

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**APLIKACE STATISTICKÝCH POSTUPŮ
VE SPEKTROMETRII**

HABILITČNÍ PRÁCE

Obor: analytická chemie

Olomouc, 2015

Ing. David MILDE, Ph.D.

Poděkování

Na tomto místě chci velmi rád a upřímně poděkovat spolupracovníkům a kolegům z Katedry analytické chemie a Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů PřF UP v Olomouci za dlouholetou výbornou spolupráci a podporu.

Zvláštní poděkování patří mé ženě Martině za trpělivost, pomoc a vytváření výborného domácího zázemí, kde vždy můžu načerpat do další práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto habilitační práci vypracoval samostatně s využitím citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci dne 5.11.2015

.....

OBSAH

1. ÚVOD	4
2. STOPOVÁ PRVKOVÁ ANALÝZA VZORKŮ BIOLOGICKÉHO PŮVODU.....	5
3. SPOJENÉ TECHNIKY V ATOMOVÉ SPEKTROMETRII	18
4. SLEDOVÁNÍ KVALITY POTRAVIN POMOCÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRIE.....	25
5. ZÁVĚR	32
6. SEZNAM ZKRATEK.....	33
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	34
8. PŘÍLOHY	38

1. Úvod

„I only believe in statistics that I doctored myself.“

Winston S. Churchill

Mé první setkání se statistikou se uskutečnilo během studia na VŠCHT Praha. Setkání to nebylo zrovna šťastné. Tato oblast matematiky mě nezaujala a to byl zřejmě důvod, proč jsem do statistiky v té době nedokázal proniknout. Vyhodnocení výsledků diplomové práce včetně stanovení nejistoty měření, jež bylo v té době v plenkách, pro mne bylo nejméně zajímavou součástí závěrečné práce inženýrského studia. Přijetí na pozici asistenta na Přírodovědeckou fakultu UP v Olomouci a také do postgraduálního studia analytické chemie bylo spojeno s podmínkou, že se budu aplikacím statistiky v analytické chemii věnovat. Přijal jsem to jako výzvu a díky podpoře tehdejšího vedoucího katedry, prof. Stránského, se mi podařilo se s aplikovanou statistikou spřátelit. V žádném případě bych se i po více než 15 letech, kdy se tomuto oboru věnuji, neodvážil označit za statistika. Spíše jsem a zřejmě i zůstanu analytickým chemikem, který vybrané statistické postupy rád používá pro vyhodnocení výsledků svého vědeckého bádání. A na základě svých zkušeností se ztotožňuji s výše uvedeným citátem W. Churchilla. Podařilo se mi zavést a úspěšně provozovat tři semestrální předměty pro studenty pregraduálního studia (Chemometrie I a II, Základy chemické metrologie) a jeden pro postgraduální studenty (Trendy v chemické metrologii).

Dovolím si Vás provést komplexem problémů, jimž čelí analytický chemik a to ve třech oblastech – ve stopové prvkové analýze vzorků biologického původu, v rychle se rozvíjejících možnostech spojených technik v atomové spektrometrii a sledování kvality potravin za pomoci infračervené spektrometrie. Neopomenu odběr a přípravu vzorků, protože i na počátku 21. století stále platí, že výsledek analýzy závisí více na kvalitě vzorku než na čemkoliv jiném. Nevynechám ani úskalí spojená s vývojem metod. Poukážu na nezbytnost zabezpečení kvality výsledků i při výzkumu. A samozřejmostí je aplikace vhodných statistických postupů k odkrytí tajů ukrytých v datech, jež na nás dnes analytické přístroje chrlí.

2. Stopová prvková analýza vzorků biologického původu

Oboru atomové spektrometrie se po pedagogické i badatelské stránce věnuji téměř 20 let. I za tuto poměrně krátkou dobu jsem svědkem podstatného vývoje instrumentace. Zlepšují se instrumentální detekční meze, robustnost a stabilita přístrojů, možnosti vyhodnocení dat, jakož i nabídka jednotlivých spektrometrů. Na druhou stranu snahy o uživatelskou přívětivost ze spektrometrů tvoří „černé skříňky“, do kterých může téměř kdokoliv vložit vzorek na jedné straně a na druhé straně se získá jakýsi výsledek. Bez posouzení jeho validity a reálnosti je však téměř k ničemu. Klíčové je i to jaký vzorek a v jaké podobě do spektrometru vkládáme. Většina biologických vzorků vyžaduje vhodný odběr vzorku, jeho skladování a samozřejmě přípravu, obvykle rozklad. V oblasti přípravy vzorků biologické původu pro stopovou prvkovou analýzu hraje prim mikrovlnný rozklad v uzavřeném systému. Snaha o spolehlivé, tedy precizní a pravdivé, kvantitativní analýzy stále nižších koncentrací však klade nemalé požadavky na zabezpečení kvality výsledků a omezení rizika možné kontaminace či ztráty analytu během přípravy.

Jsem přesvědčen, že i v dnešní době ke stopové prvkové analýze (koncentrace řádově $\mu\text{g l}^{-1}$ či $\mu\text{g kg}^{-1}$ a nižší) jsou vhodné jen dvě techniky – atomová absorpční spektrometrie (s elektrotermickou atomizací a generováním těkavých sloučenin) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. V dobách, kdy jsem začínal svou vědeckou práci, výrazně převažoval počet atomových absorpčních spektrometrů a to zejména z ekonomických důvodů. I pro mne byl AAS spektrometr prvním přístrojem, se kterým jsem více než 10 let pracoval. Na našem pracovišti to byl jediný přístroj z oblasti atomové spektrometrie. V posledním období v oblasti stopové a ultrastopové prvkové analýze převažuje ICP-MS. Domnívám se, že je to také z ekonomických důvodů. Pořizovací a podle některých názorů i provozní náklady jsou sice vyšší, rychlost měření, možnost multielementární analýzy a široký lineární rozsah kalibračních závislostí však umožňují rychlejší analýzu a tím možnost zpracovat podstatně větší množství vzorků. I my jsme před několika lety začali pracovat s ICP-MS spektrometry. Jedna z tehdy studovaných problematik – stopová prvková analýza kávových zrn byla využita k porovnání těchto dvou technik [1]. Zatímco do té doby publikované práce se zabývaly analýzou minerálního složení a případně stanovením toxických kovů pomocí jedné instrumentální techniky s cílem kontroly kvality kávy [2, 3], cílem naší práce bylo porovnání AAS a ICP-MS z hlediska metrologických charakteristik (mez detekce, preciznost a pravdivost, nejistota měření) jakož i ekonomické a časové náročnosti. Naměřená data byla

statisticky zpracována pomocí vybraných jednorozměrných i vícerozměrných statistických postupů. V pěti vzorcích kávy pocházejících z různých lokalit jsme stanovili 10 prvků (Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, Cd, Cr, Mn, Ni a Pb). Rozklad vzorků byl proveden u nás v laboratoři optimalizovanou metodou mikrovlnného rozkladu se směsí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Patřičná pozornost byla věnována i přípravě slepých pokusů. Zatímco stanovení pomocí ICP-MS nevyžadovalo žádnou úpravu mineralizovaných vzorků, tak pro AAS bylo potřeba vzorky různě ředit a přidávat uvolňovací činidla pro plamenovou atomizaci (Ca, Mg, Cu, Fe, Zn) a používat odlišné teplotní programy a modifikátory matrice pro elektrotermickou atomizaci (Cd, Cr, Mn, Ni, Pb). Podrobnosti experimentálních podmínek jsou uvedeny v publikaci [1]. Jakékoliv statistické vyhodnocení výsledků vyžaduje spolehlivá data. Z toho důvodu jsme provedli validaci našich postupů měření za pomocí analýzy matričního certifikovaného referenčního materiálu (CRM). Z dostupných CRM jsme vybrali čajové listy (NCS ZC 73014 Tea) z důvodu podobných koncentrací a vysoké počtu certifikovaných hodnot. Hodnoty základních validačních parametrů jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2. Nalezené hodnoty mezí detekce vzhledem k tomu, že byly zjištěny za podmínek mezilehlé preciznosti, možná nepůsobí tak impozantně, jako je tomu v jiných pracích, ale mnohem více odpovídají skutečnosti. Viditelné jsou rozdíly mezi hodnotami stanovenými pro AAS a pro ICP-MS. Hodnoty precizností a relativních nejistot měření lze považovat za vyhovující požadovaným účelům. Za zmínku ještě stojí vyšší hodnoty u těchto dvou metrologických parametrů pro prvky, které byly stanovovány za pomocí elektrotermické atomizace v AAS. Tato technika obecně trpí horší opakovatelností.

Tabulka 1. Hodnoty meze detekce (LOD) preciznosti a vypočtené relativní nejistoty

	LOD (mg kg ⁻¹)		Preciznost (%)		Rozšířená nejistota (%)	
	ICP-MS	AAS	ICP-MS	AAS	ICP-MS	AAS
Ca	0,055	1,75	3,01	3,38	6,22	7,20
Cu	0,018	2,25	2,29	3,93	6,87	11,37
Fe	0,082	13,75	3,39	4,99	7,91	24,78
Mg	0,063	2,75	2,97	4,87	5,51	8,73
Zn	0,058	1,38	2,85	4,14	6,11	10,03
Cd	0,003	0,01	7,68	12,06	17,01	25,67
Cr	0,010	0,16	3,49	11,90	13,82	33,70
Mn	0,004	0,04	2,61	5,83	6,28	13,15
Ni	0,013	0,17	5,70	12,44	15,64	28,50
Pb	0,003	1,03	5,41	10,87	16,53	34,07

Opakované analýzy CRM v průběhu několika měsíců ($n = 34$) umožnily výpočet preciznosti za podmínek mezilehlé preciznosti. Ke stanovení nejistoty měření bylo použito přístupu shora dolů, u kterého se propagují dvě základní složky a to preciznost a pravdivost (v našem případě zjištěná z analýz CRM) [4, 5].

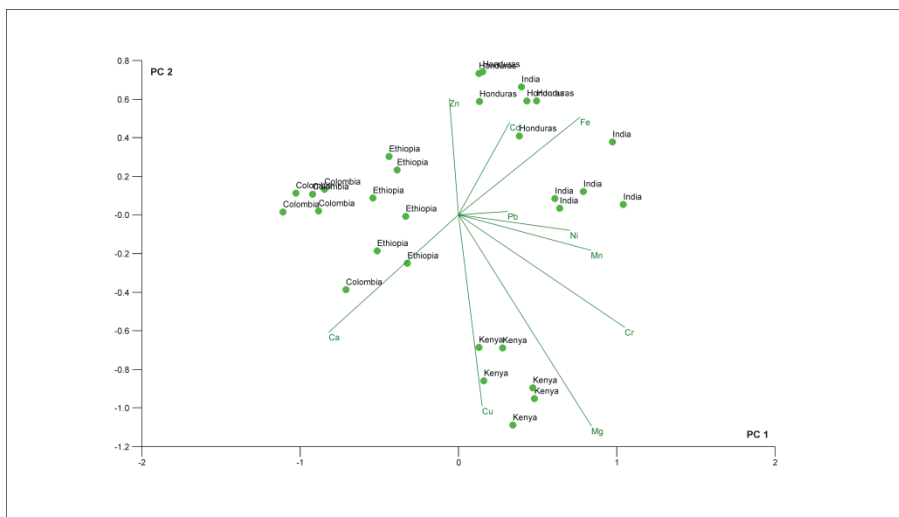
Tabulka 2. Posouzení pravdivosti pomocí analýzy CRM (mg kg^{-1}), stanovené hodnoty vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka

Prvek	Stanoveno pomocí ICP-MS	Stanoveno pomocí AAS	Certifikované hodnoty s nejistotou
Ca	$(3,26 \pm 0,10) \times 10^3$	$(3,27 \pm 0,11) \times 10^3$	$(3,26 \pm 0,04) \times 10^3$
Mg	$(1,86 \pm 0,06) \times 10^3$	$(1,85 \pm 0,09) \times 10^3$	$(1,86 \pm 0,06) \times 10^3$
Fe	241 ± 8	241 ± 12	242 ± 9
Cu	$18,4 \pm 0,4$	$18,7 \pm 0,7$	$18,6 \pm 0,4$
Zn	$51,1 \pm 1,5$	$49,8 \pm 2,1$	51 ± 1
Cd	$0,064 \pm 0,005$	$0,062 \pm 0,002$	$0,062 \pm 0,002$
Cr	$0,44 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,06$	$0,45 \pm 0,05$
Mn	507 ± 13	502 ± 29	500 ± 10
Ni	$3,3 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,2$
Pb	$1,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$

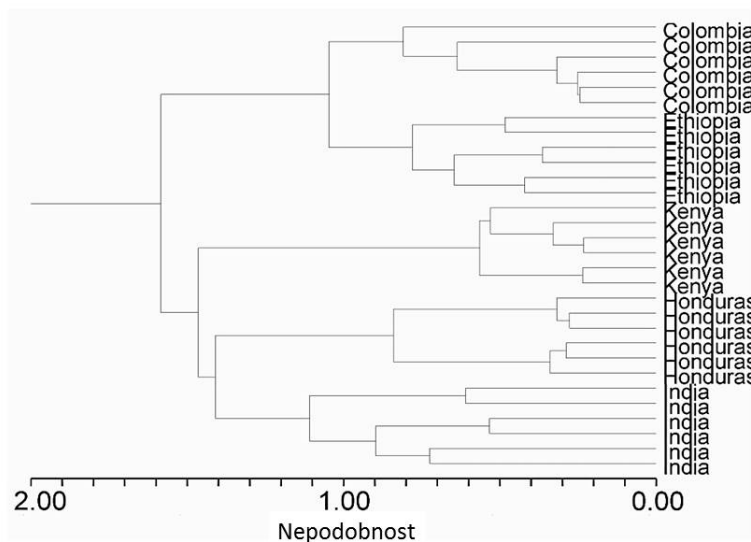
Uspokojivé závěry z vývoje a validace metod nám následně umožnily provést analýzu reálných vzorků pražených kávových zrn a naměřené koncentrace podrobit statistické analýze. Aplikace testů shodnosti neodhalila na hladině významnosti $\alpha = 5 \%$ žádné rozdíly mezi výsledky získanými na ICP-MS a AAS a ani mezi vzorky kávy z Indie, Keni, Kolumbie, Hondurasu a Etiopie. Dalším krokem byla aplikace dvou nezávislých metod a to analýzy hlavních komponent (PCA), jejíž details lze nalézt přímo v práci [1] a shlukové analýzy. Grafické znázornění závěrů u PCA pomocí dvojného grafu a dendrogramu ze shlukové analýzy (metoda nejbližšího souseda) uvádí obrázky 1a 2.

Dalším výstupem našich experimentů bylo posouzení časové náročnosti stanovení 10 kovů ve 25 vzorcích. Vzhledem k tomu, že rozklad vzorků je stejný pro obě techniky, porovnávali jsme pouze čas měření na spektrometrech a případné ředění vzorků. Pro tento modelový příklad jsme zjistili, že stanovení na AAS je asi 5x časově náročnější ze zřejmého důvodu – u atomové absorpční spektrometrie je nutné stanovení kovů provádět sekvenčně. Pro stejný modelový příklad jsme porovnávali i provozní náklady. Překvapivým zjištěním je přibližně stejná spotřeba argonu. Náklady na chemikálie jsou podobné, pro elektrotermickou atomizaci je třeba vzít úvahu cenu grafitových kyvet. Mírně vyšší náklady je třeba vynaložit při práci

s atomovým absorpčním spektrometrem. Je třeba uvést, že jsme nebrali v úvahu opotřebení kónusu u ICP-MS, protože to není možné snadno finančně ohodnotit.



Obr. 1. Dvojný graf z PCA, PC1: 43,1 %, PC2: 21,6 %

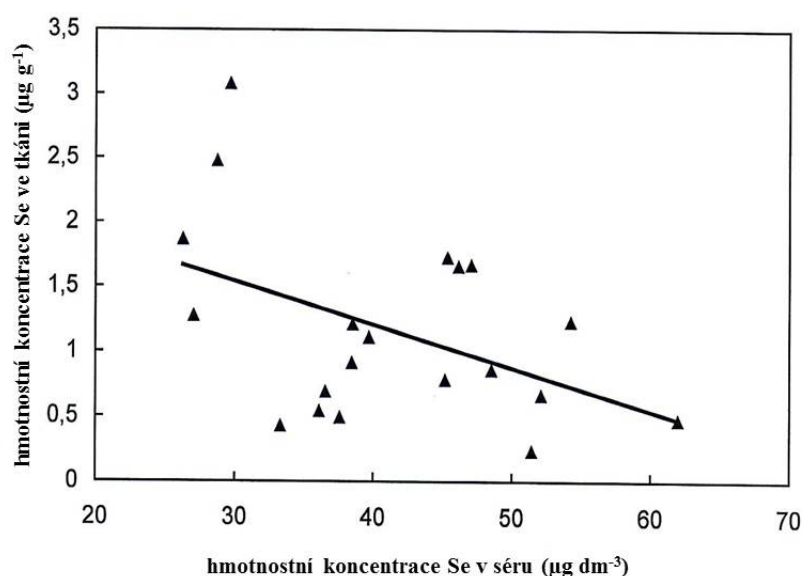


Obr. 2. Dendrogram, metoda nejbližšího souseda, euklidovská vzdálenost

Atomová absorpční spektrometrie je bezesporu i nadále rozšířenou technikou. Zejména v laboratořích, které analyzují ve vzorcích pouze několik málo prvků. Sem můžeme zařadit

klinické a biochemické laboratoře, kde se AAS používá pro stanovení Zn, Cu, Pb či Se v tělních tekutinách. Velmi často je ve vzorku požadováno stanovení pouze jednoho prvku a zde by použití multielementárních technik bylo plýtváním. V řadě případů lze pomocí AAS provést analýzu i ve vzorcích bez potřeby jejich rozkladu, i když to přináší celou řadu komplikací vzhledem k vysokému podílu organických sloučenin. Před deseti či patnácti lety byly velmi rozšířené epidemiologické studie zaměřené na stanovení několika kovů v krvi, séru či plazmě v korelaci se zátěžemi ze znečištěného životního prostředí, s vlivem pracovního prostředí a zejména s různými onemocněními. V České republice tyto studie prováděl a i nadále provádí zejména Státní zdravotní ústav v Praze [6, 7]. Z pochopitelných důvodů byla věnována pozornost také nádorovým onemocněním. Díky spolupráci s klinikami FN v Olomouci se nám podařilo získat velmi zajímavé vzorky, zejména tkáň tlustého střeva od pacientů, kteří kvůli kolorektálnímu karcinomu podstoupili operaci. Unikátnost a omezená dostupnost takových vzorků vyžadovala zvolit vhodnou metodu jejich přípravy a zabezpečit porovnatelnost výsledků v celé sérii analyzovaných vzorků. Z této spolupráce vznikly dvě publikace poskytující první údaje o koncentracích Se, Fe a Mg ve tkáni tlustého střeva ve vztahu k nádorovému onemocnění [8, 9]. Souvislost koncentrací některých prvků s nádorovým onemocněním není novou záležitostí, je pomocí atomové spektrometrie studována již od 80. let minulého století. Přestože kovy jako je Se, Cu a Zn hrají důležitou roli v řadě biochemických procesů probíhajících v živém organismu, jejich přítomnost v antioxidantních enzymech (glutathion peroxidáza, či Cu,Zn-superoxid dismutáza) má prokazatelnou souvislost s nádorovým onemocněním [10]. Cílem první naší studie bylo hledání souvislostí mezi hladinami mědi, hořčíku, selenu a zinku v krevním séru a tkáni tlustého střeva zasažené nádorem a získané při operaci. Zkoumali jsme vzorky séra a tkáň tlustého střeva od 20 pacientů a dále jsme měli krevní sérum od kontrolní skupiny. Studii předcházela pečlivá příprava odběru vzorku a jeho skladování před analýzou. Rozklad vzorků byl prováděn osvědčeným způsobem v uzavřeném systému mikrovláknového mineralizátoru. Tou dobou jsme byli vybaveni pouze jednomístným mineralizátorem, a proto jsme v pravidelných intervalech analyzovali dostupné certifikované referenční materiály. Vhodné ředění vzorků umožnilo stanovení Cu, Mg a Zn pomocí plamenové atomizace a koncentraci Se jsme stanovovali pomocí generace hydridů. V publikaci je popsáno detailní statistické vyhodnocení dat včetně rozdělení do skupin podle pohlaví. Vzhledem k tomu, že u biologických vzorků dochází často k porušení statistických předpokladů pro použití běžných momentových odhadů (aritmetický průměr a výběrový odhad směrodatné odchylky), vyhodnocení jsme provedli pomocí pivotů a pořádkových statistik [11]. Dalším použitým postupem bylo statistické

testování významnosti rozdílu hladin studovaných kovů mezi „pacienty“ a kontrolní skupinou. Zde výsledky doplnily dostupné literární údaje s tím, že v naší studii byly prezentovány postupy zabezpečení kvality dosažených výsledků, což jim dodává věrohodnost. Dalším krokem zpracování dat byla korelační analýza zaměřená na studium vztahů mezi hladinami analyzovaných kovů v séru a tkáni. Byla prokázána pouze jedna statisticky významná korelace ($p < 0,05$) a to pro selen (obrázek 3). Dosažené výsledky jsou diskutovány s dostupnými literárními údaji.



Obr. 3. Korelace mezi koncentrací selenu v tkáni a séru (převzato z [8])

(Pearsonův korelační koeficient $r = -0,444$, Spearmanův korelační koeficient $\rho = -0,341$.)

Výše uvedené výsledky nás dovedli k ještě jedné studii, která byla postavena na porovnání hladin Cu, Fe, Se a Zn ve tkáni tlustého střeva zasažené nádorem a kontrolní tkáni, nádorovým bujením nezasažené. Při operačním zákroku se odstraňuje i nepatrná část střeva nádorem nezasažená a tu jsme po diskuzi s lékaři považovali za kontrolní. Samotný analytický postup jsme nemodifikovali, aby bylo možné výsledky porovnávat s předchozími studii. V rámci výzkumu jsme ještě vyvinuli metodu alkalického rozkladu s hydroxidem tetramethyl amonným na mokré cestě a ověřili její pravdivost a preciznost analýzou

certifikovaného referenčního materiálu. Tato metoda může být vhodná pro pracoviště, která nejsou vybavena mikrovlnným mineralizátorem. Statistický soubor 23 vzorků jsme následně detailně vyhodnotili, podstatnou část uvádí tabulka 3. Aplikace počítačové průzkumové analýzy dat ukázala, že zamítnutí normality je způsobeno přítomností zdánlivě odlehlých bodů a proto v dalším vyhodnocení bylo přistoupeno k použití neparametrických statistických postupů.

Tabulka 3. Koncentrace kovů v tkáni tlustého střeva – základní statistické vyhodnocení

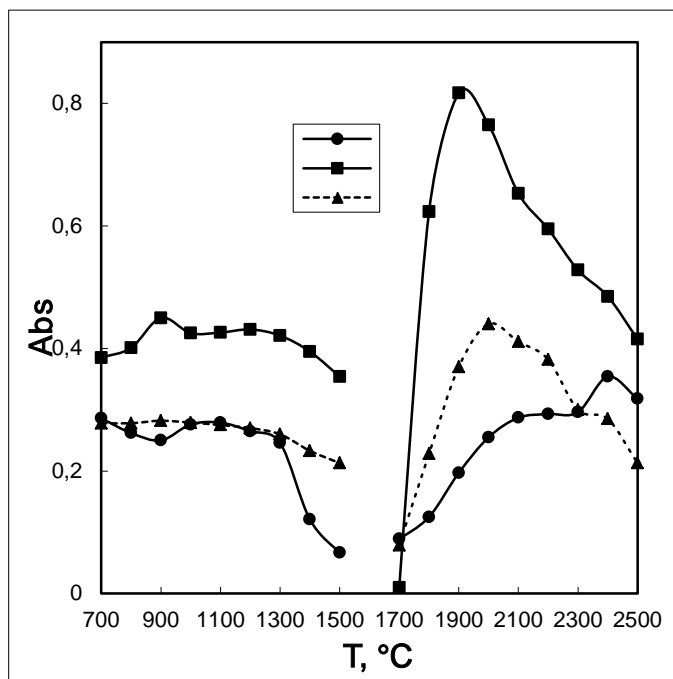
Prvek	Cu		Fe		Zn		Se	
Počet vzorků	23		19		23		23	
	nádor	kontrola	nádor	kontrola	nádor	kontrola	nádor	kontrola
Průměr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	6,49	4,30	148,8	91,1	60,5	66,2	0,52	0,26
Interval spolehlivosti	4,98–8,00	3,10–5,18	103,6–194,0	58,8–123,4	51,7–69,4	51,5–80,9	0,40–0,64	0,20–0,32
Sm. odchylka ($\mu\text{g g}^{-1}$)	3,50	2,41	93,8	67,1	20,6	34,0	0,28	0,14
Šikmost	1,21	1,53	0,68	0,80	-0,15	0,92	0,60	2,53
Špičatost	4,13	5,00	3,18	3,09	1,78	3,30	2,47	11,1
Medián ($\mu\text{g g}^{-1}$)	6,11	3,63	135,5	82,6	62,9	55,3	0,43	0,24
Nejnižší hodnota ($\mu\text{g g}^{-1}$)	4,40	2,72	71,7	21,9	44,1	35,7	0,24	0,19
Nejvyšší hodnota ($\mu\text{g g}^{-1}$)	7,82	4,54	199,2	143,4	81,8	74,9	0,63	0,30
Normalita	Ano	Ne	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ne

Kromě získání základních validačních parametrů jsme v práci pomocí testování statistických hypotéz prokázali rozdílné koncentrační hladiny u mědi, železa a selenu mezi nádorem zasaženou a nezasazenou tkání. Tato studie opět rozšířila tehdejší poznání a je v ní uvedeno podrobné srovnání s dosud publikovanými údaji. Hodnoty prezentované v naší práci jsou i v tomto případě podloženy prokazatelnými daty zabezpečení kvality výsledků. Výzkum prokázal silnou korelaci mezi koncentracemi stopových prvků ve tkáni tlustého střeva a nádorovým onemocněním. V práci navrhované pokračování výzkumu zaměřeného na sledování vlivu léčby ve formě radioterapie či chemoterapie se již neuskutečnilo. Problematika sledování hladin fyziologicky významných kovů v souvislosti s nádorovým onemocněním přestala být aktuální. I přesto v této oblasti výzkum nadále pokračuje, jehož příkladem jsou publikace beroucí v potaz ještě další vlivy jako je kouření či životní styl [12, 13]. Zavádět však již do studia komplikovaného biochemického systému, kde hladiny kovů v těle ovlivňuje řada dějů mimo nádorového onemocnění, další vlivy, může vést ke kontraproduktivním výsledkům. Jednu z potenciálně zajímavých aplikací vidím ve studiu izotopického zastoupení některých kovů v lidském organismu v souvislosti s některými

onemocněními, jako je třeba Wilsonova choroba [14]. Zajímavou epidemiologickou oblastí je i izotopická prvková analýza v souvislosti se stravováním (např. Fe u vegetariánů). Potenciál spočívá i v tom, že je třeba zkombinovat tomuto výzkumu otevřené erudované klinické pracoviště a chemickou laboratoř vybavenou velmi nákladným hmotnostním spektrometrem s indukčně vázaným plazmatem s multikolektorovým detektorem.

Tuto část habilitační práce bych ukončil informací, že po asi pěti letech jsme se vrátili k analýze klinických vzorků a zužitkovali tak své know-how. Několik posledních let se věnujeme sledování uvolňování kovů do lidského těla z kloubních náhrad. V současné době probíhá statistické zpracování dat s cílem publikování výsledků v roce 2016.

Z pohledu základního výzkumu se může zdát oblast zabezpečení kvality výsledků spočívající zejména v metrologické návaznosti výsledků, validaci analytických metod a stanovení nejistoty měření jako okrajová záležitost. Pro pracovníky analytických laboratoří je to však záležitost podstatná. Na mnoha evropských diskuzních fórech Eurachem [15] i na řadě lokálních konferencí se lze opakovaně setkat s požadavky na více a více praktických příkladů z této oblasti obvykle spojených se zaváděním nové instrumentace. Přestože oblast validace analytických postupů se může zdát jako již dobře zdokumentovaná, a to jak ve formě obecných pokynů [16], tak i specifických pro konkrétní oblast [17], je třeba vzdělávání a předávání zkušeností v této oblasti věnovat dostatečnou pozornost. Proto jsme se rozhodli jednu menší studii týkající se stanovení stopových koncentrací arsenu pomocí AAS v ořeších publikovat v Chemických listech [18]. To umožnilo popsat metodicky celý proces spojený se zaváděním nové metody do běžné laboratorní praxe – od vývoje metody, přes hledání optimálních podmínek až po validaci (v omezeném rozsahu) a popis možného způsobu stanovení nejistoty výsledků přístupem shora dolů. Od základního studia literatury, přes přípravu vzorků, detailní optimalizaci podmínek u elektrotermické atomizace a generování hydridů v AAS, studia interferenci, až po provedení validace, vyhodnocení nejistoty měření a prezentování výsledků a jejich statistické vyhodnocení. Stanovení stopových koncentrací arsenu pomocí ETA-AAS vybaveném deuteriovou výbojkou pro korekci pozadí pro eliminaci spektrálních interferencí přináší vzhledem k vlnové délce absorbovaného záření pod 200 nm určité komplikace a vyžaduje detailní optimalizaci rozkladné a atomizační teploty a použití modifikátorů matrice. To je prezentováno na obrázku 4 a v tabulce 4.



Obr. 4. Rozkladné a atomizační křivky pro různé modifikátory; 1 – $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, 2 – $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ s askorbovou kyselinou, 3 – $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

Tabulka 4. Teplotní program pro stanovení As ve vzorcích ořechů při použití různých modifikátorů

Krok	Teplota (°C)	Doba nárůstu (s)	Doba držení teploty (s)	Inertní plyn
ohřev	120	1	10	Ar
NÁSTRÍK				
sušení	150	10	25	Ar
rozklad	1100 ^a /900 ^b /1200 ^c	5	20	Ar
rozklad	1100 ^a /900 ^b /1200 ^c	0	1	-
atomizace	2400 ^a /2100 ^b /2100 ^c	max. rychlost	2	-
čištění	2700	1	5	Ar

^a modifikátor $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$; ^b modifikátor $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$; ^c modifikátor $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{askorbová kyselina}$

Druhou možnou atomizační technikou, pomocí které lze provést stanovení stopových koncentrací arsenu je generování těkavých hydridů a následná atomizace hydridů ve vyhřívaném křemenném atomizátoru. Z naší studie vyplynulo, že důležitými parametry ovlivňujícími citlivost stanovení je teplota, na kterou se vyhřívá křemenný atomizátor a dále volba vhodného předredukčního činidla, které zabezpečí účinnou redukci As^{5+} na As^{3+} .

Kritériem pro výběr vhodného redukčního činidla byly naměřené koncentrace v referenčním materiálu (RM).

Základními validačními parametry, studovanými v atomové spektrometrii poměrně často, byly i v naší práci preciznost a pravdivost. Preciznost byla vyhodnocena jak za podmínky opakovatelnosti, tak i za podmínky mezilehlé preciznosti. Pravdivost byla studována pomocí analýz referenčního materiálu a také testem výtěžnosti přídatku známého množství arsenu. Tím jsme prezentovali dva ze tří běžných způsobů hodnocení pravdivosti. Třetí způsob spočívající v analyzování vzorků jinou technikou byl pro nás v době prováděných experimentů nedostupný. Podstatnými validačními parametry jsou ty, které souvisí s kalibrací. Proto i v naší práci jsme věnovali pozornost vyhodnocení mezí detekce a stanovitelnosti a linearitě kalibračních závislostí. V názvu článku jsme použili slovo verifikace metody. Z hlediska terminologie uváděné v Mezinárodním metrologickém slovníku [19, 20] to nebylo zcela korektní, ale chtěli jsme tím naznačit, že některé validační parametry jako je robustnost a reprodukovatelnost jsme nezpracovávali a posouzení selektivity nebylo provedeno pomocí detailní interferenční studie ale pouze z výsledků stanovení arsenu v RM. Vhodnější by bylo použít validace v omezeném rozsahu.

Odhad standardní kombinované (u_c) a rozšířené nejistoty stanovení arsenu technikami ETA-AAS a HG-AAS byl proveden metodikou „shora dolů“ [21] s využitím všech výsledků analýz referenčního materiálu a modifikovaného postupu pro stanovení nejistoty měření v environmentálních laboratořích [4]. Standardní kombinovaná nejistota byla získána propagací dvou základních složek: nejistoty certifikované hodnoty koncentrace referenčního materiálu ($u(c_{RM})$) a nejistoty vychýlení ($u(odchylka)$) zjištěné z opakovaných měření tohoto referenčního materiálu. Obě složky nejistoty byly převedeny na směrodatné odchylky, zpropagovány a vynásobeny koeficientem pokrytí $k = 2$ pro výpočet rozšířené nejistoty:

$$u_c = \sqrt{s(RM)^2 + u(odchylka)^2} \quad (1)$$

$$u(odchylka) = \sqrt{odchylka^2 + \left(\frac{s(RM)}{\sqrt{n}}\right)^2 + u(c_{RM})^2} \quad (2)$$

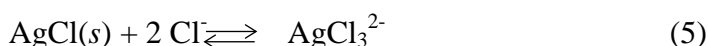
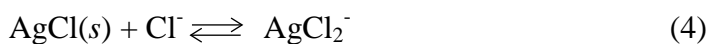
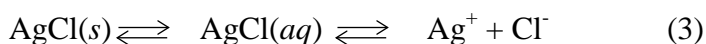
kde u_c je kombinovaná standardní nejistota, $s(RM)$ výběrový odhad směrodatné odchylky opakovaných měření RM, $u(c_{RM})$ standardní nejistota RM (z certifikátu), $odchylka$ je rozdíl

průměru opakovaných měření RM a certifikované hodnoty. Pro techniku ETA-AAS byla standardní kombinovaná nejistota 18,3 % a rozšířená nejistota 36,6 %. U techniky HG-AAS byla získána hodnota standardní kombinované nejistoty 12,6 % a hodnota rozšířené nejistoty byla 25,2 %. Pro studované koncentrační hladiny je možné hodnoty nejistoty považovat za přiměřené. V neposlední řadě byly analyzovány reálné vzorky různých ořechů a na data aplikovány statistické postupy, které nevybočovaly nad rámec těch již na předcházejících stranách popsaných.

S odstupem času vidím dvě slabiny této naší práce. Nezdůraznili jsme zabezpečení metrologické návaznosti výsledků díky vodnému kalibračnímu roztoku arsenu od firmy Analytika, s.r.o., který již v té době měl patřičný certifikát a proto ho bylo možné považovat za CRM. Druhou slabinou byla nedostatečná příprava na zakoupení matričního referenčního materiálu používaného pro validaci a stanovení nejistoty měření. Ten, který jsme vybrali, nakonec přispěl k celkové nejistotě měření větší měrou než složka nejistoty spojená s naší laboratorní prací.

Atomová spektrometrie se již desítky let používá ke stanovení stopových koncentrací kovů v rostlinných i živočišných tkáních. Ale i v této na první pohled snadné aplikační oblasti jsme se setkali se závažným problémem při stanovení stříbra ve zvířecích orgánech. Byli jsme postaveni před zdánlivě snadný úkol stanovení stříbra v orgánech myši, do jejichž břišní dutiny byly injekčně vpraveny nanočástice stříbra. První experimenty založené na sledování výtěžnosti po přidání známého množství nanočástic stříbra k živočišné tkáni poskytly nedostatečné hodnoty výtěžnosti při ICP-MS stanovení, pouze okolo 70 %. I přes detailní literární rešerši jsme nenalezli podrobnosti o přípravě vzorků, které by nám problém pomohly vyřešit. Popsané přípravy vzorků tkání pro stanovení na AAS zmiňují použití směsi kyseliny dusičné a kyseliny chloristé pro rozklad a přidavek hydroxidu amonného po rozkladu [22]. Tyto podmínky nevyhovovaly naší aplikaci. Jedna práce stručně zmiňuje zlepšení citlivosti po přidavku kyseliny chlorovodíkové bez dalších podrobností [23]. To nás přivedlo k detailní optimalizaci postupu pro rozklad a stanovení stříbra v živočišné tkáni pomocí ICP-MS [24]. Byla provedena podrobná studie výtěžností stříbra (v iontové formě i ve formě nanočástic) při dvou koncentračních úrovních a celkem 14 směsí kyseliny dusičné, peroxidu vodíku a kyseliny chlorovodíkové. Nalezené podmínky pro rozklad vzorků a stabilizaci stříbra v roztoku byly ověřeny pomocí analýzy tří matričních CRM s výtěžností 98,5 – 99,5 %

certifikované koncentrace Ag. Dalšími validovanými parametry byla mez detekce, linearita a preciznost, v této studii pouze za podmínek opakovatelnosti. Do práce jsme zahrnuli i výpočty základních srážecích rovnováh, které teoreticky podpořily závěry experimentů. Vzhledem k tomu, že obsah chloridů v tkáních je obvykle o několik řádů vyšší než obsah Ag, pozornost jsme věnovali rovnováhám (3-5):



Přítomnost chloridů jako srážecího činidla posouvá rovnováhu (3) doleva a tím snižuje koncentraci stříbrných iontů. Na druhou stranu AgCl může reagovat s nadbytkem chloridů za vzniku komplexů uvedených v rovnováhách (4) a (5). Každá z uvedených rovnováh může být popsána svou konstantou a ty nám umožňují vypočítat látkovou rozpustnost AgCl (6):

$$S = [\text{Ag}^+] + [\text{AgCl}(aq)] + [\text{AgCl}_2^-] + [\text{AgCl}_3^{2-}] = K_{\text{SP}} ([\text{Cl}^-]^{-1} + \beta_1 + \beta_2[\text{Cl}^-] + \beta_3[\text{Cl}^-]^2) \quad (6)$$

Byli jsme si vědomi, že reálné vzorky mineralizátů jsou komplexnější a v práci se stručně věnujeme i vlivu přítomnosti dalších aniontů. Jeden ze studovaných CRM, a to z ústřice (SRM 1566b, NIST), má certifikovanu i koncentraci chloru. To nám umožnilo provést další simulační experiment zaměřený na vliv chloridových iontů na výtěžnost stříbra. Podstatu provedeného experimentu simulující certifikované koncentrace Ag a Cl prezentuje tabulka 5.

Tabulka 5. Distribuce Ag v jednotlivých sloučeninách a výtěžnost ICP-MS stanovení

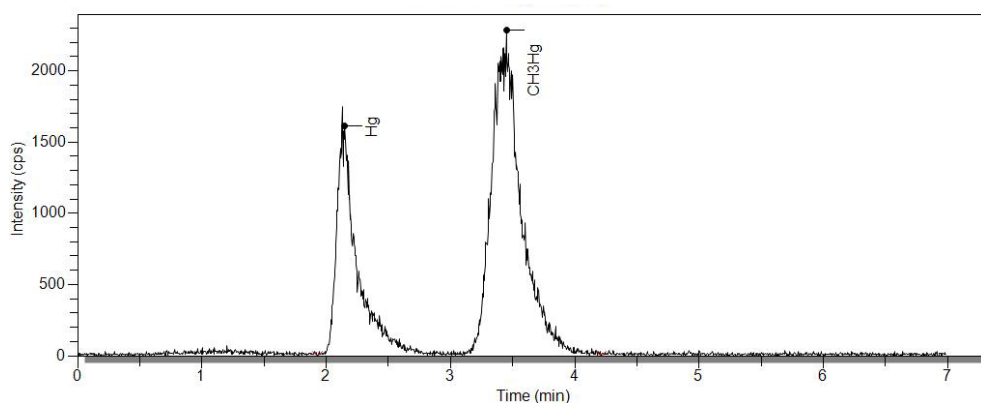
Vzorek	Složení vzorku (v 10 ml)	c_{Cl^-} (mol l ⁻¹)	Relativní zastoupení Ag (%)				Výtěžnost Ag (%)
			Ag ⁺	AgCl	AgCl ₂ ⁻	AgCl ₃ ²⁻	
1	Ag ⁺ (62 nmol l ⁻¹) + 3 ml HNO ₃	0	100	0	0	0	99,3
2	Ag ⁺ (62 nmol l ⁻¹) + 3 ml HNO ₃ + KCl (1,44 mmol l ⁻¹)	1,44×10 ⁻³	11,01	79,44	9,51	0,04	63,8
3	Ag ⁺ (62 nmol l ⁻¹) + 3 ml HNO ₃ + KCl (1,44 mmol l ⁻¹) + 3 ml HCl	3,39	2×10 ⁻⁶	0,03	8,90	91,07	98,5

I tento experiment potvrdil to, co jsme prokázali při studiu jednotlivých směsí rozkladných činidel. Pro živočišné tkáně je třeba před stanovením Ag pomocí technik atomové spektrometrie přidat vhodné množství chloridů do vzorku, což lze uskutečnit přídatkem HCl. Touto studií jsme připravili podmínky pro zvažované experimenty na laboratorních zvířatech.

3. Spojené techniky v atomové spektrometrii

Podstatné rozšíření možností technik atomové spektrometrie přinášejí spojené techniky. Pro účely speciální analýzy, kterou lze definovat jako *analytickou aktivitu vedoucí k identifikaci a/nebo stanovení jedné nebo více chemických specií ve vzorku* [25], je rozšířeno spojení spektrometrů se separačními technikami (zejména HPLC, ale i GC či CE). Pokud jde o metody atomové spektrometrie, nejrozšířenější pro oblast speciální analýzy je díky vynikajícím detekčním limitům ICP-MS. Pro některé prvky, zejména pro rtuť nachází širší uplatnění i metoda atomové fluorescenční spektrometrie a s patřičnou úpravou vzorku pak jednoúčelové analyzátoary rtuti na principu atomové absorpční spektrometrie (termooxidační stanovení či generování studených par).

V rámci několikaleté spolupráce se Státním veterinárním ústavem v Olomouci (SVÚ) jsme se podíleli na vývoji nové metody pro speciální analýzu rtuti v potravinách živočišného původu pomocí techniky HPLC-ICP-MS [26]. Tato metoda pak byla validována včetně porovnání s výsledky metody dvojité kapalinné extrakce a AAS stanovení a vyhodnocení nejistoty měření a následně zavedena do běžného provozu Národní referenční laboratoře pro chemické prvky (NRL), jež je součástí SVÚ. NRL se podílela na několika mezinárodních mezilaboratorních porovnáváních v této oblasti. Jedním z nich byla účast na studii IMEP-115: Determination of Methylmercury in Seafood. Při ní byl k dispozici SOP založený na dvojnásobné extrakci kapalina-kapalina methylrtuti (nejprve do toluenu a následně do roztoku cysteinu) a stanovení pomocí AAS a to na jednoúčelovém analyzátoru, kterým v SVÚ byl spektrometr AMA-254. Zavedení tohoto SOP do laboratoře bylo spojeno s validací, jejíž výsledky jsou také uvedeny v naší práci [26]. Pro potřeby laboratoře jsme dále vyvíjeli a optimalizovali techniku HPLC-ICP-MS, která je založena na enzymatické hydrolyze pomocí proteázy. Metoda vycházela za starší publikované práce [27]. Stanovení pak bylo provedeno pomocí kvadrupólového ICP-MS při $m/z = 202$ po separaci pomocí kapalinného chromatogramu na koloně Ascentic C8. Měřená data se zaznamenávala do chromatogramu (obr. 5), ve kterém jsou v případě pozitivních nálezů přítomny píky s retenčními časy v 2,1 min pro Hg^{2+} a ve 3,4 min pro CH_3Hg^+ .



Obr. 5. Typický chromatogram stanovení specií rtuti metodou HPLC-ICP-MS

Po ověření účinnosti extrakce a sledování vlivu některých parametrů, jako například použitý stříkačkový filtr pro čištění supernatantu po extrakci, bylo přistoupeno k validaci metody za použití 7 matričních CRM. Poněkud překvapivým zjištěním bylo, že k certifikaci koncentrace rtuti a methylrtuti nebyla ani u jednoho CRM použita technika HPLC-ICP-MS, což by díky informacím v certifikační zprávě usnadnilo vývoj metody. Validace byla provedena podle požadavků řízené dokumentace SVÚ a sestávala z vyhodnocení pravdivosti, preciznosti, meze detekce a stanovitelnosti, lineárního rozsahu kalibrační závislosti a stanovení nejistoty měření. Vyhodnocení většiny validačních parametrů poskytlo uspokojivé výsledky. Jako problematické se jevílo stanovení nejistoty měření (tabulka 6). Koncentrace methylrtuti v jednom ze studovaných CRM, a to SRM 1566b byla pod mezí stanovitelnosti.

Tabulka 6. Některé validační parametry pro stanovení CH_3Hg^+ pomocí HPLC-ICP-MS po enzymatické extrakci

CRM	stanovená koncentrace ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	pravdivost (%)	u_c bez korekce (%)	u_c po korekci (%)
DOLT-4	1020 ± 76	77	25,0	9,9
TORT-2	149 ± 14	98	9,8	9,7
SRM 2974a	75 ± 7	117	18,4	7,8
ERM CE464	4880 ± 190	96	6,3	4,9
BCR-463	2490 ± 143	88	13,2	5,6
DORM-3	383 ± 14	108	11,5	7,6

údaj za \pm je směrodatná odchylka (n = 6)

Protože získané hodnoty pravdivosti vykazují v některých případech významné vychýlení, které se v tomto případě nekoriguje, bylo přistoupeno k vyhodnocení nejistoty měření na základě jedné z navrhovaných metod pro tyto případy v literatuře [28]. Souhrnný článek [29], který se zabývá možnostmi výpočtu nejistoty měření v případech korigovaného a nekorigovaného vychýlení měření, kriticky srovnává několik přístupů a doporučuje postup, ve kterém se používají data získaná z opakovaných měření certifikovaných referenčních materiálů. Pro výpočet nejistoty měření byly použity rovnice 7 a 8,

$$u(b) = \sqrt{\frac{S_r^2}{p} + u^2(X_{ref})} \quad (7)$$

$$u_c = \sqrt{u(b)^2 + u(IMP)^2} \quad (8)$$

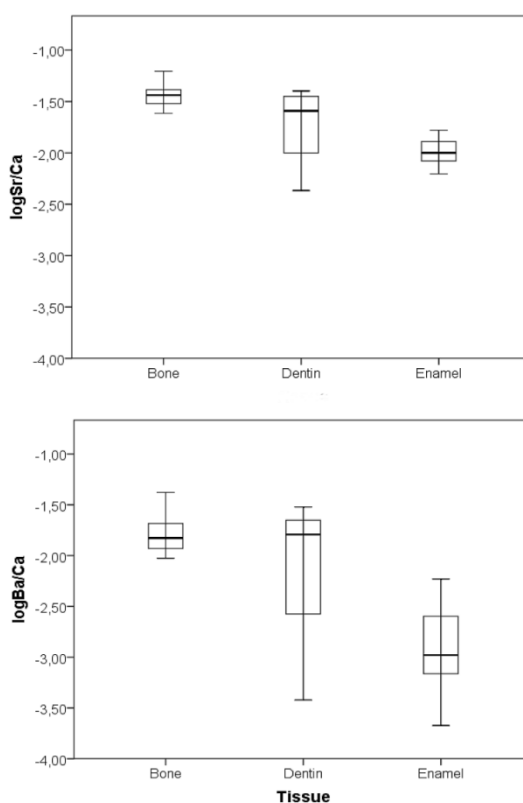
kde p představuje počet měření, S_r směrodatnou odchylku z opakovaných měření vzorku, u_b nejistotu vychýlení, u_c kombinovanou standardní nejistotu, $u(X_{ref})$ standardní nejistotu certifikované hodnoty v CRM a $u(IMP)$ podmínky mezilehlé preciznosti. Hodnoty nejistoty měření (u_c) bez provedené korekce a po ní jsou uvedeny v tabulce 6.

Výsledky prezentované v naší práci zdůrazňují potřebu zavedení programů zabezpečení kvality výsledků u environmentálních studií. Přestože jsme v literatuře našli celou řadu prací věnujících se speciální analýze rtuti či stanovení methylrtuti za použití řady instrumentálních technik, u většiny z nich nebyly dostupné dostatečné údaje o stabilitě a výkonnosti popisovaných postupů. Některé práce sice prezentují zajímavé meze detekce či snadnou úpravu vzorku, pro rutinní praxi však nejsou vhodné. V současnosti nejsou dostupné standardizované metody pro separaci a stanovení jednotlivých specií rtuti. Nám se podařilo popsat a pomocí opakovaných analýz řady CRM validovat dva postupy. Oba postupy, první s využitím techniky AAS a druhý s využitím HPLC-ICP-MS, poskytují uspokojivé výkonnostní charakteristiky a výsledná volba bude záviset na přístrojovém vybavení laboratoře. Nicméně postup s využitím enzymatické extrakce a HPLC-ICP-MS stanovení poskytuje lepší mez detekce a umožňuje stanovení i anorganické formy rtuti a to bez nutnosti komplikované přípravy vzorku.

V případech, kdy požadovaným výstupem stanovení není koncentrace v celém vzorku, ale její prostorové rozložení, přináší výhody spojení s technikami přímé analýzy pevných vzorků jako je laserová ablace (LA). Technika laserové ablace byla vyvinuta v 60. letech 20. století. V jejich počátcích byl laser využíván nejen ke vzorkování, ale také jako excitační a ionizační zdroj. Dnes už se takto nevyužívá a velice často bývá spojována s většinou v současnosti používaných technik atomové spektrometrie (AAS, ICP-OES, MIP-OES, ...). Jelikož je při použití laseru vzorkováno jen nepatrné množství materiálu, je třeba pracovat s vysoce citlivými detekčními systémy. Ideální se proto jeví spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP-MS). Největšího praktického uplatnění dosáhlo toto spojení v geologii. Aplikace v dalších oborech naráží na problémy s kvantitativní analýzou z důvodu nedostupnosti kalibračních standardů. Lze však využít toho, že ICP-MS umožňuje sledování jednotlivých izotopů a to pro vyhodnocování izotopických poměrů. To je jedna z rozšířených aplikací v archeologii. Z obsahu izotopů uložených v zubech a kostech lidí a zvířat lze zjistit informace týkající se trofické úrovně jedince, čili složení jejich potravy (býložravci mají odlišné hodnoty izotopů oproti masožravcům), dále se sleduje migrace lidí a zvířat pomocí srovnání izotopů prvků v kostech a zubech člověka a místa, kde se daný jedinec nacházel v průběhu jeho života. Každá oblast má svůj vlastní geochemický profil odpovídající obsahu stabilních izotopů různých prvků nacházejících se v horninách. Tyto prvky se dostávají do vody a půdy zvětráváním hornin, dále ve stejném poměru izotopů, který je charakteristický pro jednotlivé oblasti, pronikají do rostlinné a živočišné potravy, tzn., že se stabilní izotopy dostávají do organismu prostřednictvím výživy a postupně jsou ukládány do kostí a zubů. Z archeologického hlediska patří mezi nejzajímavější izotopy $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, jež se dostávají do těl rostlin a živočichů z atmosféry, vody a hornin. Zuby se vytvářejí v prvních letech života jedince, tudíž obsah izotopů jednotlivých prvků je po celý život v zubních tkáních stabilní a izotopový profil zubu odpovídá prvním rokům života jedince. Kostí se v průběhu života přeměňují a izotopový profil kosti odpovídá hodnotám v posledních letech života jedince. V případě rozdílného izotopového složení míst, kde daný jedinec žil na počátku života a kde zemřel, lze určit jeho migraci [30]. Jak už bylo zmíněno v kapitole 2, tyto analýzy je nezbytné provádět s dostatečnou precizností, což ve většině případů vyžaduje nákladný ICP-MS spektrometr s multikanálovým detektorem.

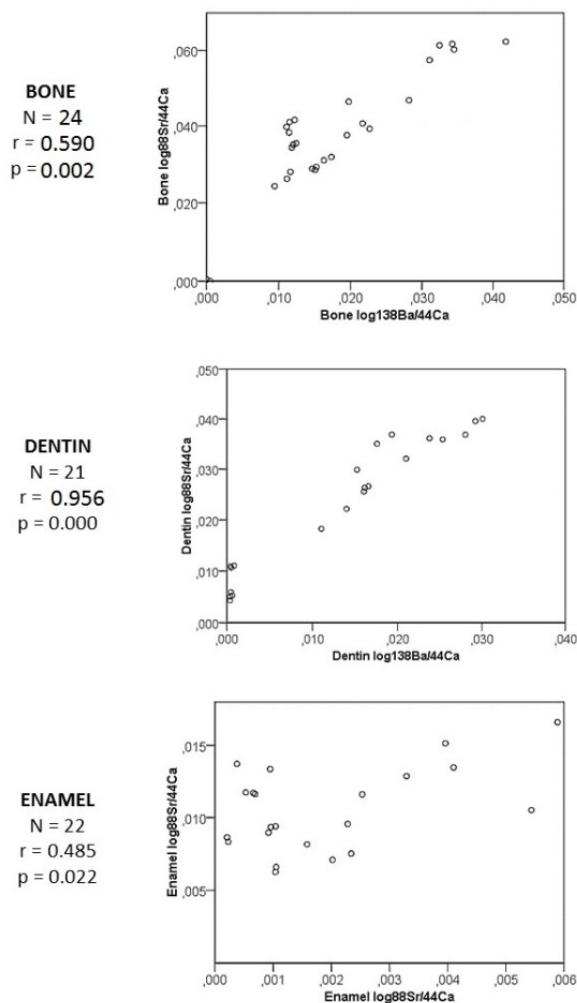
Aplikace statistických postupů umožnila rekonstrukci stravovacích návyků ze statistického vyhodnocení výsledků izotopických poměrů $^{138}\text{Ba}/^{44}\text{Ca}$ a $^{88}\text{Sr}/^{44}\text{Ca}$ v kosterních ostatcích [31]. Přestože naše pracoviště není vybaveno spektrometrem s multikanálovým detektorem,

s použitím ICP-MS spektrometru s analyzátozem doby letu a ortogonální akcelerací jsme analyzovali výše uvedené izotopické poměry v zubech a kostech se záměrem zjistit možné rozdíly mezi sklovinou, dentinem a kostí. Druhým cílem studie bylo využít tyto informace pro rekonstrukci stravovacích návyků. Vzorky kostí a zubů pocházely z archeologického naleziště Chrástany, které bylo datováno do rané doby bronzové. Příprava vzorků a experimentální podmínky jak pro laserovou ablací tak pro ICP-MS jsou uvedeny v naší práci [31]. Ze statistických postupů byly použity neparametrické (pořadové) testy, Kruskal-Wallisův test včetně párového porovnání, korelační analýza za využití Spaermanova korelačního koeficientu a dále faktorová analýza. Krabicové grafy na obrázku 6 potvrzují rozdíly mezi izotopickými poměry ve studovaných tkáních.



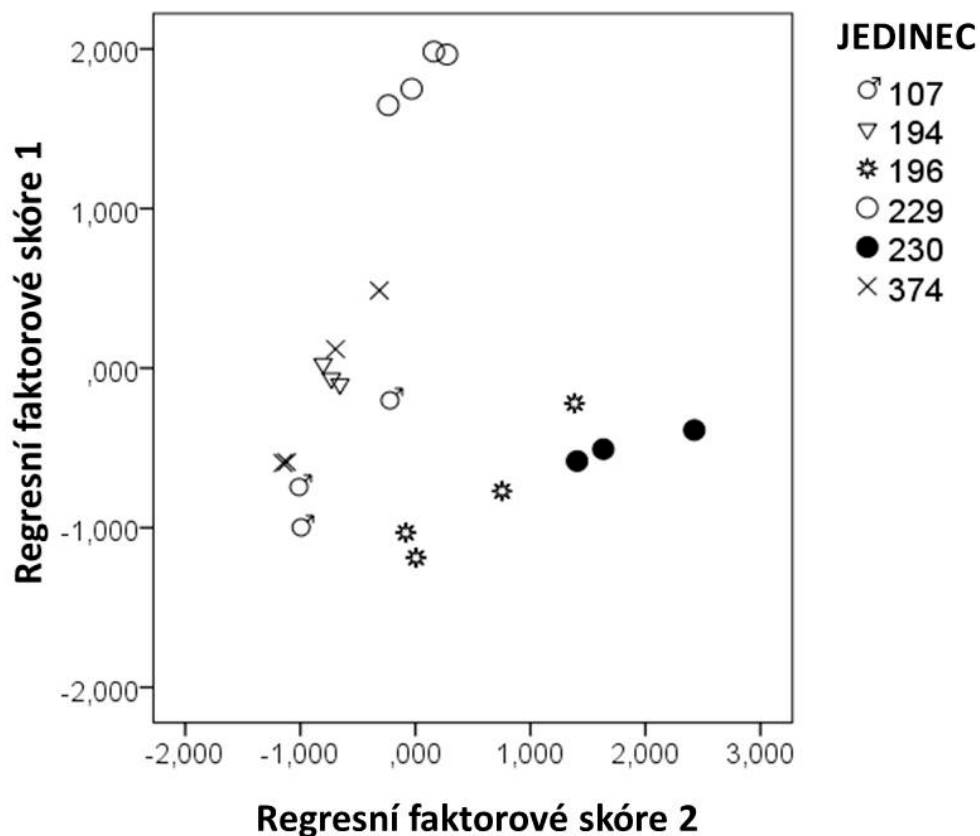
Obr. 6. Krabicové grafy izotopických poměrů $^{138}\text{Ba}/^{44}\text{Ca}$ a $^{88}\text{Sr}/^{44}\text{Ca}$

Stejně tak korelační analýza (obr. 7) potvrzuje statisticky významné korelace v jednotlivých tkáních související s jejich biogenními vztahy a zřejmě nebyly ovlivněny diagenézí.



Obr 7. Výsledky korelační analýzy

Interpretace výsledků je sice zatížena poměrně malým rozsahem výběru, přesto jsou prokazatelné rozdíly mezi sklovinou a kostí. Nalezené hodnoty izotopických poměrů vedou k závěru, že ve stravě sledovaných jedinců převažovalo maso. Sklovina se odlišuje od kosti a dentinu a vykazuje nízké hodnoty korelačních koeficientů. V této studii nalezené izotopické poměry neodrážejí stravování v dětství ani geografický původ, a to právě kvůli rozdílům mezi dentinem a sklovinou. Důvodem těchto rozdílů může být nehomogenní signál z LA-ICP-MS měření. Dále je třeba vzít v úvahu, že právě sklovina je náchylnější k vlivům okolí. Porovnání izotopických poměrů mezi vzorky lidských ostatků a zvířecího zubu pomocí faktorové analýzy (obr. 8) naznačují, že populace s výjimkou jednoho jedince žila společně na jednom místě 7-10 let. Výjimku tvoří jedinec s označením 229, což byla kostra mladé ženy. Ta se ke skupině ostatních zřejmě připojila krátce před svou smrtí.



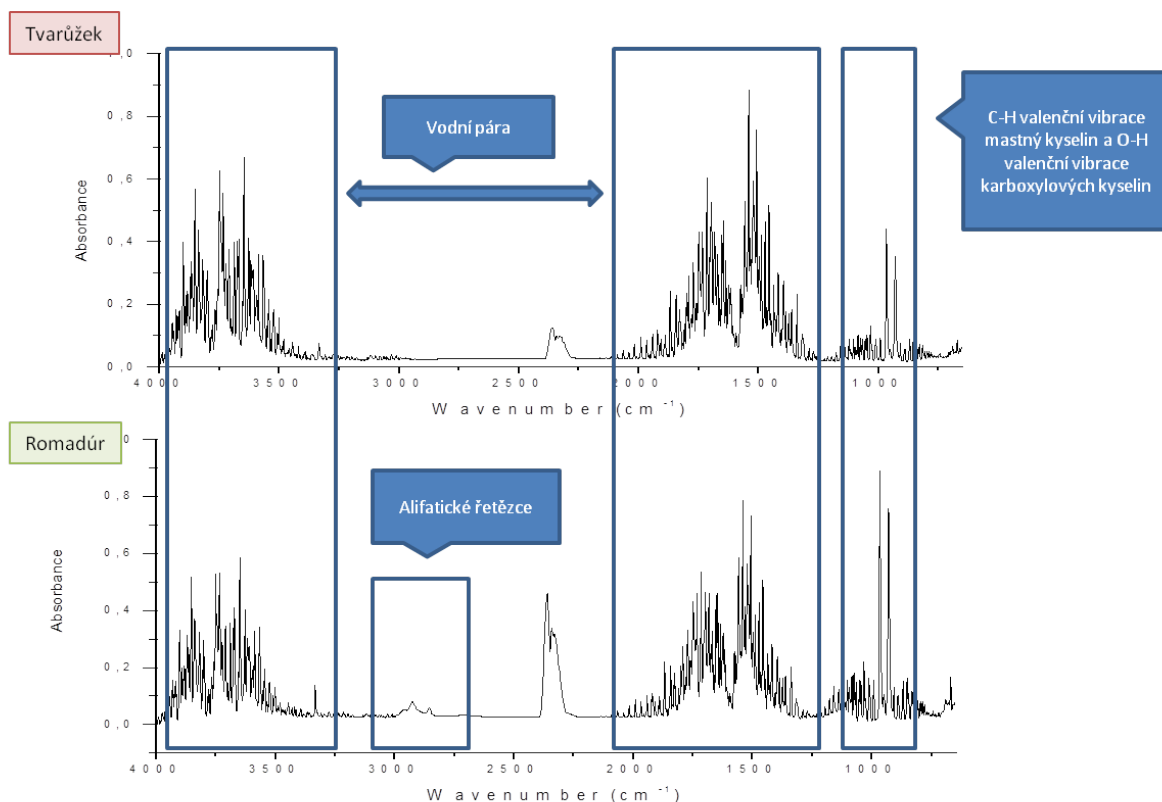
Obr. 8. Rozptylový diagram FA znázorňující shluky podle poměrů $^{88}\text{Sr}/^{44}\text{Ca}$ and $^{138}\text{Ba}/^{44}\text{Ca}$

V této studii nezastíráme možné problémy při interpretaci, které mohou být způsobeny jak nehomogenitami ve vzorcích, tak i nedostatečnou precizností našeho ICP-MS spektrometru pro izotopické poměry. Proto podrobně diskutujeme validitu stravovacích migračních studií založenou na koncentracích barya a stroncia. Jedná se o první výsledky práce na LA-ICP-MS z našeho pracoviště. Dopracovat se a interpretovat výsledky z těchto spojených technik se ukázalo náročnější, než jsme v počátcích předpokládali.

4. Sledování kvality potravin pomocí infračervené spektrometrie

Infračervená spektrometrie se v potravinářském průmyslu a při sledování kvality potravin používá již dlouho. Nástup spektrometrů s Fourierovou transformací (FTIR) na přelomu 60. a 70. letech minulého století výrazně zrychlil analýzu a po zavedení stolních počítačů o desetiletí později se stalo silným pomocníkem pro chemometrické zpracování naměřených spekter. V potravinářském průmyslu se FTIR s řadou způsobů příprav vzorků a samotných technik měření (absorpční, odrazné, ...) užívá zejména ke stanovení a identifikaci hlavních a vedlejších složek potravin, k detekci pančování a kontaminace potravin a dále k charakterizaci, prokázání pravosti nebo klasifikaci potravin. Techniky vícerozměrné kalibrace, které jsou nejen pro infračervená spektra nutností, se používají ke kvantitativní analýze složitých směsí a diskriminační analýza pak ke klasifikaci vzorků.

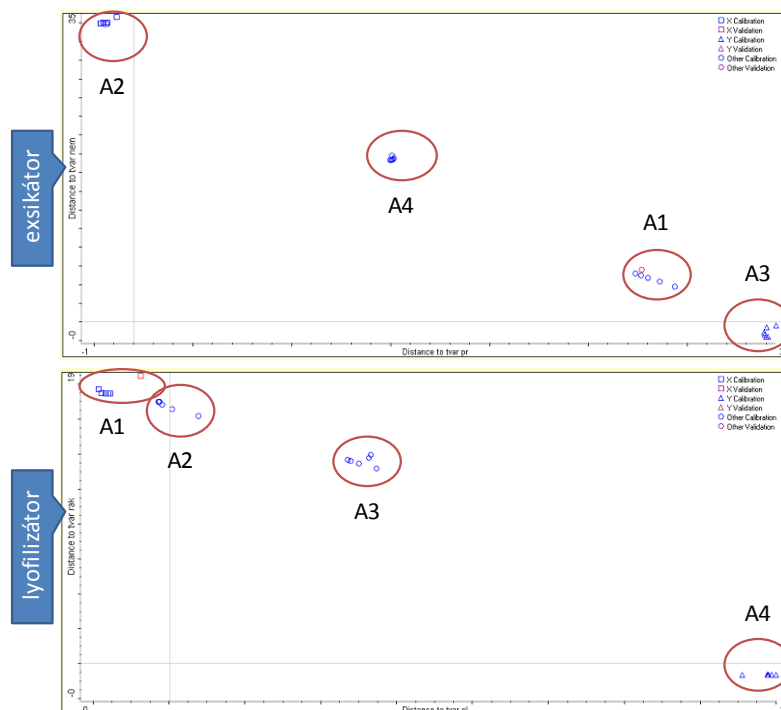
Mezi témata objevující se často v potravinářském sektoru patří originalnost produktu a ověřování pravosti. V Evropské unii je několik sýrů, které jsou chráněny Evropskou komisí, která dohlíží na produkty uznávané kvality a původu pod chráněným označením původu, chráněným zeměpisným označením a označením zaručená tradiční specialita. Mimo jiné i infračervená spektrometrie je využívána ke studiu této problematiky, tj. ke kontrole pravosti a určení geografického původu různých druhů zrajících sýrů. V literatuře je popsáno použití infračervené spektrometrie k rozlišení 166 vzorků sýrů Ementál vyráběného během roku v Německu, Rakousku, Finsku, Francii a Švýcarsku [32]. Další práce uvádí, že IR spektrometrie ve střední oblasti podává relevantní informace o zeměpisném původu jak experimentálního francouzského tvrdého sýru Jura, tak švýcarských sýrů Gruyère a l'Étivaz [33]. V roce 2010 získaly tvarůžky v rámci EU chráněné zeměpisné označení a to nás přivedlo k myšlence vyvinout metodu umožňující relativně snadné hodnocení pravosti těchto zrajících sýrů. Oproti publikovaným pracím jsme se zaměřili na studium infračervených spekter plynné fáze. Podařilo se nám vytvořit metodu založenou na měření absorpčních spekter plynné fáze ve střední infračervené oblasti jednotlivých druhů zrajících sýrů [34]. Klíčovým problémem byla příprava vzorků a to zejména z důvodu (pro naši strategii měření) vysokého obsahu vody. Pásky příslušející OH skupinám ve spektru znemožňovaly další zpracování a vzdušná vlhkost poškozovala okénka z KBr. Proto jsme použili okénka ze ZnSe a v práci popisujeme dva možné způsoby sušení vzorků, které se liší časovou náročností. Příklad infračervených spekter zrajících sýrů je na obrázku 9.



Obr 9. FTIR spektra Olomouckého tvarůžku a Romadúru, měřená po 90 minutovém zahřívání při 120 °C v rozsahu 4000 – 600 cm^{-1}

Vyhodnocení infračervených spekter se záměrem rozlišení jednotlivých sýrů bylo úspěšně provedeno pomocí diskriminační analýzy (DA). Jedná se o vícerozměrnou statistickou techniku, která hodnotí rozdíly mezi dvěma nebo více skupinami objektů charakterizovaných pomocí několika znaků. Určuje třídy objektů, které jsou nejpodobnější neznámému materiálu. Klasifikace pomocí DA vyžaduje v prvním kroku sestavení kalibračního modelu, ve kterém je specifikováno více tříd, které jsou popsány libovolným počtem standardů. Klasifikace následně pomocí vytvořeného kalibračního modelu interpretuje vibrační spektrum jako bod v dimensionálně redukováném faktorovém prostoru. Výsledkem této metody je jméno třídy (nebo tříd), které jsou nejpodobnější posuzovanému vzorku. Námí používaný software poskytuje jako výstup graf vyjadřující závislost Mahalanobisovy vzdálenosti mezi jednotlivými třídami. Mahalanobisova vzdálenost je vzdálenost hodnoceného spektra od těžiště každé třídy. V naší studii jsme pomocí DA klasifikovali dvě skupiny zrajících sýrů, a to typu Tvarůžek a typu Romadúr, v infračervené oblasti 4000 – 700 cm^{-1} . Obě skupiny

zrajících sýrů byly reprezentovány čtyřmi druhy sýrů. Výsledky pro Olomoucké ukazuje obrázek 10.



Obr. 10. Klasifikace zrajících sýrů typu Tvarůžek podle DA (A1 – Olomoucký tvarůžek; A2 – Jemné tvarůžky Loose; A3 – Jemné tvarůžky z maloobchodní sítě v ČR, jiný výrobce než A2; A4 – tvarůžky zakoupené a vyrobené v Rakousku, Quargel natur)

Z obrázku 10 je patrné, že jednotlivé vzorky zrajících sýrů tvoří oddělené shluky, které mají různé meziklastrové Mahalanobisovy vzdálenosti. Významné rozdíly ve vzdálenostech byly nalezeny v případě sušení v exsikátoru pro třídy Olomoucké tvarůžky (A1) – jemné tvarůžky Loose (A2) a Jemné tvarůžky (A3) – jemné tvarůžky Loose (A2). Zde bylo použito šest hlavních komponent, na ose x je vynesena Mahalanobisova vzdálenost od Olomouckého tvarůžku, zatímco na ose y je Mahalanobisova vzdálenost od Jemného tvarůžku. Podobné výsledky DA byly získány pro klasifikaci zrajících sýrů typu Tvarůžek, které byly vysušeny v lyofilizátoru. Ke klasifikaci takto upravených sýrů bylo použito 9 hlavních komponent (osa x: vzdálenost od Olomouckých tvarůžků, osa y: vzdálenost od tvarůžků z Rakouska). Rozdíly ve vzdálenostech byly významné pro tyto třídy: Olomoucké tvarůžky (A1) – tvarůžky z Rakouska (A4) a Jemné tvarůžky Loose (A2) – tvarůžky z Rakouska (A4). Výsledky vyhodnocení sýrů typu „Romadúr“ a tabulky Mahalanobisových vzdáleností jsou uvedeny

v naší práci [34]. Pomocí diskriminační analýzy byly zjištěny významné rozdíly mezi různými druhy zrajících sýrů typu „Tvarůžek“, resp. mezi originálními Olomouckými tvarůžkami a jejich různými „napodobeninami“. Tyto rozdíly mohou být dány jak různým složením a výrobou sýrů, které určují jejich kvalitu, tak změnami výrobku během doby použitelnosti a předúpravy vzorku. Na základě výsledků DA, můžeme konstatovat, že oba způsoby přípravy vzorků před měřením (časově náročné sušení v exsikátoru a využití lyofilizátoru) byly vhodné pro klasifikaci vzorků zrajících sýrů. Hodnoty Mahalanobisových vzdáleností u vzorků vysušených v exsikátoru byly větší než u vzorků vysušených lyofilizací. Důvodem rozdílných hodnot Mahalanobisových vzdáleností mohly být pravděpodobně chemické změny a dodatečné zrání sýrů. Námi navržený protokol přípravy vzorků, jejich měření pomocí FT-IR spektrometru a interpretace za použití softwaru, který je standardně dodáván se spektrometrem lze potenciálně využít jak při výrobě tak při kontrole autenticity.

Velký rozvoj instrumentálních metod používaných v analytické chemii se hojně využívá při kontrole výrobních procesů převážně většiny potravin. Komerčně zajímavou oblastí je výroba vína a to jak pro výrobce, tak i pro zákazníky. Vína jsou obecně zdrojem mnoha fenolických látek, které mají silný vliv na jejich výslednou kvalitu. I když tvoří méně než 5 % složek nacházejících se ve víně, jsou důležité, neboť se výrazně podílejí na celkových organoleptických vlastnostech daného vína, jako jsou barva, chuť či stahující vlastnosti. Obsah těchto sloučenin je ovlivněn jak samotným surovým materiálem, tj. hrozny, tak technologií výroby vína, která je charakteristická pro různé druhy vín a vinařství. Proto jsme použili infračervenou spektrometrii pro vývoj rychlé metody studia fenolického profilu a antioxidační aktivity červeného, růžového a bílého moravského vína, které bylo odebíráno v různých technologických fázích výroby [35]. Tato metoda byla založena na měření vzorků vín pomocí rychlé odrazové techniky ATR, tedy bez potřeby předúpravy vzorků. Kvantitativní vyhodnocení predikce celkového obsahu fenolických látek a celkové antioxidační aktivity bylo provedeno pomocí chemometrické metody částečných nejmenších čtverců (PLS), využívající k vytvoření kalibračního modelu infračervených spekter a referenčních hodnot celkového obsahu fenolů (TPC) a celkové antioxidační aktivity (TAA). Obsah TPC a TAA byl analyzován pomocí příslušných spektrometrických „referenčních“ metod [36]. Dále byl studován také vliv jednotlivých technologických postupů na obsah TPC a TAA u všech druhů vín. Kvalitativní vyhodnocení infračervených spekter bylo provedeno pomocí diskriminační analýzy, která byla využita k rozdělení vín podle základních výrobních

operací. U jednotlivých vzorků vín byl sledován obsah celkových fenolických látek a antioxidační aktivita, jejichž stanovení bylo provedeno pomocí vícerozměrné kalibrační metody PLS. V první řadě byly vytvořeny PLS modely na základě příslušných infračervených spekter a referenčních hodnot antioxidační aktivity, které byly získány nezávislým spektrofotometrickým měřením. Následně byly vytvořené modely použity k predikci celkové antioxidační aktivity. Dále byla provedena charakterizace vzorků vín podle výrobního procesu pomocí diskriminační analýzy spekter ze střední infračervené oblasti.

Hlavním krokem predikce a stanovení celkových fenolických látek a celkové antioxidační aktivity vín je vytvoření vhodného kalibračního modelu. Pro každý druh vína byly vytvořeny celkem 3 kalibrační modely a to na základě získaných spektrálních dat (neupravená spektra, 1. a 2. derivace spekter) a referenčních hodnot TPC a TAA získaných pomocí UV/Vis spektrometrie. Vyhodnocení kalibračního modelu bylo provedeno na základě chyby kalibrace a validace, chyby predikce a korelačních koeficientů. Jedním z důležitých kroků při vytváření kalibračního modelu je výběr spektrálního regionu. Jejich volba je shrnuta v tabulce 7. Výběr spektrálních regionů byl náročnou částí naší práce a byl proveden na základě literatury [37, 38] a výsledných parametrů PLS modelů.

Tabulka 7. Vybrané spektrální regiony PLS modelů všech druhů vín

Druh vína	Infračervená oblast (cm^{-1})	
	TPC	TAA
červené víno	3000 – 2960, 1457 – 966	2973 – 2434, 2280 – 1717, 1445 – 966
růžové víno	1457 – 966	3730 – 1034, 1032 – 627, 626 – 614
bílé víno	3000 – 2960, 1543 – 966	2971 – 2435, 2280 – 1717, 1543 – 966

Na základě výsledků metody PLS bylo zjištěno, že všech devět modelů poskytuje dobrou kalibraci ($r_{\text{cal}} > 0,9$), ale pouze modely z neupravených spekter poskytly nejlepší výsledky pro predikce hodnot TPC. Výjimku tvořilo pouze bílé víno, u kterého bylo dosaženo lepšího výsledku predikce pro model využívající 1. derivaci spektra. Tento poznatek by mohl souviset s různým obsahem fenolických sloučenin ve vínech. V případě TAA bylo získáno sedm kalibračních modelů poskytujících dobrou kalibraci. Nejlepší výsledky pro predikci TAA poskytly opět PLS modely, k jejichž vytvoření byla použita surová infračervená spektra. Při

porovnání PLS modelů jednotlivých druhů vín na základě korelačních koeficientů kalibrace a validace, mělo lepší statistické parametry růžové víno než červené a bílé.

Metoda PLS byla použita pro vyhodnocení celkového obsahu fenolických látek vzorků vín odebíraných v různých technologických fázích výroby na základě jejich infračervených spekter. Významně vyšší obsah celkových fenolických látek má červené víno v porovnání s růžovým a bílým vínem. Tyto výsledky potvrzují obecný fakt, že červená vína obsahují vyšší obsah TPC v rozsahu od 800 do 4000 mg.l⁻¹ a bílá vína menší obsah v rozsahu od 200 do 500 mg.l⁻¹. Obdobně (na základě IR spekter a PLS metody) bylo provedeno vyhodnocení antioxidační aktivity stejných vzorků. Z výsledků je patrné že, červené víno má zřetelně vyšší hodnoty TAA než růžové a bílé víno. V některých případech (fázích výroby) má červené víno až 5x vyšší hodnoty TAA, v porovnání s ostatními druhy vín. Stejně jako u fenolických látek, byl i zde studován vliv jednotlivých technologických fází výroby na obsah TAA. Detaily jsou uvedeny v naší studii [35] a diplomové práci [36]. Na základě výsledků hodnot TAA, získaných pomocí metody PLS, byly zjištěny významné rozdíly jak mezi jednotlivými druhy vín, tak technologickými fázemi jejich výroby. Dále byl pozorován stejný trend změn hodnot TAA a TPC v průběhu celého výrobního procesu. Z tohoto důvodu byla též provedena korelační analýza hodnot TAA a TPC. Její výsledky potvrzují statisticky významnou korelaci mezi TAA a TPC v průběhu výroby: silná korelace u červeného vína ($r = 0,7911$) a slabší u růžového vína ($r = 0,2564$) a bílého vína ($r = 0,3983$). Výsledky korelační analýzy potvrzují již dříve popsany závěr, že antioxidační aktivita vín je ovlivněna obsahem fenolických látek.

Poslední částí této studie byla aplikace DA pro klasifikaci jednotlivých druhů vín (červené, růžové, bílé) v různých technologických fázích jejich výroby. Ke klasifikaci byly vybrány různé infračervené oblasti spektra, které jsou detailně popsány v naší práci [39]. Bylo zejména potřeba eliminovat vliv vody, která ve střední infračervené oblasti absorbuje záření a ve víně je jí největší podíl. Diskriminační analýza opět na základě Mahalanabisovy vzdálenosti poskytla předpokládané výsledky – více než uspokojivé rozdělení vzorků vín do jednotlivých skupin. Výroba vína obecně zahrnuje několik technologických fází, mezi které patří sklizeň hroznů, drcení hroznů, lisování, fermentace, zrání, školení vína a lahvování. Každý z těchto výrobních kroků je charakteristický pro každý druh vína (červené, růžové, bílé víno), odrůdu a vinařství. V této práci byly použity vzorky vín, které byly sbírány během jejich výroby a byly rozděleny do 3 skupin podle základních technologických operací (macerace, fermentace a hotové víno). První skupina zahrnuje proces lisování a macerace slupek (třída 1), druhá skupina fázi fermentace (třída 2) a třetí skupina zahrnuje školení vína a lahvování (třída

3). Na základně výsledků DA, můžeme konstatovat, že jednotlivé technologické operace mohou být rozlišeny i na základně infračervených spekter vín. Jednou z nejdůležitějších operací při výrobě vína je fermentace, během které se vytváří alkohol a mošt vinné révy se pomalu mění na víno. Při porovnání Mahalanobisových vzdáleností procesu fermentace (třída 2 – třída 3) a macerace (třída 1 – třída 2), větší hodnoty vzdáleností byly pozorovány pro fermentační proces (tabulka 8). Během tohoto procesu se složení vína mění více než při procesu macerace. Při porovnání jednotlivých druhů vín v procesu fermentace, významný rozdíl ve vzdálenosti mělo růžové víno než červené a bílé víno. Pravděpodobně je to dáno rozdílnými výrobními postupy. Významné rozdíly ve vzdálenostech byly nalezeny mezi třídou 1 a třídou 3, tj. mezi fází macerace a hotovým vínem. Významné hodnoty vzdáleností byly pozorovány u červeného a bílého vína. Tyto rozdíly, mající také největší hodnoty Mahalanobisových vzdáleností, indikují změny složení vín během jejich výrobního procesu. Naproti tomu, růžové víno vykazovalo opačný trend.

Tabulka 8. Mahalanobisovy vzdálenosti mezi třídami červeného, růžového a bílého vína

třídy	červené víno	růžové víno	bílé víno
třída 1 – třída 2	3,20	5,51	3,92
třída 2 – třída 3	3,87	8,85	4,06
třída 1 – třída 3	4,75	4,84	7,70

Naše studie se snažila rozvinout myšlenky publikované v práci z roku 2010 [37] a posunout ji dále směrem ke komplexnějším matricím. Nesoustředily jsme se pouze na víno jako hotový produkt, ale museli jsme čelit problémům stanovení TAA a TPC u jednotlivých meziproduktů. Otázkou, které jsme se snažili věnovat pozornost, byla opět kvalita výsledků. Při pracích uvedených v této kapitole nebylo snadné aplikovat běžné postupy zabezpečení kvality výsledků jako je třeba analýza CRM. Tam, kde to bylo možné, jsme prováděli stanovení dvěma metodami (zejména u TAA). Případně jsme prováděli alespoň větší počet opakovaných měření, což se vzhledem k rychlému měření dalo využít u FTIR spektrometrie.

5. Závěr

Ne až tak známou skutečností je, že za zakladatele spektroskopie můžeme směle považovat Jana Marka Marci z Kronlandu, který již v roce 1648 publikoval spis s názvem „Thaumantias – O duze nebeské a o povaze, původu a příčinách jejích zjevných barev“ [40]. V něm věnuje pozornost problémům optiky, mimo jiné odrazu a lomu světla, disperzi světla a vzniku duhy. Z jeho pozorování lomu světla na skleněném hranolu, ohybu světla za přepážkou nebo vlastností duhového zbarvení tenkých vrstev lze usoudit, že vlastně objevil disperzi světla o několik let dříve než Isaac Newton. Letos si připomínáme 420 let od jeho narození. Česká odborná společnost sdružující pracovníky všech spektrálních technik nese jeho jméno – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci. Snad nebudou čtenáři této práce považovat za příliš opovážlivé tvrzení, že svou badatelskou prací se označím za jednoho z mnoha následovníků tohoto průkopníka ze 17. století. Čím více se ponořuji do tajů jednotlivých spektrálních metod, tím častěji se mi vybavuje výrok připisovaný Sokratovi – *vím, že (skoro) nic nevím*. V mnoha případech však z na první pohled nepřehledných výsledků odhalilo použití vhodných statistických postupů zajímavé závěry a souvislosti. Mnohokrát se mi potvrdila slova prof. Eckschlagera, zakladatele moderní chemometrie v Československu: „Požadovanou informaci lze získat jen na experimentálním základě, a to procesem, který probíhá ve dvou po sobě následujících fázích: 1. provedení vlastní analýzy, 2. vyhodnocení výsledků, tj. „dekódování“ informace v nich obsažené. Způsob vyhodnocení výsledků se řídí podle toho, jak byla informace získána. ...“ [41]. Nám se v řadě našich studií, a domnívám se, že úspěšně, podařilo aplikovat jednorozměrné a vícerozměrné statistické postupy a moderní statistické techniky zabezpečení kvality výsledků právě k dekódování informací z celé řady analýz.

6. Seznam zkratek

AAS – atomová absorpční spektrometrie

ATR – technika zesíleného úplného odrazu

CE – kapilární elektroforéza

CRM – certifikovaný referenční materiál

DA – diskriminační analýza

ETA – elektrotermická atomizace

FTIR – infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

GC – plynová chromatografie

HG – generování hydridů

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ICP-OES – optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

ICP-MS – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

LA – laserová ablace

LOD – mez detekce

MIP-OES – optická emisní spektrometrie s mikrovlnně indukovaným plazmatem

NRL – národní referenční laboratoř

PCA – analýza hlavních komponent

RM – referenční materiál

PLS – metoda částečných nejmenších čtverců

SOP – standardní pracovní postup

SVÚ – Státní veterinární ústav

u – standardní nejistota

u_c – kombinovaná standardní nejistota

TAA – celková antioxidační aktivita

TPC – celkový obsah fenolů

7. Seznam použité literatury

1. Jarošová M., Milde D., Kuba M.: Comparison of ICP-MS and AAS – Elemental analysis of coffee. *Czech J. Food Sci.* **32**, 354-359 (2014).
2. Oleszczuk N., Castro J. T., da Silva M. M., Korn M. D. A., Welz B., Vale M. G. R.: Method development for the determination of manganese, cobalt and copper in green coffee comparing direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* **73**, 862-869 (2007).
3. dos Santos E. J., de Oliveira D.: Determination of mineral nutrients and toxic elements in Brazilian soluble coffee by ICP-AES. *J Food Comp. Anal.* **14**, 523-531 (2001).
4. Magnusson B., Näykki T., Hovind H., Krysell M.: Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. Nordtest Report TR 537, Espo (2004).
5. Ellison S. L. R., Williams A. (editoři): Eurachem/CITAC Guide CG4: Eurachem/CITAC, Quantifying uncertainty in analytical measurement. 3rd edition, Eurachem, 2012.
6. Černá M., Krsková A., Čejchanová M., Spěváčková V.: Human biomonitoring in the Czech Republic: An overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **215**, 109-119 (2012).
7. Krsková A., Spěváčková V., Čejchanová M., Šmíd J., Wranová K., Černá M.: Hladiny olova, kadmia a rtuti v krvi českých školních dětí sledovaných v rámci 6. RP EU (projekt PHIME) - srovnání s výsledky biomonitoringu v Systému monitorování zdravotního stavu obyvatelstva. *Hygiena* **55**, 92-95 (2010).
8. Milde D., Altmannová K., Vysloužil K., Stučka V.: Trace element levels in serum and colon tissue in colorectal cancer. *Chem. Papers* **59**, 157-160 (2005).
9. Hornik P., Milde D., Trenz Z., Vysloužil K., Stučka V.: Some trace element levels in colon tissue in patients with colorectal cancer. *Chem. Papers* **60**, 297-301 (2006).
10. Oberley T. D., Oberley L. W.: Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol. Histopathol.* **32**, 525-535 (1997).
11. Meloun M., Militký J.: Computer-assisted data treatment in analytical chemometrics – IV. Classical estimates of parameters of location, scale, and shape. *Chem. Papers* **49**, 68-75 (1995).
12. Beane Freeman L. E., Karagas M. R., Baris D., Schwenn M., Johnson A. T., Colt J. S., Jackson B., Hosain G. M., Cantor K. P., Silverman D. T.: Is the inverse association between selenium and bladder cancer due to confounding by smoking? *Am. J. Epidemiol.* **181**, 488-95 (2015).

13. Celen I., Muezzinoglu T., Ataman O. Y., Bakirdere S., Korkmaz M., Nese N., Senol F., Lekili M.: Selenium, nickel, and calcium levels in cancerous and non-cancerous prostate tissue samples and their relation with some parameters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 13070-13076 (2015).
14. Aramendia M., Rello L., Resano M. Vanhaecke F.: Isotopic analysis of Cu in serum samples for diagnosis of Wilson's disease: a pilot study. *J. Anal. At. Spectrom.* **28**, 675-681 (2013).
15. Bettencourt da Silva R. J. N., Williams A.: Eurachem workshop on quality in analytical measurements: from specification to decision. *Accred. Qual. Assur.* **20**, 43-46 (2015).
16. Suchánek M., Milde D. (editoři): *Kvalimetrie 20: Vhodnost analytických metod pro daný účel.* Eurachem-ČR, Praha 2015. (ISBN 978-80-86322-00-1)
17. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).* ICH, 2005.
18. Milde D., Linhartová A.: Stanovení arsenu v ořeších pomocí AAS – verifikace metody a kvantifikace nejistoty stanovení. *Chem. Listy* **105**, 707-711 (2011).
19. *International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd edition.* JCGM 200:2012.
20. Suchánek M., Milde D. (editoři): *Kvalimetrie 18: Názvosloví analytického měření. Jak vyhovět požadavkům ISO 17025 na verifikaci metod.* Eurachem-ČR, Praha 2013. (ISBN 80-86322-06-8)
21. Suchánek M., Milde D. (editoři): *Kvalimetrie 19: Stanovení nejistoty analytického měření.* Eurachem-ČR, Praha 2014. (ISBN 978-80-86322-07-0)
22. Rooney R. C.: The determination of silver in animal tissues by a wet-oxidation process followed by atomic absorption spectrophotometry. *Analyst* **100**, 471-475 (1975).
23. Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Lam H. R., Larsen E. H., Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol.* **8**, 18-32 (2011).
24. Veverková L., Hradilová Š., Milde D., Panáček A., Skopalová J., Kvítek L., Petrželová K., Zbořil R.: Accurate determination of silver nanoparticles in animal tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta, part B* **102**, 7-11 (2014).

25. Templeton D. M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L. G., Muntau H., Van Leeuwen H. P., Lobinski R.: Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure Appl. Chem.* **72**, 1453-1470 (2000).
26. Petrželová K., Šimáková A., Milde D.: Comparison of HPLC-ICP-MS and AAS techniques for determination of methylmercury in animal tissue samples. Probíhá recenzní řízení v *J. Food Sci. Technol.*
27. Rai R., Maher W., Kirkowa F.: Measurement of inorganic and methylmercury in fish tissues by enzymatic hydrolysis and HPLC/ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **17**, 1560-1563 (2002).
28. Synek V.: Attempts to include uncorrected bias in the measurement uncertainty. *Talanta* **65**, 829-837 (2005).
29. Magnuson B., Ellison S. R. L.: Treatment of uncorrected measurement bias in uncertainty estimation for chemical measurements. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 201-213 (2008).
30. Kovačiková L., Brůžek J.: Stabilní izotopy a bioarcheologie? Výživa a sledování migrací v populacích minulosti. *Živa* **1**, 42-45 (2008).
31. Pankowská A., Milde D., Bohunská J., Hejcman M.: Variation of Ba/Ca and Sr/Ca response in human hard tissue measured by LA ICP-MS. Probíhá recenzní řízení v *HOMO - Journal of Comparative Human Biology.*
32. Karoui R., Dufour E., Pillonel L., Picque D., Cattenoz T., Bosset J.-O.: Determining the geographic origin of Emmental cheeses produced during winter and summer using a technique based on the concatenation of MIR and fluorescence spectroscopic data. *Eur. Food Res. Technol.* **219**, 184-189 (2004).
33. Karoui R., Mazerolles G., Bosset J. O., de Baerdemaeker J., Dufour E.: Utilisation of mid-infrared spectroscopy for determination of the geographic origin of Gruyère PDO and L'Etivaz PDO Swiss cheeses. *Food Chem.* **105**, 847-854 (2007).
34. Hružíková J., Milde D., Krajancová P., Ranc V.: Discrimination of cheese products for an authenticity control by infrared spectroscopy. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 1845-1849 (2012).
35. Prešerová J., Milde D., Ranc V., Kubištová V., Stávek J.: Study of phenolic profile and antioxidant activity in selected Moravian wine by FT-IR spectroscopy. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 6405-6414 (2015).
36. Kubištová V.: Studium antioxidační aktivity vína. Diplomová práce (2012).

37. Versari A., Parpinello G. P., Scazzina F., Del Rio D.: Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Control* **21**, 786-789 (2010).
38. Romera-Fernández M., Berrueta L. A., Garmón-Lobato S., Gallo B., Vicente F., Moreda J. M.: Feasibility study of FT-MIR spectroscopy and PLS-R for the fast determination of anthocyanins in wine. *Talanta* **88**, 303-310 (2012).
39. Prešerová J.: Infračervená a Ramanova spektrometrie v analýze biologicky aktivních látek v potravinách. Disertační práce, UP v Olomouci 2015.
40. Strauch B.: O duze či oblouku nebeském Jana Marka Marků z Kronlandu. *Bulletin SSJMM*, Praha, březen 2000.
41. Eckschlager K., Horsák I., Kodejš Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. *SNTL*, Praha 1980.

8. Přílohy

Seznam publikací tvořících přílohy habilitační práce:

1. Milde D., Altmannová K., Vysloužil K., Stučka V.: Trace element levels in serum and colon tissue in colorectal cancer. *Chem. Papers* **59**, 157-160 (2005).
2. Horník P., Milde D., Trenz Z., Vysloužil K., Stučka V.: Some trace element levels in colon tissue in patients with colorectal cancer. *Chem. Papers* **60**, 297-301 (2006).
3. Milde D., Linhartová A.: Stanovení arsenu v ořeších pomocí AAS – verifikace metody a kvantifikace nejistoty stanovení. *Chem. Listy* **105**, 707-711 (2011).
4. Hruzíková J., Milde D., Krajancová P., Ranc V.: Discrimination of cheese products for an authenticity control by infrared spectroscopy. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 1845-1849 (2012).
5. Jarošová M., Milde D., Kuba M.: Comparison of ICP-MS and AAS – Elemental analysis of coffee. *Czech J. Food Sci.* **32**, 354-359 (2014).
6. Veverková L., Hradilová Š., Milde D., Panáček A., Skopalová J., Kvítek L., Petrželová K., Zbořil R.: Accurate determination of silver nanoparticles in animal tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta, part B* **102**, 7-11 (2014).
7. Prešerová J., Milde D., Ranc V., Kubištová V., Stávek J.: Study of phenolic profile and antioxidant activity in selected Moravian wine by FT-IR spectroscopy. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 6405-6414 (2015).
8. Pankowská A., Milde D., Bohunská J., Hejcman M.: Variation of Ba/Ca and Sr/Ca response in human hard tissue measured by LA ICP-MS. Probíhá recenzní řízení v HOMO - *Journal of Comparative Human Biology*.
9. Petrželová K., Šimáková A., Milde D.: Comparison of HPLC-ICP-MS and AAS techniques for determination of methylmercury in animal tissue samples. Probíhá recenzní řízení v *J. Food Sci. Technol.*