + \frac{u(r)^2}{r} + \dots} \quad (5)$$

kde $p, q, r \dots$ parametry ovlivňující výsledek c , $u(p), u(q), u(r) \dots$ nejistoty jednotlivých parametrů

$$u_c = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + u(r)^2 + \dots} \quad (6)$$

kde $u(p)$, $u(q)$, $u(r)$... nejistoty jednotlivých parametrů

$$U = u_c \cdot k \quad (7)$$

kde u_c ... kombinovaná standardní nejistota, k ... koeficient rozšíření (většinou 2)

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- HNO₃ (anapure) 67-69 %, Analytika spol. s.r.o., Česká republika,
- H₂O₂ (p.a.+) 30 %, Lach-Ner spol. s.r.o., Česká republika,
- H₂O redestilovaná, Millipore Milli-Q (18,2 MΩ·cm), Merck, Německo,
- CRM Astasol As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb a Zn, koncentrace 1,0 ± 0,002 g·l⁻¹, Analytika spol. s.r.o., Česká republika,
- CRM MIX Astasol Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Mn, Pb, V a Zn, koncentrace 0,1 ± 0,002 g·l⁻¹, Analytika spol. s.r.o., Česká republika,
- Matricový certifikovaný referenční materiál ERM-BD 512 hořká čokoláda, Belgie,
- Modifikátor matrice pro ET-AAS Pd(NO₃)₂ a Mg(NO₃)₂ o koncentraci 2 g·l⁻¹, Analytika spol. s.r.o., Česká republika,
- Víceprvkový kalibrační roztok Astasol-MIX (využit jako interní standard); Bi, In, Sc, Tb a Y, koncentrace 10±0,1 mg·l⁻¹, Analytika spol. s.r.o., Česká republika,
- Ladicí roztok pro metodu ICP-MS; Li, Ce, Co, Y a Tl, koncentrace 1,0 μg·l⁻¹, Agilent Technologies, Japonsko.

3.2 Materiály a přístroje

- Teflonové kelímky s víčky, ochranným pouzdem a pojistkou, určené k mikrovlnnému rozkladu,
- 25 a 10 ml odměrné baňky třídy A,
- Veškeré materiály z plastu (polypropylen): různé špičky k poloautomatickým pipetám, kelímky, víčka, Pasteurova pipeta, stříčka na redestilovanou vodu, rotor a nálevka, 50 ml a 15 ml vzorkovnice typu Falcon s víčky,
- Pipety FINNPIPETTE F2 100-1000 μl Thermo Scientific, Spojené státy americké,
- Pipety FINNPIPETTE F2 0,5-5 ml, Thermo Scientific, Spojené státy americké,
- Mikrovlnný mineralizátor MLS 1200 MEGA, MILESTONE, Itálie,
- Přístroj Millipore Milli-Q, který slouží k demineralizaci vody, Merck, Německo,
- Přístroj ICP-MS, typ 7700x, výrobce Agilent Technologies, Japonsko, vybavený automatickým vzorkovačem ASX 520, koncentrickým zmlžovačem (400 μl·min⁻¹), niklovými kónusy a kolizní celou s He jako kolizním plynem,

- Atomový absorpční spektrometr SavantAA vybavený plamenovou a elektrotermickou atomizací, výrobce GBC, Austrálie,
- Analytické váhy Metler Toledo, typ AB 204, Spojené státy americké.

3.3 Vzorky

V laboratoři bylo zanalyzováno 9 různých produktů, které jsou detailněji popsány níže. Čtyři z nich byly čokolády a čokoládové mince od různých výrobců s různým procentuálním množstvím kakaové sušiny od bílé až po hořkou čokoládu, tyto čokolády byly zakoupeny v supermarketu v Olomouci a v Ostravě. Dvě další hořké čokolády (75 a 100 %) byly zakoupeny v ruční manufaktuře v Ostravě. Zbylé 3 vzorky (kakaové hmoty) byly zapůjčeny.

První vzorek byla bílá čokoláda „Milka bílá čokoláda“ ve 100 g balení s číslem šarže: OTM 2111563. Bílá čokoláda se vyrábí výhradně z kakaového másla, sušeného mléka a cukru. [43]

Druhý vzorek byla 33 % mléčná čokoláda „ORION Mléčná čokoláda“ ve 100g balení s číslem šarže: 12280357.

Třetí vzorek byla 56 % hořká čokoláda „Nina chocolate hořká čokoláda“ ve 100 g balení s číslem šarže: L11136B.

Čtvrtý vzorek byla 75 % hořká čokoláda „Papua Nová Guinea 75% tmavá čokoláda AZTEC MAN čokoládovna“ v 50 g balení s číslem šarže: 367. Tato čokoláda spolu se 100 % hořkou čokoládou byla zakoupena v čokoládové manufaktuře v Ostravě.

Pátým vzorek byla 100 % hořká čokoláda „Ekvádor 100 % Mono Bravo Arriba Nacional tmavá čokoláda AZTEC MAN čokoládovna“ v 50 g balení s číslem šarže: 328.

Další tři vzorky byly kakaové hmoty z Madagaskaru (70 a 100 %) a z Peru (100 %), které byly získány z Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Blíže se jednalo o: 1. 70 % kakaovou hmotu z ostrova Madagaskar, která byla konšovaná dne 27.10. 2021, 2. 100 % kakaovou hmotu z Madagaskaru, která nebyla temperovaná; 3. 100 % kakaovou hmotu z Peru, 25.11. 2021.

Posledním devátým vzorkem byly čokoládové penízky (mléčná čokoláda) „1 euro 2009“, číslo šarže na obalu produktu nebylo uvedeno.

3.4 Příprava a rozklad vzorků

Před samotným stanovením obsahů kovů metodami F-AAS, ET-AAS a ICP-MS se vzorky čokolád a kakaových hmot musely vhodně rozložit a zředit. Vzorek o hmotnosti asi 0,25 g byl navážen pomocí analytických vah do teflonových kelímků pomocí diferenčního vážení.

Dále se rozkládala také CRM čokoláda (ERM-BD 512), jedna granule čokolády o hmotnosti 0,50 g se rozdělila na dvě přibližně stejné poloviny pomocí plastových špachtlí a obě poloviny se zvažily v teflonových kelímcích. Kelímky s naváženým vzorkem se přenesly do digestoře a ke vzorku se napipetovala rozkladná směs $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ v poměru 4:1 (5 ml). Kelímky se uzavřely, vložily se a upevnily se v plastovém rotoru a rotor se přemístil do mikrovlnného mineralizátoru, kde proběhl samotný rozklad vzorku. Nastavení rozkladného programu je přehledně uvedeno v tabulce VII.

Tabulka VII Rozkladný program mikrovlnného mineralizátoru

Krok	Doba [min]	Příkon [W]
1.	2	250
2.	2	0
3.	5	250
4.	5	400
5.	5	500
6.	5	ventilace

Po rozkladném kroku se obsah teflonového kelímku kvantitativně převedl do 25 ml odměrné baňky a z ní se roztok převedl do 50 ml vzorkovnice. Vzorek se řádně popsál a stojan se všemi vzorky se uchovával v mrazničce, dokud se vzorky neanalyzovaly. Po rozkladu vzorků následoval vždy čistící krok, teflonové kelímky se po vychladnutí několikrát promyly redestilovanou vodou a poté se do nich napipetovaly 3 ml konc. HNO_3 , čistící program vypadal následovně: 1. 10 min při 600 W a potom 5 min ventilace.

3.5 Příprava kalibrace pro F-AAS, ET-AAS a ICP-MS

Pro F-AAS se kalibrační roztoky připravovaly následujícím způsobem. Z CRM pro kovy Cu, Fe, Mg, Mn a Zn se po promíchání nádob odlilo do plastového kelímku asi 0,4 ml a po napipetování 0,25 ml CRM příslušného kovu do čisté 25 ml odměrné baňky a doplnění po rysku redestilovanou vodou se naředil roztok o koncentraci $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Z tohoto zásobního roztoku se dále ředila kalibrační řada pro každý kov podle zředovací rovnice do 25 ml odměrných baněk. Kvůli přiblížení se ke kyselosti vzorku byly kalibrační roztoky okyseleny 0,5 ml konc. HNO_3 .

U ET-AAS se ze zásobního roztoku naředil pouze nejkoncentrovanější kalibrační roztok, který se okyselil 0,5 ml HNO_3 . Automatický dávkovač přístroje si zbylé kalibrační body po naprogramování naředil sám. U Cd a Pb dávkovač ke každému kalibračnímu bodu přidával

ještě 5 µl směsi dusičnanů paladnatého a hořečnatého v poměru 1:1 (modifikátor matrice).

Při měření metodou ICP-MS se zásobní roztok ředil z CRM MIX (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V a Zn) tak, že se z nádoby do 25 ml odměrné baňky odpipetovalo 2,5 ml roztoku. Do této 25 ml odměrné baňky se dále přidalo 0,25 ml CRM As a Fe a baňka se doplnila po rysku redestilovanou vodou. Z tohoto zásobního roztoku obsahujícího všechny kovy potřebné k měření se postupným ředěním naředila kalibrační řada do 25 ml odměrných baněk, do každé baňky se přidalo 0,5 ml konc. HNO₃. Mg se měřil zvlášť, kalibrační řada byla připravena stejným způsobem jako u F-AAS.

3.6 Stanovení kovů metodami AAS a ICP-MS

3.6.1 F-AAS

Samotné stanovení kovů probíhalo v plameni acetylén-vzduch dle parametrů v tabulce VIII. Nejprve se optimalizovala poloha hořáku, poté se proměřily absorbance kalibrační řady, a následně se proměřily rozložené vzorky. Každý vzorek byl měřený 5×. Mezi jednotlivými měřeními vzorků hadička nasávala redestilovanou vodu, která byla pravidelně měněná. Takto se proměřily všechny vzorky spolu s příslušnými slepými pokusy.

Tabulka VIII Přehled základních parametrů při měření na F-AAS, upraveno z [46]

Prvek	Kalibrační rozsah [mg·l ⁻¹]	Vlnová délka [nm]	Žhavicí proud [mA]	Šířka štěrbin [nm]
Cu	0,05-1,00	324,7	5,0	0,5
Fe	0,20-2,00	248,3	8,0	0,2
Mg	0,05-0,75	285,2	3,0	0,5
Mn	0,1-0,6	279,5	10,0	0,2
Zn	0,05-1,00	213,9	5,0	0,5

3.6.2 ET-AAS

Při práci s ET-AAS se naředil z CRM pro Cd, Cr, Mn, Ni a Pb pouze nejkonzentrovanejší kalibrační bod, automatický dávkovač přístroje si už zbylé kalibrační body po naprogramování naředil z nejkonzentrovanejšího kalibračního bodu.

Roztoky vzorku se před samotným měřením promíchaly, a následně se převedly do 2 ml plastových vzorkovniček. Základní parametry pro měření jednotlivých kovů jsou přehledně uvedeny v tabulkách IX, X a XI. K analýze bylo pro všechny prvky s výjimkou Pb dávkováno 20 µl vzorku, u Pb to bylo 30 µl. Při stanovení Cd a Pb automatický dávkovač

odebíral ještě 5 µl směsi dusičnanů paladnatého a hořečnatého v poměru 1:1 (modifikátor matrice). Každý vzorek byl měřen 2×.

Tabulka IX Přehled základních parametrů při měření na ET-AAS [46]

Prvek	Kalibrační rozsah [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	Vlnová délka [nm]	Žhavicí proud [mA]	Šířka štěrbin [nm]
Cd	1-30	228,8	3,0	0,5
Cr	15-60	357,9	7,0	0,2
Mn	25-150	279,5	5,0	0,2
Ni	15-60	232,0	6,0	0,2
Pb	1-25	283,3	5,0	0,5

Tabulka X Parametry teplotního programu pro Mn, Ni a Cr [46]

Fáze teplotního programu	Teplota [°C]	Doba nárůstu teploty [s]	Doba konstantní teploty [s]	Typ plynu
1. sušení	90	5,0	5,0	Ar
2. sušení	120	5,0	15,0	Ar
3. rozklad	700 ^a /900 ^b /1100 ^c	10,0	15,0	Ar
4. rozklad	700 ^a /900 ^b /1100 ^c	0	1,0	-
5. atomizace	2200 ^a /2400 ^b /2500 ^c	1,0	1,2	-
6. čištění	2650	1,0	3,0	Ar

pozn. horní index a se týká Mn, b Ni, c Cr

Tabulka XI Parametry teplotního programu pro Cd a Pb [46]

Fáze teplotního programu	Teplota [°C]	Doba nárůstu teploty [s]	Doba konstantní teploty [s]	Typ plynu
1. sušení	90	1,0	5,0	Ar
2. sušení	110	10,0	15,0	Ar
3. rozklad	800 ^d /900 ^e	10,0	15,0	Ar
4. rozklad	800 ^d /900 ^e	0	1,0	-
5. atomizace	1600 ^d /2000 ^e	0,8	1,0	-
6. čištění	2650	1,0	3,0	Ar

pozn. horní index d se týká Cd, e Pb

3.6.3 ICP-MS

Při měření na ICP-MS se nejprve nařadila kalibrační řada standardů (mix všech kovů v 1 roztoku) z CRM MIX (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V a Zn) a z CRM As a Fe. Všechny roztoky standardů se připravovaly do 25 ml odměrné baňky, a aby se kalibrační roztoky přiblížily kyselosti matrice vzorků, byly okyseleny 0,5 ml konc. HNO₃. Všechny vzorky se z 50 ml vzorkovnic po promíchání přelily do 15 ml plastových zkumavek, které se vložily

do plastového stojanu, který se umístil do automatického dávkovače vzorků. Základní nastavení přístroje je přehledně uvedeno v tabulce XII.

Tabulka XII Základní nastavení přístroje ICP-MS, upraveno a doplněno z [47]

Příkon generátoru	1550 W
Vzdálenost hlavice od rozhraní	8 mm
Pumpa zmlžovače	0,1 RPS
Teplota mlžné komory	2 °C
Průtok plazmového plynu	14,98 l·min ⁻¹
Průtok nosného plynu	1,02 l·min ⁻¹
Průtok pomocného plynu	0,9 l·min ⁻¹
Průtok He	5 ml·min ⁻¹
Akviziční mód	SPECTRUM
Repliky měření	6
Měřené izotopy prvků¹	⁷⁵ As, ¹¹¹ Cd, ⁵⁹ Co, ⁵² Cr, ⁶³ Cu, ⁵⁶ Fe, ²⁴ Mg, ⁵⁵ Mn, ⁶⁰ Ni, ²⁰⁸ Pb, ⁶⁶ Zn
Interní standardy (korekce měření)	⁴⁵ Sc, ⁸⁹ Y, ¹¹⁵ In, ¹⁵⁹ Tb, ²⁰⁹ Bi

pozn. horní index 1 znamená, že všechny prvky byly měřeny v He módu

4 Výsledky a diskuze

V 9 vzorcích kakaových hmot a čokolád s různým procentuálním obsahem kakaové hmoty (0-100 %) byly stanoveny následující kovy: As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb a Zn. Tyto kovy byly stanoveny pomocí dvou metod, ICP-MS a AAS, u které byly využity dvě atomizační techniky F-AAS a ET-AAS. Před samotným stanovením uvedených kovů ve vzorcích byla provedena validace postupů měření a pro kovy, které měly certifikované hodnoty v matricovém CRM, byl proveden výpočet nejistoty měření kvůli celkovému vyhodnocení vhodnosti daných metod pro analýzu kakaových hmot a čokolád.

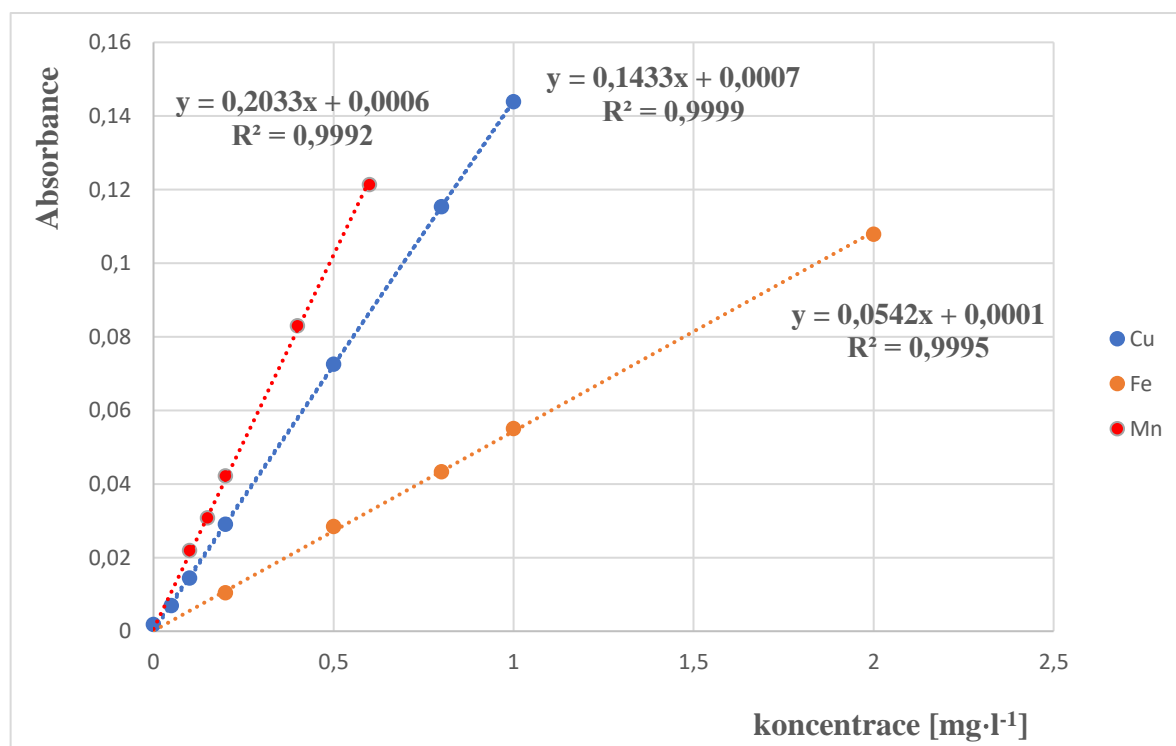
4.1 Validace postupů měření

4.1.1 AAS

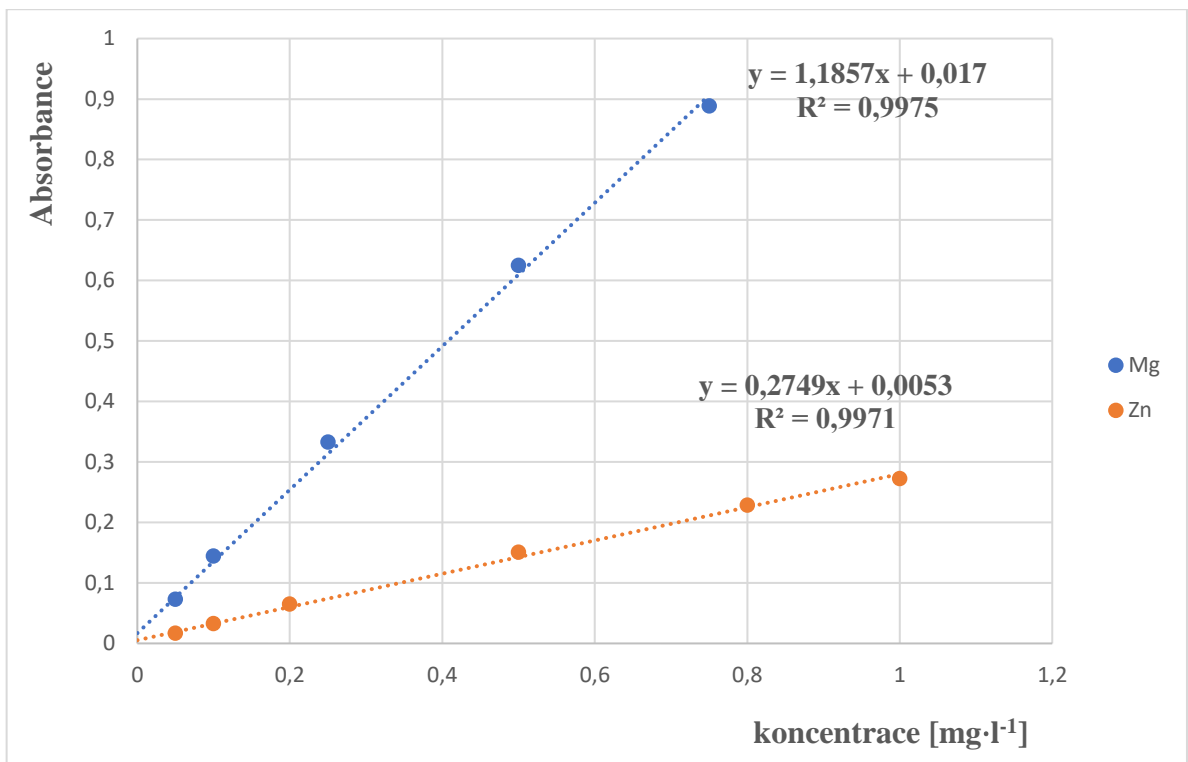
Posouzení linearity

Jako první výkonnostní charakteristika byla posuzována linearita pro dané stanovení kovů danou metodou. Technikou plamenové atomizace se stanovovaly tyto kovy: Cu, Fe, Mg, Zn a Mn. Technikou elektrotermické atomizace se stanovovaly tyto kovy: Cd, Cr, Mn, Ni a Pb. Pro získané závislosti absorbance na koncentraci daného kovu byl vždy vypočítán determinační koeficient, viz obrázky 13 a 14.

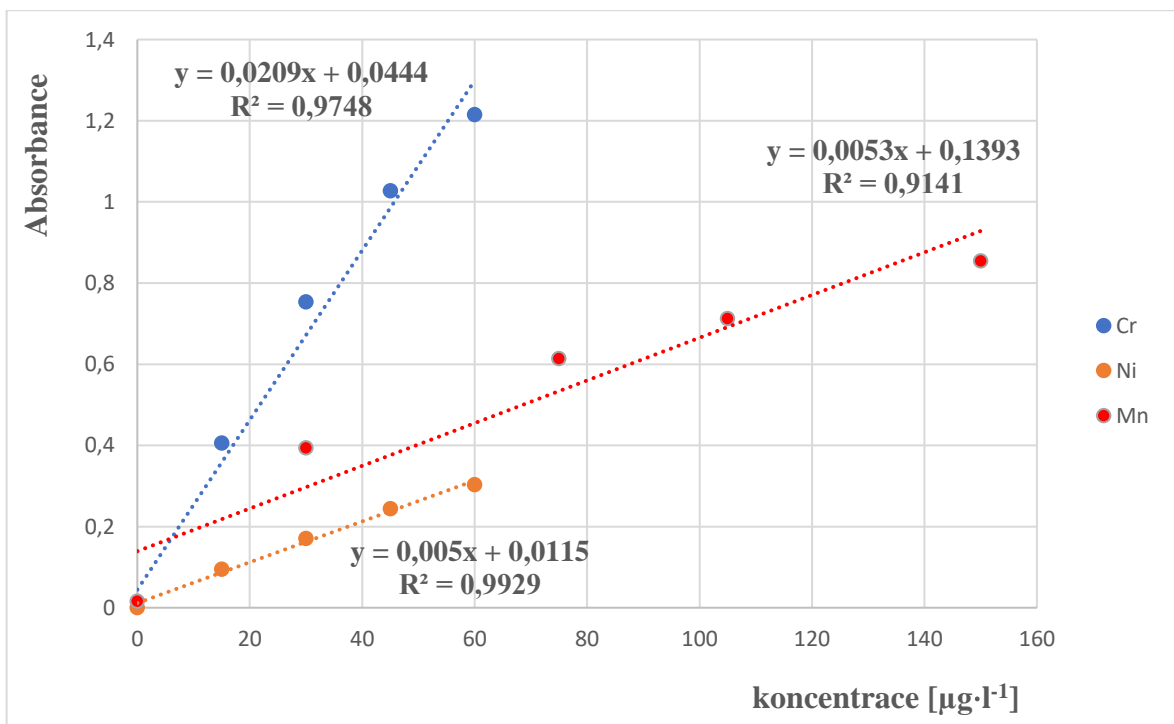
Obrázek 13 Kalibrační přímky pro Cu, Fe a Mn stanovené technikou F-AAS



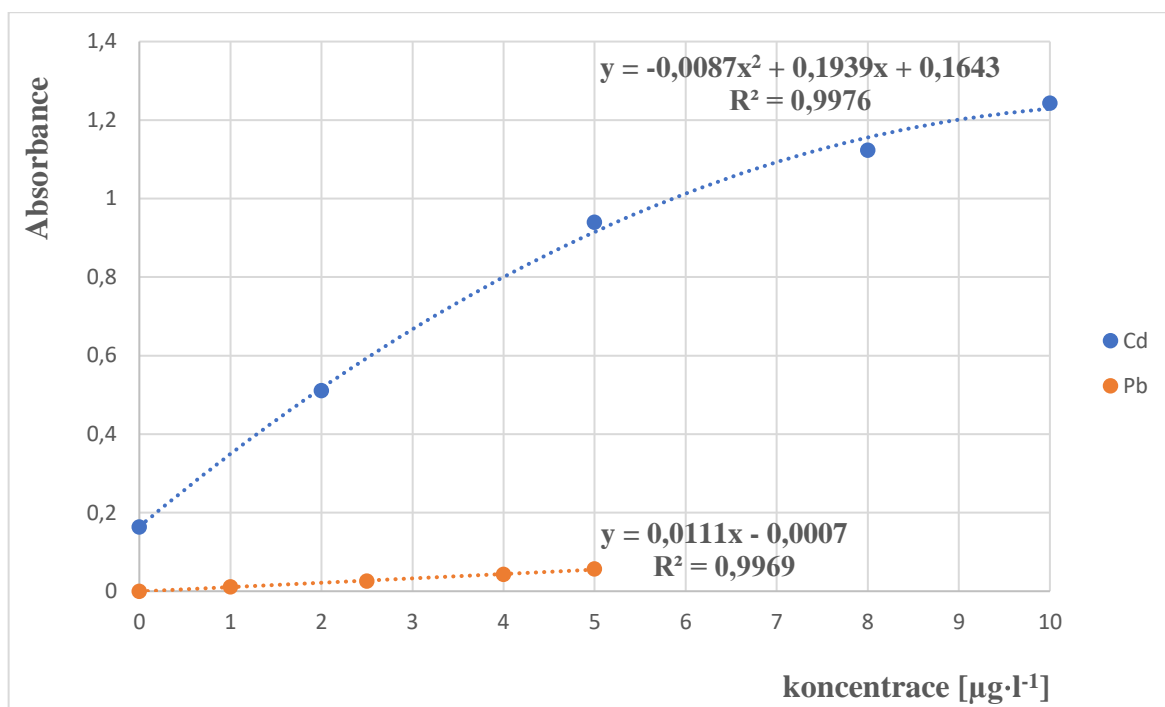
Obrázek 14 Kalibrační přímky pro Zn a Mg stanovené technikou F-AAS



Obrázek 15 Kalibrační přímky Cr, Ni a Mn, stanovené technikou ET-AAS



Obrázek 16 Kalibrační přímky pro Cd a Pb stanovené technikou ET-AAS



Tabulka XIII Přehled dat z kalibračních přímek pro techniku F-AAS

Prvek	Rovnice kalibrační přímky	Determinační k. R^2
Cu	$y = 0,1433x + 0,0007$	0,9999
Fe	$y = 0,0542x + 0,0001$	0,9995
Mg	$y = 1,1857x + 0,017$	0,9975
Mn	$y = 0,2033x + 0,0006$	0,9992
Zn	$y = 0,2749x + 0,0053$	0,9971

Vizuální kontrolou kalibračních závislostí byla zkontrolována linearita a kontrolou determinačních koeficientů z tabulky XIII bylo potvrzeno, že akceptační kritérium pro linearitu ($R^2 \geq 0,99$) bylo splněno u techniky F-AAS pro všechny kovy.

Tabulka XIV Přehled dat z kalibračních přímek pro ET-AAS

Prvek	Rovnice kalibrační závislosti	Determinační k. R^2
Cd	$y = -0,0087x^2 + 0,1939x + 0,1643$	0,9976
Cr	$y = 0,0209x + 0,0444$	0,9748
Ni	$y = 0,005x + 0,0115$	0,9929
Mn	$y = 0,0053x + 0,1393$	0,9141
Pb	$y = 0,0111x - 0,0007$	0,9969

U techniky ET-AAS bylo akceptační kritérium splněno pro kovy Ni a Pb, viz tabulka XIV. Pro Cd byla data proložena parabolou, daná závislost není lineární, ale proložení body

parabolou je vyhovující. Pro Mn a Cr jsou hodnoty determinačních koeficientů nižší a proložení kalibračních přímk body je horší.

LOD a LOQ

Meze detekce a stanovitelnosti byly převzaty diplomové práce [46]. Mez detekce byla přepočítána z původní navážky 0,20 g na navážku 0,25 g a z meze detekce se vypočítala mez stanovitelnosti tak, že se vynásobila koeficientem 3,333. Přehled LOD a LOQ pro všechny stanovované kovy uvádí tabulka XV.

Tabulka XV *Převzaté a vypočtené LOD a LOQ [46]*

Prvek	LOD (mg·kg⁻¹)	LOQ (mg·kg⁻¹)
Cu	1,80	6,00
Fe	11,00	36,67
Mg	2,20	7,33
Zn	1,10	3,67
Cd	0,01	0,03
Cr	0,12	0,41
Mn	0,03	0,11
Ni	0,13	0,44
Pb	0,83	2,76

Preciznost

Preciznost měření je těsnost shody mezi naměřenými hodnotami CRM hořká čokoláda (ERM-BD 512) za specifických podmínek. Kvantitativně se preciznost vyhodnotí pomocí relativních směrodatných odchylek CRM, 56 % hořké čokolády a přídavek standardů ve vzorcích 56 % hořké čokolády, vše ze 6 opakování. Akceptační kritérium pro preciznost ($RSD \leq 20\%$) bylo splněno u metody AAS pro všechny kovy až na Fe u 56 % hořké čokolády s přídávkem standardů a Mn u vzorků CRM. Přehled relativních směrodatných odchylek pro vzorky 56 % hořké čokolády, pro přídávky standardů ve vzorcích 56 % hořké čokolády a CRM hořká čokoláda jsou uvedeny v tabulce XVI.

Tabulka XVI *Vyhodnocení preciznosti pomocí RSD v %*

Prvek	56 % čokoláda	Přídavek standardů	CRM	Počet opakování
Cu	4,51	1,70	10,99	6;6;6
Fe	2,67	21,69	14,34	6;4;6
Mg	3,11	1,44	3,06	6;4;4
Zn	17,63	15,30	14,61	6;6;6
Mn^F	-	-	3,84	-;-;4
Cd	8,26	5,00	12,70	6;6;6
Cr	11,84	12,93	11,22	6;6;4
Mn^E	11,62	3,95	64,61	6;4;5
Ni	15,41	5,91	11,38	6;6;4
Pb	<LOQ	<LOQ	<LOQ	6;6;6

pozn. horní index F znamená, že prvek byl stanoven technikou F-AAS, E pak ET-AAS, pomlčka (-) znamená, že daný kov nebyl ve vzorku stanoven/analyzován

Pravdivost

Pravdivost měření je těsnost shody mezi průměrnou hodnotou \bar{x} a průměrnou hodnotou z opakovaných měření vzorků s přídavkem nebo certifikovanou hodnotou v CRM hořká čokoláda (ERM-BD 512). Je nepřímou úměrná systematické chybě měření a vyjadřuje hypotetickou schopnost postupu měření (metody) dosáhnout výsledků blízko očekávané referenční hodnoty CRM. Akceptační kritérium pro pravdivost bylo stanoveno pro výtěžnost standardních přídavků v intervalu 70-130 % pro standardní přídavek $25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a interval 80-120 % pro všechny vyšší standardní přídavky (pro Mn $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, pro Fe $500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro Mg $25 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Veškeré výtěžnosti jsou uvedeny v tabulce XVII. Akceptační kritérium pro pravdivost bylo splněno u všech kovů až na Fe, Mn (ET-AAS) a Pb.

Tabulka XVII *Vyhodnocení pravdivosti pomocí výtěžností v %*

Prvek	CRM	Přídavek standardů	Počet opakování
Cu	90,85	114,35	6;6
Fe	-	148,62	-;4
Mg	-	91,60	-;4
Zn	-	71,69	-;6
Mn^F	86,73	-	4;-
Cd	73,12	81,95	6;6
Cr	-	122,65	-;6
Mn^E	64,61	34,51	6;4
Ni	84,14	86,22	4;6
Pb	<LOQ	<LOQ	6;6

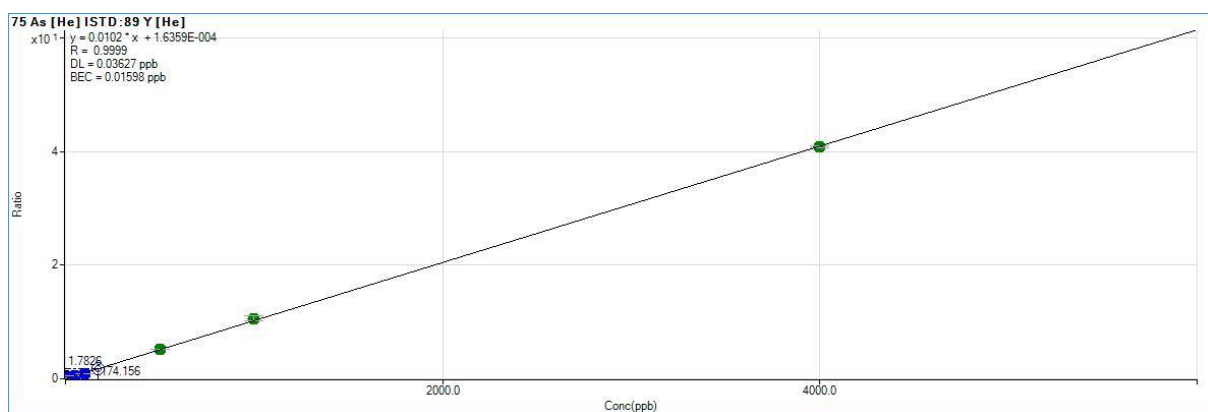
pozn. horní index F znamená, že prvek byl stanoven technikou F-AAS, E pak ET-AAS, pomlčka (-) znamená, že daný kov nebyl ve vzorku stanoven

U vyhodnocení Mn technikou ET-AAS nevyhovovala výtěžnost CRM, a kvůli tomu se Mn stanovoval technikou F-AAS a došlo k výraznému zlepšení výtěžnosti CRM.

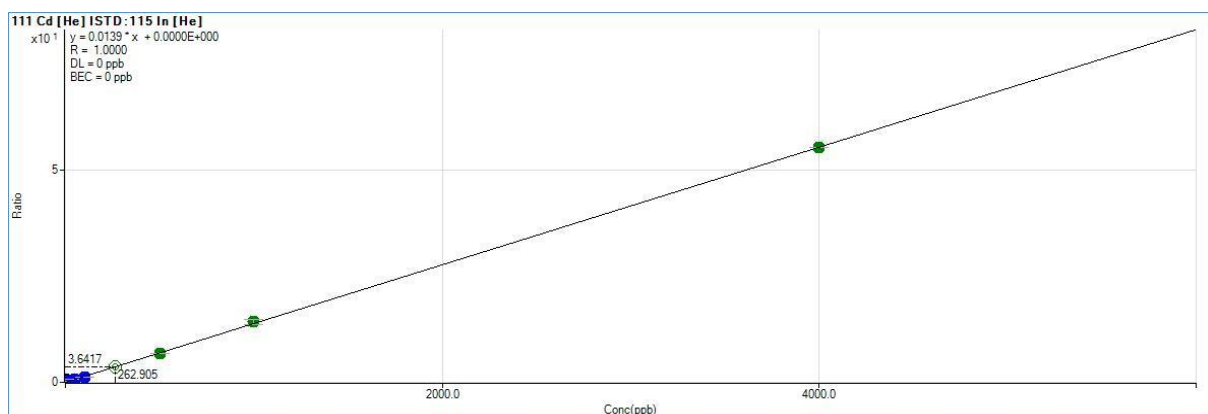
4.1.2 ICP-MS

Pro metodu ICP-MS byla posuzována jako první výkonnostní charakteristika linearita pro kovy As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb a Zn. Pro získané závislosti poměru izotopů analyzovaného kovu a vhodného interního standardu na koncentraci daného analytu byl vždy uveden v tabulce XVIII korelační koeficient, viz obrázky 17-27. Korelační koeficient byl přepočítán na determinační koeficient.

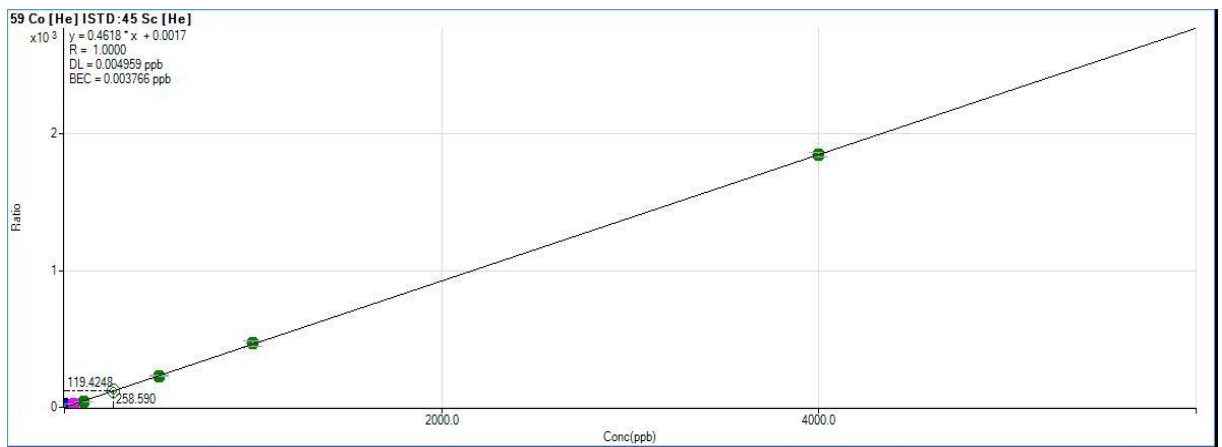
Obrázek 17 Kalibrační přímka pro As



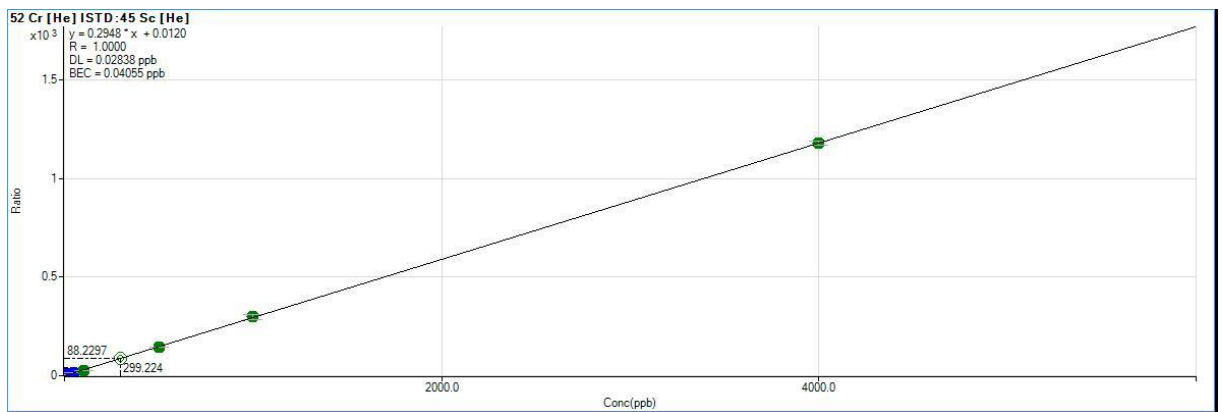
Obrázek 18 Kalibrační přímka pro Cd



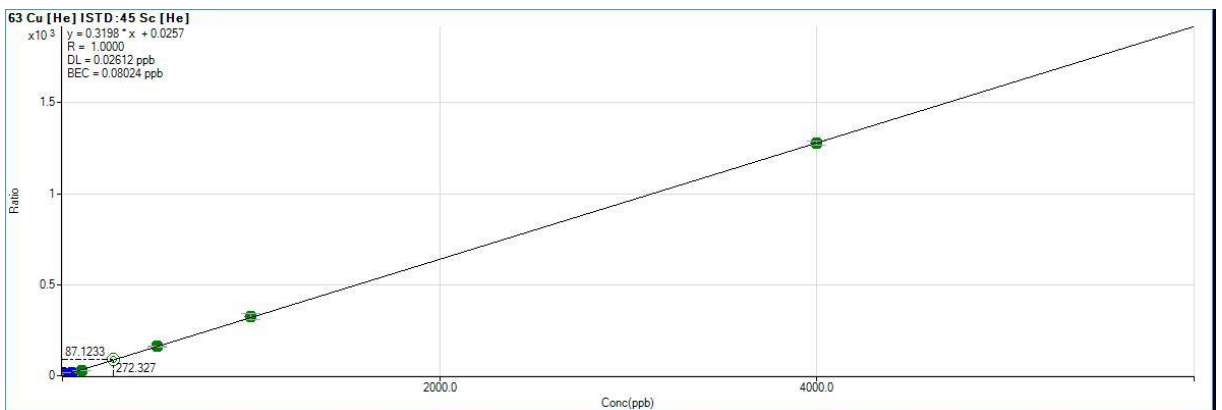
Obrázek 19 Kalibrační přímka pro Co



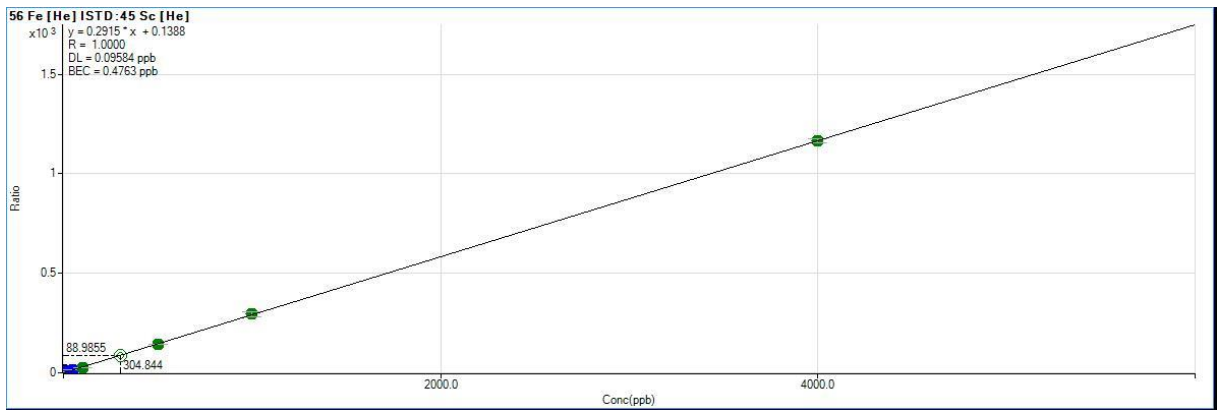
Obrázek 20 Kalibrační přímka pro Cr



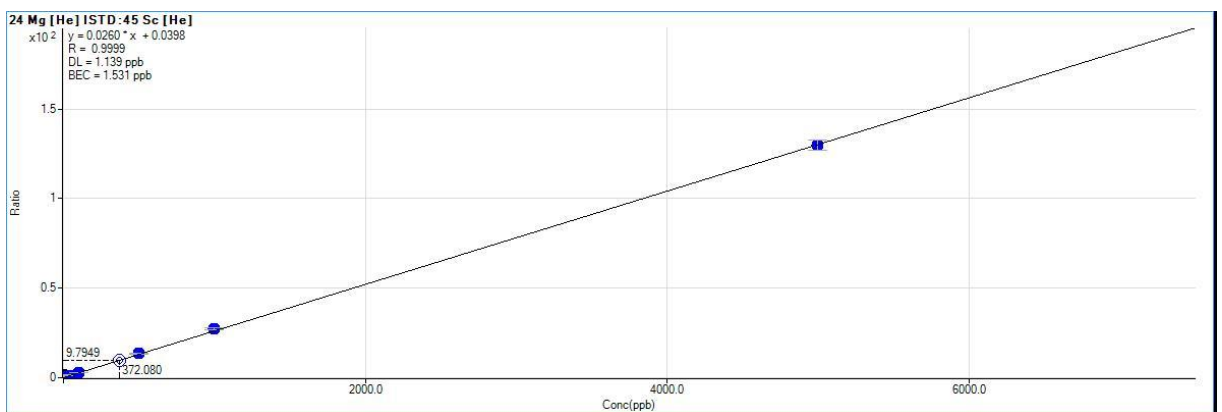
Obrázek 21 Kalibrační přímka pro Cu



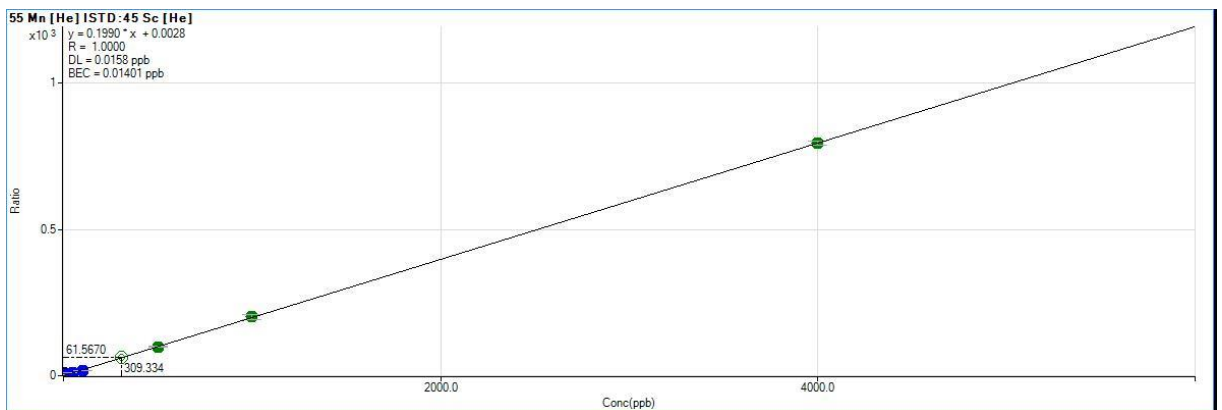
Obrázek 22 Kalibrační přímka pro Fe



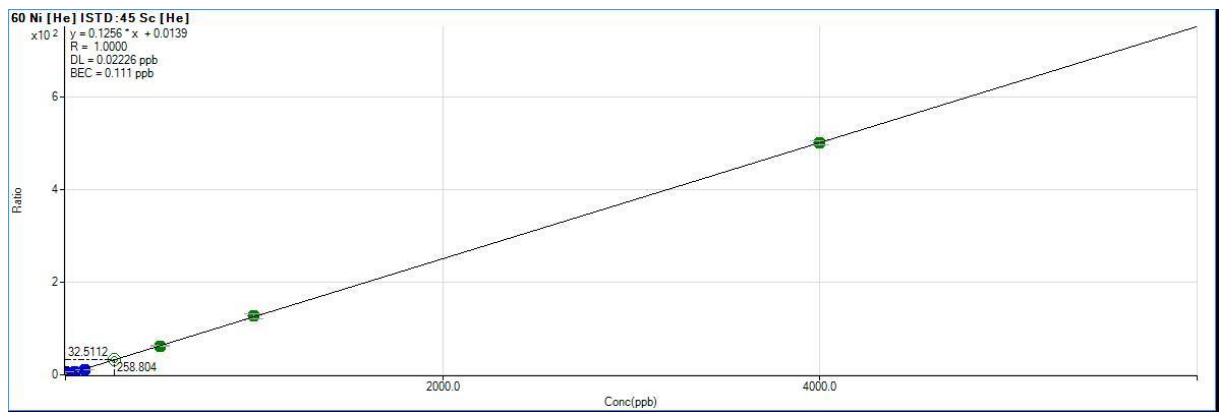
Obrázek 23 Kalibrační přímka pro Mg



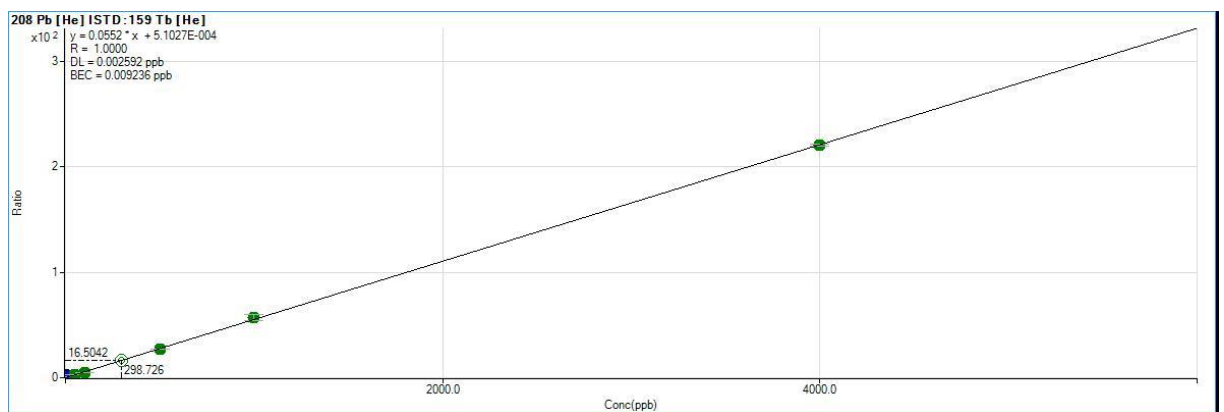
Obrázek 24 Kalibrační přímka pro Mn



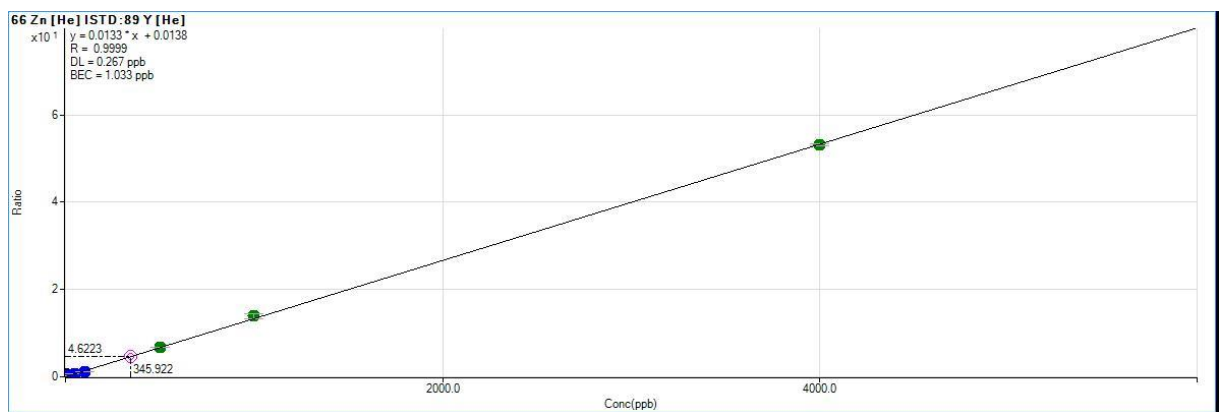
Obrázek 25 Kalibrační přímka pro Ni



Obrázek 26 Kalibrační přímka pro Pb



Obrázek 27 Kalibrační přímka pro Zn



Tabulka XVIII *Přehled dat z kalibračních přímek ICP-MS*

Prvek	Rovnice kalibrační přímky	Korelační k. R	Determinační k. R ²
As	$y = 0,9985x + 4,5297$	0,9999	0,9998
Cd	$y = 1,0001x - 0,2397$	0,9999	0,9998
Co	$y = 1,0002x - 0,6643$	1,0000	1,0000
Cr	$y = 1,0004x - 1,0668$	1,0000	1,0000
Cu	$y = 0,9999x + 0,4336$	1,0000	1,0000
Fe	$y = 1,0006x - 1,7004$	1,0000	1,0000
Mg	$y = 0,997x + 11,755$	0,9999	0,9998
Mn	$y = 1,0004x - 1,0694$	1,0000	1,0000
Ni	$y = 1,0003x - 1,0406$	1,0000	1,0000
Pb	$y = 0,9994x + 1,7664$	0,9999	0,9998
Zn	$y = 0,9986x + 4,1483$	0,9999	0,9998

Vizuální kontrolou kalibračních přímek byla zkontrolována linearita a kontrolou determinačních koeficientů z tabulky XVIII bylo potvrzeno, že akceptační kritérium pro linearitu ($R^2 \geq 0,99$) bylo splněno pro všechny kovy.

LOD a LOQ

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny z 12 slepých pokusů z rovnic 2 a 3 a jsou uvedeny v tabulce XIX. LOD a LOQ pro Mg byly vypočítány z 8 slepých pokusů.

Tabulka XIX *LOD a LOQ pro dané kovy stanovené metodou ICP-MS*

Prvek	LOD (mg·kg ⁻¹)	LOQ (mg·kg ⁻¹)
As	0,10	0,29
Cd	0,01	0,04
Co	0,01	0,03
Cr	0,17	0,52
Cu	0,03	0,09
Fe	1,18	3,59
Mg	0,52	1,59
Mn	0,03	0,09
Ni	0,08	0,25
Pb	0,03	0,08
Zn	2,70	8,22

Preciznost

Preciznost měření je těsnost shody mezi naměřenými hodnotami CRM čokolády (ERM-BD 512) za specifických podmínek. Kvantitativně se preciznost vyhodnotí pomocí relativních směrodatných odchylek CRM hořká čokoláda, 56 % hořké čokolády a přísadků standardů ve vzorcích 56 % hořké čokolády, vše ze 6 opakování. Akceptační kritérium pro

preciznost ($RSD \leq 20 \%$) bylo splněno u metody ICP-MS pro všechny kovy až na Fe. Relativní směrodatná odchylka pro Fe má vysokou hodnotu (22,32 %), protože jeden analyzovaný vzorek byl s největší pravděpodobností kontaminovaný. Přehled relativních směrodatných odchylek pro vzorky 56 % hořké čokolády, pro přídatky standardů ve vzorcích 56 % hořké čokolády a CRM hořká čokoláda jsou uvedeny v tabulce XVI.

Tabulka XX *Vyhodnocení preciznosti pomocí RSD v %*

Prvek	56 % čokoláda	Přídavek standardů	CRM	Počet opakování
As	<LOQ	8,11	<LOQ	6
Cd	2,98	9,36	4,51	6;6;6
Co	1,43	15,30	9,22	6;6;6
Cr	4,26	7,56	4,34	6;6;4
Cu	2,17	5,83	4,20	6;6;6
Fe	2,73	22,32	2,84	6;4;6
Mg	4,72	11,42	5,39	5;4;4
Mn	1,86	2,82	2,35	6;4;6
Ni	2,06	9,95	8,82	6;6;6
Pb	<LOQ	5,95	<LOQ	6
Zn	5,76	5,35	6,26	6;4;6

Pravdivost

Pravdivost měření je těsnost shody mezi průměrnou hodnotou \bar{x} a průměrnou hodnotou z CRM čokoláda (ERM-BD 512). Pravdivost se vyhodnocuje pomocí výtěžků z CRM a ze známých přídatků standardů v 56 % hořké čokoládě ($25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ pro Mg, $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pro Fe, $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pro Mn a pro všechny ostatní kovy $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Akceptační kritérium pro pravdivost bylo stanoveno pro výtěžnost standardních přídatků v intervalu 70-130 % pro standardní přídavek $25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a interval 80-120 % pro všechny vyšší standardní přídatky (pro Mn $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, pro Fe $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro Mg $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Veškeré výtěžnosti jsou uvedeny v tabulce XXI. Akceptační kritérium pro pravdivost splňují všechny kovy až na Fe, Mg a Zn. Příčinou nevyhovujících výsledků je pravděpodobně kontaminace vzorků při práci v částečně zkorodované digestoři. Přehled výtěžků pro vzorky CRM hořká čokoláda a 56 % hořké čokolády s přídatkem standardu je uveden v tabulce XXI.

Tabulka XXI *Vyhodnocení pravdivost pomocí výtěžků v %*

Prvek	CRM	Přídavek standardů	Počet opakování
As	-	122,17	-;6
Cd	93,53	117,63	6;6
Co	-	116,35	-;6
Cr	-	102,35	-;6
Cu	97,43	103,28	6;6
Fe	-	144,51	-;4
Mg	-	144,29	-;4
Mn	93,98	120,19	6;4
Ni	86,84	103,77	6;6
Pb	<LOQ	102,91	6;6
Zn	-	143,53	-;4

pozn. pomlčka (-) zde znamená, že pro daný kov nebylo v CRM hořká čokoláda certifikované množství daného kovu

4.2 Vyhodnocení nejistoty měření

V této diplomové práci bude nejistota vypočítána pomocí přístupu „shora dolů“ [49] (viz př. výpočtu pro Cu). Pro výpočet nejistot byly dosazeny do vzorců certifikované hodnoty z CRM hořká čokoláda (ERM-BD 512). Přehled vypočítaných nejistot pro všechny certifikované kovy metodami F-AAS, ET-AAS a ICP-MS uvádí tabulka XXII.

Nejspolehlivější výsledky poskytuje metoda ICP-MS pro Cd a Mn, pro stanovení těchto kovů je tedy metoda ICP-MS velmi vhodná. Vyšší nejistota potom vyšla pro Cu (30,60 %). Metodou F-AAS se stanovovaly kovy Cu a Mn a rozšířené nejistoty vyšly uspokojivě, metoda je tedy vhodná pro stanovení Cu a Mn v čokoládě. Pro techniku ET-AAS vyšla rozšířená nejistota pro všechny kovy uspokojivě, ale na základě výtěžností z CRM hořká čokoláda se dá konstatovat, že technika je vhodná pouze pro stanovení Ni.

4.2.1 F-AAS, ET-AAS a ICP-MS

Tabulka XXII *Přehled rozšířených nejistot v %*

Kovy	U		
	F-AAS	ET-AAS	ICP-MS
Cd	-	15,09	16,40
Cu	19,39	-	30,60
Mn	21,50	18,52	9,61
Ni	-	26,73	20,87

Následující příklad výpočtu se bude týkat Cu, stanovené metodou ICP-MS. Nejprve se vypočte nejistota výtěžnosti CRM (N_v). Výtěžnost CRM (R_m) je 97,4340 %, průměrná hodnota (\bar{x}) z 6 měření CRM je 13,9331 a směrodatná odchylka ($s_{\bar{x}}$) k této hodnotě je 0,5853. Certifikovaná hodnota Cu v CRM(C) je 14,3 a nejistota k této hodnotě (s_c) je 0,7.

$$N_v = R_m \cdot \left(\sqrt{\frac{s_{\bar{x}}^2}{6 \cdot \bar{x}^2} + \frac{0,35^2}{14,3^2}} \right) = 0,974340 \cdot \left(\sqrt{\frac{0,34257609}{1164,787654} + \frac{0,1225}{204,49}} \right) = 0,02912$$

$$V_v = \frac{(1 - 0,974340)}{0,02912} = 0,8812$$

Hodnota významnosti výtěžnosti $0,8812 < 2$ a hodnota se tedy neliší od 1. V dalším kroku se vypočítá nejistota výtěžnosti standardního přídatku (V_s). Výtěžnost standardního přídatku (R_s) je 103,2829; průměrná hodnota ze 6 standardních přídatků (\bar{x}_s) je 14,9994, její směrodatná odchylka (s_s) je 0,8741, průměrná hodnota ze 6 vzorků čokolád (\bar{x}_c) je 12,4174 a její směrodatná odchylka (s_c) je 0,2698. Příspěvek nejistoty, který přísluší nejistotě standardního přídatku byl zanedbán, protože roztok přídatku byl připraven z CRM s velmi nízkou nejistotou koncentrace, a proto je tato složka z výpočtu vynechána.

$$V_s = R_s \cdot \left(\sqrt{\frac{\frac{s_s^2}{6} + \frac{s_c^2}{6}}{(\bar{x}_s - \bar{x}_c)^2}} \right) = 1,032829 \cdot \left(\sqrt{\frac{\frac{0,76405081}{6} + \frac{0,07279204}{6}}{6,666724}} \right) = 0,14939$$

$$V_s = \frac{(1 - 1,032829)}{0,14939} = -0,2198$$

Hodnota významnosti výtěžnosti standardních přídatků v absolutní hodnotě V_s $0,2198 < 2$ a hodnota se tedy neliší od 1. Dalším krokem je výpočet u_R celkového vychýlení (hodnocení pravdivosti) a u_P preciznosti.

$$u_R = \sqrt{\left(\frac{N_v}{R_m}\right)^2 + \left(\frac{V_s}{R_s}\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{0,02912}{0,974340}\right)^2 + \left(\frac{0,14939}{1,032829}\right)^2} = 0,14770$$

$$u_p = \left(\frac{s_{\bar{x}} + s_s}{2 \cdot 100} \right) = 0,04000$$

A následně se vypočítá kombinovaná standardní nejistota u_c v procentech, vynásobením hodnoty u_c 2 (koeficient rozšíření příslušející kvantilu normovaného normálního rozdělení) se vypočítá rozšířená nejistota U .

$$u_c(\%) = \sqrt{(u_R^2 + u_p^2)} \cdot 100 = 15,30 \%$$

4.3 Souhrn výsledků

V této kapitole jsou uvedeny průměrné vypočítané obsahy všech kovů u všech vzorků, které se danými metodami analyzovaly. Nejprve jsou uvedeny výsledky z metody AAS, poté výsledky z metody ICP-MS. Tyto výsledky jsou uvedeny v tabulkách XXIII, XXIV a XXV. Pro kovy Cd, Cu, Mn a Ni byla vypočítaná rozšířená nejistota U (%). Po vynásobení jedné setiny rozšířené nejistoty stanoveným obsahem daného certifikovaného kovu, pro který byla tato nejistota vypočítána dostaneme hodnotu za znaménkem \pm jako rozšířenou nejistotu. Pokud pro daný kov rozšířená nejistota není vypočítaná, je hodnota za znaménkem \pm směrodatná odchylka (s) ze 3 opakování, pro vzorky 56 % hořké čokolády, bílé čokolády a CRM (ERM-BD512) ze 6 opakování. V tabulce XXIV (ET-AAS) není uvedeno Pb, protože všechny obsahy Pb, které byly ve vzorcích naměřeny jsou pod LOQ. V tabulce XXV (ICP-MS) není uveden As a Pb, protože všechny naměřené obsahy těchto kovů jsou pod LOQ.

4.3.1 AAS

Tabulka XXIII Obsahy kovů v čokoládách a kakaových hmotách, stanovené technikou F-AAS v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Horní index U-rozšířená nejistota a s-směřovaná odchylka)

Vzorky	Cu ^U	Fe ^s	Mg ^s	Zn ^s	Mn ^U
Bílá čokoláda	<LOQ	<LOQ	245±14	<LOQ	-
Mléčná čokoláda 33 %	<LOQ	71±1,3	470±4	9±0,3	-
Hořká čokoláda 56 %	10,69±2,07	130±3,5	1668±52	19±3,4	-
Hořká čokoláda 75 %	16,27±3,15	36±3,0	1967±57	24±1,1	-
Hořká čokoláda 100 %	18,17±3,52	<LOQ	2677±73	35±0,3	-
Kakaová hmota 70 % Madagaskar	8,54±1,66	<LOQ	1091±11	19±0,3	11,70±2,52
Kakaová hmota 100 % Madagaskar	12,93±2,51	<LOQ	1583±88	27±1,4	16,86±3,62
Kakaová hmota 100 % Peru	19,58±3,80	150±11,2	1973±43	33±1,8	18,85±4,05
Mince	<LOQ	<LOQ	378±14	<LOQ	5,24±1,13
ERM – BD512 (CRM)	12,99±2,52	62±8,9	1895±58	23±3,3	13,62±2,93

pozn. pomlčka (-) znamená, že vzorek nebyl pro daný kov měřen/analyzován

Tabulka XXIV Obsahy kovů v čokoládách a kakaových hmotách, stanovené technikou ET-AAS v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Horní index U-rozšířená nejistota a s-směrodatná odchylka)

Vzorky	Cd ^U	Cr ^s	Mn ^U	Ni ^U
Bílá čokoláda	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Mléčná čokoláda 33 %	<LOQ	<LOQ	2,40±0,44	<LOQ
Hořká čokoláda 56 %	0,11±0,02	1,95±0,23	6,88±1,27	2,42±0,65
Hořká čokoláda 75 %	0,08±0,10	<LOQ	2,83±0,52	2,32±0,62
Hořká čokoláda 100 %	0,69±0,10	<LOQ	9,97±1,85	4,74±1,27
Kakaová hmota 70 % Madagaskar	0,12±0,02	<LOQ	12,00±2,22	3,51±0,94
Kakaová hmota 100 % Madagaskar	0,18±0,03	<LOQ	11,61±2,15	3,78±1,01
Kakaová hmota 100 % Peru	0,52±0,08	3,77±0,06	10,97±2,03	4,97±1,33
Mince	0,014±0,002	<LOQ	0,98±0,18	<LOQ
ERM – BD512 (CRM)	0,22±0,03	0,58±0,06	10,14±1,88	2,53±0,68

4.3.2 ICP-MS

Tabulka XXV Obsahy kovů v čokoládách a kakaových hmotách, stanovené metodou ICP-MS v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Horní index U-rozšířená nejistota a s-směrodatná odchylka)

Vzorky	Cd ^U	Co ^s	Cr ^s	Cu ^U	Fe ^s	Mg ^s	Mn ^U	Ni ^U	Zn ^s
BC	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,09±0,03	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
MC 33 %	<LOQ	0,22±0,007	0,83±0,01	4,52±1,38	86±1	812±41	5,84±0,56	1,12±0,23	12,24±0,54
HC 56 %	0,14±0,02	0,32±0,005	1,84±0,08	12,42±3,80	125±3	1781±84	14,17±1,36	2,68±0,56	18,98±1,09
HC 75 %	0,11±0,02	0,10±0,002	<LOQ	19,11±5,85	33±3	2377±108	7,66±0,74	1,99±0,42	23,05±0,86
HC 100 %	0,91±0,15	0,83±0,020	<LOQ	21,04±6,44	32±1	3071±96	25,45±2,45	5,98±1,25	33,66±0,24
KH 70 % Mad.	0,16±0,03	0,15±0,003	<LOQ	10,05±3,08	23±1	2034±57	13,14±1,26	2,64±0,55	28,39±0,60
KH 100 % Mad.	0,25±0,04	0,21±0,010	<LOQ	14,33±4,38	32±2	2938±60	18,37±1,77	3,62±0,76	41,59±1,93
KH 100 % Peru	0,70±0,11	0,42±0,011	4,10±0,14	20,29±6,21	206±4	3459±62	20,68±1,99	5,19±1,08	46,28±1,39
Mince	<LOQ	0,07±0,003	<LOQ	2,18±0,67	25±1	530±4	2,57±0,25	0,60±0,13	<LOQ
ERM – BD512	0,28±0,05	0,35±0,032	0,81±0,04	13,93±4,26	67±2	2243±121	14,76±1,42	2,61±0,54	24,07±1,51

pozn. BC je bílá čokoláda, MC je mléčná čokoláda, HC je hořká čokoláda, KH je kakaová hmota a Mad. je Madagaskar

4.3.3 Porovnání a diskuze

V této kapitole budou diskutovány a porovnány obsahy všech kovů, které byly stanoveny dvěma různými metodami (AAS a ICP-MS). Dále budou porovnány stanovené obsahy Cd technikou ET-AAS a metodou ICP-MS s legislativními limity EU, viz tabulka III (strana 8). Nakonec budou všechny naměřené obsahy kovů porovnány s literární rešerší, jejíž přehled je uveden v kapitole 2.7 (tabulka VI na straně 33-36).

Data získaná pomocí metody AAS byla vždy porovnána s daty získanými metodou ICP-MS, k tomuto porovnání byl využit dvouvýběrový párový t-test střední hodnoty na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Testování bylo provedeno v tabulkovém procesoru MS Excel. Výsledky párového testu ukázaly, že vypočtené obsahy kovů, které byly stanovené technikou F-AAS a metodou ICP-MS, se ve smyslu rovnosti středních hodnot neliší pro Cu a Fe. Pro ostatní kovy (Mg, Zn a Mn) se data liší. Z výsledků párového t-testu se dá také vyčíst, že metoda ICP-MS stanovuje obecně vyšší koncentrace Cu, Fe, Mg, Mn a Zn oproti technice F-AAS. U techniky ET-AAS a metody ICP-MS se data neliší pouze pro Ni. Pro ostatní kovy (Cd, Cr a Mn) se data liší. Z párového t-testu se dá opět vyčíst, že metoda ICP-MS stanovuje vyšší koncentrace všech kovů (Cd, Cr, Mn a Ni) oproti technice ET-AAS.

U čokolád nebyly legislativní limity pro Cd překročeny u žádného vzorku až na 100 % hořkou čokoládu z manufaktury, tato čokoláda podle techniky ET-AAS a metody ICP-MS obsahuje 0,69 a 0,91 mg·kg⁻¹ kadmia. Legislativní limit EU pro Cd v hořkých čokoládách s obsahem kakaové hmoty ≥ 50 % je stanoven hodnotou 0,8 mg·kg⁻¹. Zde by bylo dobré posoudit pomocí rozšířené nejistoty, jestli množství Cd, stanovené metodou ICP-MS skutečně překročuje legislativní limit EU 0,8 mg·kg⁻¹. Příručka Kvalimetrie 15 [49] popisuje metodiku těchto výpočtů, samotný výpočet vypadá následovně: Rozšířená nejistota, která přísluší Cd stanoveném metodou ICP-MS (16,40 %) se vydělí dvěma a vyjde 8,20 %. Legislativní limit pro Cd v hořkých čokoládách s obsahem kakaové hmoty ≥ 50 % je stanoven hodnotou 0,8 mg·kg⁻¹. Po vynásobení tohoto limitu kombinovanou standardní nejistotou ($0,8 \cdot 0,082 = 0,066$) dostaneme hodnotu 0,066. Tuto hodnotu vynásobíme koeficientem 1,64 ($g = k \cdot u = 1,64 \cdot 0,066 = 0,11$) a dostaneme $g = 0,11$, g je tzv. ochranné pásmo. Po přičtení ($0,11 + 0,8 = 0,91$ mg·kg⁻¹) dostaneme tzv. rozhodovací mez 0,91 mg·kg⁻¹. Stanovené množství Cd ve 100 % hořké čokoládě je také 0,91 mg·kg⁻¹ a množství Cd není nad mezí.

Pro kakaové hmoty byl zvýšený obsah Cd stanoven pouze ve 100 % kakaové hmotě z Peru, metody ET-AAS a ICP-MS stanovily množství Cd 0,52 a 0,70 mg·kg⁻¹. Legislativní limit pro obsah Cd ve 100 % kakaových hmotách ale ve výše uvedeném předpise EU není uveden.

Několik vědeckých článků popisuje korelace některých kovů na procentuálním obsahu kakaové hmoty v čokoládě. Tyto korelace jsou u některých kovů (Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb a Zn) obzvláště silné, pokud daná „čokoládová řada“ se zvyšujícím se procentuálním množstvím kakaové hmoty pochází od stejného výrobce (má stejný původ). V této diplomové práci jsou takovéto korelace pozorovatelné u Cu, Mg a Zn. Nutno ale dodat, že každá z analyzovaných čokolád byla vyrobena jiným výrobcem (má jiný původ), jediné dva analyzované vzorky, které mají stejný původ jsou 70 % a 100 % kakaová hmota z Madagaskaru. Je proto velice zajímavé se na tyto kakaové hmoty podívat z pohledu korelace obsahů kovů na procentuálním množství kakaové hmoty. Zvyšující se obsah kovů můžeme vyzorovat pro Cd, Cu, Fe, Mg, Mn a Zn. Při porovnání obsahů kovů v kakaových hmotách z Madagaskaru a z Peru je patrné, že obsahy téměř všech kovů s výjimkou Ni jsou vyšší ve 100 % kakaové hmotě z Peru. Důvodem je pravděpodobně jiný druh půdy, který zde hraje rozhodující roli, jak je uvedeno ve vědeckém článku [34]. Kakaovníky, ze kterých se vyrábí 100 % kakaová hmota z Peru, analyzovaná v této diplomové práci pravděpodobně rostou na sopečné půdě, která je obecně na kovy bohatší.

V čokoládě se nejčastěji stanovují kovy Cd a Pb, pro jejich vysokou toxicitu, zejména u dětí. Ve vědeckém článku [39] autoři analyzovali 65 % kolumbijské hořké čokolády a zjistili, že průměrně se v kolumbijských 65 % hořkých čokoládách vyskytuje 4,05 mg·kg⁻¹ Cd, což je asi 5× více, než udává legislativní limit EU. V tomtéž článku autoři uvádějí i výsledky stanovování obsahů Cd v zahraničních čokoládách, nejvyšší obsah Cd, a to 3,1 mg·kg⁻¹ byl nalezen v 70 % hořké čokoládě původem ze Španělska. Toto množství je asi 4× vyšší, než udává legislativní limit EU.

Množství As a Pb, která byla stanovena ve všech čokoládách a kakaových hmotách v této diplomové práci jsou pod LOQ. Kov As se ve vzorcích čokolád stanovuje zřídka, ve vědeckých člancích [40-41,43] je rozsah obsahů As v čokoládách 0,006-0,064 mg·kg⁻¹. Ve vědeckém článku [33] bylo nejvyšší množství Pb 4,87 mg·kg⁻¹ stanoveno ve vzorku kaka. Pro analyzované čokolády s různým procentuálním obsahem kakaové hmoty (32-75 %) byl stanoven rozsah obsahů Pb 0,67-2,45 mg·kg⁻¹. Autoři uvádějí, že toto množství je pod legislativním limitem 3,0 mg·kg⁻¹ pro doplňky stravy.

Hořčík je pro lidský organismus velice důležitý makroprvek. V této diplomové práci byl v čokoládách a kakaových hmotách stanoven v nejvyšším množství ze všech stanovovaných

kovů. Množství Mg v „čokoládové řadě“ (33-100 %) je v rozsahu 812 ± 41 až 3071 ± 96 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, doporučený denní příjem Mg činí 250-300 mg. Hořká čokoláda s vysokým množstvím kakaové hmoty je tedy bohatým zdrojem Mg.

Železo je stavebním prvkem hemoglobinu, který hraje klíčovou roli v transportu kyslíku z plic do tělesných tkání, a proto je nezbytný pro dýchání. V této diplomové práci bylo Fe stanoveno ve vzorcích čokolád a kakaových hmot. Je velmi zajímavé, že nejvyšší množství Fe bylo stanoveno v 56 % hořké čokoládě, a to 125 ± 3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 75 % a 100 % hořká čokoláda obsahuje Fe pouze v množství 33 ± 3 , resp. 32 ± 1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. To poukazuje na možnou kontaminaci Fe během samotného procesu výroby čokolády. Autor se v literatuře s tímto problémem nikde nesešel. Vědecká práce [33], kde autoři stanovují Fe v čokoládě mluví o tom, že s rostoucím procentuálním množstvím kakaové hmoty v čokoládě roste i obsah Fe. Tento trend se ve výsledcích stanovení Fe metodou ICP-MS nevyskytuje, ovšem obsahy Fe určené technikou F-AAS toto tvrzení potvrzují.

Další prvek, který se ve vzorcích čokolád a kakaových hmot nachází ve vyšších množstvích a koreluje s procentuálním množstvím kakaové hmoty je Zn. Ten patří mezi prvky, které mají významný vliv na správný vývoj všech živých organismů. Zjištěná množství Zn v „čokoládové řadě“ (33-100 %) se pohybují v rozsahu $12,24 \pm 0,54$ až $33,66 \pm 0,24$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, doporučený denní příjem Zn je 8-14 mg. Ve vědeckém článku [33] autoři stanovili rozsah obsahů Zn v „čokoládové řadě“ (32-75 %) na 4,5-38,1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Naměřený rozsah obsahů v této diplomové práci je o něco nižší, 75 % hořká čokoláda obsahuje $23,05 \pm 0,86$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ zinku.

Poslední prvek, který silně koreluje s procentuálním obsahem kakaové hmoty je Cu. V tomtéž vědeckém článku [33] autoři stanovili také obsahy Cu v „čokoládové řadě“ (32-75 %), a to v množství 2,63-16,38 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, což jsou nižší obsahy, než byly stanoveny v této diplomové práci ($4,52 \pm 1,38$ až $19,11 \pm 5,85$ pro 33-75 % „čokoládovou řadu“). Vzorek 100 % hořké čokolády obsahoval $21,04 \pm 6,44$ Cu.

Mangan je důležitý stopový prvek, pokud lidský organismus dlouhodobě trpí nedostatkem Mn, zvyšuje se riziko vzniku kardiovaskulárních chorob. V této diplomové práci byl Mn stanoven v rozsahu $5,84 \pm 0,56$ až $25,45 \pm 2,45$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro 33-100 % čokoládu. Nejvyšší množství Mn byly stanoveny ve vzorcích 56 % a 100 % hořké čokolády, a to $14,17 \pm 1,36$ a $25,45 \pm 2,45$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Ve vědeckém článku [33] autoři analyzovali „čokoládovou řadu“ 32-75 % čokolád a zjistili, že množství Mn bylo v rozsahu 2,33-22,17 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Dále pozorovali korelaci mezi zvyšujícím se procentuálním množstvím kakaové hmoty a množstvím Mn.

Stejný trend byl pozorován ve vědeckém článku [50]. Autoři zde analyzovali „čokoládovou řadu“ (27-70 %), stanovili rozsah pro Mn 1,7-17,3 mg·kg⁻¹ a pozorovali tutéž korelaci. V této diplomové práci tento trend nebyl u analyzované „čokoládové řady“ (33-100 %) pozorován. V dalším vědeckém článku [40] autor analyzoval 9 různých vzorků čokolád, v níž stanovil rozsah obsahů Mn na 1,91-12,36 mg·kg⁻¹. Nutno ale dodat, že autor zde neuvádí procenta kakaové hmoty v analyzovaných čokoládách.

Stopové množství kobaltu je pro člověka životně důležité, protože kobalt je stavební prvek vitamínu B₁₂. Kobalt se v čokoládách stanovuje velmi zřídka. Podle autorova vědomí pouze ve dvou vědeckých článcích [40,44]. V prvně jmenovaném článku autor uvádí výsledky stanovení Co v čokoládě v množstvích 0,04-0,18 mg·kg⁻¹, fálr autor vyhodnotil tzv. index hazardu 1,909 v kakaových produktech a došel k závěru, že častá konzumace těchto produktů může vést k nepříznivým nekarcinogenním vlivům na zdraví. K tomuto indexu hazardu přispíval z 34,08 % právě Co. V druhém článku autoři stanovili Co ve vzorcích 70 % hořké čokolády v množstvích 0,34-0,52 mg·kg⁻¹.

Ni je pro lidský organismus důležitý ultrastopový prvek. Nedostatek Ni se projevuje snížením koncentrace hemoglobinu v krvi a narušením funkce jater. V této diplomové práci byl Ni stanoven v „čokoládové řadě“ (33-100 %) v množství 1,12 ± 0,23 až 5,98 ± 1,25 mg·kg⁻¹. Ve vědeckém článku [42] autoři zkoumali vliv zpracování vstupních surovin při výrobě čokolády až po samotnou čokoládu a zjistili, že koncentrace Ni v čokoládě je daná typem půdy, na které kakaovník roste. Autoři porovnávali obsah Ni v kakaových bobech z Dominikánské republiky a z Ekvádoru a zjistili, že boby z Dominikánské republiky obsahují 7,62 mg·kg⁻¹ Ni, oproti tomu kakaové boby z Ekvádoru obsahovaly jen asi třetinu tohoto množství (2,54 mg·kg⁻¹). Během procesu zpracování obecně obsah Ni klesá, nejvíce během procesu konšování, kdy se přidávají další ingredience, jako je např. cukr a kakaové máslo. Tyto ingredience totiž obsahují mnohem méně Ni než kakaové boby.

5 Závěr

V této diplomové práci byly zoptimalizovány a zvalidovány metody AAS (F-AAS, ET-AAS) a ICP-MS pro stanovení As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb a Zn ve vzorcích čokolád a kakaových hmot. Validace těchto metod byla provedena pomocí nového matricového certifikovaného referenčního materiálu ERM-BD512 (hořká čokoláda) a přídavek standardů na jedné koncentrační úrovni. Pro metodu AAS nebylo akceptační kritérium pro preciznost ($RSD \leq 20\%$) splněno pro Fe a Mn, stanovené technikou ET-AAS. Kritérium pro pravdivost, tedy výtěžnost standardních přídavek v intervalu 70-130 % pro standardní přídavek $25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a interval 80-120 % pro všechny vyšší standardní přídávky (pro Mn $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, pro Fe $500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro Mg $25 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), nebylo splněno opět pro Fe a Mn, stanovené technikou ET-AAS. Pro metodu ICP-MS nebylo akceptační kritérium pro preciznost ($RSD \leq 20\%$) splněno pouze pro Fe. Stejné akceptační kritérium pravdivosti, jako pro metodu AAS nebylo splněno pro Fe, Mg a Zn. Následně byly všechny stanovené kovy vyhodnoceny ve všech vzorcích čokolád a kakaových hmot.

As a Pb nemohly být vyhodnoceny, protože vypočítané LOQ byly vyšší než stanovená množství kovů ve vzorcích. Pomocí dříve vyvinuté metody ET-AAS [46] se ve vzorcích čokolád a kakaových hmot nepodařily stanovit As a Pb na požadované úrovni nad LOQ. Aby metoda byla schopna stanovit tyto dva kovy, bylo by třeba zvýšit náložku vzorků z 0,25 g, provést optimalizaci teplotního programu nebo použít superlampu.

Pro Cd byly v nařízení komise (ES) č. 1881/2006 dohledány legislativní limity v čokoládách podle procentuálního množství kakaové hmoty. Jediný vzorek, který příslušný legislativní limit EU pro množství Cd překročil byla, 100 % hořká čokoláda, která obsahovala $0,91 \pm 0,15 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd (údaj za \pm je rozšířená nejistota, $k = 2$).

Autoři některých vědeckých prací uvádějí korelace některých kovů na procentuálním množství kakaové hmoty v čokoládě. Tyto korelace jsou obzvláště silné, pokud daná „čokoládová řada“ se zvyšujícím se procentuálním množstvím kakaové hmoty pochází od stejného výrobce (má stejný geografický původ). V této diplomové práci byly takovéto korelace pozorovatelné u Cu, Mg a Zn. Pro doplnění je ale třeba uvést, že každá z analyzovaných čokolád byla vyrobena jiným výrobcem a kakaové boby měly s největší pravděpodobností i jiný geografický původ. Jediné dva analyzované vzorky, které měly stejný geografický původ, byly 70 % a 100 % kakaová hmota z Madagaskaru. Bylo proto velice zajímavé porovnat obsahy kovů v těchto kakaových hmotách a sledovat korelace

obsahů kovů na procentuálním množství kakaá. Zvyšující se obsah kovů byl vyzorován pro Cd, Cu, Fe, Mg, Mn a Zn.

Další výzkum v oblasti čokolád a kakaových hmot by se mohl zaměřit na sledování korelací obsahů kovů na procentuálním zastoupení kakaových hmot v čokoládě od jednoho výrobce (stejný geografický původ kakaových bobů) v místních manufakturách v České republice a celkově na analýzu většího množství vzorků. Zajímavé by také bylo zanalyzovat různé exotické druhy čokolád např. čokolády s mořskou solí, slaným karamellem nebo vybraným druhem kořením a sledovat změny v množství kovů oproti čokoládám bez těchto příměsí.

6 Seznam použité literatury:

1. E. O. Afoakwa, *Cocoa Production and Processing Technology*, Routledge, Boca Raton 2014.
2. <https://www.aarp.org/health/medical-research/info-03-2011/dark-chocolate-can-help-lower-your-blood-pressure.html>, staženo 16. dubna 2022.
3. M. Serafini, R. Bugianesi, G. Maiani, S. Valtuena, S. De Santis, A. Crozier, Plasma antioxidants from chocolate, *Nature* 424 (2003) 1013.
4. <https://www.lechocolat.cz/o-cokolade/proc-jist-cokoladu-pro-zdravi/>, staženo 16. dubna 2022.
5. P. Hebbbar, H.C. Bittenbender, D. O'Doherty, Farm and forestry production and marketing profile for cacao (*Theobroma cacao*), *PAR* (2011) 1-23.
6. H. Dzahini-Obaitey, O. Domfah, F.M. Amoah, Over seventy years of viral disease of cocoa in Ghana: From researchers' perspective, *African Journal of Agricultural Research* 5 (2010) 476-479.
7. E. O. Afoakwa, *Chocolate Science and Technology*, 1. vydání, Wiley-Blackwell, Oxford 2010.
8. E. O. Afoakwa, A. Paterson, Cocoa fermentation: Chocolate flavour quality, *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food* (2010) 457-468.
9. S. T. Beckett, *Industrial Chocolate Manufacture and Use*, 4. vydání, Wiley-Blackwell, Oxford 2009.
10. M. Rusconi, A. Conti, *Theobroma cacao L., the food of the gods: A scientific approach beyond myths and claims*, *Pharmacological Research* 61 (2010) 5-13.
11. G. Mossu, *Cocoa*, Macmillan Press Londýn 1992.
12. R. Dand, *The International Cocoa Trade*, 2. vydání, Woodhead publishing limited, New York 1996.
13. E. O. Afoakwa, A. Paterson, M. Fowler, Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate-A review. *Trends in Food Science & Technology* 18 (2007) 290-298.
14. Vyhláška č. 76/2003 Sb., ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaá s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony, dostupná také z <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-76>, staženo 13. února 2022.
15. Zákon č. 110/1997 Sb., ze dne 24. dubna 1997, zákon o potravinách a tabákových výrobcích, dostupný také z <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110>, staženo 13. února 2022.

16. Nařízení komise (ES) č. 1881/2006, ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity kontaminujících látek v potravinách, dostupné také z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex:32006R1881>, staženo 13. února 2022.
17. C. E. Housecroft, A. G. Sharpe, Inorganic chemistry, 4. vydání, Pearson Harlow 2012.
18. E. Grzesik – Bobrowska, J. Ciba, A. Grossman, J. Kluczka, J. Trojanowska, M. Zolotajkin, Chemical Elements Compendium, 2 THETA, Český Těšín 2013.
19. F. Březina, F. Kašpárek, R. Pastorek, Z. Šindelář, Anorganická chemie, Univerzita Palackého, Olomouc 2006.
20. H. Matusiewicz, E. Bulska (Eds.), Inorganic Trace Analytics Trace Element Analysis And Speciation, De Gruyter, Berlín/Boston 2018.
21. L. P. Silva, N. Da S. Campos, T. P. Lisboa, L. V. de Faria, M. A. C. Matos, R. C. Matos, R. A. de Sousa, Simultaneous determination of cadmium, lead and copper in chocolate samples by square wave anodic stripping voltammetry, Food Additives & Contaminants: Part A (2021) 418-426.
22. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Analytická chemie, VŠCHT Praha, Praha 2019.
23. T. Černohorský, P. Jandera, Atomová spektroskopie, Univerzita Pardubice, Pardubice 1997.
24. J. Komárek, Atomová absorpční spektrometrie, MUNI, Brno 2000.
25. K. Záruba a kolektiv, Analytická chemie 2. díl, VŠCHT, Praha 2016.
26. https://is.muni.cz/el/sci/podzim2014/C7031/um/4_AS_AAS.pdf, staženo 6. dubna 2022.
27. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, 9. vydání, Cengage Learning, Brooks/Cole 2014.
28. R. Thomas, Practical Guide to ICP-MS A Tutorial for Beginners, 3. vydání, CRC Press, Boca Raton 2013.
29. V. Otruba, Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, 8. kurz ICP-MS/OES 2015, Brno-Bohunice, 25.-28. května 2015. Univerzitní kampus MU Brno-Bohunice, Spektroskopická společnost Jana Marka Marci (2015) 106-120.
30. J. S. Hill, Inductively Coupled plasma Spectrometry and its Applications, 2. vydání, Blackwell publishing, Plymouth 2007.
31. M. Mihaljevič, L. Strnad, O. Šebek, Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii, Chem. Listy 98 (2004) 123-130.
32. S. Rehman, S. M. Husnain, Assessment of trace metal contents in chocolate samples by Atomic Absorption Spectrometry, Journal of Trace Element Analysis (2012) 1-11.

33. N Alagić, J. Huremovic, Determination of metal contents in various chocolate samples, *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* (2015) 39-42.
34. E. Abt, J. F. Sam, P. Gray, L. P. Robin, Cadmium and lead in cocoa powder and chocolate products in the US Market, *Food Additives & Contaminants: Part B* (2018) 92-102.
35. J. E. L. Villa, R. R. A. Peixoto, S. Cadore, Cadmium and lead in chocolates commercialized in Brazil, *Agric. Food Chem.* (2014), 8759–8763.
36. M. Guldás, Comparison of digestion methods and trace elements determination in chocolates with pistachio using atomic absorption spektrometry, *Journal of Food and Nutrition Research* (2008) 92-99.
37. G. Ramtahal, I. Ch. Yen, I. Bekele, F. Bekele, L. Wilson, B. Sukha, K. Maharaj, Cost-effective Method of Analysis for the Determination of Cadmium, Copper, Nickel and Zinc in Cocoa Beans and Chocolates, *Journal of Food Research* (2014) 193-199.
38. L. Dohnalova, P. Bucek, P. Vobornik, V. Dohnal, Determination of nickel in hydrogenated fats and selected chocolate bars in Czech Republic, *Food chemistry* 217 (2017) 456-460.
39. A. Echeverry, H. R. Pineda, Determination of the concentration of cadmium in a Colombian chocolate with 65 % of cocoa, and foreign chocolates with different cocoa percentages, *Entre Ciencia e Ingeniería* (2016) 22-32.
40. A. Salama, Health risk assessment of heavy metals content in cocoa and chocolate products sold in Saudi Arabia, *Toxin Reviews* (2018) 1-10.
41. R. Mohamed, B. H. Zainudin, A. S. Yaakob, Method validation and determination of heavy metals in cocoa beans and cocoa products by microwave assisted digestion technique with inductively coupled plasma mass spektrometry, *Food chemistry* (2020), 125392.
42. B. Kruszewski, M. W. Obiedziński, J. Kowalska, Nickel, cadmium and lead levels in raw cocoa and processed chocolate mass materials from three different manufacturers, *Journal of Food Composition and Analysis* (2018) 127-135.
43. G. M. Lo Dico, F. Galvano, G. Dugo, C. D'ascenzi, A. Macaluso, A. Vella, G. Giangrosso, G. Cammilleri, V. Ferrantelli, Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion, *Food Chemistry* (2018), 1163-1168.
44. R. L. Yanus, H. Sela, E. J. C. Borojovich, Y. Zakon, M. Saphier, A. Nikolski, E. Gutflais, A. Lorber, Z. Karpas, Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICPMS study, *Talanta* (2014) 1-4.
45. V. Červený, E. Klokočnicková, S. Kříženecká, D. Milde, A. Nižnanská, Z. Plzák, M. Suchánek, J. Vilímeč, *KVALIMETRIE* 23, Eurachem-ČR, z.s., Ústí nad Labem 2018.

46. M. Jarošová, Analýza kávy pomocí atomové absorpční spektrometrie, diplomová práce, UPOL, Olomouc 2011.
47. T. Hanák, Elementární nečistoty v doplňcích stravy, bakalářská práce, UPOL, Olomouc 2020.
48. V. J. Barwick, S. L. R. Ellison, VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles, Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, LGC (Teddington) Limited, Londýn 2000.
49. M. Suchánek, Kvalimetrie 15. Použití informací o nejistotě k posuzování shody, Eurachem-ČR, z.s., Praha 2008.
50. C. Viana, D. Bohrer, P. Nascimento, L. M. Carvalho, L. A. Gobo, Determination of aluminum, copper and manganese content in chocolate samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a microemulsion technique, Journal of Food Composition and Analysis 24 (2011) 465-468.
51. <https://www.rohlik.cz/1407939-milka-bila-cokolada>, staženo 21.dubna 2022.
52. <https://www.rohlik.cz/1297839-orion-mlecna-cokolada>, staženo 21.dubna 2022.
53. <https://aztecman.cz/eshop/page/2/>, staženo 21. dubna 2022.
54. <https://aztecman.cz/produkt/ekvador-100-arriba-nacional/>, staženo 21. dubna 2022.
55. <https://www.zbozi.cz/vyrobek/only-obri-cokoladova-mince-21-5-g/>, staženo 21. dubna 2022.

7 Přílohy

7.1 Obrázky některých analyzovaných vzorků

Příloha I Analyzovaná čokoláda „Milka bílá čokoláda“ [51]



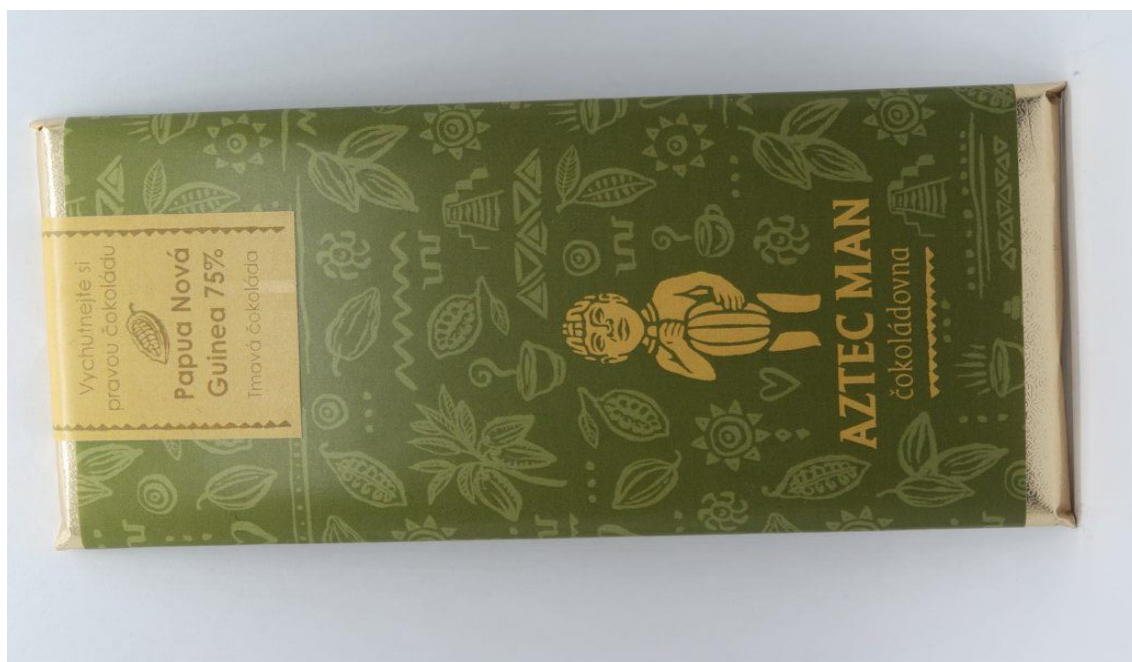
Příloha II Analyzovaná čokoláda „Orion Mléčná čokoláda 33 %“ [52]



Příloha III Analyzovaná čokoláda „Nina chocolate hořká čokoláda 56 %“



Příloha IV Analyzovaná čokoláda „Papua Nová Guinea 75 % tmavá čokoláda“ [53]



Příloha V Analyzovaná čokoláda „Ekvádor 100 % Mono Bravo Arriba Nacional tmavá čokoláda“ [54]



Příloha VI *Analyzovaná čokoláda „, čokoládová euromince“ [55]*



Pro všechny tři vzorky kakaových hmot v přílohách obrázky chybí.

7.2 Data z měření vzorků čokolád a kakaových hmot

Příloha VII Část experimentálních dat z techniky F-AAS

vzorek	Cu	Fe	Mg	Zn	Mn
56% HC1	11,4458	130,1205	1621,4859	18,4739	x
56% HC2	11,1356	126,0032	1650,2809	19,1613	x
56% HC3	10,5494	133,7580	1686,9029	18,9092	x
56% HC4	10,2451	126,1551	1647,2479	14,1623	x
56% HC5	10,4208	130,0601	1763,5271	21,5431	x
56% HC6	10,3705	133,9106	1636,1257	24,4664	x
56% HC spike1	13,3626	177,7024	3958,9150	18,2489	x
56% HC spike2	13,4892	179,2566	4036,7706	21,4828	x
56% HC spike3	13,8666	190,0121	3928,8585	25,6230	x
56% HC spike4	13,7385	270,2797	3905,9366	24,6691	x
56% HC spike5	13,2523	107,7122	1081,1080	19,0315	x
56% HC spike6	13,6109	108,6869	1025,8207	18,4147	x
CRM HC1	14,4192	66,3079	1929,3258	25,7920	x
CRM HC2	15,1816	63,9898	1958,0023	25,2554	x
CRM HC3	12,0017	69,6528	1837,7625	22,2889	13,1805
CRM HC4	12,3011	69,9223	1854,4210	25,3422	13,2260
CRM HC5	11,9454	51,6212	1125,2133	18,7713	14,2918
CRM HC6	12,0985	50,0626	1089,9040	18,6692	13,7672

pozn. x znamená, že daný kov nebyl ve vzorcích stanoven

Příloha VIII Část experimentálních dat z techniky ET-AAS

vzorek	Cd	Cr	Mn	Ni	Pb
56% HC1	0,1117	2,0922	7,6187	2,3121	0,0829
56% HC2	0,1134	2,1634	7,5759	2,1389	0,0343
56% HC3	0,1270	2,1757	7,6265	2,0082	0,0469
56% HC4	0,0988	1,8622	6,0327	3,0654	0,0792
56% HC5	0,1145	1,7441	6,2847	2,4633	0,0517
56% HC6	0,1072	1,6356	6,1464	2,5613	0,0928
56% HC spike1	2,0717	4,4843	8,9578	4,6739	2,7058
56% HC spike2	2,1219	4,5092	8,8023	4,7013	1,9868
56% HC spike3	2,2003	4,8648	8,2017	5,0195	2,3421
56% HC spike4	2,3597	6,1883	8,4641	4,4282	2,6350
56% HC spike5	2,0770	5,2975	7,2054	4,3530	2,2716
56% HC spike6	2,1339	4,7265	7,2286	4,3062	2,4346
CRM HC1	0,2053	ND	ND	2,7138	ND
CRM HC2	0,1964	0,3583	12,1344	2,1039	ND
CRM HC3	0,2593	0,4898	11,1347	2,6873	0,0010
CRM HC4	0,2541	0,6307	10,0702	2,6250	ND
CRM HC5	0,2036	0,5671	8,5555	1,5774	0,0956
CRM HC6	0,2063	0,6219	8,8257	1,8111	0,1257

pozn. ND znamená, že kov nebyl detekován

Příloha IX Část experimentálních dat z metody ICP-MS

vzorek	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Pb	Zn
56% HC1	ND	0,15	0,32	1,75	12,37	123,66	1680,76	13,83	2,67	0,06	19,25
56% HC2	ND	0,15	0,33	1,77	11,96	119,74	1900,17	14,04	2,59	0,05	19,87
56% HC3	ND	0,15	0,32	1,82	12,39	122,62	1785,16	14,20	2,67	0,04	19,61
56% HC4	0,01	0,14	0,32	1,97	12,48	127,17	1813,24	14,26	2,73	0,05	17,26
56% HC5	0,01	0,14	0,33	1,87	12,79	129,19	2341,73	14,61	2,75	0,04	18,01
56% HC6	0,01	0,14	0,32	1,86	12,52	126,02	1726,06	14,07	2,68	0,04	19,89
56% HC sp1	2,79	2,96	3,06	4,15	14,99	169,37	5391,51	19,71	5,27	2,48	22,98
56% HC sp2	2,78	2,99	3,17	4,13	15,37	173,95	4979,70	19,66	5,40	2,51	24,04
56% HC sp3	3,41	3,47	3,86	4,85	15,72	182,16	6257,08	20,70	5,79	2,87	22,00
56% HC sp4	3,25	3,42	3,80	4,80	16,00	262,47	4924,54	20,64	5,86	2,82	21,26
56% HC sp5	3,06	2,79	2,72	4,21	13,97	131,87	1863,22	14,41	4,68	2,66	27,50
56% HC sp6	3,06	2,86	2,78	4,26	13,95	133,20	1861,89	14,28	4,64	2,69	25,33
CRM HC1	0,01	0,27	0,32	0,56	13,67	67,39	x	14,61	2,37	0,01	22,45
CRM HC2	0,001	0,27	0,32	0,56	14,02	69,76	x	15,30	2,41	0,004	22,69
CRM HC3	0,02	0,29	0,39	0,84	14,36	64,31	2373,67	14,25	2,86	0,02	22,97
CRM HC4	0,02	0,30	0,40	0,85	14,82	66,82	2316,85	14,86	2,93	0,02	25,36
CRM HC5	0,03	0,27	0,35	0,77	13,49	65,62	2130,10	14,84	2,58	0,05	25,36
CRM HC6	0,02	0,29	0,34	0,79	13,24	65,62	2150,17	14,66	2,53	0,02	25,58

pozn. x znamená, že daný kov nebyl ve vzorcích stanoven