

VYSOKOŠKOLSKÉ SKRIPTÁ

Univerzita Komenského v Bratislave

Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Objektivizácia faktorov životného a pracovného prostredia I.

pre študijný odbor

Verejné zdravotníctvo

Jela Čajdová

2020

Ústav verejného zdravotníctva

Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave

Vedúca ústavu: Prof. MUDr. Henrieta Hudečková, PhD., MPH.

Recenzia: doc. MUDr. Oto Osina, PhD.

Ing. Daniela Borošová, PhD., MPH

Autor: RNDr. Jela Čajdová, PhD., 2020

Externá pracovníčka ÚVZ JLF UK

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine

Rok vydania: 2020

Vydanie: prvé AH: 5,3 100 strán

ISBN: 978-80-8187-096-5

Predhovor

Cieľom študijného materiálu je poskytnúť základné informácie o objektivizácii faktorov, ktoré môžu mať škodlivý účinok na zdravie, ale tiež faktorov, ktorých prítomnosť v prostredí je prospešná a žiaduca.

Objektivizácia je zabezpečená chemickým a fyzikálno-chemickým, mikrobiologickým, biologickým, senzorickým a fyzikálnym skúšaním zložiek životného a pracovného prostredia. Predmetom skúmania sú vlastnosti vôd, potravín, predmetov bežného užívania, ovzdušia, vnútorného prostredia budov, ako aj ďalších zložiek prostredia a biologického materiálu. Zistené výsledky slúžia ako podklad pre kontrolné, rozhodovacie a ďalšie významné konanie spojené s ochranou zdravia obyvateľstva. Vykonanie správnych rozhodnutí vo veľkej miere závisí od spoľahlivých výsledkov. Preto je dôležité porozumieť, akými skúšobnými metódami sa analytické informácie získavajú, aké činnosti vedú k dosiahnutiu presných a spoľahlivých výsledkov a ako sa majú výsledky správne interpretovať.

Tieto učebné texty slúžia na pochopenie základných princípov chemických a fyzikálno-chemických metód, ktoré sú súčasťou úradnej kontroly potravín a štátneho zdravotného dozoru vo všetkých oblastiach verejného zdravotníctva. Mali by poskytnúť základnú orientáciu v zložitej problematike javov a procesov, ktorými sa získava požadovaná informácia o skúmaných zložkách. Taktiež by mali objasniť postupy laboratórií na zavedenie nových metód a ich činnosti, ktoré po zavedení metód vykonávajú na dosiahnutie čo najpresnejších a najreprezentatívnejších výsledkov skúšania. Keďže súčasťou laboratórnych analýz je tiež zmyslové posudzovanie vody, potravín a kozmetických výrobkov, časť študijného materiálu sa v stručnosti zaoberá aj problematikou senzorickej analýzy a možnosťou jej využitia vo verejnozdravotníckej praxi.

Obsah

| | | |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. | ZAVEDENIE SKÚŠOBNEJ VYŠETROVACEJ METÓDY, VALIDÁCIA, ZABEZPEČENIE KVALITY VÝSLEDKOV | 6 |
| 1.1. | Voľba vhodnej chemickej a fyzikálno-chemickej skúšobnej metódy | 6 |
| 1.2. | Validácia metód pred zamýšľaným použitím | 8 |
| 1.2.1. | Kalibračná funkcia | 9 |
| 1.2.2. | Linearita | 10 |
| 1.2.3. | Overenie homogenity rozptyl | 11 |
| 1.2.4. | Pracovný rozsah | 11 |
| 1.2.5. | Presnosť – správnosť a zhodnosť | 14 |
| 1.2.6. | Neistota | 17 |
| 1.2.7. | Selektivita | 19 |
| 1.2.8. | Robustnosť | 19 |
| 1.2.9. | Citlivosť | 20 |
| 1.2.10. | Vhodnosť pre daný účel | 20 |
| 1.3. | Postup po zavedení metódy do rutínnej praxe | 21 |
| 1.3.1. | Štandardný pracovný postup | 21 |
| 1.3.2. | Regulačné diagramy – prvky interného riadenia kvality | 22 |
| 1.3.3. | Vyjadrovanie výsledkov skúšok | 24 |
| 1.3.4. | Interpretácia výsledkov s neistotou | 27 |
| 1.3.5. | Metrologická nadväznosť a výsledky meraní | 28 |
| 2. | CHEMICKÉ A FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ VYŠETROVACIE METÓDY | 31 |
| 2.1. | Chemické vyšetrovacie metódy základné | 31 |
| 2.1.1. | Odmerná analýza | 31 |
| 2.1.2. | Gravimetria | 34 |
| 2.2. | Fyzikálno-chemické metódy - optické metódy | 36 |
| 2.2.1. | Nespektrálne optické metódy | 38 |
| 2.2.2. | Spektrálne optické metódy | 38 |
| 2.3. | Fyzikálno-chemické metódy - separačné chromatografické metódy | 50 |
| 2.3.1. | Planárna chromatografia | 53 |
| 2.3.2. | Kolónová chromatografia | 57 |
| 2.4. | Fyzikálno-chemické metódy - elektrochemické metódy | 69 |
| 2.4.1. | Potenciometrické meranie pH | 70 |
| 2.4.2. | Konduktometria | 72 |

| | | |
|--------|---------------------------------------------------------|-----|
| 3. | SENZORICKÁ ANALÝZA | 73 |
| 3.1. | Zmyslové hodnotenie v senzorickej analýze | 74 |
| 3.2. | Podnetové prahy | 76 |
| 3.3. | Zmyslové orgány v senzorickej analýze | 77 |
| 3.3.1. | Zrakový orgán v senzorickej analýze | 77 |
| 3.3.2. | Hmatový orgán v senzorickej analýze | 78 |
| 3.3.3. | Chuťový orgán v senzorickej analýze | 79 |
| 3.3.4. | Čuchový orgán v senzorickej analýze | 80 |
| 3.3.5. | Sluchový orgán v senzorickej analýze | 82 |
| 3.4. | Postup pri vnímaní podnetov | 82 |
| 3.5. | Optimálne podmienky pre hodnotenie | 84 |
| 3.5.1. | Maximálna eliminácia rušivých vplyvov | 84 |
| 3.5.2. | Optimalizácia psychických dispozícií hodnotiteľov | 86 |
| 3.5.3. | Zaistenie anonymity podávaných vzoriek | 86 |
| 3.5.4. | Randomizácia vzoriek | 86 |
| 3.5.5. | Posudzovanie skupinou | 86 |
| 3.6. | Chyby a vplyvy pri senzorickom hodnotení | 86 |
| 3.6.1. | Psychologické a psychofyzické chyby | 86 |
| 3.6.2. | Zdravotný stav a psychická vyrovnanosť | 87 |
| 3.6.3. | Vplyv času a prostredia | 88 |
| 3.7. | Hodnotitelia | 88 |
| 3.8. | Najpoužívanéjšie senzorické testy | 89 |
| | Odpovede na otázky | 92 |
| | Zoznam použitých skratiek | 94 |
| | Zoznam obrázkov a tabuliek | 96 |
| | Zoznam použitej literatúry | 98 |
| | Prílohy | 101 |

1. ZAVEDENIE SKÚŠOBNEJ VYŠETROVACEJ METÓDY, VALIDÁCIA, ZABEZPEČENIE KVALITY VÝSLEDKOV

1.1. Voľba vhodnej chemickej a fyzikálno-chemickej skúšobnej metódy

Skúšobná metóda pre objektivizáciu faktorov prostredia musí spĺňať požiadavky podľa účelu, pre ktorý má byť zavedená do praxe. Musí zohľadňovať úroveň požadovaných informácií, ktoré je potrebné získať, povahu vzorky a jej množstvo, ale aj experimentálne možnosti pracoviska a schopnosti pracovníkov.

Zmyslom analýz je nájsť spôsob, ako využiť určitý fyzikálny, chemický, mikrobiologický, biologický alebo kombinovaný jav na vytvorenie signálu, pomocou ktorého sa získa určitá informácia o chemickom zložení vzorky. Zisťovanie celkového zloženia vzorky však nebýva často primárnym cieľom chemických a fyzikálno-chemických meraní. Veľakrát je skúmanie zamerané len na určenie vybraných látok, ktoré sú predmetom záujmu a celkové zloženie zostáva neznáme.

Zložka (látka, prvok, ión, funkčná skupina alebo ich kombinácia v analyzovanom objekte), ktorej prítomnosť alebo množstvo sa určuje metódami analytickej chémie, sa nazýva *analyt*. Zvyšok vzorky sa nazýva *matrica*. Signál sa môže vytvoriť v meracom zariadení, alebo môže vzniknúť v dôsledku reakcie činidla s analytom. Signálom v odmernej analýze môže byť farebná zmena titrovaného roztoku, v gravimetrii zase vznik zrazeniny. V prípade fyzikálno-chemických metód sa signál prejaví ako odozva detektora.

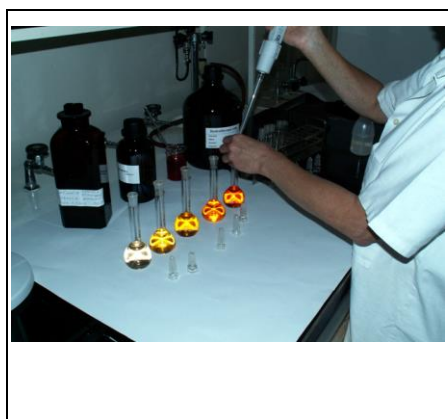
Analytická informácia o vzorke, ktorú má zvolená pracovná technika priniesť, môže byť rýchla, finančne menej náročná, ale často len orientačná. Alebo takáto informácia nepostačuje a je potrebné získať vysoko presný výsledok aj za cenu vyšších nákladov a dlhšieho času.

Ak je cieľom analýzy určenie jednotlivých zložiek v skúmanej vzorke, ide o *kvalitatívne určenie*, čiže *dôkaz*. Ak je cieľom určenie zastúpenia jednotlivých zložiek vzorky (ich množstva), alebo vzájomný pomer, ide o *kvantitatívne určenie*, čiže *stanovenie*.

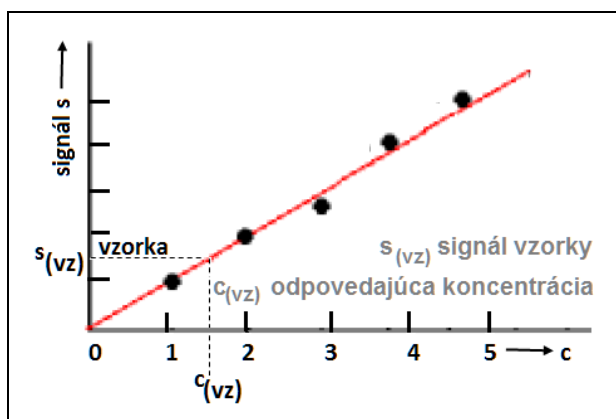
Kvantitatívne metódy využívajú vlastnosti látok, ktorých veľkosť sa dá zmerať. Tie, pri ktorých sa stanovovaný obsah zisťuje priamo z nameranej hodnoty signálu a hmotnosti alebo objemu vzorky, sú *nezávislé* od použitia referenčného materiálu - štandardu. Takých metód je menej, patrí sem napr. gravimetria a odmerná analýza. Väčšina metód je

porovnávacích, kde je potrebné určiť *závislosť* medzi veľkosťou signálu a koncentráciou stanovovanej zložky pomocou štandardov. Zaužívaných je viacero spôsobov, ako sa pomocou signálov zo štandardov stanoví obsah zložky vo vzorke, ale najčastejšie sa používa metóda kalibračnej krivky.

Pri metóde kalibračnej krivky sa na zistenie veľkosti signálov zmeria séria kalibračných vzoriek s definovanou stúpajúcou koncentráciou (obr. č. 1), pripravených napr. z referenčných materiálov a získa sa kalibračná závislosť. Snahou je, aby každá kalibračná vzorka svojimi vlastnosťami odpovedala reálnej vzorke a prešla rovnakým procesom ako analyzovaná vzorka. Grafické znázornenie závislosti meraného signálu od veľkosti meranej veličiny sa nazýva kalibračná krivka. Závislosť môže byť *lineárna* aj *nelineárna*. Nameraná odozva analyzovanej vzorky sa porovnáva s odozvou štandardov. Z kalibračného vzťahu sa potom zistí odpovedajúca koncentrácia analytu vo vzorke, ako to znázorňuje obr. č. 2. Na zistenie vplyvu činidiel a meracieho prostredia sa vždy zaraďuje aj slepá vzorka, blank (z angl. *blank* – prázdny, čistý), čo je materiál pripravený rovnako ako ostatné kalibračné roztoky, avšak bez prítomnosti analytu.



Obr. č.1 Kalibračné štandardy



Obr. č. 2 Kalibračná krivka - grafický záznam
vzťahu koncentrácia – signál

Výber metód sa pri objektivizácii faktorov prostredia odvíja od záväzných právnych predpisov a noriem, ktoré ustanovujú limity, napr. najvyššie medzné hodnoty rizikových faktorov, príp. od očakávaného obsahu ukazovateľov. Kritériá na pracovné charakteristiky metód môžu byť stanovené priamo v požiadavkách legislatívy, alebo si ich určí laboratórium vo svojich interných postupoch tak, aby korešpondovali s pokynmi medzinárodne uznávaných odborných inštitúcií.

Skúšobné metódy je možné rozdeliť do 4 kategórií: *štandardné*, *štandardné modifikované*, *prevzaté* a *vlastné*.

- Štandardné metódy (normalizované metódy) sú tie, ktoré sú publikované v medzinárodných, národných alebo regionálnych normách, v záväzných predpisoch, príp. ako normatívny dokument uznávanej inštitúcie. Vždy, keď je to možné, sa využívajú prednostne, avšak pri implementácii sa nesmú nijako modifikovať.
- Štandardné modifikované metódy sú upravené štandardné metódy, ktoré si pracovisko prispôsobí napr. zmenou koncentračného rozsahu, aplikáciou na inú blízku matricu a pod., pričom odchýlky od normy sú odôvodnené, princíp metódy je dodržaný a jej charakteristické prvky ostali zachované.
- Prevzaté metódy sú metódy, ktoré boli publikované vo vedeckých časopisoch, alebo ich zverejnili uznávané odborné organizácie, prípadne sú to aplikačné listy a postupy výrobcov laboratórnych zariadení a prístrojov.
- Vlastné metódy sú unikátne postupy, ktoré boli vytvorené v danom laboratóriu a sú preukázateľne vhodné pre zamýšľané použitie. Je to posledná voľba, keď nie sú dostupné iné možnosti.

1.2. Validácia metód pred zamýšľaným použitím

V súčasnosti je už bežné, že laboratóriá majú záujem preukázať svoju dôveryhodnosť tak, že doložia svoju kompetentnosť a schopnosť generovať platné výsledky. Dôležitou činnosťou je preto zabezpečenie kvality výsledkov merania. Dostatočným stupňom dôvery je zavedenie systému manažérstva kvality a získanie osvedčenia o akreditácii určitej činnosti. Skúšobné laboratóriá pre objektivizáciu faktorov životného a pracovného prostredia tak preukazujú súlad s princípmi normy STN EN ISO/IEC 17025 (Všeobecné požiadavky na kompetentnosť skúšobných a kalibračných laboratórií). Medicínske laboratóriá preukazujú súlad s normou STN EN ISO 15189 (Medicínske laboratóriá. Požiadavky na kvalitu a kompetentnosť). V Slovenskej republike je jediným uznaným akreditačným orgánom Slovenská národná akreditačná služba, skratka SNAS, ktorá pracoviskám udeľuje osvedčenia o akreditácii, čím oficiálne potvrdzuje ich spôsobilosť vykonávať deklarované činnosti nestranne, nezávisle a na požadovanej odbornej úrovni.

Ak chce laboratórium plniť požiadavky normy pre akreditáciu, musí pred plánovaným zavedením metódy preukázať objektívny dôkaz, že analytický postup je vhodný pre zamýšľané použitie a že výsledky majú prijateľnú neistotu. Experimentálne potvrdenie vhodnosti metódy a akceptovanie jej analytického použitia sa nazýva validácia. Výraz

validovaný sa používa na označenie vyhovujúceho stavu. Postup validácie sa vykonáva pomocou experimentálnych údajov zistených dostatočne spoľahlivým meraním a ich matematického a štatistického spracovania. Výsledkom je jasne určená výkonnosť metódy podľa jej výkonnostných (pracovných) charakteristík, tzv. validačných parametrov metódy vo forme protokolu.

Výkonnostné charakteristiky – validačné parametre skúšobnej metódy

Medzi výkonnostné charakteristiky, ktoré určujú pracovnú výkonnosť metódy, patrí *selektivita, pracovný rozsah, presnosť, robustnosť, citlivosť, neistota*. Pre kvantitatívne porovnávacie metódy je dôležitý aj výkonnostný parameter *kalibračná funkcia, linearita kalibračnej čiary a overenie homogenity rozptylu*. Získané charakteristiky sa musia porovnať s analytickými požiadavkami na metódu a zisťuje sa ich primeranosť, čiže *vhodnosť pre daný účel*.

Výber parametrov - prvkov validácie, ktoré majú byť experimentálne stanovené v podmienkach pracoviska, sa nazýva rozsah validácie.

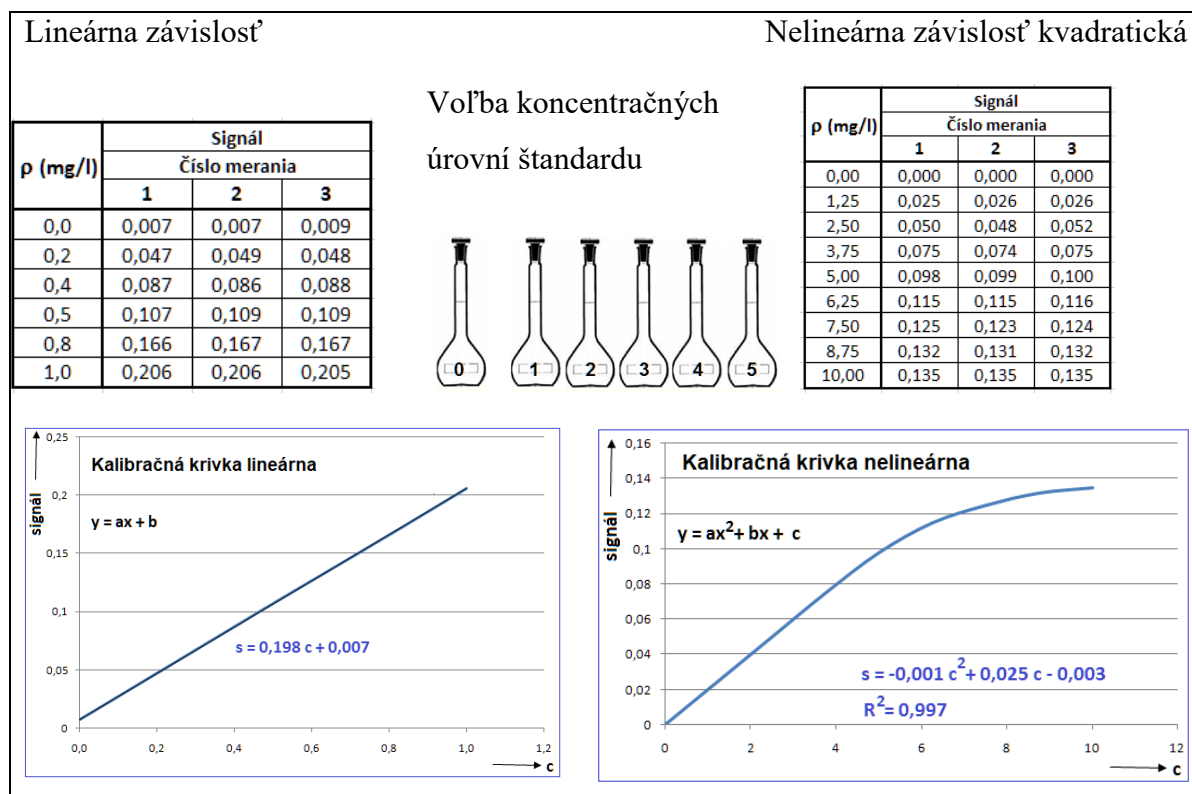
Vzhľadom na rôznorodosť metód, predmetov skúšok (vzoriek), aplikácií, nákladov a pod. nie je možné predpísať jednotný postup validácie. Spôsob a rozsah validácie skúšobnej metódy si zvolí laboratórium podľa okolností. V prípade akreditácie posúdi vhodnosť jeho postupu akreditačný orgán.

Z hľadiska rozsahu a náročnosti sa rozlišuje *validácia čiastočná a úplná*. Čiastočná validácia postačuje v prípade, ak už boli všetky pracovné charakteristiky určené v iných laboratóriách, ako je to napr. v prípade štandardizovaných metód. Aj keď tieto metódy možno považovať za úplne validované, koncový užívateľ musí potvrdiť svoju schopnosť takú metódu použiť vo vlastných podmienkach. Na vybraných charakteristikách musí dosiahnuť porovnateľné hodnoty s deklarovanými parametrami. Pri novo vyvinutých metódach je však nevyhnutné vynaložiť viac úsilia, finančných prostriedkov a vykonať úplný rozsah so všetkými prvkami validácie.

1.2.1. Kalibračná funkcia

Kalibračná funkcia reprezentuje matematický model vzťahu pre *obsah analytu a signál*. Kalibračná funkcia $y = f(x)$ sa určí z experimentálnych údajov, ktoré sa získajú meraním niekoľkých koncentračných úrovní kalibračných štandardov (nezávisle premenná x) za vzniku korešpondujúcich signálov (závisle premenná y). Merania sa opakujú pre viaceré

série kalibračných koncentrácií. Tvar funkcie, ktorá by najlepšie vystihovala závislosť premenných, rieši regresná analýza, najčastejšie metódou najmenších štvorcov. Kalibračná funkcia môže byť lineárna alebo nelineárna - napr. kvadratická, kubická. V prípade lineárnej závislosti sa zmeria spravidla 5 koncentračných úrovní štandardu a slepá vzorka. V prípade zložitejšej, nelineárnej závislosti, je potrebný väčší počet štandardov na viacerých koncentračných úrovniach. Príklad meraní kalibračných štandardov a dva typy kalibračných vzťahov znázorňuje obr. č. 3.



Obr. č. 3 Odozva kalibračných štandardov, kalibračné funkcie

Adekvátnosť matematického modelu sa overuje referenčnými vzorkami alebo slepými vzorkami, ku ktorým sa pridá známe množstvo analytu.

1.2.2. Linearita

Linearita je schopnosť analytickej metódy poskytovať odozvu, ktorá lineárne závisí od koncentrácie analytu. Väčšine analytických metód lineárny kalibračný model vyhovuje. Vďaka štatistickým softvérom však už linearita nie je podmienkou vhodnosti použitej metódy. Je však výhodou, ak v požadovanom rozsahu poskytuje proporcionálnu odozvu.

Linearitu je možné testovať viacerými spôsobmi, napr.:

- vizuálne z kalibračnej krivky
- Mandelovým numerickým F- testom na nelinearitu, t. j. testuje sa hypotéza na vhodnosť iného ako lineárneho modelu, napr. kvadratického. Test je založený na porovnaní reziduálnych rozptylov lineárneho a kvadratického modelu. Porovnaním s kritickou tabuľkovou F-hodnotou sa zisťuje, či kvadratická funkcia je alebo nie je významne vhodnejším modelom.

1.2.3. Overenie homogenity rozptylu

Homogenita rozptylu sa overuje testom, kde sa predpokladá konštantný rozptyl chýb pozdĺž celého koncentračného rozsahu. Zozbierajú sa údaje signálov zo súboru opakovaných meraní najnižšieho štandardu a rovnako aj zo súboru meraní najvyššieho štandardu. F-testom sa zisťuje, či je možné považovať rozptyl v oblasti pracovného rozsahu za homogénny. V prípade, že sa predpoklad nepotvrdí a homogenita sa nepreukáže, robia sa nápravné opatrenia – zúženie pracovného rozsahu, príp. použitie váženej regresie.

1.2.4. Pracovný rozsah

Pracovný rozsah je interval koncentrácií kvantitatívnej skúšobnej metódy, v ktorom možno sledovanú látku stanoviť (merať) s definovanou presnosťou. Koncentrácie sa zvolia tak, aby pokrývali celú oblasť pravdepodobných výsledkov.

1.2.4.1. Horná hranica rozsahu

Optimálne by horná hranica koncentračného rozsahu, t. j. najvyšší kalibračný bod, mala dosiahnuť 1,5 až 2-násobok limitnej hodnoty rizikového faktora, príp. najčastejšie očakávaného obsahu sledovaného analytu. Extrapolácia z krivky nad testovanými koncentraciami je neakceptovateľná, nakoľko za najvyššou zmeranou hranicou už nie je priebeh kalibračnej krivky známy. Prípad, keď sa pri meraní vzorky zistí signál vyšší ako odozva posledného kalibračného bodu, sa rieši analýzou nižších podielov vzorky, príp. použitím inej, menej citlivej metódy.

1.2.4.2. Spodná hranica rozsahu – medza dôkazu LOD, medza stanovenia LOQ

Spodnú hranicu rozsahu tvoria medze, ktoré patria medzi výkonnostné charakteristiky metódy – medza dôkazu a medza stanovenia.

Medza dôkazu, tiež detekčný limit, skratka LOD (angl. *Limit of detection*), je najmenšie množstvo alebo koncentrácia zisťovanej látky, ktorej prítomnosť vo vzorke ešte možno danou metódou s pravdepodobnosťou 99 % dokázať.

Nakoľko pre odhad LOD nie je ustálená definícia, ani presné usmernenie, na získanie hodnoty je možné využiť viacero rôznych postupov. Najbežnejší postup využíva odporúčanie celosvetovej autority v oblasti chemického názvoslovía, terminológie, normalizovaných metód merania a v mnohých ďalších oblastiach - IUPAC.

Pri spôsobe IUPAC sa podľa vzťahu (1.1) za LOD považuje koncentrácia prislúchajúca priemernej hodnote odozvy opakovaných meraní slepého pokusu, zväčšená o trojnásobok smerodajnej odchýlky šumu. Pod pojmom *šum* sa rozumie zmena signálu počas merania bez prítomnosti analytu, spôsobená zmenami prostredia a fyzikálnymi vplyvmi.

Medza stanovenia, limit kvantifikácie, skratka LOQ (angl. *Limit of quantification*) je najmenšie množstvo alebo koncentrácia zisťovanej látky, ktorú ešte možno s pravdepodobnosťou 99 % kvantitatívne stanoviť s akceptovateľnou neistotou merania.

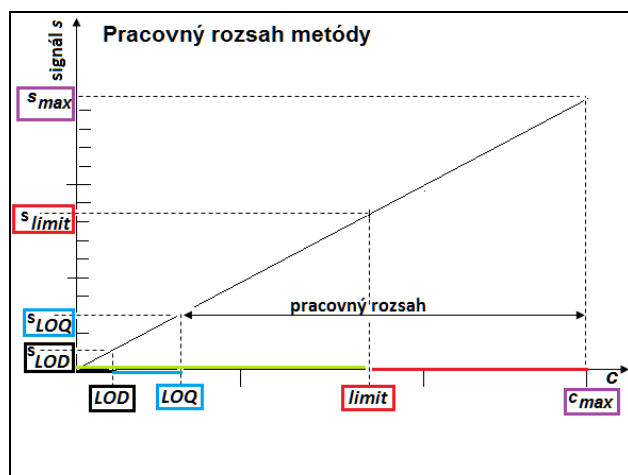
Pri postupe odporúčanom IUPAC sa za LOQ považuje koncentrácia prislúchajúca priemernej hodnote odozvy opakovaných meraní slepého pokusu zväčšenej o desaťnásobok smerodajnej odchýlky šumu podľa vzťahu (1.2).

V praxi sa stanoví 10 až 20 nezávislých opakovaných meraní slepých vzoriek, príp. blankov s veľmi nízkym obsahom pridaného analytu a sleduje sa signálová odozva. Numerickým prepočtom sa z kalibračného vzťahu zistí odpovedajúca koncentrácia c a vypočíta sa smerodajná odchýlka s .

$$LOD = \overline{c_{sl}} + 3s \quad (1.1)$$

$$LOQ = \overline{c_{sl}} + 10s \quad (1.2)$$

Rozsah koncentrácií medzi úrovňou LOD a LOQ predstavuje oblasť detekcie, v ktorej je možná iba kvalitatívna analýza. Kvantitatívne stanovenie pod úroveň LOQ by nebolo spoľahlivé, neistota merania je v tejto veľmi nízkej koncentračnej oblasti oveľa väčšia ako v pracovnom intervale. Pracovný rozsah metódy začína až hodnotou LOQ. Situáciu znázorňuje obr. č. 4.



Obr. č. 4

Grafické znázornenie
pracovného rozsahu metódy

LOD, LOQ, limit,
posledný kalibračný bod c_{max}

Vo viacerých prípadoch sú nároky na LOD a LOQ skúšobnej metódy špecifikované legislatívne. Pre ukazovatele kvality pitnej vody sa požiadavky na detekčný limit a limit kvantifikácie ustanovujú vo Vyhláške MZ SR č. 247/2017 Z. z. v znení č. 97/2018 Z. z. ako percentuálne hodnoty z limitu.

Ukážka 1 LOD, LOQ skúšobnej metódy na stanovenie vybraných kovov v pitnej vode

V zmysle Vyhlášky MZ SR 247/2017 Z. z. v znení č. 97/2018 Z. z. najvyšší akceptovateľný LOD pre stanovenie olova, kadmia a medi v pitnej vode je 10 % a najvyšší akceptovateľný LOQ je 30 % z limitnej hodnoty. Najvyššia medzná hodnota pre olovo je 0,010 mg/l, pre kadmium 0,005 mg/l a pre meď 2,0 mg/l (tab. č. 1). Aké hodnoty LOD a LOQ sú podľa vyhlášky akceptovateľné?

| Tab. č.1 Požiadavky Vyhlášky MZ SR 247/2017 Z. z. v znení č. 97/2018 Z. z. na vybrané ukazovatele kvality pitnej vody | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-----|---------------------------------|
| Ukazovateľ | LOD % z hodnoty limitu | LOQ | Limit mg/l vyjadrený ako NMH |
| Olovo | 10 | 30 | 0,010 |
| Kadmium | 10 | 30 | 0,005 |
| Meď | 10 | 30 | 2,00 |

Podľa požiadaviek ustanovených vo vyhláške musí byť LOD metódy na stanovenie olova rovný alebo nižší ako 0,001 mg/l, LOQ rovný alebo nižší ako 0,003 mg/l. LOD metódy na stanovenie kadmia musí byť rovný alebo nižší ako 0,0005 mg/l, LOQ rovný alebo nižší ako 0,0015 mg/l. LOD metódy na stanovenie medi musí byť rovný alebo nižší ako 0,20 mg/l, LOQ rovný alebo nižší ako 0,60 mg/l. Metódy s vyššími parametrami by neboli dostatočné. Ak by bola nameraná napr. koncentrácia olova 0,002 mg/l, čo

odpovedá hodnote z intervalu od LOD = 0,001 mg/l po LOQ = 0,003 mg/l, hodnotu nie je možné považovať za kvantitatívne stanovenie. Z takého výsledku je známa len skutočnosť, že prítomnosť olova vo vzorke bola spoľahlivo dokázaná, avšak v koncentrácii menšej ako LOQ, t. j. 0,003 mg/l, pretože merania sa dajú spoľahlivo kvantifikovať až od koncentračnej hodnoty prislúchajúcej LOQ a vyššej.

1.2.5. Presnosť – správnosť a zhodnosť

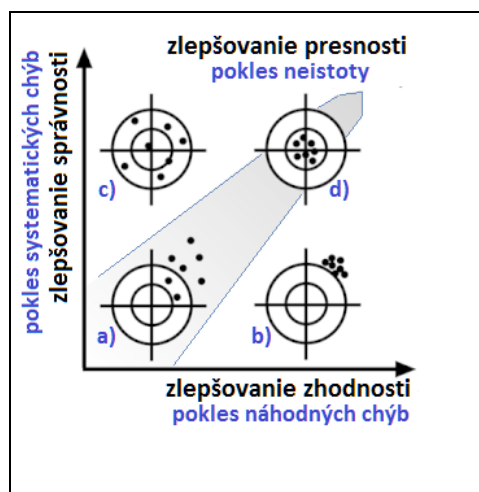
Norma STN ISO 5725-1 opisujúca presnosť používa na označenie presnosti (anglický ekvivalent *accuracy*) kombináciu dvoch pojmov - zhodnosť (anglický ekvivalent *precision*) a správnosť (anglický ekvivalent *trueness*).

Presnosť metódy je definovaná ako tesnosť zhody medzi výsledkami skúšky získanými danou metódou a prijatou referenčnou hodnotou.

Správnosť je mierou systematickej chyby, teda blízkosť zhody medzi aritmetickým priemerom veľkého počtu výsledkov skúšok a skutočnou alebo akceptovanou referenčnou hodnotou.

Zhodnosť je miera náhodnej chyby, teda tesnosť zhody medzi nezávislými výsledkami meraní jedného objektu.

Výstižným znázornením definícií je grafické zobrazenie presnosti, správnosti a zhodnosti v podobe terčov s výsledkami opakovaných meraní známej vzorky na obr. č. 5. V strede terčov sú skutočné hodnoty, body reprezentujú jednotlivé merania a ich rozptyl.



Obr. č. 5

Grafické znázornenie presnosti, správnosti, zhodnosti

- a) Nízka zhodnosť, nízka správnosť \Rightarrow nízka presnosť
- b) Vysoká zhodnosť, nízka správnosť \Rightarrow nízka presnosť
- c) Nízka zhodnosť, vyššia správnosť \Rightarrow nízka presnosť
- d) Vysoká zhodnosť, vysoká správnosť \Rightarrow vysoká presnosť

(Upravené podľa: <https://www.artel-usa.com/clarifying-accuracy-with-help-from-iso-iwa-15/definition-of-accuracy-trueness-precision/>)

1.2.5.1. Správnosť

Správnosť sa hodnotí porovnaním nameraných údajov voči deklarovaným hodnotám referenčných materiálov, alebo voči referenčným hodnotám uvádzaným vo vhodných typoch medzilaboratórnych porovnávaní. Štatisticky sa hodnotí významnosť rozdielu medzi získanou a skutočnou hodnotou. Vyjadrením správnosti je *výťažnosť* metódy.

V praxi je to percentuálne porovnanie reálne nameraných výsledkov analýz vzorky so známym obsahom analytu voči očakávanej hodnote. Vzorkou môže byť referenčný materiál, certifikovaný referenčný materiál alebo výsledok medzilaboratórneho porovnávania skúšky vhodnej vzorky. V prípade nedostupnosti týchto materiálov sa môže použiť aj reálna vzorka s prídavkom definovaného množstva analytu. Pridaná látka však nie je chemicky viazaná k skutočnej matici, preto výsledky získané týmto spôsobom majú nižšiu platnosť než výsledky získané použitím referenčného materiálu.

Referenčný materiál, skratka RM, je materiál dostatočne homogénny a časovo stály, v ktorom jedna alebo viac vlastností (t. j. koncentrácia sledovanej látky) sú dobre definované a známe, aby sa mohli použiť na kalibráciu metódy, aj na stanovenie parametrov presnosti. RM môže byť ako čistá látka na kalibráciu, alebo ako materiál s komplexnou reálnou maticou.

Certifikovaný referenčný materiál, skratka CRM, je materiál, ktorého jedna alebo viac hodnôt veličín, vrátane neistoty a nadväznosti, sú doložené certifikátom vydaným oprávneným orgánom. CRM zaručuje nadväznosť merania na SI sústavu.

Certifikované referenčné materiály sú jednak roztoky chemikálií, ako aj maticové materiály dostatočne homogénne a stabilné s reálnou maticou (napr. lyofilizovaný prášok BCR® Brown bread (Hnedý chlieb) alebo BCR® White cabbage (Biela kapusta) na stopovú analýzu kovov), ktoré sa podrobili medzilaboratórnym porovnaniam medzi špičkovými laboratóriami, aj krížovej kontrole s použitím rôznych metód.

Systematická chyba, ktorú parameter správnosť reprezentuje, môže byť spôsobená napr. nesprávnou kalibráciou meradiel, kontamináciou vzorky, vplyvom matrice, atď. Vtedy sú výsledky systematicky skreslené buď záporne, smerom k nižším hodnotám, alebo kladne, smerom k vyšším hodnotám.

1.2.5.2. Zhodnosť

Zhodnosť je variabilita medzi opakovanými meraniami, ktorá vzniká v dôsledku náhodných chýb. Náhodné chyby vznikajú vždy, ich distribúciu možno vyjadriť Gaussovým normálnym rozdelením. Zhodnosť sa preto najčastejšie vyjadruje prostredníctvom smerodajnej odchýlky. K vzniku týchto chýb prispieva jednak osoba, ktorá meranie vykonáva, a tiež použité zariadenie, kalibrácia zariadenia, podmienky prostredia (teplota, vlhkosť, znečistenie ovzdušia) a čas, ktorý uplynul medzi meraniami. Rozdielnosť medzi meraniami vykonávanými rôznymi pracovníkmi, na rôznych zariadeniach, v rôznom prostredí a čase je obvykle väčšia ako pri meraní jedného pracovníka na jednom zariadení v krátkom časovom odstupe. Podľa faktorov, ktoré sa podieľajú na variabilite, má zhodnosť dve hraničné miery – *opakovateľnosť* (angl. *repeatability*) a *reprodukovateľnosť* (angl. *reproducibility*).

1.2.5.2.1 Opakovateľnosť

V podmienkach opakovateľnosti sa uvedené faktory môžu považovať za konštantné, ktoré neprispievajú k variabilite, nakoľko sa uvažuje o sérii výsledkov získaných tou istou osobou, v tom istom laboratóriu, na tom istom zariadení a v krátkych časových úsekoch medzi meraniami. Preto opakovateľnosť predstavuje minimálnu rozdielnosť výsledkov. Najčastejšie je vyjadrená ako *smerodajná odchýlka opakovateľnosti* s_r zo súboru minimálne 12 nezávislých podielov tej istej vzorky.

1.2.5.2.2 Reprodukovateľnosť

V podmienkach reprodukovateľnosti sa všetky uvedené faktory menia a všetky prispievajú k variabilite. Merania sa vykonávajú na rôznych miestach, na rôznych zariadeniach, s rôznymi operátormi a v dlhšom časovom odstupe. Preto reprodukovateľnosť predstavuje maximálnu rozdielnosť výsledkov. Najčastejšie je vyjadrená ako *smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti* s_R .

V prípade, že nie sú údaje o meraní rovnakého materiálu z rôznych laboratórií dostupné, merania sa môžu vykonať aj na jednom mieste, na jednom zariadení, ale aspoň viacerými operátormi a s väčším časovým odstupom. Uvedený postup však treba zdokumentovať.

1.2.6. Neistota

Všetky merania sú zaťažené chybou, a preto sa výsledky merania odlišujú od skutočnej hodnoty meranej veličiny. Neistota je parameter spojený s výsledkom merania, charakterizujúci *rozptyl hodnôt*, ktoré môžu byť *oprávnené priradené meranej veličine*. Je to rozsah hodnôt, v ktorom sa so zvolenou pravdepodobnosťou nachádza nameraný výsledok. Neistota merania zahŕňa mnoho príspevkov. K neistote prispieva meracie zariadenie, jeho opotrebovanosť, šum, primeranosť jeho kalibrácie, prispievať môže aj miera stability meranej vzorky. Na neistotu tiež vplýva postup pri odbere vzorky, podmienky laboratórneho prostredia – teplota, vlhkosť a mnohé ďalšie faktory.

Niektoré zložky neistoty môžu byť vyhodnotené experimentálne zo série opakovaných meraní štatistickou analýzou nameraných hodnôt. Môžu byť vyjadrené smerodajnou odchýlkou. Odhad vplyvu týchto príspevkov je označovaný ako *neistota získaná postupom typu A*, v skrátenej forme neistota typu A, označenie u_A .

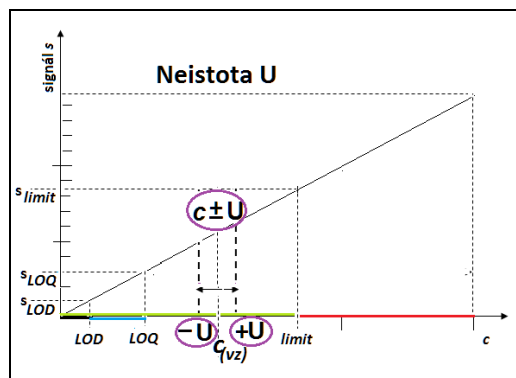
Ďalšie možné zložky neistoty sa viažu na známe, identifikovateľné zdroje a môžu byť tiež vyjadrené formou smerodajnej odchýlky. Sú založené na predchádzajúcej skúsenosti alebo poskytnutej informácii. Odhad vplyvu týchto príspevkov je označovaný ako *neistota získaná postupom typu B*, v skrátenej forme neistota typu B, označenie u_B . Takými informáciami môžu byť údaje z kalibračných certifikátov prístrojov, údaje z certifikátov k váham na váženie, neistoty doložené k certifikovaným hodnotám objemov odmerných nádob, k referenčným hodnotám certifikovaných referenčných materiálov, údaje z medzilaboratórnych porovnávaní, niektoré publikované informácie, ale aj vlastné zistenia napr. z predchádzajúcich kalibrácií a pod.

V prvom kroku je potrebné identifikovať, ktoré z týchto alebo ďalších zdrojov sa podieľajú na neistote. V druhom kroku je potrebné odhadnúť veľkosť príspevku z konkrétného zdroja.

Jednotlivé príspevky typu A aj typu B sa podľa zákona šírenia neistôt skombinujú, aby poskytli celkovú hodnotu neistoty, tzv. kombinovanú neistotu u_C .

Aby neistota poskytovala zvolenú úroveň spoľahlivosti, kombinovaná neistota u_C sa vynásobí príslušným koeficientom rozšírenia (prekrytia) k , čím sa dosiahne tzv. rozšírená kombinovaná neistota označovaná U . Ak by sa kombinovaná neistota nerozšírila a ostal by faktor $k = 1$, úroveň spoľahlivosti by bola nízka, len 68 %. Najčastejšie sa volí koeficient rozšírenia $k = 2$, aby sa dosiahla úroveň spoľahlivosti 95 %. To znamená že s

pravdepodobnosťou 95 % skutočná hodnota $c \pm U$ leží v intervale $\langle -U, U \rangle$. Napr. výsledok stanovenia olova v pitnej vode vyjadrený hodnotou $5,00 \pm 0,87 \mu\text{g/l}$ znamená, že s 95 % pravdepodobnosťou skutočná hodnota leží v intervale 4,13 až 5,87 $\mu\text{g/l}$. Grafické zobrazenie neistoty je na obr. č. 6.



Obr. č. 6 Grafické zobrazenie neistoty

$c \pm U$

Nameraná hodnota \pm neistota

Skutočná hodnota leží v intervale $\langle -U, U \rangle$

Ukážka 2 Postup odhadu neistoty pre prípravu kalibračného štandardu kadmia (obr. č. 7)

Príprava kalibračného štandardu kadmia 1000 mg/l prejde procesom: čistenie povrchu kovu \rightarrow naváženie kovu \rightarrow rozpustenie kovu v kyseline \rightarrow rozriedenie roztoku na konečný objem \rightarrow výsledok

- Odhad neistoty
- identifikácia zdrojov podieľajúcich sa na neistote, vytvorenie zoznamu neistoty
 - odhad veľkosti príspevku z konkrétneho zdroja, kvantifikácia zložiek
 - výpočet rozšírenej kombinovanej neistoty U

$$c_{(Cd)} = \frac{1000 \cdot m \cdot P}{V} \text{ (mg/l)}$$

Matematický vzťah

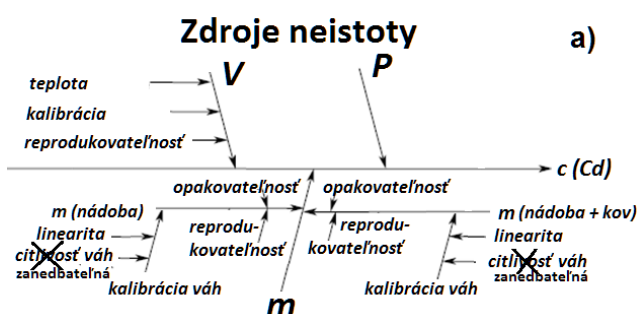
| | Vlastnosť | Hodnota | Neistota | Relatívna neistota |
|------------|---------------------------|-------------|----------|--------------------|
| P | Čistota kovu | 0,9999 | 0,000058 | 0,000058 |
| m | Hmotnosť kovu | 100,28 mg | 0,05 mg | 0,0005 |
| V | Objem odmernej banky | 100,0 ml | 0,07 ml | 0,0007 |
| $c_{(Cd)}$ | Koncentrácia štandardu Cd | 1002,7 mg/l | 0,9 mg/l | 0,0009 |

c (Cd) - koncentrácia kal. štandardu (mg/l)

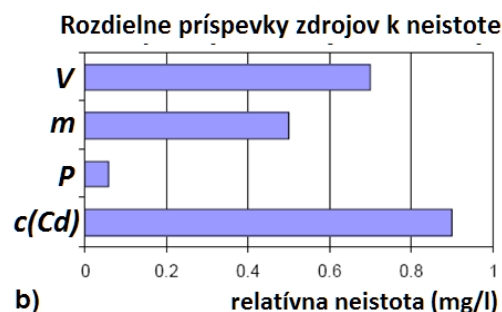
m - hmotnosť čistého kovu (mg)

P - čistota kovu

V - objem kalibračného štandardu (ml)



a)



b)

Obr. č. 7 Odhad neistoty – identifikácia zdrojov a odhad veľkosti príspevkov zo zdrojov

(Upravené podľa: Eurachem/CITAC, 2019)

K odhadu neistoty boli použité certifikáty dodávateľov o čistote kovu, kde sa uvádza $P = 99.99 \pm 0.01\%$ a certifikát k objemu odmernej banky, kde sa uvádza $V = 100 \text{ ml} \pm 0.1 \text{ ml}$. Na objem však vplývali aj ďalšie faktory v laboratóriu, ktorých príspevok bolo treba zarátat'. Pri navažovaní čistého kovu sa bral do úvahy certifikát k analytickým váham s deklarovanou neistotou a ďalšie faktory ovplyvňujúce váženie. Sériou výpočtov sa dospelo k čiastkovým neistotám, prislúchajúcim k identifikovaným zložkám. Z grafu b) je zrejmé, že najväčším príspevkom k neistote bol objem odmernej banky. Spojením parciálnych neistôt sa vypočítala kombinovaná neistota s hodnotou $u_c = 0,9 \text{ mg/l}$, ktorá bola rozšírená faktorom $k = 2$ na hodnotu $U_{(c \text{ Cd})} = 1,8 \text{ mg/l}$.

1.2.7. Selektivita

Selektivita je schopnosť meracieho systému alebo metódy dokázať a stanoviť príslušný analyt aj v zložitej zmesi bez toho, aby iné zložky ovplyvnili výsledok analýzy. Selektivita sa často zisťuje porovnávaním kalibračnej funkcie získanej z mnohozložkových kalibračných roztokov (kde je pridaný potenciálny interferent) s kalibračnou funkciou získanou z jednoduchých kalibračných roztokov analytu v demineralizovanej vode. Sleduje sa významnosť rozdielov, pri lineárnej závislosti sa porovnávajú smernice priamky.

Ak sú pri meraní prítomné rušivé zložky, zisťuje sa taký rozsah koncentrácií týchto zložiek, kedy je ešte možné sledovaný analyt stanoviť bez interferencií. Zdrojom rušivých signálov sú vedľajšie interakcie skúmadla so vzorkou, iné súčasti vzorky, šum prístrojov a mnohé ďalšie faktory, ktoré môžu spôsobiť prekryv analytického signálu a skresliť ho.

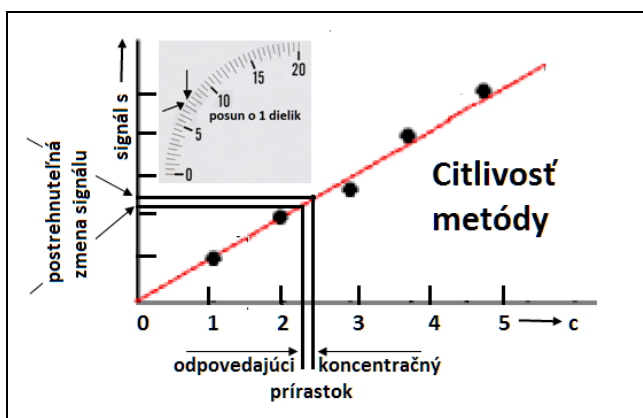
1.2.8. Robustnosť

Robustnosť je mierou stability metódy, vyjadruje odolnosť metódy voči jemným odchýlkam vykonaným v experimentálnych podmienkach. Faktory, ktoré by mohli ovplyvniť pracovné charakteristiky a tým aj výsledky, môžu byť malé zmeny teploty, pH, návažkov vzorky, doby skladovania a prípravy vzorky a štandardov, nadbytok činidla, druh a značka chemikálií atď. Vplývajúce faktory môžu byť identifikované zámerným vykonaním malých zmien do podmienok analýzy. Metóda sa považuje za odolnú voči vykonanej zmene, pokiaľ sa štatistickými testami nepreukáže významnosť rozdielu medzi výsledkami meraní súboru bez zmenených podmienok a výsledkami zo súboru

po vykonanej zmene. Musia sa však určiť hranice veľkosti jednotlivých odchýlok, v rámci ktorých ešte nedochádza k narušeniu stability metódy.

1.2.9. Citlivosť

Citlivosť metódy je miera zmeny veľkosti signálu spôsobenej zmenou určitého množstva sledovanej látky. Je to rozdiel v hodnote obsahu analytu zodpovedajúci najmenšiemu postrehnuteľnému (detegovateľnému) prírastku alebo úbytku signálu v meracom prístroji (obr. č.8). Pri ručičkovom meradle by došlo k posunu o 1 dielik na stupnici. Metóda je citlivá vtedy, keď malá zmena koncentrácie alebo množstva analytu vyvolá veľkú zmenu signálu. Ak je funkcia *signál - koncentrácia* lineárna, citlivosť sa zhoduje so smernicou kalibračnej priamky.



Obr. č. 8 Citlivosť metódy

Prírastok analytu spôsobil postrehnuteľnú zmenu veľkosti signálu

1.2.10. Vhodnosť pre daný účel

Metóda vybraná pre určitý účel by mala byť praktická, t. j. nemá vyžadovať zložité operácie, mala by spĺňať požiadavky na náklady a efektívnosť (počet vyšetrených vzoriek). Po ukončení validácie sa posudzuje:

- primeranosť získaných validačných parametrov
- porovnanie s limitom
- porovnanie s požiadavkami predpisov
- primeranosť výsledku skúšky s CRM
- úspešnosť výsledku v medzilaboratórnom porovnávacom meraní

Medzilaboratórne porovnávacie meranie je skúška organizovaná na národnej alebo medzinárodnej úrovni, v rámci ktorej laboratória merajú množstvo (koncentráciu) zložky v jednom alebo viacerých porovnateľných podieloch homogénnych, stabilných

materiálov, pričom výsledky sa zhrnú do jedného dokumentu. Matrica použitých materiálov by mala odpovedať vzorkám, ktoré sa danou metódou budú bežne analyzovať. Účasť na takýchto skúškach sa považuje za dôležitú súčasť zabezpečenia kvality skúšok a v prípade akreditácie sa tým preukazuje aj plnenie akreditačných kritérií.

V prípade, že parametre validovanej metódy vyhovujú kritériám, stanovená hodnota cieľovej látky v CRM je vyhovujúca a medzilaboratórnym porovnávacím meraním sa potvrdila vhodnosť metódy, zdokumentuje sa protokol o validácii skúšobnej metódy, vypracuje sa štandardný pracovný postup, skratka ŠPP a metóda sa zavedie do rutinného užívania.

1.3. Postup po zavedení metódy do rutinnej praxe

Po zavedení metódy do rutinnej praxe je potrebné udržiavať metódu v porovnateľnom stave, v akom bola hodnotená jej vhodnosť pre daný účel a pravidelne monitorovať, či nedošlo k neočakávanej zmene. Spôsob, akým sa metóda udržiava v požadovanom stave, má byť podrobne zdokumentovaný v príslušnom ŠPP.

1.3.1. Štandardný pracovný postup

Štandardný pracovný postup je dokument opisujúci všetky podstatné kroky, ktoré sa musia pri použití danej metódy vykonať - od prípravy vzorky až po správu o výsledku skúšky. Dôležitou súčasťou je systém zabezpečenia kvality, ktorý má byť pre danú metódu jasne stanovený. Tvoria ho prvky vnútorného riadenia kvality – analýza duplicitných podielov vzorky, slepých vzoriek, kontrolných vzoriek, používanie regulačných diagramov a prvky vonkajšieho riadenia kvality – účasť na programoch medzilaboratórných porovnávacích meraní (tab. č. 2).

| Tab. č. 2 Zabezpečenie kvality dosahovaných výsledkov | | |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Stanovený počet | kalibračných štandardov na overenie platnosti kalibračného vzťahu | |
| | duplicitných stanovení vzorky | |
| | slepých vzoriek | |
| Stanovená frekvencia | vzoriek interného riadenia kvality | RM |
| | | CRM |
| | | kontrolné vzorky pripravené na pracovisku |
| | | reálne vzorky s prídavkom definovaného množstva štandardu, ktoré prešli celým analytickým procesom |
| | vzoriek externého riadenia kvality | pravidelná účasť na medzilaboratórnom porovnávacom meraní |
| | overovania validačných charakteristík | kalibračný vzťah |
| | | LOD, LOQ |
| | | presnosť ...atď. |

Väčšinou sú slepé vzorky a niektoré z ďalších vzoriek interného riadenia kvality zaradené ku každej meranej sérii vzoriek. Po analýze sa porovnávajú s nastavenými kritériami, t. j. voči stanoveným *kritickým hodnotám* a posudzuje sa miera splnenia požiadaviek. V prípade, že kritériám nevyhoveli, výsledky sú pre celú sériu meraní neplatné a analytický proces sa musí zopakovať.

Každý krok postupu, aj prípadný odklon od postupu, musí byť zdokumentovaný. Musia sa zaznamenávať všetky vykonávané operácie, tak aby bolo jasné, akým spôsobom sa výsledok dosiahol, ktorí pracovníci sa na analýze podieľali, kto celý proces kontroloval a kto je zodpovedný za správu o výsledku skúšky. Záznamy sa počas stanovenej doby archivujú tak, aby boli počas tejto doby kedykoľvek dostupné.

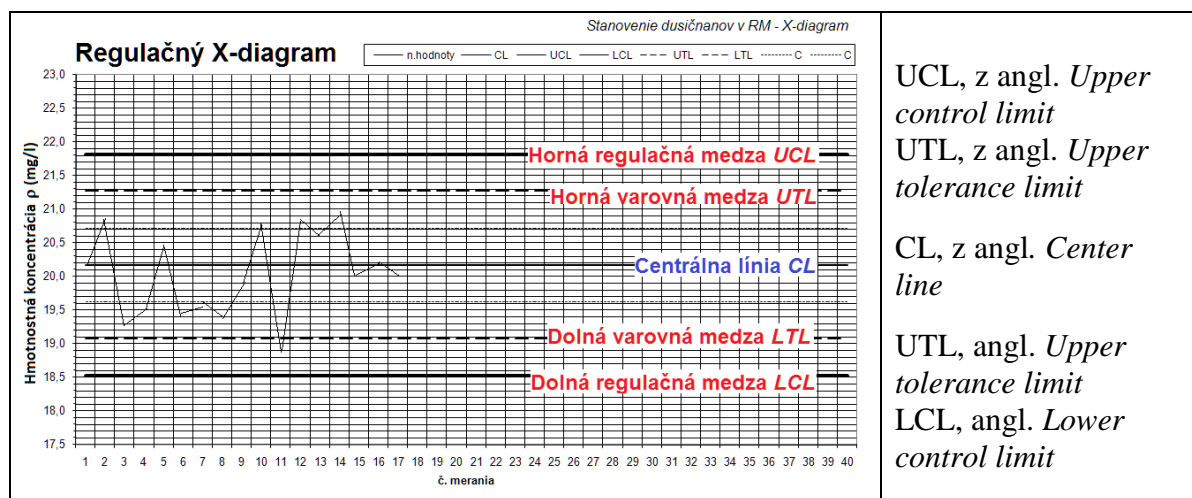
1.3.2. Regulačné diagramy – prvky interného riadenia kvality

Medzi hlavné štatistické diagnostické nástroje používané na sledovanie dlhodobej stability systému patria Shewhartove regulačné diagramy, ktorým sa venuje norma STN ISO 8258. Walter Andrew Shewhart (1891 – 1967), americký fyzik, inžinier a štatistik, zaviedol základné princípy kontroly kvality priemyselného procesu formou jednoduchých diagramov, ktoré sa dajú aplikovať aj na dlhodobé monitorovanie analytickej metódy

po jej úspešnom zavedení v laboratóriu. V analytickej praxi sa osvedčili dva druhy regulačných diagramov - kontrolný X-diagram a R-diagram rozpätí.

1.3.2.1. Regulačný X-diagram

Základom kontrolného X-diagramu je periodické meranie vhodnej kontrolnej vzorky alebo slepej vzorky. Namerané hodnoty niektorých metrologických charakteristík (často aritmetického priemeru duplicitných stanovení) sa v časovom postupe zanášajú do grafu. Namerané hodnoty sú porovnávané s referenčnou hodnotou, ktorú reprezentuje *centrálna línia* umiestnená v strede grafu. V regulačnom diagrame sa sleduje rozptyl zaznamenaných výsledkov okolo centrálnej línie a štatisticky stanovených hraníc - *varovných* a *regulačných medzí* (obr. č. 9), s cieľom odhaliť zmeny a mimokontrolné situácie. Taktiež sa sledujú aj hodnoty neobvyklého zoskupenia tvoriace nežiaduce trendy, ktoré norma presne popisuje. Mimokontrolné situácie a trendy signalizujú nevyhovujúci stav meracieho systému. V takom prípade sa hľadá príčina a robia sa nápravné opatrenia.

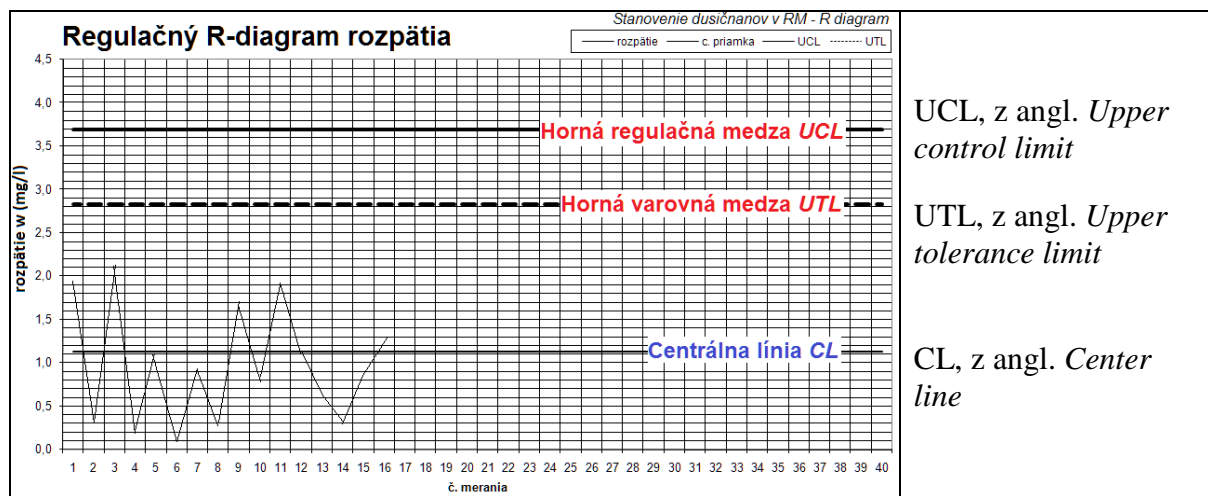


Obr. č. 9 Regulačný X-diagram

1.3.2.2. Regulačný R-diagram rozpätia

Základom regulačného R-diagramu rozpätia je periodické sledovanie minimálne dvoch duplicitných stanovení vhodnej kontrolnej vzorky alebo slepej vzorky a zanášanie ich rozpätia do grafu v časovom postupe. Namerané hodnoty sú porovnávané so štatisticky stanovenou *centrálnou liniou* referenčnej hodnoty. Podobne ako pri regulačnom X-diagrame sa sleduje rozptyl hodnôt okolo centrálnej línie a štatisticky stanovených hraníc - *varovných* a *regulačných medzí* (obr. č. 10), s rovnakým cieľom odhaliť zmeny

a mimokontrolné situácie. Tiež sa sledujú hodnoty neobvyklého zoskupenia tvoriace nežiaduce trendy.



Obr. č. 10 Regulačný R-diagram rozpätia

1.3.3. Vyjadrovanie výsledkov skúšok

Výsledky merania majú byť vyjadrené vo veličinách a jednotkách, v akých sú vyjadrené aj limitné hodnoty v právnych predpisoch a normách. Najčastejšie sa používa:

- hmotnostná koncentrácia ρ [g/l], [mg/l], [μ g/l]
- látková koncentrácia c [mol/l], [mmol/l], [μ mol/l]
- percentuálny podiel hmotnosti alebo objemu, vyjadrený ako
 - hmotnostné percento [%] $^{m/m}$ - hmotnosť rozpustenej látky v pomere k celkovej hmotnosti roztoku
 - objemové percento [%] $^{V/V}$ - objem látky v pomere k celkovému objemu roztoku

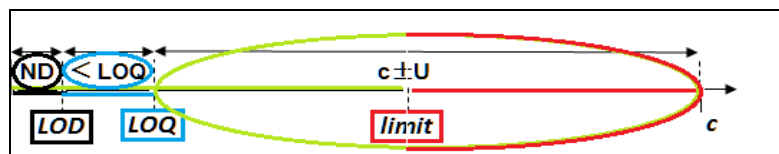
Vyjadrenie vo forme ppm (z angl. *parts per million*), ppb (z angl. *parts per billion*) sa neodporúča.

Pri kvantitatívnom stanovení môžu nastať 3 prípady:

- obsah sledovanej látky je v koncentračnom intervale 0 až LOD
- obsah sledovanej látky je v koncentračnom intervale LOD až LOQ
- obsah sledovanej látky je rovný alebo vyšší ako LOQ

Pre vyjadrovanie výsledkov nie je ustálený jednotný postup. Jedným z vhodných a výstižných spôsobov zápisu je vyjadrenie s použitím parametrov metódy LOD, LOQ a neistoty, ako je to znázornené na obr. č. 11 a v ukážke 3 na obr. č. 12.

- Výsledok z intervalu 0 až LOD sa zapíše v tvare ND (z angl. *not detected*) s vypočítanou hodnotou LOD uvedenou v zátvorke, čo znamená, že látka nebola danou metódou detegovateľná. Je to kvôli tomu, že výsledok v tvare 0,0 nemusí znamenať úplnú neprítomnosť sledovanej látky, citlivejšia metóda môže dokázať koncentrácie, ktoré sa pre menej citlivú metódu javia ako nulové.
- Výsledok z intervalu LOD až LOQ sa zapíše v tvare \leq číselná hodnota LOQ, čo znamená, že hodnota nebola danou metódou kvantifikovateľná. V týchto prípadoch sa neistota U k výsledku nezapíše, pretože v tejto oblasti má úplne inú hodnotu (oveľa vyššiu) ako v meracom rozsahu.
- Výsledok z intervalu vyšší ako LOQ má už priradenú akceptovateľnú neistotu, zapíše sa v tvare strednej hodnoty opakovaných meraní \pm neistota U , pričom počet desatinných miest je rovnaký.



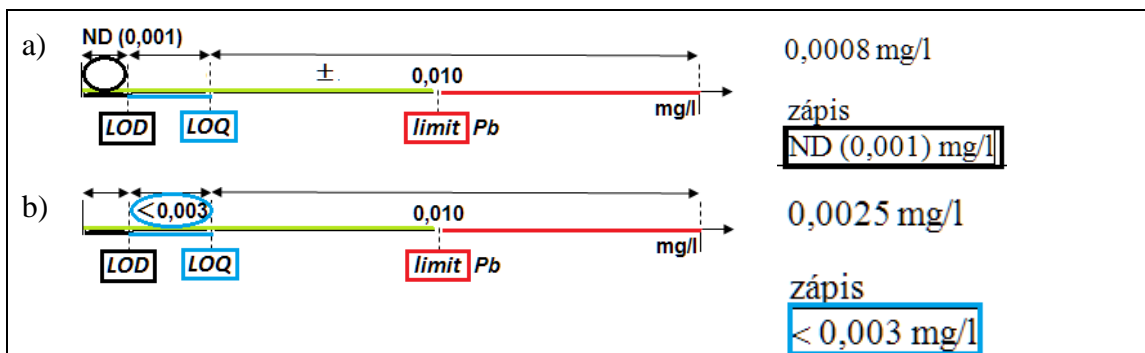
Obr. č. 11

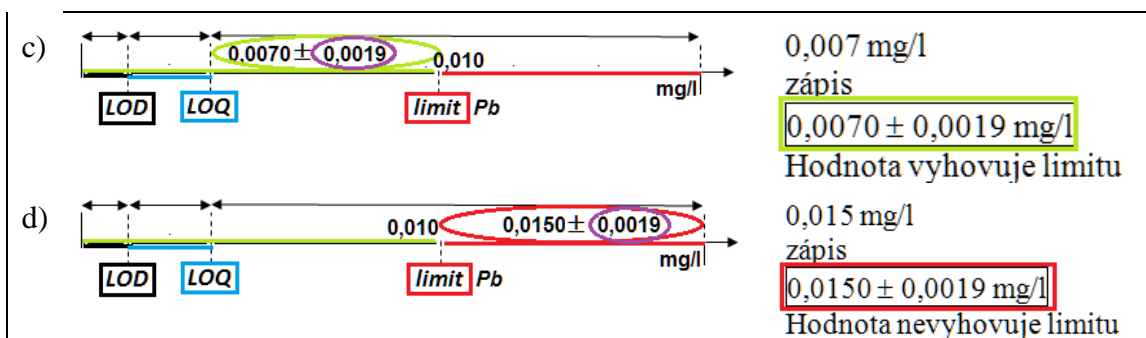
Spôsoby zápisu výsledkov v závislosti od koncentrácie

Ukážka 3 Zápisy výsledkov stanovenia olova v pitnej vode (obr. č. 12)

Použitá metóda ET AAS má pre stanovenie olova v pitnej vode parametre LOD = 0,0010 mg/l, LOQ = 0,0030 mg/l a neistotu 0,0019 mg/l pre celý pracovný rozsah.

Použitím tejto metódy sa zistil výsledok pre vzorku a) 0,0008 mg/l, pre vzorku b) 0,0025 mg/l, pre vzorku c) 0,007 mg/l a pre vzorku d) 0,015 mg/l. Zápis výsledkov je v tvare:





Obr. č. 12 Ukážka zápisov výsledkov – olovo v pitnej vode

Ukážka 4 Výber metódy pre stanovenie kadmia v pitnej vode

Rozhodnite, či metóda na stanovenie kadmia v pitnej vode, s validačnými parametrami LOD = 0,135 µg/l, LOQ = 0,405 µg/l, správnosťou 0,042 µg/l a neistotou 0,885 µg/l vyhovuje kritériám Vyhlášky MZ SR č. 247/2017 v znení č. 97/2018 Z. z.

| Kadmium v pitnej vode | | | | | |
|-----------------------|------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Parameter | | LOD | LOQ | Správnosť | Neistota |
| Požiadavky vyhlášky | % | 10 | 30 | 10 | 25 |
| Požiadavky vyhlášky | µg/l | 0,5 | 1,5 | 0,5 | 1,25 |
| Parametre metódy | µg/l | 0,135 | 0,405 | 0,042 | 0,885 |
| Splnenie požiadavky | µg/l | 0,135 ≤ 0,5 | 0,405 ≤ 1,5 | 0,042 ≤ 0,5 | 0,885 ≤ 1,25 |
| | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |

Metóda vyhovuje v daných parametroch legislatívnym požiadavkám.

Ukážka 5 Výber metódy pre stanovenie olova v pitnej vode

Rozhodnite, či metóda na stanovenie olova v pitnej vode, s validačnými parametrami LOD = 0,99 µg/l, LOQ = 2,97 µg/l, správnosťou 1,49 µg/l a neistotou 2,95 µg/l, vyhovuje kritériám Vyhlášky MZ SR č. 247/2017 v znení č. 97/2018 Z. z.

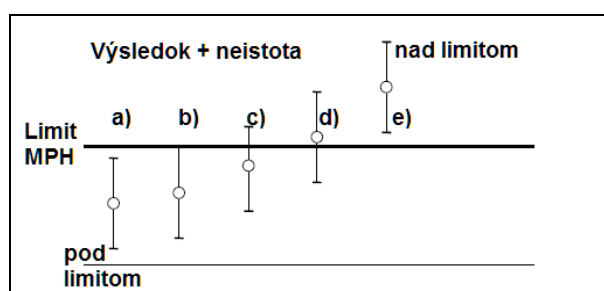
| Olovo v pitnej vode | | | | | |
|---------------------|------|------------|------------|------------|------------|
| Parameter | | LOD | LOQ | Správnosť | Neistota |
| Požiadavky vyhlášky | % | 10 | 30 | 10 | 25 |
| Požiadavky vyhlášky | µg/l | 1,0 | 3,0 | 1,0 | 2,5 |
| Parametre metódy | µg/l | 0,99 | 2,97 | 1,49 | 2,95 |
| Splnenie požiadavky | µg/l | 0,99 ≤ 1,0 | 2,97 ≤ 3,0 | 1,49 > 1,0 | 2,95 > 2,5 |
| | | ✓ | ✓ | ✗ | ✗ |

Metóda nevyhovuje legislatívnym požiadavkám, nakoľko parameter správnosť a neistota sú príliš vysoké oproti nastaveným kritériám. Na stanovenie olova v pitnej vode je potrebné použiť inú metódu, príp. sa pokúsiť odstrániť možnú systematickú chybu,

prehodnotiť kalibračný model, vylepšiť výťažnosť, identifikovať všetky zdroje neistoty, pokúsiť sa znížiť vplyv najzávažnejších príspevkov a pod.

1.3.4. Interpretácia výsledkov s neistotou

Pri interpretácii výsledkov voči legislatívne stanoveným limitným hodnotám by sa mali brať do úvahy oba faktory – výsledok aj interval neistôt. Pri posudzovaní výsledkov a ich neistôt môže nastať 5 prípadov, ako to znázorňuje obr. č. 13:



Obr. č. 13

Neistota a porovnanie s limitnou hodnotou

(Upravené podľa: Eurachem/CITAC, 2012)

- Výsledok s celým intervalom neistoty je pod limitom - výsledok vyhovuje.
- Výsledok je pod limitom, ale s pripočítanou neistotou sa rovná práve limitu - výsledok vyhovuje, ak limitom je najvyššia prípustná hodnota (posledná vyhovujúca hodnota).
- Výsledok je síce pod limitom, ale limit je v intervale neistoty, teda existuje pravdepodobnosť, že skutočný výsledok leží nad limitnou hodnotou; výsledok síce nevyhovuje, ale je potrebné individuálne posúdenie podľa okolností.
- Výsledok je síce nad limitom, ale interval neistoty zasahuje aj pod limit; existuje pravdepodobnosť, že skutočný výsledok by mohol ešte ležať pod limitnou hodnotou - výsledok síce nevyhovuje, ale potrebné je individuálne posúdenie podľa okolností.
- Výsledok s celým intervalom neistoty je nad limitom - výsledok nevyhovuje.

Ukážka 6 Interpretácia výsledku

Rozhodnite, či je dodržaná maximálna prípustná hodnota pre kadmium v pitnej vode stanovená vyhláškou MZ SR na 5 µg/l, keď sa pri rozbere vody zistila hmotnostná koncentrácia $\rho(\text{Cd}) = 4,115 \mu\text{g/l} \pm 0,885 \mu\text{g/l}$.

$$\rho(\text{Cd}) = 4,115 \pm 0,885 \mu\text{g/l} \Rightarrow \rho(\text{Cd}) = \langle 3,23; 5,0 \rangle \mu\text{g/l} \leq \text{MPH}(\text{Cd}) 5 \mu\text{g/l}$$

Maximálna prípustná hodnota pre kadmium v danej pitnej vode bola dodržaná, kvalita vody pre tento parameter vyhovuje požiadavkám.

1.3.5. Metrologická nadväznosť a výsledky meraní

Podľa definície *metrologická nadväznosť* (angl. *traceability*) je vlastnosť výsledku merania, pomocou ktorej sa výsledok môže vzťahovať na určenie referenciu prostredníctvom dokumentovaného neprerušeného reťazca kalibrácií, z ktorých každá prispieva k určenej neistote merania. Predstavuje neprerušený reťazec porovnaní od primárneho etalónu na realizáciu jednotiek SI, cez národný etalón, sekundárny etalón až po pracovný etalón v laboratóriu.

Už v starom Egypte bola zavedená dĺžková jednotka kubit (kráľovský lakeť). Bol odvodený z dĺžky predlaktia panujúceho faraóna, zmeranej od lakťa po koniec prostredníka. Pôvodná miera sa preniesla vytesaním do granitového kameňa ako referenčný etalón a pre stavebných robotníkov sa vyhotovili granitové alebo drevené kópie, v dnešnom ponímaní pracovné etalóny. Ešte v nedávnej histórii každá krajina používala svoje vlastné miery. Predchodcom dnešného systému bol Metrický systém, ktorý vznikol vo Francúzsku. Tvorili ho platínové etalóny metra a kilogramu, dodatočne označené ako archívny meter a archívny kilogram. V súvislosti s priemyselnou revolúciou a hospodárskym trendom sa objavila potreba jednotnej sústavy jednotiek, ktorá sa mala používať celosvetovo. V súčasnosti je zavedený medzinárodný systém jednotiek SI uznaný 56 štátmi BIPM a 41 pridruženými štátmi a ekonomikami, ktoré podporujú a financujú stály vedecký inštitút BIPM - Medzinárodný úrad pre váhy a miery (z franc. *Bureau International des Poids et Mesures*).

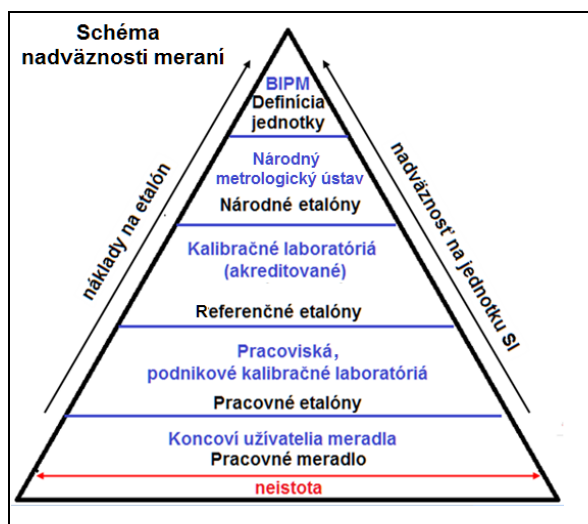
Systém SI zahŕňa definície medzinárodne uznaných meracích jednotiek na základe prírodných konštánt (fyzikálnych javov). Posledná redefinícia základných jednotiek bola vykonaná v roku 2018. Jednotky sú definované tak, aby boli univerzálne dostupné. Každá meracia jednotka je v praxi technicky realizovateľná vedeckými metódami, napr. realizácia metra laserovým lúčom. Zrealizovaná fyzikálna veličina sa nazýva etalón, ktorý reprezentuje jej hodnotu s príslušnou neistotou a slúži ako referencia. Etalón môže byť fyzicky realizovaný meracím zariadením alebo referenčným materiálom.

Uchovávaním národných etalónov a realizáciou zhmotnenej miery jednotiek podľa ich definície sú poverené národné metrologické ústavy. Na Slovensku je to Slovenský metrologický ústav, skratka SMÚ, ktorý aj zastupuje krajinu na medzinárodnej úrovni.

SMÚ uchováva, vykonáva primárne realizácie metrologických jednotiek a odovzdáva hodnoty jednotiek alebo stupníc hodnôt z etalónov s najvyššími metrologickými parametrami podľa schémy nadväznosti na etalóny nižších rádov, až na pracovné meradlá príslušnej veličiny. Tento proces je sprevádzaný zvyšovaním neistoty, každý prenos vyššieho etalónu na nižší aj pri najprecíznejšom meraní niekoľkonásobne zväčšuje neistotu stanovenej jednotky.

Koncový používateľ môže získať nadväznosť na najvyššiu medzinárodnú úroveň prostredníctvom sekundárneho kalibračného, zväčša akreditovaného laboratória, alebo pokiaľ to jeho požiadavky na presnosť vyžadujú, až priamo od národného príp. rovnocenného zahraničného metrologického ústavu. Výrazný rozdiel medzi spôsobmi získania nadväznosti je v miere neistoty hodnoty etalónu alebo kalibrácie a v cene. V každom prípade musí byť tento proces zabezpečený etalónom, ktorý je v hierarchii etalónov na vyššej úrovni a nadväznosť jeho merania siaha až po realizáciu jednotky SI. Výsledky hodnôt etalónov a kalibrácií spolu s neistotami musia byť zdokumentované v certifikátoch.

Obr. č. 14 znázorňuje postupnosť nadväznosti etalónov a kalibrácií od definície jednotky cez jej realizáciu a zmaterializovanie prostredníctvom národných etalónov, cez kalibrácie referenčných etalónov smerom cez pracovné etalóny až ku konečnému meradlu.



Obr. č. 14

Schéma nadväznosti meraní

- najvyššia úroveň - primárny etalón
- neprerušovaný reťazec porovnaní z vyšších rádov na nižšie
- výsledok merania alebo hodnota etalónu - prepojenie na vyššie rády
- rast neistoty smerom k nižším rádom

Tento jednoduchý princíp sa dá ľahko implementovať do fyzikálnych meraní. Pri chemických meraniach je situácia zložitejšia. Kalibrovať je možné len meracie zariadenia prostredníctvom certifikovaných referenčných materiálov alebo referenčných materiálov. Napr. použitie primárneho CRM (vodný roztok oxidu holmia) na kalibráciu stupnice

vlnovej dĺžky prístroja pre UV-VIS spektrometriu, čím sa realizuje prenos hodnôt na národný etalón.

Chemické merania často neprebiehajú v takých riadených a definovaných podmienkach ako fyzikálne, závisia od povahy vzorky. Preto nadväznosť merania v oblasti chemických meraní poskytujú *matricové certifikované referenčné materiály* a *štandardné referenčné metódy (normalizované)*, pokiaľ sú k dispozícii. V prípade, že pre stanovenie daného analytu v danej matrici je dostupná normalizovaná metóda, je zárukou, že na dvoch rôznych pracoviskách budú porovnateľné podmienky pre merania.

CRM majú preukázateľnú nadväznosť na národné a medzinárodné štandardy a majú doloženú neistotu certifikovanej hodnoty analytu. Sú veľmi spoľahlivé, odporúča sa ich použitie všade, kde je to možné. Dôkaz o nadväznosti je uvedený v kalibračných certifikátoch.

Použitie matricových CRM však má význam iba vtedy, ak sa približujú svojim zložením reálnym vzorkám a ak certifikovaná hodnota stanovovaného analytu je na porovnateľnej koncentračnej úrovni. V praxi sa matricové CRM vzhľadom na finančné náklady nepoužívajú na kalibráciu. Zaraďujú sa v pravidelných intervaloch ako vzorky zabezpečenia kvality k meraniu série reálnych vzoriek niekoľkokrát do roka podľa potreby. Chemické merania naviazané na CRM poskytujú porovnateľné a medzinárodne akceptovateľné výsledky.

Otázky ku kapitole

- 1 Na základe kalibračného vzťahu z tabuľky zistíte, aká je hmotnostná koncentrácia niklu vo vode, keď bola metódou ET AAS nameraná absorbanca vzorky $A = 0,431$.

| Kalibračné roztoky niklu – ET AAS | | | | | | |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\rho(\text{Ni}) \mu\text{g/l}$ | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| absorbancia | 0,000 | 0,066 | 0,132 | 0,198 | 0,264 | 0,330 |

- 2 Ako by ste zapísali výsledok skúšky na obsah patulínu v ovocnej šťave, kde bola metódou HPLC s $\text{LOD} = 5,5 \mu\text{g/kg}$, $\text{LOQ} = 16,5 \mu\text{g/kg}$, neistotou $U = 0,007 \text{ mg/kg}$ stanovená hodnota $0,015 \text{ mg/kg}$?
- 3 Vysvetlite, na čo slúži CRM.
- 4 Akým spôsobom zapíšete výsledok merania obsahu etylalkoholu v alkoholickom nápoji, keď sa skúšobnou metódou s parametrami $\text{LOD} = 0,21$, $\text{LOQ} = 0,63$ a neistotou $U = 0,41$ objemových percent zistila hodnota $11,89$ objemových percent?

- 5 Zistíte hmotnostnú koncentráciu železa v neznámej vzorke, pri ktorej bola zistená absorbanca $A(\nu_z) = 0,129$, nameraná metódou FLAME AAS s kalibračným vzťahom $A = 0,04983 \rho \text{ (mg/l)} + 0,005$.

Odpovede sú na str. 92

2. CHEMICKÉ A FYZIKÁLNO-CHEMICKÉ VYŠETROVACIE METÓDY

2.1. Chemické vyšetrovacie metódy základné

Základné vyšetrovacie metódy patria medzi klasické metódy analytickej chémie. Boli vyvinuté v 18. storočí pre požiadavky textilného priemyslu. Skúmajú zloženie daného objektu (vo forme roztoku, výluhu a pod.) prostredníctvom chemických reakcií. Vhodne zvolenými reakciami je možné zistiť prítomnosť či neprítomnosť určitých látok, t. j. kvalitatívne dokázať jednotlivé zložky v skúmanej vzorke. Taktiež umožňujú aj ich kvantitatívne stanovenie, čím poskytujú informáciu o množstve daného komponentu alebo o vzájomnom pomere viacerých zložiek. Medzi základné metódy, ktoré umožňujú dôkaz aj stanovenie skúmaných látok, patrí odmerná analýza a gravimetria.

2.1.1. Odmerná analýza

Odmerná analýza (iný názov volumetria, latinsky *volumen* - objem), je metóda založená na meraní objemu odmerného roztoku skúmadla - titračného činidla - s presne známou koncentráciou, ktoré reaguje s určovanou látkou - analytom. Skúmadlo sa postupne pridáva do roztoku vzorky so skúmanou látkou až dovtedy, kým nedôjde k úplnému ukončeniu reakcie. Tento proces sa nazýva titrácia (francúzsky *titre* – hodnota, čistota, rýdzosť). Reakcia je ukončená vtedy, keď celá stanovovaná zložka chemicky zreagovala s titračným činidlom. Z objemu spotrebovaného činidla a jeho známej koncentrácie sa podľa stechiometrie reakcie vypočíta množstvo alebo koncentrácia stanovovaného analytu.

2.1.1.1. Základ odmerného stanovenia

Základom odmerného stanovenia je chemická reakcia, ktorej priebeh musí byť:

- jednoznačný, t. j. bez vzniku vedľajších produktov, ktorý sa dá opísať chemickou rovnicou

- podľa známej stechiometrie, aby bolo možné pomocou stechiometrických koeficientov vypočítať látkové množstvo stanovovaného analytu
- kvantitatívny, aby stanovovaná zložka zreagovala celá
- dostatočne rýchly, látky musia zreagovať počas premiešavania titrovaného roztoku po prídavku činidla v niekoľkých sekundách; niektoré pomalšie reakcie sa môžu urýchliť pridaním vhodného katalyzátora
- výrazný, sledovateľný (zmena farby, tvorba zrazeniny a pod.), umožňujúci zaregistrovať koniec reakcie, kedy všetok určovaný analyt zreagoval a ďalší prídavok činidla už nemá s čím reagovať.

Podmienkam vyhovujú 4 typy reakcií, podľa ktorých sú aj metódy odmernej analýzy rozdelené:

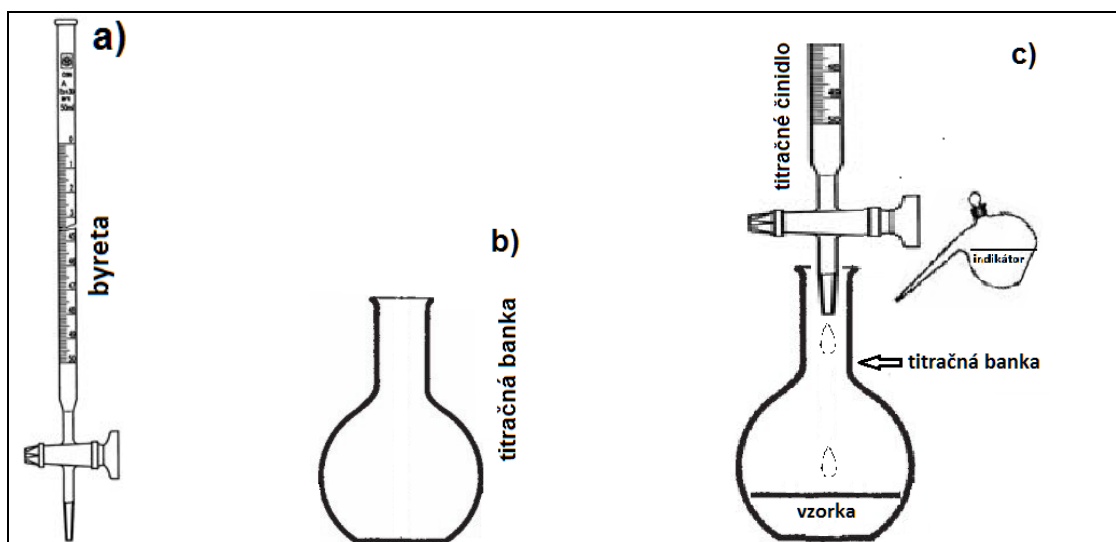
- Acidobázické titrácie (acidimetria a alkalimetria)

Sú založené na reakciách kyselín a zásad, kde základom stanovenia je výmena protónu H^+ . Sú to reakcie, kde titračným činidlom je buď roztok kyseliny so známou koncentráciou a stanovovaná látka je zásada, vtedy ide o *acidimetriu*. Alebo naopak, ak stanovovanou látkou je kyselina, titruje sa odmerným roztokom zásady so známou koncentráciou, vtedy sa jedná o *alkalimetriu*.

- Komplexotvorné titrácie, založené na tvorbe komplexných zlúčenín.
- Zrážacie titrácie, založené na vzniku málo rozpustnej zrazeniny.
- Oxidačno-redukčné titrácie, založené na výmene elektrónov medzi reakčnými partnermi, pri ktorej sa mení oxidačný stupeň látok. Ak je titračným činidlom oxidujúci roztok, ide o *oxidimetriu*, ak sa titruje redukujúcou látkou, ide o *reduktometriu*.

2.1.1.2. Zariadenia na odmernú analýzu

Na samom začiatku využívania odmernej analýzy bola meradlom objemu činidla čajová lyžička. Postupom času sa začalo používať špeciálne laboratórne sklo. Meradlom na presné meranie objemu titračného činidla sa stala byreta - sklená trubica s výpustným uzáverom, vybavená stupnicou objemov (obr. č. 15a). Roztok obsahujúci skúšanú látku je v titračnej banke (obr. č. 15b). Pri manuálnej titracii sa v titračnej banke krúživým pohybom premiešava pridávané činidlo s titrovaným roztokom (obr. č. 15c)



Obr. č. 15 Zariadenie na odmernú analýzu

V súčasnosti sa viac využívajú automatické digitálne byrety, ktoré umožňujú dávkovať aj malé dávkovacie objemy pre veľmi presnú titráciu. Titrácia nemusí byť manuálna, miešanie zabezpečuje elektromagnetická miešačka.

Ukončenie reakcie je indikované buď subjektívne - vizuálnym pozorovaním zmien v roztoku, alebo objektívne - meraním vhodnej fyzikálnej vlastnosti roztoku, napr. pH, vodivosti, absorpcie a i. Tento koncový stav reakcie sa označuje ako bod ekvivalencie alebo tiež stechiometrický bod a znamená, že pridané látkové množstvo titračného činidla je ekvivalentné látkovému množstvu prítomnej skúmanej látky.

Koncový bod reakcie sa pri vizuálnej titracii najčastejšie indikuje pomocou prídavku vhodných chemických látok - tzv. indikátorov - ku skúmanej vzorke, niekedy je možné bod ekvivalencie pozorovať aj priamo. Vizuálna titrácia vyžaduje vhodné osvetlenie pracovného miesta, napr. rozptýleným denným svetlom, priame slnečné svetlo nie je vhodné. Farebná zmena sa pozoruje proti bielemu podkladu. Vznik zákalu sa pozoruje proti tmavému podkladu.

Chemické zloženie odmerného roztoku titračného činidla sa časom môže meniť, preto je pred analýzou potrebné stanoviť jeho presnú koncentráciu. Stanovenie presnej koncentrácie činidla v odmernom roztoku sa nazýva štandardizácia. Vykonáva sa titračne pomocou látok, ktoré sú na vzduchu stále, majú definované zloženie a dobrú rozpustnosť vo vode. Označujú sa ako základné látky alebo tiež volumetrické štandardy.

2.1.1.3. Výhody a nevýhody odmernej analýzy

Výhody odmernej analýzy

Metóda poskytuje výsledky bez použitia etalónov. Patrí preto medzi priame, nezávislé metódy, v staršej terminológii označované ako absolútne. Je jednoduchá, rýchla, dostatočne presná pre koncentrácie analytov 10^{-3} až 10^{-4} mol/l, ekonomická, bez nárokov na drahú prístrojovú techniku a prevádzku.

Nevýhody odmernej analýzy

Metóda nie je vhodná na stopovú analýzu, vyžaduje dostatočné množstvo vzorky a skúseného analytika.

2.1.1.4. Príklady analytického využitia odmernej analýzy vo verejnom zdravotníctve

Ukazovatele kvality vody: stanovenie vápnika, horčíka, chemickej spotreby kyslíka, tvrdosti, kyselinovej neutralizačnej kapacity a i.

Ukazovatele kvality potravín: stanovenie chloridov (NaCl), kyslosti, stanovenie peroxidového čísla v tukoch a i.

2.1.2. Gravimetria

Gravimetrická metóda v širšom ponímaní zahŕňa metódy založené na meraní hmotnosti odseparovaných zložiek. Váženie sa už oddávna využívalo pri určovaní zloženia kovov.

Gravimetria v užšom ponímaní je vážková metóda založená na vylučovaní stanovovanej látky vo forme málo rozpustnej zlúčeniny, ktorá vhodným postupom zreaguje na zrazeninu presne definovaného zloženia. To znamená, že sa dá vyjadriť chemickým vzorcom. Jej hmotnosť sa zisťuje vážením. Z hmotnosti návažku vzorky a z hmotnosti získanej zrazeniny vo vážiteľnej forme sa na základe stechiometrických vzťahov vypočíta obsah stanovovanej látky v hmotnostných percentách.

2.1.2.1. Pracovný postup gravimetrickej metódy

Pracovný postup gravimetrickej metódy pozostáva z niekoľkých krokov:

1. Reakcia skúmanej zložky so zrážadlom

- využívajú sa špecifické alebo selektívne zrážadlá, ktoré dovoľujú izolovať danú látku aj zo zložitejšej zmesi.

2. Zrážanie

- stanovovaný analyt sa vylúči ako málo rozpustná zrazenina, ktorá musí byť vyvrážaná v čo najčistejšej a dostatočne stálej forme
- rozpustnosť zrazeniny nemôže byť pri laboratórnej teplote väčšia ako $1 \cdot 10^{-4}$ g /l.

3. Filtrácia

- zrazenina musí byť dobre filtrovateľná, aby sa izolovala z roztoku filtráciou
- používa sa filtračný papier s rôznou veľkosťou pórov alebo filtračný téglik s pórovitou vložkou – fritou, veľkosť pórov sa volí podľa potreby.

4. Premývanie

- po filtrácii sa zrazenina premýva vhodným premývacím roztokom, v ktorom je rozpustnosť zrazeniny čo najnižšia
- aby sa zrazenina opäť nerozpustila, používa sa iba nevyhnutné množstvo premývacieho roztoku - podľa druhu stanovovanej látky je to zriedený roztok zrážadla alebo destilovaná voda, príp. organické rozpúšťadla.

5. Sušenie / žihanie - úprava na vážiteľnú formu

- po premytí sa zrazenina spolu s filtrom vysuší pri danej teplote do konštantnej hmotnosti vo vopred vysušenej a odváženej navažovačke
- v niektorých prípadoch je potrebné zrazeninu nielen vysušiť, ale aj vyžíhať pri vysokých teplotách v žihacom tégliku
- po sušení/žíhaní sa zrazenina nechá vychladnúť na laboratórnu teplotu v nádobe so sušidlom - *exsikatore*, aby sa do nej nedostala vzdušná vlhkosť a prach, čo by váženie zaťažilo chybou.

6. Meranie hmotnosti – váženie

- hmotnosť sa zmeria vážením na vysoko citlivých analytických váhach.

2.1.2.2. Výhody a nevýhody gravimetrie

Výhody gravimetrie

Metóda podobne ako odmerná analýza poskytuje výsledky bez použitia etalónov. Patrí tiež medzi priame, nezávislé metódy. Je finančne nenáročná, dostatočne presná, avšak nie je vhodná pre stopovú analýzu.

Nevýhody gravimetrie

Nevýhodou je dlhý čas potrebný na analýzu, metóda tiež vyžaduje dostatočný objem vzorky a skúseného analytika.

2.1.2.3. Príklady analytického využitia gravimetrie vo verejnom zdravotníctve

Ukazovatele kvality vody: stanovenie celkových rozpustených látok, nerozpustených látok

Ukazovatele kvality potravín: stanovenie tuku

Ukazovatele kvality ovzdušia: stanovenie pevného aerosólu v ovzduší

Otázky ku kapitole

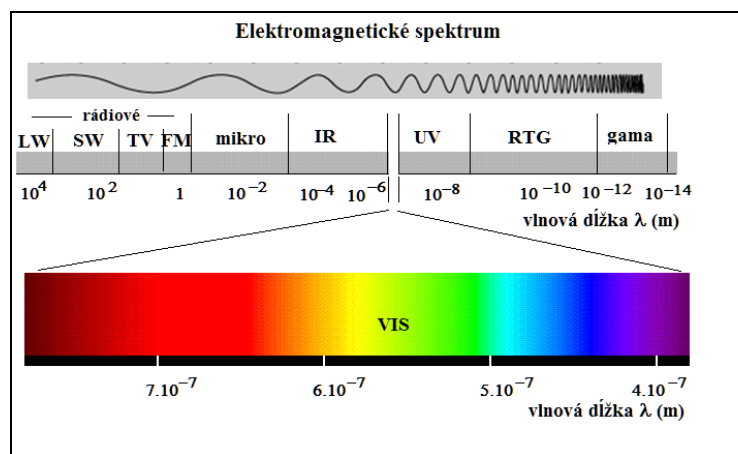
- 6 Ako sa nazýva odmerné sklo na stanovenie spotrebovaného objemu titračného činidla?
- 7 Čo je odmerný roztok?
- 8 Prečo je potrebné štandardizovať odmerné roztoky?
- 9 Môže sa vysušená alebo vyžíhaná zrazenina nechať vychladnúť na voľnom vzduchu?

Odpovede sú na str. 92

2.2. Fyzikálno-chemické metódy - optické metódy

Optické metódy využívajú interakciu atómov, molekúl a iónov analyzovanej sústavy a elektromagnetického žiarenia. Všetky elektromagnetické vlny sa šíria vo vákuu rovnakou rýchlosťou $3 \cdot 10^8$ m/s, avšak ich energia je rozdielna, je daná vlnovou dĺžkou λ . Interval všetkých vlnových dĺžok od najväčších po najmenšie sa nazýva spektrum. Z praktického hľadiska je celé spektrum rozdelené na základe vlnových dĺžok na skupiny, čo znázorňuje obr. č. 16, medzi ktorými nie sú ostré hranice. Oblasť viditeľného svetla (VIS) je len malým intervalom od 380 nm do 780 nm z celej škály vlnových dĺžok od

10^4m (rádiové vlny) až po 10^{-14}m (gama lúče). Názov spektrum (latinsky *spectrum* - obraz, úkaz) zaviedol už Isaac Newton (1643 – 1727) pri svojich experimentoch na popis farieb dúhy. Spektrum dúhy vzniká disperziou polychromatického bieleho svetla na vodných kvapkách, v meracích prístrojoch sa používajú na rozklad svetla optické mriežky a hranoly (prizmy), ako znázorňuje obr. č. 17.



Obr. č. 17 Vznik spektra disperziou na hranole

(Upravené podľa: <http://www.yorku.ca/eye/spectru.htm>)

Obr. č. 16 Elektromagnetické spektrum

(upravené podľa http://pk-info.spsepn.edu.sk/studium/ucebtext/ele/siete/elmag_vlna.pdf)

Pri interakcii elektromagnetického žiarenia so vzorkou nastávajú viaceré fyzikálne a chemické procesy. Žiarenie sa sčasti absorbuje, sčasti odráža, vyvoláva elektrónové prechody a následné emisie, vedie k chemickým reakciám atď. Povahu a veľkosť týchto zmien využíva na získanie analytických informácií o vzorkách a objektoch vedná disciplína s názvom *spektroskopia* (grécky *skopein* - skúmať, prezerať).

Začiatok modernej analytickej spektroskopie sa datuje do roku 1861 a pripisuje sa Gustavovi Robertovi Kirchhoffovi (1824 – 1887) a Robertovi Wilhelmovi Bunsenovi (1811 – 1899). Títo nemeckí prírodovedci sa zaslúžili o zdokonalenie optického prístroja spektroskopu, pomocou ktorého mohli bez rušivých vplyvov detailne skúmať charakteristické emisné aj absorpčné spektrá prislúchajúce čistým látkam. Vytvorili katalóg spektier známych prvkov, popritom objavili dva nové, pomenované po farbách svojho spektra – cézium (modrá) a rubídium (červená). Porovnávaním spektier dokázali analyzovať aj chemické zloženie slnecnej atmosféry. Poukázali aj na to, že spektrá atómov emisné aj absorpčné môžu byť základom výkonnej chemickej analýzy.

Metódy, ktoré využívajú poznatky spektroskopie, sa delia na *nespektrálne* a *spektrálne*.

2.2.1. Nespektrálne optické metódy

Pri nespektrálnych metódach nedochádza k výmene energie medzi látkou a žiarením, po interakcii dochádza k zmenám vlastností žiarenia – rýchlosť, smer, rozptyl a i.

2.2.1.1. Nefelometria, turbidimetria, refraktometria

Nespektrálna analytická metóda založená na fotometrii rozptýleného svetla sa nazýva **nefelometria** (grécky *nefele* – hmla). Na meraní rozptylom zoslabeného svetla je založená **turbidimetria** (angl. *turbid* – zakalený). Obe zákalomerné pracovné techniky sa používajú na analýzu koloidných sústav.

Pri prechode svetla z jedného optického prostredia do prostredia s inou mernou hmotnosťou sa mení jeho prieniková rýchlosť, ktorá však v praxi nie je dosť dobre merateľná. Fyzikálnym dôsledkom zmeny prienikovej rýchlosti je zmena smeru prieniku lúčov, čo sa prejaví ako lom na rozhraní dvoch optických prostredí. Pre túto situáciu je definovaný *index lomu*, ktorý využíva **refraktometria** (angl. *refraction* – lom). Index lomu je pri stálych podmienkach fyzikálnou konštantou látky, možno ho preto využiť na identifikáciu.

2.2.1.2. Príklady analytického využitia nespektrálnych metód vo verejnom zdravotníctve

- Ukazovatele kvality potravín: stanovenie cukrov v sladených nápojoch a sirupoch refraktometricky

2.2.2. Spektrálne optické metódy

Pri spektrálnych metódach dochádza k výmene energie medzi látkou a žiarením.

Podľa toho, či sa analytická informácia získava pri absorpcii (pohlcovaní) fotónov alebo pri vzniku, čiže emisii (vyžiarení) fotónov, jedná sa o absorpčnú alebo emisnú spektrálnu analýzu. Podľa povahy skúmanej látky sa spektroskopia tiež delí na atómovú a molekulovú.

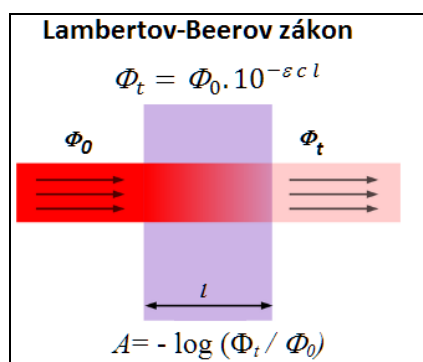
2.2.2.1. Analýza založená na molekulovej absorpčnej spektrometrii

Spektrofotometria vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti

UV/VIS spektrofotometer využíva svetlo s vlnovými dĺžkami od 185 po 700 nm.

Energia fotónov z viditeľnej a ultrafialovej oblasti spektra je dostatočne veľká na to, aby pri interakcii s molekulou spôsobila zmenu elektrónového stavu danej molekuly. Pri absorpcii svetla nastáva interakcia elektrickej zložky žiarenia s elektrickým poľom molekuly, ktoré je tvorené elektrónmi pohybujúcimi sa okolo jadier atómov. Elektróny sa pohybujú v orbitáloch, ktorých energie sú kvantované. Ak elektróny zaberajú najnižšie energetické stavy, sú v *základnom stave*. Aby došlo k absorpcii svetelného žiarenia, musia byť schopné po prijímaní fotónovej energie prejsť na vyššie energetické hladiny – do *excitovaného (vzbudeného) stavu*, čím sa zvýši vnútorná energia molekuly o hodnotu, ktorá odpovedá rozdielu hornej a dolnej energetickej hladiny. Excitovaný stav je nestabilný, molekuly sa vrátia opäť do základného stavu. Pravdepodobnosť uskutočnenia prechodu elektrónov určuje *mólový absorpčný koeficient* ε danej látky, veličina charakteristická pre každú hmotu.

Základom pre kvantitatívnu analýzu založenú na meraní absorpcie žiarenia je Lambertov-Beerov zákon. Platí pre zriedené roztoky, kde možno zanedbať zmenu indexu lomu so zmenou koncentrácie meraného roztoku. Vystihuje ho obr. č. 18 a vzťah (1.3):



Obr. č. 18

Lambertov-Beerov zákon

(Upravené podľa: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/.../Spectrophotometry)

Lambertov-Beerov zákon

$$\Phi_t = \Phi_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l} \quad (1.3) \quad \varepsilon \quad - \text{mólový absorpčný koeficient danej látky (l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$$

Φ_0 - žiarivý tok na vstupe do vzorky

Φ_t - žiarivý tok vystupujúci zo vzorky

l - optická dráha lúča vo vzorke - hrúbka kyvety (cm)

c - koncentrácia absorbujúcej zložky (mol.l⁻¹)

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (1.4) \quad A \quad - \text{absorbancia - bezrozmerná veličina používaná na popis absorpcie}$$

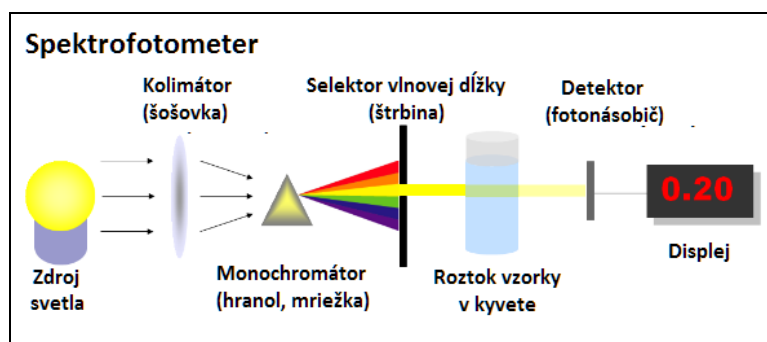
$$A = -\log(\Phi_t / \Phi_0)$$

Zo vzťahu (1.4) vyplýva, že absorbancia A je pre určitý skúmaný roztok pri konštantnej hrúbke kyvety l s použitím monochromatického žiarenia úmerná koncentrácii c skúmanej látky, ktorej prislúcha mólový absorpčný koeficient ε . Grafické znázornenie závislosti absorbancie a vlnovej dĺžky pre daný roztok sa nazýva *absorpčné spektrum*, má tvar *absorpčnej krivky*. Na absorpčnej krivke sa hľadá poloha, pri ktorej je absorpcia najväčšia, tzv. *absorpčné maximum*. Poloha odpovedá vlnovej dĺžke, ktorá spravidla slúži na stanovenie cieľového analytu.

Prvé UV/VIS spektrofotometre sa začali vyvíjať od 30-tych rokov minulého storočia najmä pre výskum vitamínov v strave, o ktorých sa predpokladalo, že absorbujú svetlo z UV oblasti. V tom čase bol proces analýzy ešte veľmi zdĺhavý a málo presný. V roku 1940 bol uvedený prvý komerčne dostupný laboratórny prístroj, vyvinutý Arnoldom Orvillom Beckmanom (1900 – 2004), americkým chemikom a vynálezcom, ktorý zjednodušil, urýchlil a zlepšil presnosť metódy.

Aj keď sa moderné UV/VIS spektrometre výrazne líšia od prvých, všetky pracujú na rovnakom princípe. Zdrojom žiarenia pre viditeľnú oblasť je volfrámová alebo halogénová lampa, nevýhodou volfrámovej je jej nižšia životnosť. Zdrojom žiarenia pre UV oblasť je vodíková alebo deutériová lampa.

Optickým hranolom alebo mriežkou sa svetlo zo zdroja rozloží a pomocou štrbiny sa z polychromatického spektra odfiltruje nepotrebné žiarenie. Vzorkou potom prechádza monochromatický zväzok ultrafialového alebo viditeľného svetla s vybranou vlnovou dĺžkou. Meria sa rozdiel intenzity pred vstupom a po výstupe zo vzorky. Kyvety na meranie v UV oblasti sú kremenné, na meranie vo viditeľnej oblasti postačuje sklený materiál. Množstvo absorbovaného svetla zodpovedá koncentrácii absorbujúcej zložky vo vzorke. Schematický náčrt spektrofotometra znázorňuje obr. č. 19.



Obr. č. 19

Schematický náčrt
spektrofotometra

(Upravené podľa: chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook..._Kinetics/Spectrophotometry)

Intenzita žiarenia dopadajúceho na detektor je okrem stanovovanej absorbujúcej zložky ovplyvnená aj absorpciou a odrazom na stenách kyvety, v rozpúšťadle a v optike prístroja. Na kompenzáciu tohto vplyvu sa meranie vykonáva vzhľadom na porovnávací roztok. Porovnávacím roztokom je slepá vzorka bez prítomnosti analytu, pri ktorej sa predpokladá rovnaký prejav vplyvov ako aj pri roztoku vzorky.

Mólový absorpčný koeficient ε vyjadruje absorbanciu roztoku danej zlúčeniny s koncentráciou 1 mol.l^{-1} , v kyvete s optickou dráhou (hrúbkou) 1 cm. Bežne sa jeho hodnota nezisťuje, väčšinou sa spoľahlivo používa metóda kalibračnej krivky za použitia štandardov o známej koncentrácii. Z nameraných hodnôt absorbancií sa zistí matematický model vzťahu $A = f(\rho)$, kde A je absorbancia a ρ je hmotnostná koncentrácia. Moderné meracie zariadenia umožňujú vložiť parametre kalibračnej krivky do pamäte prístroja. Platnosť Lambertovho-Beerovho zákona sa overuje zisťovaním linearitu kalibračnej krivky.

Príprava vzorky

K analýze sa pripraví presne definovaný podiel vzorky, ktorý sa spracuje príslušným postupom do kvapalného stavu so známym objemom.

Výhody a nevýhody UV/VIS spektrofotometrie

Výhodou UV/VIS spektrofotometrie je jej široká oblasť použitia na analýzu organických aj anorganických látok. Mnohé jej aplikácie sú vysoko citlivé, pri iných je možné citlivosť zvýšiť použitím kyviet s väčšou optickou dráhou. Samotné meranie je pomerne rýchle, najbežnejšia prístrojová technika nie je príliš finančne nákladná v porovnaní s inými inštrumentálnymi metódami.

Nevýhodou je, že metóda si vyžaduje prevod pevnej vzorky do roztoku. Príprava vzorky je pri niektorých postupoch pomerne náročná a zdĺhavá. Analytická vzorka niekedy nie je stabilná, môže sa meniť v čase, preto je často potrebné dodržiavať presne stanovený čas merania.

Príklady analytického využitia spektrofotometrickej metódy vo verejnom zdravotníctve

- Ukazovatele kvality potravín: stanovenie dusitanov a dusičnanov v mäse a mäsových výrobkoch, dusičnanov v zelenine, histamínu v rybacom mäse a konzervách a i.
- Ukazovatele kvality vody: stanovenie dusitanov, dusičnanov, fosforečnanov, kyanidov, tenzidov a i.

Otázky ku kapitole

- 10 Je nevyhnutné k meraniam zaraďovať slepú vzorku?
- 11 Je výhodnejšie použiť na kalibračnú krivku štandardy, ktoré nemuseli prejsť všetkými krokmi prípravy ako vzorka?
- 12 Môže sa pomocou UV/VIS spektrofotometra merať absorbancia bezfarebnej látky?
- 13 Je možné použiť pre merania v UV oblasti sklené kvety?

Odpovede sú na str. 92

Ukážka spektrofotometrickej metódy je v prílohe A

2.2.2.2. *Analýza založená na atómovej absorpčnej spektrometrii*

Atómová absorpčná spektrometria AAS

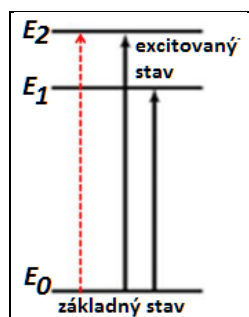
V praxi sa už v 30-tych rokoch 20. storočia využívali absorpčné spektrá *molekúl*. Aj *emisné* spektrá atómov mali už v tom čase svoje využitie, najmä pre účely metalurgického priemyslu. Napriek tomu, že Kirchhoff a Bunsen ešte v 19. storočí zistili, že pre stanovenie kovov je výhodné aj *absorpčné* spektrum *atómov*, myšlienka jeho praktického využitia ostala dlho v úzadí. Túto pracovnú techniku zaviedol v roku 1952 v Austrálii britsko-austrálsky fyzik Alan Walsh (1916 – 1998), ktorý si uvedomil výhody využitia absorpčných spektier pre atómy. Prvý komerčne dostupný prístroj AAS bol uvedený až v roku 1958.

Analytická informácia pre metódu AAS je založená na *absorpcii žiarenia voľnými atómami* stanovovaného prvku. Mierou koncentrácie voľných atómov elementu je úbytok žiarenia pohlteneho touto látkou. Meraný signál vzniká pri elektrónových prechodoch v atómoch.

Pre každý prvok sú po prijímaní energie charakteristické rozdiely energií medzi jednotlivými elektrónovými stavmi. Prechod z nižšej energetickej hladiny elektrónu na vyššiu nie je spontánny, ale je vynútený prítomnosťou žiarenia s vhodnou vlnovou dĺžkou, pričom sa selektívne absorbuje časť žiarenia. V súlade s Kirchhoffovým zákonom atóm najsilnejšie absorbuje fotóny tej vlnovej dĺžky, ktoré je schopný sám najsilnejšie vyžarovať. Energia prijatých fotónov musí odpovedať energetickému prechodu valenčného elektrónu v základnom stave na niektorú vyššiu hladinu. V praxi je táto

situácia vyriešená, keď zdrojom fotónov s potrebnou vlnovou dĺžkou je rovnaký prvok umiestnený v katóde lampy.

Na to, aby sa zabránilo interferenciám elektrónových prechodov s vibračnými a rotačnými prechodmi v molekule, ktoré sú z hľadiska atómovej spektrometrie nevhodné, interakcia žiarenia so vzorkou sa vykonáva v rozžeravenom plyne. Vtedy dochádza v molekulách k prerušeniu chemických väzieb, ióny sú redukované príjmom elektrónov zo spaľovania a vznikajú voľné atómy. Na splyňovanie vzorky a tým disociáciu jej molekúl na atómy sa využíva plameň, ktorý dosahuje podľa druhu paliva (najčastejšie acetylén) a oxidovadla (vzduch, oxid dusný) teplotu 2 000 až 3 150 K alebo bezplameňový grafitový atomizér, ktorý sa elektricky zahreje až na 4 000 K. Pri týchto teplotách sa prevažná časť voľných atómov väčšiny prvkov nachádza v základnom energetickom stave E_0 a pohltením fotónu sa dostáva na niektorú z vyšších hladín E_x , čo je znázornené na obr. č. 20. V AAS majú najväčšiu pravdepodobnosť prechody medzi základným stavom E_0 a najbližším excitovaným stavom E_1 . Týmto prechodom odpovedajú tzv. základné rezonančné čiary, ktoré sú pre atómy jednotlivých prvkov najcitlivejšie a charakteristické.



Obr. č. 20 Elektrónové prechody pri AAS

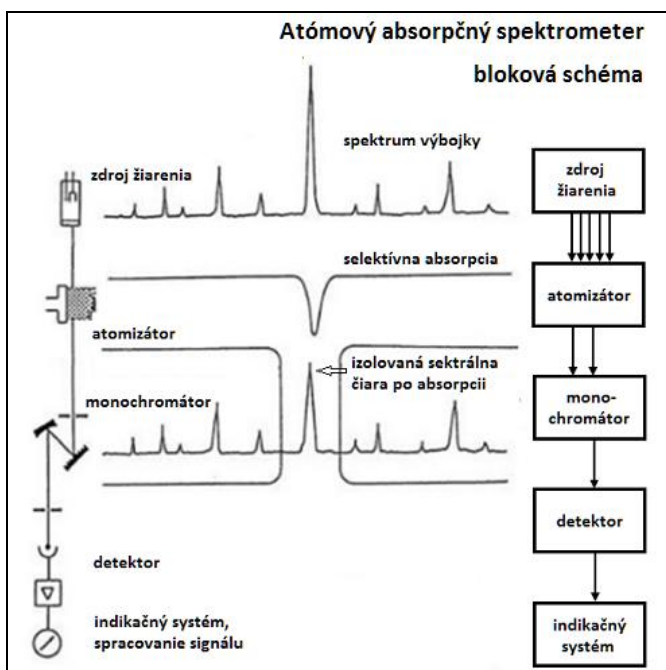
Prechod elektrónu v základnom stave E_0 na vyššie energetické hladiny E_1 a E_2 po prijíme energie

Po absorpcii fotónu v AAS je pravdepodobný prechod $E_0 - E_1$
Pri AAS sa sleduje úbytok energie, ktorá spôsobila elektrónový prechod

Absorpciu žiarenia pri danej vlnovej dĺžke možno vyjadriť pomocou absorbancie A , jej vzťah s hrúbkou absorbujúceho prostredia a jeho koncentráciou je daný Lambertovým-Beerovým zákonom $A = \varepsilon \cdot l \cdot c$ (vzťah 1.4), kde l je hrúbka absorbujúcej vrstvy, c je počet atómov v základnom stave a konštanta ε je mólový absorpčný koeficient, charakteristický pre absorbujúci prvok. To znamená, že čím je vyššia koncentrácia sledovanej látky, tým menej svetla sa deteguje v meracom systéme.

Zariadenie pre atómovú absorpčnú spektrometriu

V súčasnosti sa vyrábajú prístroje AAS najrôznejšej konštrukcie. Vo všeobecnosti sa zariadenie skladá zo zdroja žiarenia, atomizátora, monochromátora, detektora a indikačného systému, ktorý spracúva a vyhodnocuje analytickú informáciu. Schematický náčrt atómového absorpčného spektrometra je na obr. č. 21.



Obr. č. 21

Schematický náčrt atómového absorpčného spektrometra

Časti atómového absorpčného spektrometra

1. Zdroj žiarenia
2. Atomizátor
3. Monochromátor
4. Detektor
5. Indikačný systém

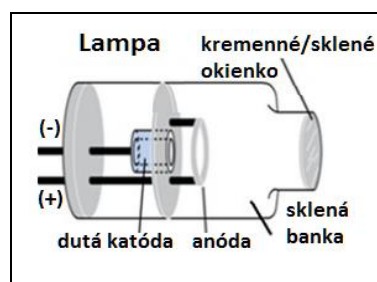
(Upravené podľa: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=2304&typ=html)

Zdroj žiarenia – znázorňuje obr. č. 22

Obr. č. 22

Najbežnejším zdrojom žiarenia v AAS je výbojka s dutou katódou. Je to evakuovaná sklená trubica naplnená argónom alebo neónom. Katódou je dutý kovový valček z rovnakého kovu, aký sa má stanovovať. Po vložení elektrického napätia emituje cez okienko úzke spektrálne čiary s vlnovými dĺžkami charakteristickými pre analyzovaný element.

Zdroj žiarenia



(Upravené podľa: <https://slideplayer.com/slide/5779677/>)

Atomizátor

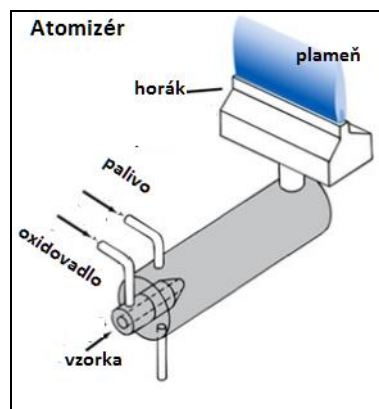
Podľa druhu použitého atomizátora sa metóda AAS delí na:

- a) Plameňovú (angl. *Flame Atomic Absorption Spectrometry*, skratka FL AAS)
- b) Bezplameňovú (angl. *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*, skratka ET AAS)
- c) Hydridovú (angl. *Hydride generation Atomic Absorption Spectrometry*, skratka HG AAS)

a) **Atomizátor pre plameňovú AAS – horák** (obr. č. 23)

Obr. č. 23 Horák pre AAS

Najbežnejšie sa atomizuje kvapalná vzorka. V prípade plameňovej AAS je absorpčným prostredím vysokoteplotný plameň horáka, najčastejšie so štrbinovým ústím, do ktorého sa nasáva vzorka v podobe aerosólu. V prostredí plameňa sa rozpúšťadlo odparí, vzorka sa atomizuje, pričom vznikajú voľné atómy v základnom stave. Tie sú schopné absorbovať spektrálne línie emitované zo zdroja žiarenia.



(Upravené podľa: <https://slideplayer.com/slide/5779677/>)

b) **Atomizátor pre bezplameňovú, elektrotermickú AAS – grafitová piecka**

Na zachytenie veľmi nízkych stopových koncentrácií prvkov sa vzorky atomizujú v pieckach. Potrebné teplo sa dodáva elektrickým rozžeravením grafitovej kyvety v tvare trubičky, do ktorej sa dávkuje niekoľko mikrolitrov vzorky. Teplotným programom sa vzorka v ochrannej dusíkovej alebo argónovej atmosfére najprv termicky upravuje. V prvom, *sušiacom kroku* sa zbaví rozpúšťadla a so stúpajúcou teplotou sa v *spaľovacom kroku* zbaví možného organického podielu. V treťom, *atomizačnom kroku* prudkým zvýšením teploty na niekoľko sekúnd bez prístupu inertného plynu dochádza k atomizácii a absorpcii žiarenia. Spaľovacie a atomizačné teploty sa zistia z rozkladných a atomizačných kriviek.

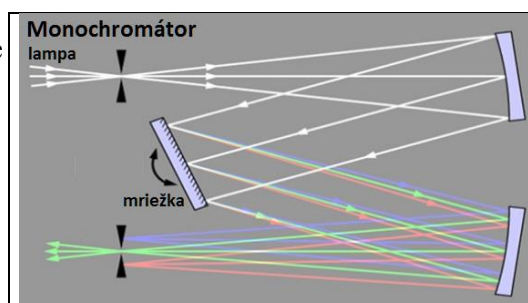
c) **Atomizátor pre hydridovú AAS – vyhrievaná kremenná trubica v tvare písmena T**

Používa sa na stanovenie hydridotvorných prvkov, ako je arzén, selén, antimón, ktoré sa z matrice vzorky uvoľňujú po chemickej reakcii vo forme prchavého hydridu. Prúdom nosného plynu (dusík, argón) sa privádzajú do atomizátora.

Monochromátor (obr. č. 24)

Obr. č. 24 Monochromátor

Monochromátor selektuje a filtruje spektrálne línie vystupujúce z lampy pomocou mriežky alebo prizmy nastavenej pod uhlom. Nastavenie uhla vyčleňuje presnú vlnovú dĺžku, ktorá prechádza výstupnou štrbinou cez vzorku do detektora.

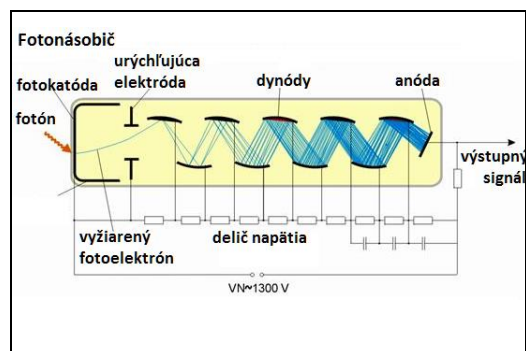


(Upravené podľa: <https://slideplayer.com/slide/5779677/>)

Detektor (obr. č. 25)

Na detekciu sa bežne používajú fotoelektrické násobiče, ktoré premenia veľmi slabý záblesk na merateľný elektrický prúd. Po dopade fotónov na fotokatódu sa z nej uvoľnia elektróny, ktoré po urýchlení elektrickým poľom po dopade na najbližšiu z kaskády elektród emitujú nové, sekundárne elektróny. Každá ďalšia elektróda spôsobuje so zvyšujúcim sa napätím zväčšenie fotoprúdu emitujúcich elektrónov.

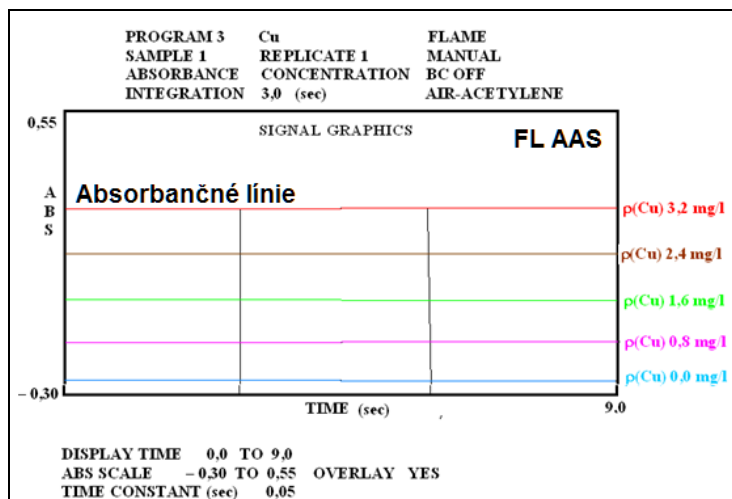
Obr. č. 25 Detektor



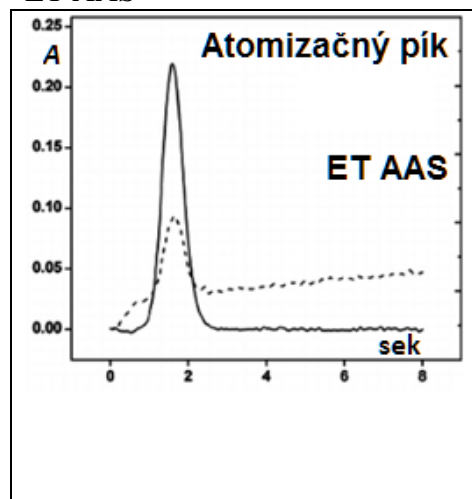
(Upravené podľa: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/747-fotonasobic>)

Odozva detektora pri plameňovej AAS je v tvare *linie*, ktorej poloha v určitej výške na osi y odpovedá absorbancii, (obr. č. 26), zatiaľ čo odozva pri bezplameňovej AAS je v tvare ostrého *atomizačného píku*, absorbancia sa spravidla zisťuje z výšky píku, v niektorých prípadoch z plochy píku (obr. č. 27).

Obr. č. 26 Odozva detektora pre FL AAS



Obr. č. 27 Odozva detektora pre ET AAS



Pri ET AAS sa takmer celé nadávkované množstvo vzorky zúčastňuje na absorbancii primárneho žiarenia. Táto skutočnosť zaručuje vyššiu koncentráciu voľných atómov v plynnej fáze v malom objeme atomizátora. Elektrotermická metóda preto dokáže zaregistrovať oveľa nižšie koncentrácie prvkov oproti plameňovej AAS, pri ktorej efektívnosť disociácie na účinné atómy je nižšia. Na dosiahnutie lepších spodných limitov sa niekedy používa koncentrátor umiestnený nad horákom.

Vyhodnotenie signálu

Metódy AAS patria medzi porovnávacie, pre ktoré je potrebné určiť závislosť medzi veľkosťou signálu a koncentráciou stanovovanej zložky pomocou štandardov. Zisťuje sa kalibračný vzťah $A = f(\rho)$, kde A je absorbancia a ρ je hmotnostná koncentrácia. Na elimináciu vplyvu chemikálií, rozpúšťadiel a prostredia sa vždy pripravuje aj slepé stanovenie.

Príprava vzorky na analýzu

Najbežnejšou prípravou vzorky je rozklad. Účelom je odstránenie organickej matrice a kvantitatívne prenesenie analytu do roztoku. Rozklad môže byť čiastočný alebo úplný. Pri čiastočnom rozklade sa uvažovaná forma analytu vylúhuje zo vzorky do vhodného rozpúšťadla a reprezentuje iba rozpustný, voľnejšie viazaný podiel z celku.

Cieľom pri úplnom rozklade – mineralizácii – je úplné rozrušenie organickej matrice, aby sa získal celý podiel analytu. K úplnému rozkladu dochádza buď *mokrou cestou* pôsobením agresívneho prostredia minerálnych kyselín, ako je kyselina dusičná, sírová a i., alebo *suchou cestou* pôsobením tepla, prípadne pôsobením oxidačnej zmesi plynov v špeciálnom zariadení. Zvyšok po mineralizácii sa rozpustí do roztoku, v ktorom možno stanoviť kovy aj v stopových množstvách. Stupeň výťažnosti je ovplyvnený voľbou podmienok rozkladu, je dôležité, aby mineralizácia bola dostatočne účinná a zároveň aby nedošlo k úniku prechavejších analytov pri vysokých teplotách. Účinnosť rozkladu môže podporiť aj zvýšený tlak a aplikácia mikrovlnného žiarenia.

Niektoré typy prístrojov umožňujú meranie pevného skupenstva vzorky vo forme suspenzie prášku, tzv. *slurry technika* (angl. *slurry* - riedka kaša).

Príklady analytického využitia atómovej absorpčnej spektrometrie vo verejnom zdravotníctve

- Ukazovatele kvality potravín: stanovenie kovových prvkov - olovo, kadmium, nikel, arzén a i.
- Ukazovatele kvality vody: stanovenie kovových prvkov – olovo, kadmium, železo, chróm, nikel, mangán, meď, arzén, antimón a i.
- Ukazovatele kvality predmetov bežného užívania: stanovenie kovových prvkov – olovo, kadmium, zinok a i.

- Ukazovatele kvality výživových doplnkov: stanovenie kovových prvkov – železo, zinok, selén a i.
- Ukazovatele kvality pracovného ovzdušia: stanovenie kovových prvkov – olovo, nikel, mangán, meď, chróm a i.

Výhody a nevýhody metódy AAS

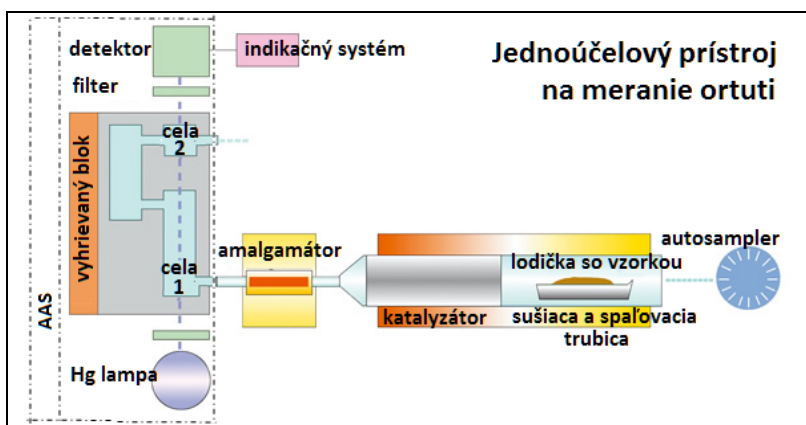
Výhodou je vysoká schopnosť detekcie a stanovenia prevažnej časti kovov, metaloidov a niektorých nekovov (bór, fosfor), vysoká selektivita, rýchla analýza, spoľahlivé výsledky.

Nevýhodou je, že metóda si spravidla vyžaduje kvantitatívne prenesenie pevnej vzorky do roztoku, vysoké nároky sú na čistotu chemikálií, v danom čase sa meria len jeden prvok, používa sa väčší počet výbojok - pre každý prvok (prípadne malú skupinu prvkov) samostatná výbojka. Pri ET AAS je potrebná korekcia absorpcie rušivého pozadia a modifikátory na dokonalejšie odstránenie zložiek matrice a stabilizáciu prchavých analytov. Prístrojová technika a nároky na chemikálie sú finančne pomerne náročné.

Jednoúčelový prístroj na meranie ortuti

Špeciálny prípad aplikácie atómovej absorpčnej spektrometrie je priame stanovenie ortuti v organických aj anorganických, kvapalných aj pevných vzorkách bez potreby chemickej úpravy. Jednoúčelový prístroj (obr. č. 28) sa nazýva DMA, TMA príp. AMA (angl. *Direct Mercury Analyzer, Trace Mercury Analyser, Advanced Mercury. Analyser*). Táto technika využíva prekoncentráciu ortuti amalgamáciou na grafitovej kyvete potiahnutej zlatom, príp. platinou.

Nosným plynom je kyslík. Spravidla postačuje hmotnosť vzorky približne 0,25 g. Meraná vzorka sa vsúva do spaľovacej trubice, kde dochádza v prúde kyslíka k termickému rozkladu. Plynné produkty prechádzajú cez katalyzátor, kde je dokončená oxidácia a kde sú zachytené rušivé látky kyslej povahy. Plynné produkty sú ďalej vedené prúdom kyslíka cez amalgamátor, kde dochádza k selektívnemu zachyteniu a nakoncentrovaniu ortuti. Zachytená ortuť je potom uvoľnená krátkodobým ohrievaním a vedená cez meráciu celu, umiestnenú do optickej dráhy spektrometra, kde sa meria absorbancia.



Obr. č. 28

Jednouúčelový prístroj
na meranie ortuti

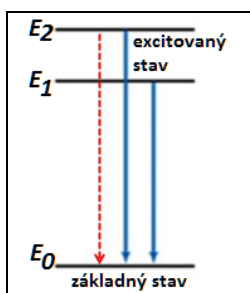
(Upravené podľa: <https://www.analytix.co.uk/mercury-analysis/solid-liquid-and-gas-analysis-systems/>)

Príklady analytického využitia vo verejnom zdravotníctve

- Ukazovatele kvality potravín: stanovenie ortuti
- Ukazovatele kvality vody: stanovenie ortuti

2.2.2.3. Atómová emisná spektrometria AES

Analytická informácia atómovej emisnej spektrometrie je založená na meraní emitovaného charakteristického žiarenia. Emisia takého žiarenia vzniká po splynení, atomizácii vzorky a budení atómov teplom. Vzorka sa meria v plynnom alebo v plazmatickom stave. Účinkom tepelnej energie z budiaceho zdroja prejde elektrón skokom do prvého excitovaného stavu E_1 , príp. do vyššieho energetického stavu. Krátko nato sa zase vráti do základného stavu E_0 , pričom sa nadbytočná energia vyžiari vo forme charakteristických čiarových spektier (obr. č. 29). Vlnové dĺžky vzniknutých spektrálnych čiar sú dôležité pre kvalitatívnu analýzu, intenzita je dôležitá pre kvantitatívnu analýzu. Na rozdiel od atómovej absorpcie nie je v zariadení potrebný žiadny zdroj žiarenia, keďže merané žiarenie tvorí emisia fotónov zo stanovovaného prvku. Potrebný je zdroj budenia, ktorý môže byť *elektrický výboj* alebo *plameň*. Plameň sa však pre svoju nižšiu energiu uplatňuje najmä na analýzu ľahko excitovateľných prvkov, ako sú alkalické kovy (sodík, draslík a i.) a kovy alkalických zemín. Dobré budiace vlastnosti má *indukčne viazaná plazma*.



Obr. č. 29 Elektrónové prechody pri AES

Prechod elektrónu zo vzbudeného stavu E_1 príp. E_2 po vyžiarení charakteristického fotónu do základného stavu E_0

Pri AES sa sleduje nárast charakteristického žiarenia

Atómová emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou - ICP

ICP AES (angl. *Inductively coupled plasma*) je rýchla analytická technika pre stopovú analýzu. Budiacim zdrojom je argónová plazma, ktorá obsahuje vysoko ionizované častice Ar^+ a elektróny. Vzniká v prúde argónu, ktorý vyteká z *plazmového horáka*. K zapáleniu a vzniku plazmy dochádza iskrovým výbojom a jej udržiavanie zabezpečuje prívod vysokofrekvenčnej energie prechádzajúci indukčnou cievkou.

Teplota plazmy je veľmi vysoká, od 6 000 K nad horákom po 10 000 K v blízkosti horáka. Pri týchto teplotách je možné získať emisné spektrá aj ťažko ionizovateľných prvkov.

Metóda je teda vhodná pre všetky kovy a niektoré nekovy, ako je bór a fosfor. Je aj *multielementárna*, umožňuje simultánne v jednom meraní spoľahlivo stanoviť vedľa seba mnohé prvky bez vzájomných rušivých vplyvov. Rovnako ako ďalšie atómové emisné techniky na rozdiel od AAS pri meraní nepotrebuje výbojky, okrem ortuťovej lampy, ktorá sa používa len na kalibráciu vlnovej dĺžky. Nevýhodou sú vyššie náklady, spotreba argónu je pomerne vysoká.

Otázky ku kapitole

- 14 Čo je spoločné pre atómovú absorpčnú a atómovú emisnú spektrometriu?
- 15 Čo je zdrojom žiarenia pri atómovej emisnej spektrometrii?
- 16 Čo je zdrojom žiarenia pri atómovej absorpčnej spektrometrii?
- 17 Je možné pri atómovej absorpčnej spektrometrii merať viacero prvkov naraz v rámci jedného merania?

Odpovede sú na str. 92

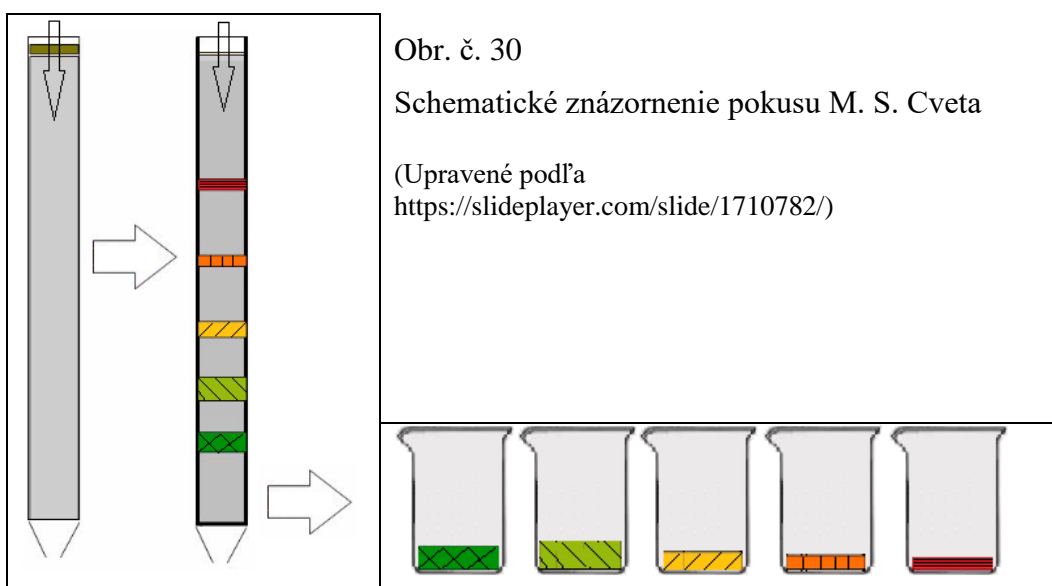
Ukážka spektrofotometrickej metódy je v prílohe B

2.3. Fyzikálno-chemické metódy - separačné chromatografické metódy

Chromatografia zahŕňa skupinu fyzikálno-chemických separačných metód, pomocou ktorých je možné deliť zmesi látok na jednotlivé zložky. Separované zložky sa distribuujú

medzi dve fázy, ktoré sú odlišné od tých, v ktorých bola zmes pôvodne prítomná. Jedna fáza je nepohyblivá – stacionárna, ktorá má schopnosť rôznou mierou zadržiavať analyzované zložky. Druhá je pohyblivá – mobilná, ktorá sa pohybuje systémom v danom smere a unáša analyzované látky.

Za zakladateľa chromatografie sa považuje Michail Semjonovič Cvet (1872 – 1919) – ruský botanik, ktorému sa v roku 1900 podarilo oddeliť prírodné listové pigmenty vyextrahované z rastlín. Do skleného stĺpca (kolóny) naplneného jemne mletým uhličitanom vápenatým (stacionárna fáza) nalial petroléterový extrakt zo zelených rastlinných listov. Po naadsorbovaní roztoku premýval stĺpec čistým petroléterom (mobilná fáza). Pôvodná zmes sa premývaním rozdelila na rad rôznofarebných pásov, ktoré sa pohybovali kolónou rôznou rýchlosťou – situáciu znázorňuje obr. č. 30. Látky, ktoré boli najsilnejšie zadržiavané na uhličitanovej stacionárnej fáze, sa pohybovali kolónou oveľa pomalšie oproti tým, ktoré boli k tejto fáze priťahované menej. To umožnilo odoberať jednotlivé oddelené zložky postupne vytekajúce z kolóny. Farebné pásy rôznych pigmentov prítomných v rastlinnom extrakte boli neskôr stanovené ako chlorofyly, xantofyly a karotenoidy.



Obr. č. 30

Schematické znázornenie pokusu M. S. Cvet

(Upravené podľa
<https://slideplayer.com/slide/1710782/>)

M. S. Cvet prezentoval výsledky svojej práce na vedeckom kongrese prírodovedcov a lekárov v roku 1901 v Petrohrade. Neskorší názov „chromatografia“ bol odvodený z gréckych slov *chromos* – farba a *grafein* – písať, nakoľko sa najprv zdalo, že taká separácia môže byť použitá len pre farebné látky. Od 30-tych rokov 20. storočia sa táto technika začala významne rozvíjať a v súčasnosti je jednou z najpoužívanějších metód na oddeľovanie nespočetného množstva rôznych látok.

Delenie chromatografických metód

Z hľadiska separačného mechanizmu sa metódy delia podľa toho, aké fyzikálno-chemické sily rozhodujú o transporte zložiek zmesi medzi mobilnou a stacionárnou fázou. Podľa dominantného deja sa chromatografia delí na *adsorpčnú*, *rozdeľovaciú*, *iónovýmennú*, *gélovú* a *chirálnu*.

- Adsorpčná chromatografia je metóda, kde prevládajú adsorpčno-desorpčné javy na povrchu stacionárnej fázy. Bez prítomnosti analytov je povrch stacionárnej fázy v styku iba s mobilnou fázou, čo znamená, že molekuly pohyblivej fázy sú viazané silou zodpovedajúcou ich adsorpčnej energii; ak sa v mobilnej fáze objaví analyt s väčšou adsorpčnou energiou, prechodne sa naadsorbuje na povrch stacionárnej fázy, pričom vytlačí predchádzajúce naviazané molekuly. K rozdeleniu zmesi dochádza, ak jednotlivé zložky majú rozdielnu adsorpčnú energiu.
- Rozdeľovacia chromatografia je založená na rozdielnej rozpustnosti látok v polyfázovom systéme. Metóda využíva vlastnosť, keď rozpustnosť zložky v stacionárnej fáze je väčšia ako v mobilnej fáze, čo sa dá dosiahnuť najmä vtedy, ak obe fázy majú rozdielnu polaritu. K rozdeleniu zmesi dochádza, ak jej jednotlivé zložky majú rozdielnu rozpustnosť, t. j. rozdielne rozdeľovacie koeficienty v systéme danej mobilnej a stacionárnej fázy.
- Pri iónovýmennej chromatografii sa skúmaný analyt vo forme nabitkej častice - iónu - zachytí na stacionárnu fázu (ionex) výmenou za iný. Častice bez náboja prechádzajú systémom bez zadržania.
- Pri gélovej chromatografii a chromatografii na molekulových sitách dochádza k deleniu zložiek na stacionárnej fáze s pórovitou štruktúrou v dôsledku rozdielnej veľkosti molekúl. Molekuly menšie ako veľkosť pórov difundujú do dutín vyplnených mobilnou fázou, čím sa zachytia a prenikajú systémom pomalšie oproti väčším molekulám unášaným mobilnou fázou, ktoré do pórov nezapadnú.
- Chirálna chromatografia má za cieľ rozdelenie optických enantiomérov t. j. rôznych stereoizomérov opticky aktívnej látky, ktoré majú identické fyzikálno-chemické vlastnosti s výnimkou otáčania roviny polarizovaného svetla. K deleniu dochádza na základe schopnosti stacionárnej fázy zachytávať práve jednu z konfigurácií.

Táto klasifikácia nie je úplná, okrem spomenutých dejov sú známe aj ďalšie mechanizmy. Tiež nie je vždy jednoznačná, pretože sa pri separácii často uplatňujú viaceré separačné princípy súčasne.

Všetky typy chromatografických metód využívajú rozdielnu distribúciu rôznych zložiek medzi obe fázy. Delenie je založené na nerovnakých fyzikálno-chemických vlastnostiach rozpustených látok v zmesi, čím dochádza k ich rôznemu zadržaniu – *retencii* - v polyfázovom systéme. Pri pohybe z jednej fázy do druhej dochádza k rozdielnej migrácii jednotlivých zlúčenín a zložky sa od seba priestorovo oddiaľujú.

Proces migrácie

V dôsledku unášania látok mobilnou fázou sa uvažovaný analyt posúva na dosiaľ ním neobsadený diel stacionárnej fázy, kde je viazaný určitými fyzikálno-chemickými silami. Tam zotrúva dovtedy, kým sa nenaruší prechodne ustálený rovnovážny stav. Po narušení rovnováhy je zo svojej pozície opäť vymytý mobilnou fázou a presunutý na ďalší diel stacionárnej fázy, kde sa opäť zdrží počas ustálenej krátkodobej rovnováhy. Takýmto opakovaným procesom sa daná zlúčenina postupne posúva po jednotlivých úsekoch, až je nakoniec zo systému úplne vymytá.

Účinnosť separácie súvisí s počtom opakovane vytvorených rovnovážnych stavov separovaných analytov medzi dvoma fázami. Čím je počet ustálených rovnováh väčší, tým je aj delenie uvažovaných zlúčenín od ostatných zložiek zmesi účinnejšie.

Z hľadiska experimentálneho usporiadania je možné chromatografiu rozdeliť na *planárnu* a *kolónovú*.

2.3.1. Planárna chromatografia

Pri planárnej t. j. *plošnej chromatografii* sa separačný proces deje na tenkej vrstve sorbentu nanesenom na plochej podložke – názov **tenkovrstvová chromatografia** (angl. *thin layer chromatography*, skratka TLC). Separácia sa môže realizovať aj na papieri, vtedy sa jedná o **papierovú chromatografiu** (angl. *paper chromatography*, skratka PC).

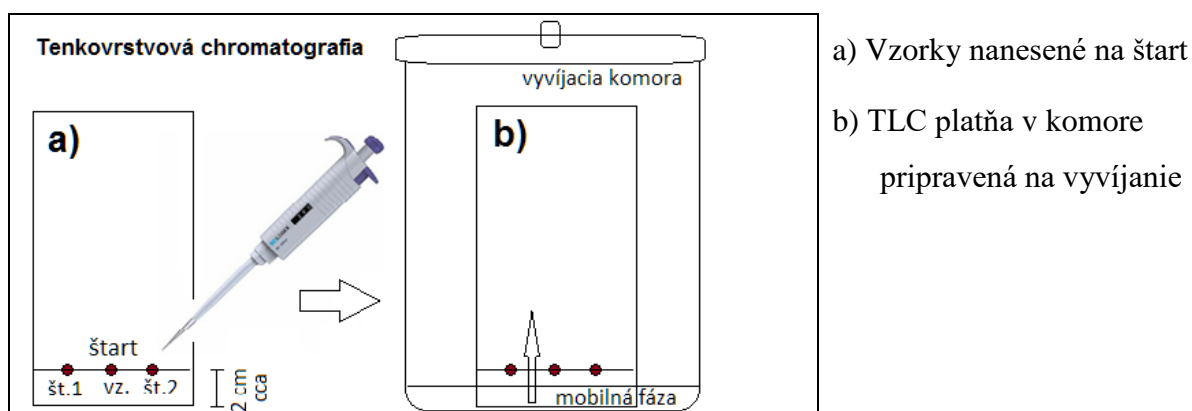
2.3.1.1. Základný systém tenkovrstvovej chromatografie

Pri tenkovrstvovej chromatografii základný systém pozostáva z TLC platne, z vyvíjacej chromatografickej komory a z organických rozpúšťadiel ako mobilnej fázy (obr. č. 31).

Dominantnú úlohu zohráva adsorpcia na povrchu stacionárnej fázy. Bežne používaným sorbentom je polárny silikagél alebo oxid hlinitý, ktorý vo forme tenkého filmu s hrúbkou 0,1 – 0,5 mm prichyteného na podložku zo skla, plastu alebo na kovovú fóliu tvorí chromatografickú platňu. Platne sa často upravujú prímiesou fluorescenčného indikátora, ktorý uľahčuje detekciu.

Pred aplikáciou vzoriek sa na chromatografickej platni naznačí štartovacia línia so zvýraznením jednotlivých bodov, do ktorých sa majú dávkovať analyzované zmesi. Vzorky a príslušné referenčné látky - štandardy - sa zvyčajne rozpustia v malom množstve prchavého rozpúšťadla. Na štart sa nanášajú mikropipetou v objemoch niekoľkých mikrolitrov, ako je to znázornené na obr. č. 31 a). Na zakoncentrovanie analytov je možné viacnásobné dávkovanie po odparení rozpúšťadla.

Separačný proces planárnej chromatografie sa nazýva *vyvíjanie*. Najčastejším spôsobom vyvíjania TLC platní je lineárna metóda, ktorá vyžaduje kontakt spodného konca platne s malou vrstvou mobilnej fázy. TLC platňa s nanesenými vzorkami a štandardami sa vloží v zvislom smere alebo v miernom uhle do *vyvíjacej komory*, ktorá sa a prikryje vekom. Jej dno je už vopred pokryté vrstvou *vyvíjacej sústavy* (mobilnej fázy), aby sa vnútorná atmosféra nasýtila parami organických rozpúšťadiel mobilnej fázy. Zloženie vyvíjacej sústavy závisí od charakteru skúšaných vzoriek. Štartovacia línia TLC platne s nanesenými vzorkami nesmie byť pri vyvíjaní ponorená pod hladinu vyvíjacej sústavy. Začiatočnú fázu vyvíjacieho procesu znázorňuje obr. č. 31 b).



Obr. č. 31 Základný systém tenkovrstvovej chromatografie

(Upravené podľa <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/thinlayer.html>)

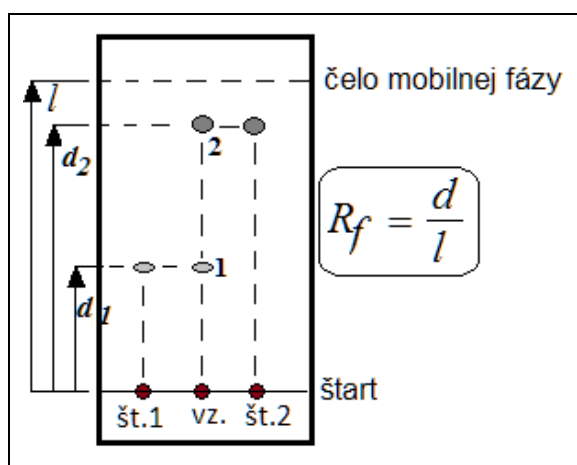
Počas vyvíjania putuje mobilná fáza vzostupne pôsobením kapilárnych síl medzi zrnami sorbentu a unáša jednotlivé zložky vzorky rôznou rýchlosťou pozdĺž deliacej vrstvy

nahor. Vyvíjanie prebieha tak dlho, pokiaľ sa čelo vzliňajúcej zmesi nepriblíži k hornému okraju platne. Vtedy sa platňa vyberie, zaznačí sa čelo mobilnej fázy a po vysušení sa lokalizujú buď priamo alebo po vizualizácii škvrny oddelených zložiek zo skúmaných zmesí látok. Ak by sa platňa naďalej ponechala vo vyvíjacej sústave, čelo mobilnej fázy by vzliňalo až po samotný horný okraj a spolu s ním by sa k okraju postupne presunuli bez rozdielu aj všetky škvrny jednotlivých zložiek.

2.3.1.2. Detekcia a hodnotenie tenkovrstvovej chromatografie

Ak sú molekuly analytov farebné, oddelené škvrny vidno voľným okom a je možné ich detegovať priamo. V prípade nefarebných látok je možné niektoré pozorovať pod zdrojom UV žiarenia, veľa ráz je však nevyhnutné použiť na zviditeľnenie škvŕn chemickú reakciu s vhodným reagenčným činidlom, aplikovaným na vysušenú platňu vo forme pár alebo postreku. Vizualizáciou škvŕn sa získa chromatogram.

Pri hodnotení chromatogramu sa meria vzdialenosť stredu škvrny od štartu, čo predstavuje vzdialenosť d , ktorú dosiahla zložka počas separácie. Tiež sa zmeria vzdialenosť l , ktorú prešla mobilná fáza od štartu, ako je to zobrazené na obr. č. 32. Obrázok znázorňuje situáciu, kde sa vzorka vz. porovnáva s dvoma štandardami št. 1 a št. 2. Vzorku tvorila zmes, ktorá sa v daných podmienkach rozdelila na dve zložky s rozdielnymi hodnotami d_1 a d_2 . Vzdialenosti d_1 a d_2 zložiek vzorky sú zhodné so vzdialenosťami d_1 a d_2 použitých štandardov.



Obr. č. 32

Hodnotenie chromatogramu TLC

- l - vzdialenosť čela mobilnej fázy od štartu
- d_1 - vzdialenosť štandardu č. 1 a zložky 1 zo vzorky
- d_2 - vzdialenosť štandardu č. 2 a zložky 2 zo vzorky

(Upravené podľa <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/thinlayer.html>)

Poloha separovanej látky a teda jej pohyblivosť sa vyjadruje hodnotou retardačného faktora R_f (faktor zdržania), ktorý je definovaný ako pomer vzdialenosti d a l podľa vzťahu (1.5).

$$R_f = \frac{d}{l} \quad (1.5)$$

| | | |
|-------|---|------------------------------------------|
| R_f | - | retardačný faktor |
| d | - | vzdialenosť stredu škvrny od štartu |
| l | - | vzdialenosť čela mobilnej fázy od štartu |

Hodnoty R_f sa pohybujú od 0 do 1. Pre látky, ktoré zostávajú blízko štartu, sa hodnota R_f blíži k nule. Pre látky, ktoré idú takmer s čelom mobilnej fázy, sa hodnota R_f blíži k 1.

Jednotlivé zložky skúmanej vzorky sa identifikujú porovnaním vypočítanej hodnoty retardačného faktora a hodnoty R_f štandardu. Na obr. č. 32 je zložka 1 identická so štandardom č. 1 a zložka 2 je identická so štandardom č. 2. Hodnota $R_f(1)$ zložky 1 je nižšia ako $R_f(2)$ zložky 2, čo znamená, že ide o rozdielne látky a zložka 1 je viac viazaná k stacionárnej fáze.

Pre dané podmienky je hodnota R_f pre určitú látku charakteristická veličina. Pri zmene fyzikálnych podmienok, ako je teplota, tlak alebo pri zmene zloženia mobilnej fázy či stacionárnej fázy sa však hodnota R_f mení. Látky je možné identifikovať aj podľa správania sa v ultrafialovom žiarení a podľa sfarbenia škvrny po postreku reagenčným činidlom.

Možnosti kvantitatívnej analýzy sú pri klasickej tenkovrstvovej a papierovej chromatografii obmedzené. Koncentráciu zložky zo vzorky je možné približne odhadnúť na základe porovnania intenzity sfarbenia jej škvrny voči referenčnej látke so známou koncentráciou. V praxi sa používajú aj iné postupy.

Výhody a nevýhody planárnej chromatografie

Veľkou výhodou je najmä jej rýchlosť a finančná dostupnosť. Je vhodná na delenie zmesí a kvalitatívne dokazovanie prítomnosti určitých zložiek alebo skupiny látok. Dovoľuje hodnotiť naraz viacero vzoriek vedľa seba na jednej platni. Pre svoju spoľahlivosť a nenáročnosť na laboratórne vybavenie je aj v súčasnosti často využívaná.

Nevýhodou je, že výsledky klasickej planárnej chromatografie sú len orientačné a získané informácie treba často potvrdiť konfirmačnými analytickými metódami.

Príklady analytického využitia planárnej chromatografie vo verejnom zdravotníctve

- Ukazovatele kvality potravín: kvalitatívny dôkaz farbív, triazínových herbicídov a i. metódou TLC

2.3.2. Kolónová chromatografia

Pri usporiadaní pre kolónovú chromatografiu sa separačný proces deje v chromatografickej kolóne naplnenej sorbentom. V klasickom experimentálnom usporiadaní ide o tzv. *stĺpcovú chromatografiu*, kde sa pracuje so sklenou rúrkou s priemerom 1 až 3 cm a dĺžkou cca 20 až 30 cm. Na dne rúrky je pórovitá fritá na zachytenie náplne a kohút, ktorým možno regulovať prietok mobilnej fázy. Do rúrky sa vpraví náplň, čím sa získa chromatografická kolóna. Mikropipetou sa nadáva vzorka a do kolóny sa začne privádzať mobilná kvapalina, ktorá najčastejšie samospádom preniká kolónou. Tento spôsob vyžaduje náplne s väčšou zrnitosťou a kratšie kolóny. Analýza trvá pomerne dlho a účinnosť separácie nie je vysoká, toto usporiadanie je možné využiť len pre rozdelenie jednoduchých zmesí. Požiadavka na efektívnejšiu a rýchlejšiu separáciu zložitejších matric podnietila rozvoj *inštrumentálnych chromatografických metód*. Prístroje, pomocou ktorých sa separácia uskutočňuje, sa nazývajú *chromatografy*.

Chromatograf pozostáva z *dávkovacieho bloku*, *chromatografickej kolóny* so stacionárnou fázou a *detektora*. K prístroju je pripojený zdroj mobilnej fázy. Zobrazenie a spracovanie údajov zabezpečuje počítač s príslušným softvérovým vybavením. Bloková schéma chromatografu je na obr. č. 33.

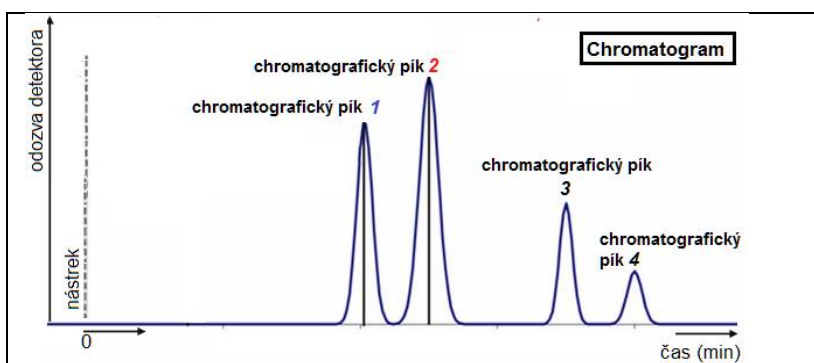


Obr. č. 33 Bloková schéma chromatografu

Grafický záznam odozvy detektora a času sa nazýva *chromatogram*. Možno ho použiť na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu a tiež na charakterizáciu separačnej účinnosti chromatografického systému.

Chromatogram obsahuje krivky, spravidla s vlastnosťami Gaussovho rozdelenia, ktoré sa nazývajú chromatografické píky. Jednotlivé píky reprezentujú izolované zložky zmesi. Z polohy píku je možné predpokladať identitu látky, plocha píku informuje o množstve tejto látky. Optimálny chromatogram je vtedy, keď sa píky navzájom neprekrývajú.

Obr. č. 34 znázorňuje chromatogram získaný analýzou štvorzložkovej vzorky, pretože chromatogram obsahuje štyri píky. Prvý z nich prislúcha najrýchlejšie vyplavenej zložke, ktorá je najmenej viazaná k stacionárnej fáze a štvrtý prislúcha zložke viazanej najdlhšie, ktorá opúšťa systém ako posledná.



Obr. č. 34 Chromatogram – grafický záznam separácie štvorzložkovej vzorky

(Upravené podľa <https://chromblog.files.wordpress.com>)

Charakteristiky, ktoré špecifikujú separovanú zložku, sú elučné údaje získané po jej vymytí z kolóny. Pre identifikáciu látky je podstatné umiestnenie maxima píku na chromatograme vzhľadom na časovú os.

Základné elučné charakteristiky v kolónovej chromatografii

K veličinám, ktoré sa zaraďujú medzi hlavné chromatografické parametre, patrí *elučný (retenčný) čas* t_R , *elučný (retenčný) objem* V_R , *redukovaný elučný (retenčný) čas* t'_R a *redukovaný elučný (retenčný) objem* V'_R .

Záchyt na stacionárnej fáze spôsobuje, že zadržaná látka migruje menšou rýchlosťou ako je priemerná rýchlosť mobilnej fázy. Molekula zložky strávi v kolóne určitý čas, ktorý sa nazýva elučný (retenčný) čas t_R . Je to čas, ktorý uplynie od okamihu nadávkovania skúmanej vzorky, až kým sa maximálna koncentrácia uvažovanej látky nevymyje z kolóny do detektora. Závisí od podmienok v kolóne, rýchlosti mobilnej fázy a rozmerov kolóny.

Elučný objem V_R prislúchajúci analytu je objem mobilnej fázy, ktorá prešla cez kolónu za jeho elučný čas t_R . Prepočet časového údaju na objem vyžaduje znalosť objemového prietoku danej mobilnej fázy a je vyjadrený vzťahom (1.6):

$$V_R = F_m \cdot t_R \quad (1.6)$$

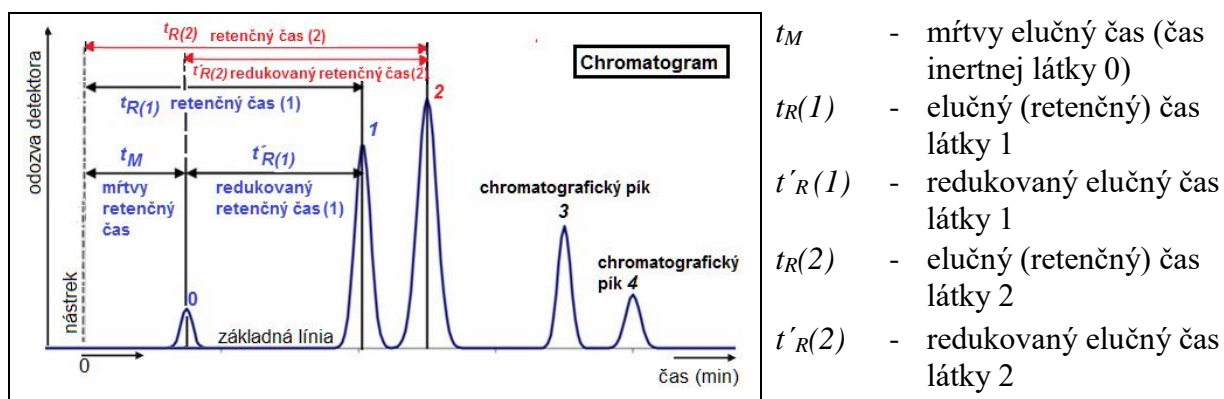
V_R - elučný objem uvažovanej látky
 F_m - objemový prietok mobilnej fázy v kolóne
 t_R - elučný čas uvažovanej látky

Elučný čas sa delí na čas, ktorý molekula strávi v mobilnej fáze a spolu s ňou preniká kolónou totožnou rýchlosťou – mŕtvy elučný (retenčný) čas t_M a čas strávený v stacionárnej fáze – redukovaný elučný (retenčný) čas t'_R , podľa vzťahu (1.7).

$$t_R = t_M + t'_R \quad (1.7)$$

t_R - elučný čas uvažovanej látky
 t_M - mŕtvy elučný čas
 t'_R - redukovaný elučný čas

Mŕtvy elučný čas t_M sa stanoví pomocou látky inertnej voči stacionárnej fáze, ku ktorej nie je priťahovaná. Pohybuje sa systémom po celý čas bez zdržania, rýchlosťou rovnakou ako mobilná fáza. Pri daných podmienkach je retenčný čas $t_{R(0)}$ takejto látky zhodný s mŕtvym retenčným časom t_M systému. Základné elučné údaje sú znázornené na obr. č. 35, pík inertnej látky je označený 0.



Obr. č. 35

Základné elučné charakteristiky v kolónovej chromatografii – mŕtvy elučný čas t_M , elučné časy t_R , redukované elučné časy t'_R (Upravené podľa <https://chromblog.files.wordpress.com>)

Redukovanému času t'_R zodpovedá redukovaný elučný objem V'_R , t. j. objem mobilnej fázy, ktorý prešiel kolónou za čas t'_R .

Identifikácia zložiek vo vzorke sa kolónovou chromatografiou najčastejšie vykonáva porovnaním elučných údajov s elučnými údajmi referenčných látok analyzovaných za podobných podmienok.

Keďže základné elučné charakteristiky závisia od viacerých faktorov, akými sú typ a dĺžka kolóny, teplota, rýchlosť mobilnej fázy, nemožno ich merať tak reprodukovateľne, aby sa mohli tabelovať a porovnávať medzi laboratóriami. Preto boli zavedené ďalšie veličiny - relatívne elučné údaje, ako kapacitný pomer k , retenčný (zbrzd'ovací) faktor R , elučný pomer $r_{i,s}$ a elučné indexy I .

Kapacitný pomer k charakterizuje distribúciu látky medzi stacionárnu a mobilnú fázu. Je definovaný vzťahom (1.8) ako pomer množstva látky v stacionárnej a v mobilnej fáze. Látkové množstvo danej zlúčeniny v stacionárnej fáze je úmerné času, počas ktorého je v tejto fáze zadržiavaná.

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1.8)$$

k - kapacitný pomer
 n_s - látkové množstvo v stacionárnej fáze
 n_m - látkové množstvo v mobilnej fáze
 t'_R - redukovaný elučný čas
 t_M - mŕtvy elučný čas

Retenčný faktor R vyjadruje relatívne zadržanie zložky v kolóne, je definovaný ako pomer rýchlostí, ktorými sa kolónou pohybuje analyzovaná látka a mobilná fáza- vzťah (1.9).

$$R = \frac{v}{u} = \frac{t_M}{t_R} \quad (1.9)$$

R - relatívny retenčný faktor zložky
 v - priemerná rýchlosť migrácie uvažovanej zložky
 t_M - mŕtvy elučný čas
 u - priemerná rýchlosť mobilnej fázy (migrácie)
 t_R - elučný čas zložky

Elučný pomer $r_{i,s}$ a je definovaný vzťahom (1.10) ako pomer redukovaného elučného času uvažovanej zlúčeniny $t'_{R,i}$ a redukovaného elučného času referenčnej látky $t'_{R,s}$:

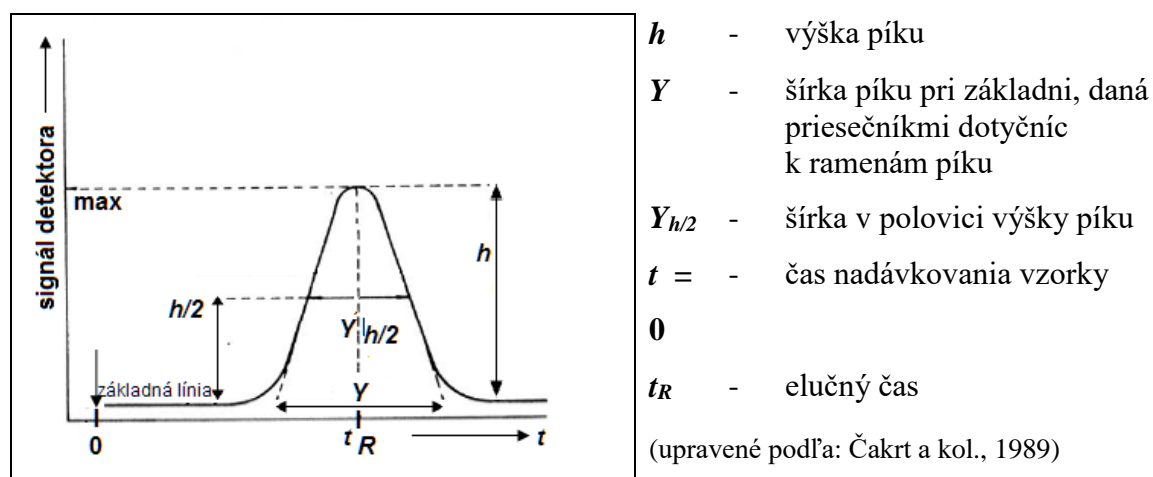
$$r_{i,s} = \frac{t'_{R,i}}{t'_{R,s}} \quad (1.10)$$

$r_{i,s}$ - elučný pomer
 $t'_{R,i}$ - redukovaný elučný čas uvažovanej zlúčeniny
 $t'_{R,s}$ - redukovaný elučný čas referenčnej látky

Elučný (retenčný) index I zlučieniny sa používa pre jej identifikáciu pomocou viacerých štandardov. Je to číslo získané spravidla logaritmickou interpoláciou redukovaného elučného času $t'_{R,i}$ uvažovanej látky (príp. iných odvodených elučných údajov) a redukovaných elučných časov dvoch hypotetických referenčných látok $t'_{R,p}$ a $t'_{R,p+1}$, ktoré by pri analýze za rovnakých podmienok boli eluované pred a po danej látke.

Kvantitatívna analýza

Základom kvantitatívnej analýzy vzorky kolónovou chromatografiou je určenie vzťahu medzi veľkosťou signálu detektora – spravidla plochou píku a obsahom skúmanej zložky. Z nameraných hodnôt plochy píkov referenčných látok sa zistí matematický model vzťahu $A = f(c)$, kde A je plocha píku a c je koncentrácia analytu. Charakteristiky píku pre výpočet plochy sú znázornené na obr. č. 36. Výsledok sa stanoví metódou kalibračnej krivky, vnútorného štandardu alebo prídavku štandardu ku vzorke.



Obr. č. 36 Charakteristiky chromatografického píku

V minulosti sa na zistenie plochy píkov využívali viaceré postupy – od rôznych výpočtových metód, cez prekresľovanie píkov z registračného zariadenia na milimetrový papier, až po váženie plôch vystrihnutých z chromatogramov. Súčasné zariadenia integrujú plochy zvolených píkov pomocou softvérov, ktorými sú vybavené.

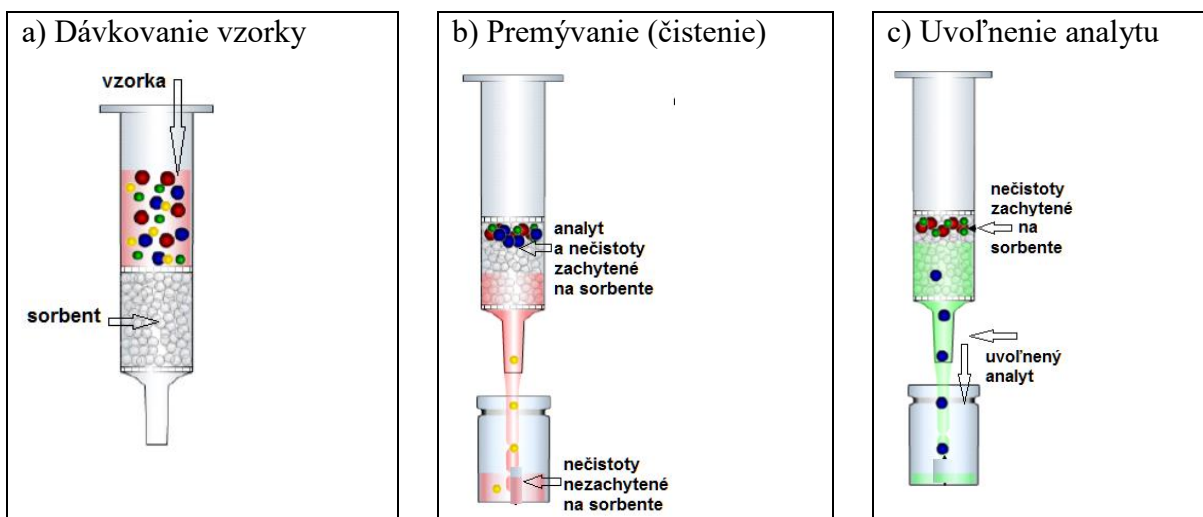
Predanalytická fáza - úprava vzoriek pre kolónovú chromatografiu

Príprava vzorky sa vykonáva najčastejšie extrakciou zložky zo vzorky do extrahovadla. Medzi rozhodujúce faktory, ktoré ovplyvňujú účinnosť procesu, patrí rozpustnosť stanovovaného analytu v extrahovadle.

Klasický spôsob prípravy vzorky je extrakcia zložky medzi dve navzájom nemiešateľné kvapaliny. Najjednoduchšou formou extrakcie látky z jednej kvapalnej fázy do druhej je pretrepávanie. Analyt spravidla rozpustený vo vodnom roztoku sa na základe lepšej rozpustnosti ochotnejšie presúva z pôvodného roztoku do kvapalného extrahovadla, najčastejšie nepolárneho alebo málo polárneho organického rozpúšťadla. Jednotlivé fázy sa od seba v oddel'ovacom lieviku oddelia. Analyzovaná zložka sa zakoncentruje tým, že sa organické rozpúšťadlo, v ktorom je rozpustená, nechá odpariť. Nevýhodou tohto postupu je jeho časová náročnosť, veľký objem použitých chemikálií a pomerne veľa nečistôt, ktoré sa extrahujú spolu s cieľovou zložkou.

V súčasnosti je trend vylúčiť používanie veľmi toxických látok, znižovať objem použitých chemikálií a skracovať dobu dosiahnutia výsledku. K šetrnému získavaniu rýchlych, spoľahlivých a presných výsledkov napomáha *extrakcia na tuhej fáze* (z angl. *Solid Phase Extraction*, skratka SPE), kde extrahovadlom je tuhá fáza. Je vhodná pre stredne prchavé a neprchavé látky. Jej cieľom je vyčistenie vzorky od nečistôt, izolácia a zakoncentrovanie požadovanej zložky z matrice do vhodného extraktu.

Pri tomto postupe sú cieľové analyty najprv rozpustené v kvapalnej fáze. Po aplikovaní vzorky sa zadržia na tuhom sorbente, ktorý tvorí náplň špeciálnych SPE kolóniek alebo je zlisovaný do membrány v tvare disku. Prípravu vzorky extrakciou SPE znázorňuje obr. č. 37. Sorbent sa vopred aktivuje - *kondicionuje* príslušným rozpúšťadlom, čím sa pripraví na interakciu so sledovaným analytom. Do pripravenej kolónky sa nadávkuje vzorka (obr. č. 37 a). Spolu s uvažovaným analytom sa zachytáva aj určitý podiel nežiaducich zložiek, ale veľký podiel matrice sa vyplavuje preč. V *premývacom kroku* sa použitím vhodného premývacieho roztoku vymyjú zo sorbentu ďalšie nečistoty (obr. č. 37 b). Premývací roztok je zvolený tak, aby nevyplavil aj sledovanú látku. Posledným krokom je uvoľnenie - *elúcia* - cieľovej látky zo sorbentu použitím selektívneho elučného roztoku (obr. 37 c).



Obr. č. 37 Príprava vzorky extrakciou SPE

(Upravené podľa: https://www.chromacademy.com/lms/sco53/Sample_Preparation_Solid_%20Phase_Extraction_Overview.pdf)

Na urýchlenie procesu sa všetky kroky dejú za použitia podtlaku v špeciálnom zariadení s názvom *manifold*, napojenom na vývev.

Viacere aplikácie v chromatografii umožňujú aj dávkovanie vzorky, ktorú netreba v predanalytickom kroku výrazne upravovať. Kvapalné vzorky v niektorých prípadoch stačí prefiltrovať a prípadne nariediť. Pri niektorých postupoch pre prchavé látky sa v špeciálnych zariadeniach môže bez akejkoľvek úpravy vzorky odobrať na analýzu len plynná časť nad uzavretou vzorkou.

Výhody a nevýhody kolónovej chromatografie

Medzi hlavné výhody chromatografie patrí, že má veľmi široké uplatnenie, má schopnosť rozdeliť mnohozložkové zmesi, dokazovať a stanovovať veľmi rôznorodé spektrum najmä organických látok v priebehu jednej analýzy. V kombinácii s hmotnostnou detekciou dokáže identifikovať mnohé neznáme komponenty a ich deriváty.

Nevýhodou je, že neexistuje univerzálna chromatografická kolóna, ktorá by sa dala použiť na všetky skupiny látok. V súčasnosti sú však vyvinuté mnohé druhy kolón, ktoré sú výkonné pre veľmi širokú skupinu látok.

Finančnú náročnosť nie je možné zovšeobecniť, nakoľko sa v závislosti od typu chromatografických aplikácií uplatňujú aj cenovo dostupné zostavy, ale aj systémy finančne veľmi náročné.

Rozdelenie chromatografie podľa skupenstva mobilnej fázy

Podľa skupenstva mobilnej fázy sa kolónové chromatografické metódy delia na:

- *plynovú chromatografiu* (angl. *gas chromatography*, skratka GC), kde mobilná fáza je plyn
- *kvapalinovú chromatografiu* (angl. *liquid chromatography*, skratka LC), kde mobilná fáza je kvapalina

2.3.2.1. Plynová chromatografia

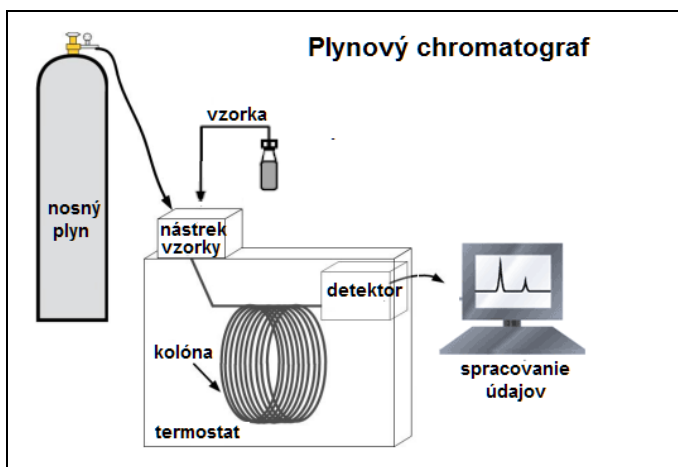
Plynová chromatografia je jednou z najdlhšie a najčastejšie používaných separačných metód. Mobilnou fázou je inertný plyn - hélium, argón, dusík a i., označovaný ako nosný plyn. Touto metódou je možné analyzovať plyny, kvapaliny, aj vhodne upravené tuhé látky.

Vzorky sa cez nástrekový vstup dávkujú do kolóny v kvapalnej forme, spravidla v objemoch od 1 do 2 μ l. Metóda však vyžaduje, aby všetky látky vstupujúce do deliaceho systému boli v plynnej fáze. Aby bolo možné analyzovať kvapalné a tuhé látky, musí sa nástrekový vstup, kolóna a detektor vyhriať na požadovanú teplotu v termostatoch. To znamená, že aj tuhé látky sa musia pri pracovnej teplote aspoň čiastočne vyparovať a nesmú sa rozkladať. Spravidla sa analyzujú látky do bodu varu cca 500 °C, počtom uhlíkových atómov do 100 a relatívnou molekulovou hmotnosťou do 1600. V niektorých prípadoch možno analyzovať aj látky neprchavé, tie však musia byť chemicky modifikované na vhodné deriváty s vyhovujúcimi vlastnosťami.

Pri analýze prchavých látok je možné plynú časť vzorky priamo dávkovať do analyzátoru pomocou zariadenia s názvom *headspace* (voľný preklad *priestor nad maticou*). Toto dávkovacie zariadenie umožňuje odobrať alikvotnú časť plynnej fázy sponad kvapalnej alebo pevnej vzorky umiestnenej v hermeticky uzavretej vialke, po jej vyhriatí na požadovanú teplotu a ustálení rovnováh.

Separčný systém plynového chromatografu sa skladá zo stacionárnej fázy zakotvenej v kolóne. V súčasnosti sa využívajú najmä kapilárne kolóny v tvare zvinutej špirály s dĺžkou 25 až 30 m, pri niektorých aplikáciách môže byť od 10 m po 150 m. Látky opúšťajúce kolónu sú detegované detektormi, od ktorých sa vyžaduje rýchla odozva, veľký rozsah, vysoká citlivosť a stabilita základného signálu. Musia byť schopné

kontinuálne monitorovať látky vystupujúce z kolóny. Schematický náčrt plynového chromatografu je znázornený na obr. č. 38.



Obr. č. 38

Schematický náčrt plynového chromatografu

(Upravené podľa https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/behind_the_scenes/meas_analyzers.html)

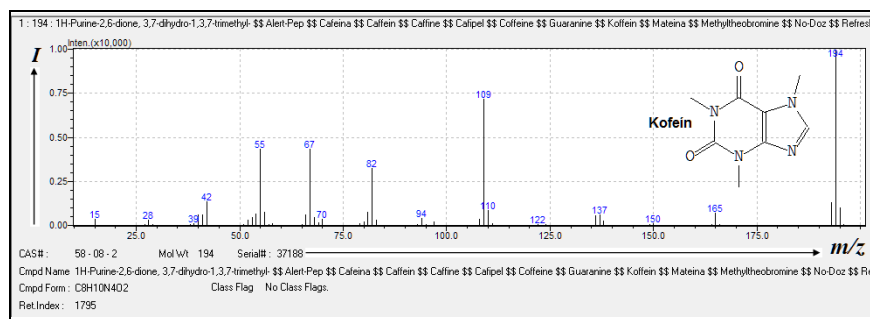
Medzi najrozšírenejšie typy detektorov patrí *plameňovo-ionizačný* detektor a *tepelnovodivostný* detektor. Veľmi výhodné na identifikáciu neznámych látok je spojenie s *hmotnostným* detektorom.

Princípom plameňovo-ionizačného detektora (z angl. *flame ionization detector*, skratka FID) je ionizácia zložiek v kyslíkovo-vodíkovom plameni, ktorý horí medzi dvoma elektródami. Na elektródy sa vkladá jednosmerné ionizačné napätie. Vodík horiaci v prúde vzduchu bez prítomnosti iných látok poskytuje len malé množstvo iónov, čo je registrované ako nulový prúd. Vstupom a spaľovaním eluovaných látok s väzbami C-H sa počet iónov zvýši a zodpovedajúci ionizačný prúd sa zaregistruje vo forme signálu. FID je teda vhodný na detekciu organických zlúčenín.

Princípom tepelnovodivostného detektora je odvod tepla z rozžeraveného odporového vlákna nosným plynom. Zmenou prostredia sa mení tepelná vodivosť vlákna a mení sa jeho odpor. Vstup látky eluovanej z kolóny spôsobí zmenu prostredia, pričom dôjde k zmene tepelnej vodivosti vlákna, a tým aj jeho odporu, čo sa prejaví vo forme signálu.

Hmotnostné detektory (angl. *Mass spectrometry*, skratka MS) umožňujú identifikáciu neznámej látky porovnávaním jej hmotnostného spektra s databázou tabelovaných spektier. V hmotnostnom detektore dochádza k ionizácii a k fragmentácii, t. j. k štiepeniu molekuly na charakteristické iónové fragmenty. Závislosť intenzity (počtu) a hmotnosti (resp. pomeru hmotnosti a náboja m/z) takto vzniknutých iónov – fragmentov - vytvára sériu čiar charakteristických pre danú látku s názvom *hmotnostné spektrum*. Náboj iónov

z je najčastejšie rovný 1, preto hmotnosti zo spektra väčšinou zodpovedajú reálnym atómovým a molekulovým hmotnostiam. Na obr. č. 39 je znázornený príklad pre hmotnostné spektrum - kofeín s charakteristickými fragmentami m/z 194, 109 a 67.



Kofeín

m/z 194

m/z 109

m/z 67

Obr. č. 39 Hmotnostné spektrum – závislosť intenzity od m/z

(Library Editor – NIST5.LIB (163,198 Spectrum))

Príklady analytického využitia plynovej chromatografie vo verejnom zdravotníctve

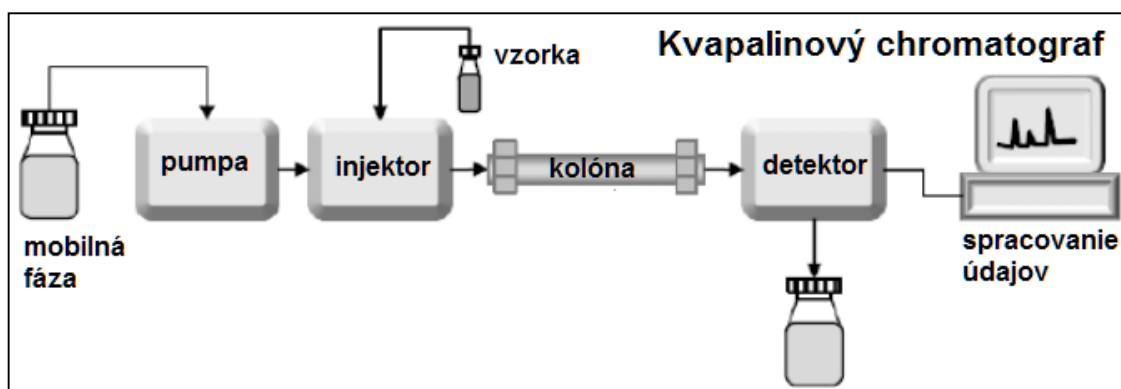
- Ukazovatele kvality potravín: stanovenie pesticídov, polychlóvaných bifenylov, metylalkoholu, etylalkoholu, a i.
- Ukazovatele kvality vody: stanovenie chlórovaných insekticídov a iných pesticídov, halogenovaných uhlíkovodíkov, prchavých organických zlúčenín – benzén, xylén, toluén a i.
- Ukazovatele kvality pracovného prostredia: stanovenie toluénu, formaldehydu, acetónu a i. prchavých organických látok

2.3.2.2. Kvapalinová chromatografia

V kvapalinovej chromatografii je mobilnou fázou kvapalina. Na rozdiel od plynovej chromatografie nie je inertná, ale výrazne ovplyvňuje separáciu zložiek. Stacionárnou fázou je nemiešateľná kvapalina alebo pevná látka. Klasické stĺpcové usporiadanie nemá potrebnú účinnosť, ale stalo sa základom pre vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu.

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z angl. *High performance liquid chromatography*, skratka HPLC), sa vyvinula zo stĺpcovej a plynovej chromatografie začiatkom 70-tych rokov 20. storočia. Vysoká účinnosť je zabezpečená stacionárnymi fázami, ktoré obsahujú malé častice pravidelného tvaru a jednotnej veľkosti, ktoré homogénne vyplňajú kolónu. Prietok mobilnej fázy zabezpečuje výkonné vysokotlakové čerpadlo.

Vzorka sa dávkuje aj stanovuje v kvapalnej forme. Preto je možné pracovať pri laboratórnej teplote a metóda je vhodná aj pre termolabilnejšie a neprchavé zlúčeniny. Kvôli reprodukovateľnosti výsledkov je však potrebná definovaná teplota, ktorú zabezpečuje termostat. Metóda umožňuje analyzovať polárne aj nepolárne látky, nízkomolekulárne aj vysokomolekulárne zlúčeniny. Schematický náčrt kvapalinového chromatografu je na obr. č. 40.



Obr. č. 40 Schematický náčrt kvapalinového chromatografu

(Upravené podľa: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-the-High-Performance-Liquid-Chromatography-HPLC-system_fig2_236146377)

Vzorky sa spravidla dávkujú v objemoch od 1 do 20 μl , chromatografické kolóny majú dĺžku od 5 do 30 cm, vývoj smeruje k ich miniaturizácii. Kolóna sa skladá z rúrkového kovového plášťa naplneného stacionárnou fázou, uzavretého na oboch koncoch poréznu kovovou fritou. Náplňou kolón je najčastejšie granulovaný materiál na báze silikagelu. Silikagél sa vyznačuje polárnymi vlastnosťami, preto je často modifikovaný naviazaním rôznych skupín. Najbežnejšie sú to uhľikové reťazce obsahujúce spravidla 18, prípadne 8 uhľikových atómov, ktoré znižujú polaritu. Na sorbent však môžu byť naviazané ďalšie funkčné skupiny, voľba vhodnej náplne závisí od vlastností skúmaných látok.

Separácia môže prebiehať izokratickou elúciou – v mobilnej fáze s konštantným zložením alebo gradientovou elúciou – v mobilnej fáze, ktorej zloženie sa behom analýzy plynulo mení podľa zvoleného programu.

Detekciu zložiek zabezpečujú viaceré druhy detektorov. Niektoré sú univerzálne a reagujú s rovnakou citlivosťou na všetky látky okrem mobilnej fázy, iné sú selektívne a reagujú len na určitú skupinu látok. Najrozšírenejšie sú *spektrometrické*, *fluorescenčné*, *refraktometrické* a *elektrolytické* detektory. Novším trendom sú *hmotnostné* detektory.

Spektrometrické UV/VIS detektory sú založené na princípe absorpcie ultrafialového alebo viditeľného elektromagnetického žiarenia v oblasti vlnových dĺžok od 195 do 700 nm. Počas analýzy prechádzajú eluované zložky čírou bezfarebnou kyvetou, tzv. prietokovou celou, ktorá je ožarovaná monochromatickým svetlom s vybranou vlnovou dĺžkou. Intenzita svetla pohlcovaná samotnou pretekajúcou mobilnou fázou bez prítomnosti iných látok je iná ako pri prechode eluentu. Detektor zaznamená rozdiel v absorpcii svetla a na výstupe vznikne grafický záznam vo forme chromatografického píku. Veľkosť signálu je daný Lambertovým-Beerovým zákonom, ktorý vyjadruje vzájomný vzťah medzi hrúbkou absorbujúcej vrstvy (závisí od rozmerov prietokovej cely), koncentráciou absorbujúcej zložky a veľkosťou absorpcie vyjadrenej ako absorbancia, ktorá súvisí s chemickou štruktúrou látky.

K UV/VIS detektorom patria aj detektory s diódovým polom (angl. *diode-array detector*, skratka DAD). Na rozdiel od klasického UV/VIS detektora, ktorý deteguje absorbanciu len pre jednu zvolenú vlnovú dĺžku počas jednej analýzy, DAD sníma opakovane vo veľmi krátkych časových intervaloch úplný rozsah vlnových dĺžok priebežne počas celej analýzy. Tento detektor nemá monochromátor, žiarenie zo zdroja dopadá na diódové pole, kde je každá fotodióda nastavená na určitú vlnovú dĺžku žiarenia z rozsahu 190 až 600 nm, v niektorých prípadoch až po 900 nm. Počet diód určuje spektrálne rozlíšenie detektora. Pre každú eluovanú zložku sa zosnímajú veľkosti absorbancií v celom intervale vlnových dĺžok a tak sa získa charakteristická spektrálna mapa - spektrogram. Na rozdiel od UV/VIS detektora s jednou fixnou vlnovou dĺžkou, kde identifikácia zložiek je možná len podľa retenčného času, pri DAD sa identifikujú zložky spoľahlivejšie, porovnaním svojich spektier s tabelovanými databázami v knižniciach.

Fluorescenčné detektory, vysoko citlivé a selektívne, registrujú fluorescenčné žiarenie skupiny látok, ktoré fluoreskujú. Ak zlúčeniny nemajú túto vlastnosť, chemickou reakciou možno z mnohých organických látok pripraviť vhodné deriváty, ktoré nadobudnú schopnosť fluoreskovať. Často sa využíva tzv. postkolónová derivatizácia, kde je reakčná špirála s činidlom umiestnená za kolónu prístroja, pred vstupom do detektora. Tam dochádza k naprogramovanému primiešavaniu reagencie k eluovaným zložkám za vzniku fluoreskujúcich derivátov.

Princípom detekcie refraktometrických detektorov je meranie rozdielov v indexe lomu eluátu a mobilnej fázy. Pretože index lomu závisí od teploty, detekčnú celu treba

termostatovať. Sú univerzálne, neselektívne a majú pomerne nízku citlivosť. Citlivosť je tým väčšia, čím je väčší rozdiel v indexe lomu analytu a mobilnej fázy.

Citlivé *elektrochemické detektory* merajú určitú elektrickú veličinu - elektrická vodivosť, elektrický náboj alebo prúd – vyvolaný prechodom látky prietokovou celou, v ktorej sú umiestnené elektródy s vloženým pracovným napätím. Sleduje sa závislosť medzi elektrickou veličinou a koncentráciou zložky, ktorá musí byť schopná elektrochemickej reakcie.

Do popredia sa čoraz viac dostávajú systémy **ultravysoko účinnej chromatografie**, (z angl. *Ultra high performance liquid chromatography*, skratka UPLC), ktoré sú vysoko účinné, aj keď používajú výrazne vyššie tlaky a skracujú dobu analýz. Tieto systémy je možné kombinovať s *hmotnostnými detektormi*.

Príklady analytického využitia kvapalinovej chromatografie vo verejnom zdravotníctve

- Ukazovatele kvality potravín: stanovenie farbív, konzervačných látok, umelých sladidiel, vitamínov, kofeínu a ďalších alkaloidov, mykotoxínov a iných organických látok
- Ukazovatele kvality vody a ovzdušia: stanovenie polycyklických aromatických uhľovodíkov

Otázky ku kapitole

- 18 Aké látky sa najčastejšie stanovujú chromatografickými metódami?
- 19 Je možné stanoviť pevné látky metódou plynovej chromatografie?
- 20 Ako pomáha dávkovacia technika headspace pri analýze neprchavých zložiek?
- 21 Kde dochádza k oddeľovaniu jednotlivých zložiek zmesi v kolónovej chromatografii?
- 22 Môže sa tenkovrstvová chromatografia použiť aj pre separáciu bezfarebných látok?

Odpovede sú na str. 92

Ukážka chromatografickej metódy je v prílohe C

2.4. Fyzikálno-chemické metódy - elektrochemické metódy

Metódy elektrochemickej analýzy sú založené na meraní elektrochemických veličín, ako je potenciál, prúd, náboj, odpor a i. Sú vhodné na stanovenie iónov v roztoku.

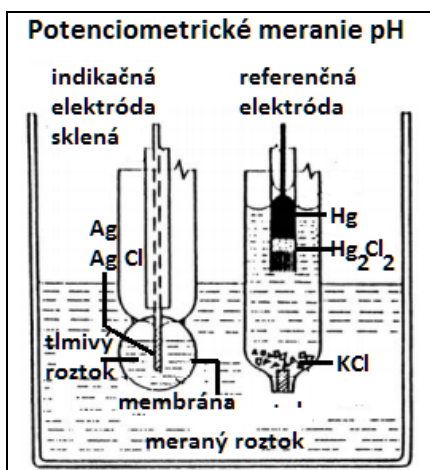
Elektrochemická veličina sa deteguje, premieňa na vhodný elektrický signál a vyhodnocuje. Do skupiny týchto metód sa zaraďuje *potenciometria* a *konduktometria*.

2.4.1. Potenciometrické meranie pH

Potenciometrické meranie pH je založené na informácii o koncentrácii vodíkových iónov H^+ , ktorá sa získa z potenciálového rozdielu medzi dvoma elektródami ponorenými do meraného roztoku.

Merania sa vykonávajú pomocou indikačnej (pracovnej) sklenej elektródy a referenčnej (porovnávacej), napr. kalomelovej elektrody, ktoré ponorením do skúmaného roztoku tvoria elektrochemický článok. Referenčná elektróda má pri danej teplote známy, konštantný, od roztoku nezávislý potenciál, zatiaľ čo potenciál pracovnej sklenej elektródy sa mení v závislosti od koncentrácie vodíkových iónov.

Sklená elektróda je vyrobená zo špeciálnych druhov skla, zvyčajne má tvar úzkej trubičky uzavretej tenkou sklenou guľovitou membránou, ktorá je schopná prepúšťať H^+ . Spravidla pozostáva z chloridostriebovej elektródy ponorenej vo vnútri sklenej trubičky do tlmivého roztoku. Sklená elektróda nereaguje na prítomnosť oxidačno-redukčných látok, ani povrchovo aktívnych látok v roztoku, je selektívna iba na ióny vodíka. Jej použitie je založené na procese, pri ktorom tenká sklená membrána, oddeľujúca vnútorný tlmivý roztok a vonkajší meraný roztok, umožňuje difúziu vodíkových iónov buď smerom dnu, pokiaľ má vnútorný roztok nižší obsah H^+ oproti vonkajšiemu, alebo smerom von do meraného roztoku, pokiaľ má vnútorný roztok obsah H^+ vyšší oproti vonkajšiemu (obr. č. 41). Difúzia prebieha až do stavu dynamickej rovnováhy, kým sa nevyrovnajú rozdielne koncentrácie vodíkových iónov oboch roztokov. Potenciál sklenej elektródy tak dosiahne rovnovážny stav úmerný koncentrácii vodíkových iónov v meranom roztoku. Keďže absolútna hodnota potenciálu sa v praxi nemeria, potenciometrom sa zisťuje rozdiel oproti referenčnej elektróde.



Obr. č. 41

Schéma potenciometrického merania pH

(Upravené podľa <http://www.chtf.stuba.sk/kalch/AC/ii-2.pdf>)

Mnohé pH metre sú usporiadané na prácu s kombinovanou sklenou elektródou, kde sú v spoločnom obale inštalované obe elektródy, sklená aj referenčná. Vodiče, ktoré sú vyvedené z každej elektródy osobitne na odlišné časti konektora, sú kryté v spoločnom obale.

Výsledkom merania je bezrozmerná hodnota pH z rozsahu od 0 po 14, ktorá vyjadruje záporný dekadický logaritmus koncentrácie vodíkových iónov v roztoku podľa vzťahu (1.11) $pH = -\log [H^+]$. Tento pojem zaviedol dánsky biochemik Søren Peter Lauritz Sørensen (1868 – 1939) kvôli jednoduchšiemu vyjadrovaniu koncentrácie vodíkových iónov.

Hodnota pH menšia ako 7 poukazuje na kyslý charakter meraného roztoku, s vysokou koncentráciou H^+ . Hodnota väčšia ako 7 poukazuje na bázičný charakter, s nízkou koncentráciou H^+ . Roztok s hodnotou pH 7 je neutrálny.

Meranie je ovplyvnené teplotou, v minulosti bolo potrebné roztoky a meraciu sústavu temperovať na štandardnú laboratórnu teplotu. Moderné prístroje dokážu teplotu snímať senzorom a výsledky pH automaticky kompenzovať, takže meranie je rýchle.

Meracie zariadenie je potrebné v pravidelných intervaloch *štandardizovať* pomocou *tlmivých roztokov* známej hodnoty pH. Spravidla sú to referenčné materiály pH 4, pH 7 a pH 9, podľa očakávanej hodnoty meranej vzorky. Pred každou sériou vzoriek sa overuje nastavenie prístroja zaradením pufrov s dlhodobou sledovanými hodnotami, ktoré sa porovnávajú s nastavenými kritériami.

Príklady analytického využitia potenciometrickej metódy vo verejnom zdravotníctve

- Ukazovatele kvality potravín: stanovenie pH v mäse a mäsových výrobkoch, v škrobových produktoch, nápojoch a i.
- Ukazovatele kvality vody: stanovenie pH v pitnej vode

2.4.2. Konduktometria

Konduktometrická analýza, čiže stanovenie elektrolytickej vodivosti, je založená na vzťahu medzi elektrolytickou vodivosťou a koncentráciou elektrolytu. Meraná veličina súvisí s elektrickým prúdom, ktorý vedú ióny prítomné v sústave. Závisí od ich charakteru a koncentrácie, tiež od teploty, druhu rozpúšťadla a viskozity roztoku. Elektrický prúd vzniká v dôsledku migrácie iónov k elektródam opačného náboja. Na transporte sa zúčastňujú všetky ióny prítomné v roztoku, konduktometrické stanovenie je preto neselektívne.

Schopnosť viesť elektrický prúd opisuje veličina *vodivosť* a *konduktivita*.

Vodivosť - konduktancia G je schopnosť akéhokoľvek vodiča viesť elektrický prúd, bez rozdielu, či ide o prúd elektrónov alebo iónov. Jednotkou je *Siemens*, skratka S a je definovaná ako prevrátená hodnota elektrického odporu R s jednotkou ohm, skratka Ω . Platí, že $G = R^{-1}$ a teda S je Ω^{-1} .

V prípade, keď je vodičom *vodivý roztok*, elektrický prúd vzniká *prúdom iónov*. Vodivosť kvapalín opisuje veličina elektrolytická vodivosť – konduktivita γ . Možno ju interpretovať ako vodivosť hypotetickej kocky s hranou o dĺžke 1 m naplnenej meraným roztokom, pričom dve protiľahlé steny sú vodiče I. triedy (tok elektrického prúdu sprostredkujú elektróny) z inertného materiálu, ktorý chemicky nereaguje s meraným roztokom. Jednotkou konduktivity γ je **S/m**, v praxi často **S/cm**, zahŕňa teda dve veličiny, elektrickú aj dĺžkovú. Čistá voda má pri teplote 25 °C v dôsledku svojej vlastnej disociácie elektrolytickú vodivosť 0,005483 mS/m.

Vodivosť roztoku sa nedá merať priamo, merania sa realizujú na princípe merania odporu. Konduktometre sa kalibrujú pomocou CRM.

Rovnako ako odpor, aj vodivosť je závislá od teploty. Zmena teploty o 1 °C spôsobuje zmenu vodivosti o 2 až 3 %. Pokiaľ sa meranie nevykonalo pri teplote 25 °C, hodnoty

odčítané z prístroja sa musia korigovať zodpovedajúcim korekčným faktorom na konvenčnú štandardnú teplotu 25 °C ako elektrolytická vodivosť pri 25 °C.

Moderné prístroje už majú obyčajne v meracej sonde zabudovaný snímač teploty. V prípade, že sa zosnímaná teplota líši od štandardnej, konduktometer automaticky vykoná korekciu. Nesprávna hodnota teplotného koeficienta môže zapríčiniť veľké chyby výsledku merania. Preto sa pri výsledku uvádza aj skutočná teplota a metóda korekcie na teplotu 25 °C.

Ukážka zápisu výsledku

| |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\gamma_{25} = 25,8 \text{ mS/m}$ (podľa STN EN 27888) Teplota merania 11,5°C Matematická korekcia |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Príklady analytického využitia konduktometrie vo verejnom zdravotníctve

- Ukazovatele kvality vody: Stanovenie elektrolytickej vodivosti pitnej vody
- Monitoring kvality vody na prípravu roztokov

Otázky ku kapitole

- 23 Je možné merať pH roztoku len jednou elektródou?
- 24 Je možné pri štandardnej teplote dosiahnuť elektrolytickú vodivosť destilovanej vody lepšiu ako 5 $\mu\text{S/m}$?

Odpovede sú na str. 93

3. SENZORICKÁ ANALÝZA

Senzorická analýza je jednou z najstarších vedných disciplín, používa ľudské zmysly ako detektory. Vyvinula sa z potreby výberu neškodných a k zamietnutiu škodlivých potravín. U človeka sa tak už v skorých etapách vyvinulo pozitívne hodnotenie sladkých a tučnejších, príp. slaných potravín, ktoré mu dodávali energiu a dôležité minerálne látky. Naopak, negatívne hodnotené boli väčšinou horké alebo príliš kyslé chute a trpké potraviny, ktoré mohli byť potenciálnym zdrojom toxických látok. Senzorické hodnotenie aké poznáme dnes vychádza z metodológie, ktorej základy boli položené v 19. storočí. Až objasnenie funkcie zmyslových orgánov, ich súvisu s podnetmi, pochopenie premeny nervového vzruchu na zmyslový vnem, spolu s rozvojom biológie, psychológie, štatistiky a mnohých ďalších vedných odborov dopomohli k premene disciplíny, dovtedy založenej iba na empirických skúsenostiach.

Senzorické hodnotenie má významnú úlohu aj v súčasnosti, nedá sa nahradiť aj napriek vysokému stupňu rozvoja objektívnych, najmä analytických metód. Stalo sa neoddeliteľnou súčasťou kontroly, jeho poslaním je posudzovanie kvality a bezpečnosti potravín, pomáha pri odhaľovaní ich falšovania. Využitie senzorickej analýzy sa rozšírilo aj do ďalších odvetví - posudzovanie kozmetických a hygienických výrobkov, textilu, obalov a mnohých ďalších produktov, pomoc pri optimalizácii receptúr, vývoji nových výrobkov, technologických postupov, hodnotenie vplyvu prepravy a skladovania na senzorickú kvalitu a využitie v mnohých ďalších oblastiach.

Na zmyslové hodnotenie vplýva vonkajšie prostredie a variabilita fyziologických a psychických funkcií hodnotiteľa. Z tohto dôvodu by sa mohli výsledky senzorickej analýzy považovať za subjektívne. Avšak detailnejším poznaním procesu vnímania organoleptických vlastností, výberom posudzovateľov, ich školením, správnu voľbou senzorických metód, ako aj matematicko-štatistickým spracovaním výsledkov hodnotení od skupiny hodnotiteľov je možné výrazne zvýšiť objektivitu zmyslového posudzovania.

Senzorické hodnotenie sa skladá zo série techník, ktoré umožňujú presné a výstižné meranie ľudskej odozvy na vlastnosti skúmaných vzoriek. Správnym školením a skúsenosťami posudzovateľ dokáže potlačiť uprednostňovanie alebo zaujatosť voči niektorým druhom skúšaných objektov. Zatiaľ neexistuje žiadna univerzálna analytická metóda, ktorá by dokázala nahradiť psychologickú metódu zmyslového hodnotenia, ktorej hlavný proces prebieha v centrálnej nervovej sústave.

Pojem, ktorý sa vzťahuje na *skúšaný objekt* a na jeho vlastnosti pôsobiace na ľudské zmysly tak, že vyvolajú vnem, vystihuje termín *organoleptický*. Výraz *senzorický* sa vzťahuje na *človeka*, na použitie jeho zmyslov. Pojem *senzorická analýza* na rozdiel od staršieho termínu *organoleptická analýza* je širší, nezužuje hodnotenie len na posúdenie vlastností vzorky. Zahŕňa aj výber vhodných metód, sledovaný účel a cieľ, ktorý sa má zvoleným postupom dosiahnuť. Z výsledkov senzorického hodnotenia veľaokrát vyplývajú závery a dôležité informácie, ktoré pomôžu odstrániť problém, alebo pomôžu zjednodušiť či skvalitniť niektorý proces výroby.

3.1. Zmyslové hodnotenie v senzorickej analýze

Ľudský organizmus je citlivý na zmeny vo vonkajšom prostredí, ako aj vo vnútornom prostredí vlastného organizmu. Podnety zachytáva prostredníctvom *zmyslových orgánov* -

analýzátorov. Sú to orgány špecializované na príjem – *repciu* – rôznych druhov podnetov, ktoré k človeku prichádzajú vo forme fyzikálnej alebo chemickej energie.

Podľa prostredia, z ktorého prijímajú informácie, sa rozlišujú:

- *Exteroreceptory*, vonkajšie receptory, ktoré zachytávajú podnety zvonka. Reagujú na svetlo, teplo, chlad, bolesť, tlak, dotyk, ale aj na podnety z vlastných zmyslov – zraku, sluchu, čuchu a chuti.
- *Interoreceptory* prijímajú podnety z vnútorného prostredia. Patria k nim
 - *proprioceptory*, ktoré informujú o polohe tela v priestore, nachádzajú sa v svaloch, šľachách, kĺbových puzdrách
 - *enteroreceptory* informujú o vnútorných orgánoch.

Okrem tohto delenia sa odlišujú receptory podľa charakteru podnetov:

- *fotoreceptory* - tyčinky a čapíky sietnice oka, citlivé na elektromagnetické vlnenie vo viditeľnej oblasti
- *mechanoceptory*- umiestnené najmä v hmatovom orgáne, citlivé na mechanické podnety, reagujú na ťah, tlak, bolesť
- *termoreceptory*- uložené najmä v pokožke, v slizniciach aj v svaloch, podnetom je teplota a chlad
- *chemoreceptory* - chuťové poháriky, čuchové receptory nosa, reagujú na chemické látky
- *nociceptory*, osobitná skupina - receptory bolesti v koži, kostrových svaloch, srdcovom svale, vnútorných orgánoch, schopné reagovať na mechanické, termické, chemické stimuly.

Po podráždení receptora sa fyzikálna alebo chemická energia prijatá z podnetu premení na elektrický nervový impulz – *vzruch*. Vzruch je vedený dostredivými nervami do ústredia, t. j. mozgu alebo miechy. Tu je impulz spracovávaný na psychický jav – *pocit*. V ústredí dochádza k vypracovaniu odpovede, ktorá je vedená odstredivými nervami k výkonným orgánom, ktorými sú svaly a žľazy vykonávajúce činnosť – svalové reakcie, vylučovanie hormónov. Súčasťou procesu pociťovania je aj spätná väzba z výkonného orgánu, ktorá signalizuje adekvátnosť reakcie alebo vyvolá nápravnú reakciu.

Pocit je prvou informáciou o jednotlivých vlastnostiach predmetov a javov, ako je chuť jedla, teplota vody, vôňa krému a pod. Je definovaný ako najjednoduchšia jednotka, založená na odraze jednotlivých vlastností a javov reálneho sveta, alebo vnútorných stavov organizmu pri bezprostrednom pôsobení podnetov.

Človek však vníma prostredie komplexnejšie, ako súbor viacerých pocitov, čím vzniká vnem. Vnem je odraz predmetov a javov ako celku vo vedomí človeka. Je to výsledný efekt súčinnosti viacerých receptorov alebo spojenia viacerých pocitov z jedného receptora.

3.2. Podnetové prahy

Receptory majú svoje obmedzenia, nakoľko to sú orgány špecializované iba na príjem podnetu s určitou intenzitou. Aby podnet pôsobiaci na receptor vyvolal podráždenie a vzruch, musí dosiahnuť určitú hranicu intenzity, aby ho človek pocítil. Túto hranicu predstavuje tzv. podnetový prah, označovaný aj ako *prahová koncentrácia*.

- *Dolný podnetový prah*, alebo *prah rozpoznania*, je najmenšia hodnota (intenzita) podnetu, ktorú je receptor schopný zaregistrovať, aby došlo k vzruchu a pocitu (napr. minimálna koncentrácia soli na vyvolanie slanej chute). Hodnota nižšia ako dolný podnetový prah sa nazýva *podprahová* a je taká nízka, že ešte nevyvoláva žiadny vzruch ani pocit.
- *Horný podnetový prah* je daný maximálnou hodnotou (intenzitou) podnetu, ktorú je receptor schopný zachytiť. Podnety nad túto hranicu sa nazývajú *nadprahové* a sú také vysoké, že už nevyvolajú vzruch ani pocit (napr. ultrazvuk, ultrafialové žiarenie...).

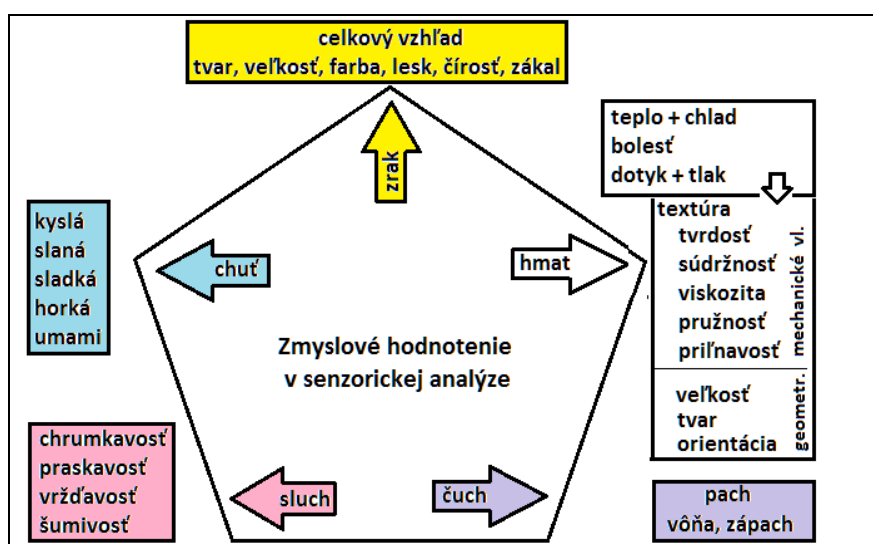
Ak je receptor vystavený príliš dlho podnetom s vyššími intenzitami, dochádza k nasýteniu všetkých jeho aktívnych miest a tak pri ďalšom zvyšovaní intenzity podnetu (napr. zvyšovanie koncentrácie vône) receptor už nedokáže postrehnúť zmenu vo veľkosti intenzity. V tomto prípade sa horný podnetový prah nazýva *prah nasýtenia*, nakoľko pri tejto intenzite dochádza k zahlteniu receptora.

- *Rozdielový podnetový prah* je daný minimálnym rozdielom v intenzite dvoch podnetov rovnakého druhu, ktorý je receptor schopný spoľahlivo rozoznať (napr. najmenšia zaregistrovaná zmena v koncentrácii soli medzi dvoma roztokmi, najmenšia zaregistrovaná zmena intenzity červenej farby medzi dvoma roztokmi a i.)

Hodnoty podnetových prahov môžu byť u jednotlivých ľudí rozdielne, je to individuálna schopnosť jedinca. U každého jedinca sú tieto hodnoty za konštantných podmienok rovnaké, avšak pri zmene podmienok sa výrazne menia.

3.3. Zmyslové orgány v senzorickej analýze

Proces vnímania organoleptických vlastností objektov úzko súvisí s anatomickou stavbou zmyslového orgánu a fyziologickými pochodmi prebiehajúcimi pri vnímaní. Len dokonalým poznaním týchto otázok možno dosiahnuť objektívnejšie senzorické hodnotenie produktov. Dôležitosť jednotlivých zmyslových orgánov pre rôzne produkty je rôzna. Napr. pri hodnotení voňaviek je dominantný čuch, pri hodnotení medu zase chuť. Zmyslové orgány a ich použitie v senzorickej analýze zobrazuje obr. č. 42.



Obr. č. 42

Zmyslové hodnotenie
v senzorickej analýze

3.3.1. Zrakový orgán v senzorickej analýze

Človek vníma až 80 % všetkých informácií zrakom, ktorého vlastným zmyslovým orgánom je oko. Podnetom sú svetelné elektromagnetické vlny v rozsahu 380 – 780 nm.

Zrakom je možné posúdiť celkový vzhľad, pričom sa zisťuje tvar, veľkosť, farba, ale aj lesk, čírosť alebo zákal skúmaného objektu. Aj laik dokáže zrakom postrehnúť odchýlky od predchádzajúcich skúseností, ktoré signalizujú podozrenie na nedostatky – napr. sivastá farba šunky (po dobe spotreby, príp. zlé skladovanie), namodrastá farba mlieka (riedenie vodou), rozozná cudzorodú prímes zapečenú v chlebe a i.

Pri posudzovaní farby je v niektorých prípadoch možné zvýšiť objektívnosť senzorického hodnotenia niekoľkými spôsobmi. Jedným z nich je použitie presne

definovaného etalónu - farebného štandardu, voči ktorému sa vzorky porovnávajú. Sú vyhotovené z tuhých materiálov, ako sklo, plast, papier, alebo sú vo forme roztokov. Používajú sa pri hodnotení nápojov, pretlakov, cukru a i. Inou možnosťou je priame meranie farby spektrofotometricky alebo kolorimetrami. Ďalšou alternatívou je použitie fyzikálno-chemických metód, napr. keď je spozorovaná zmena vo farbe vzorky. Vtedy spektrofotometria alebo aj iné analytické techniky pomôžu sledovať látky, ktoré degradáciu farby spôsobili či už pri nesprávnom skladovaní alebo pri nevhodnom spracovaní produktu.

Objektívizovať je možné aj meranie *zákalu* napr. v šťavách, v pive, vo víne, kde sa sleduje čírosť výrobkov. Na hodnotenie zákalu je vhodná turbidimetria a nefelometria.

3.3.2. Hmatový orgán v senzorickej analýze

Hmat je zmyslový orgán, ktorý je prostredníctvom niekoľkých typov receptorov citlivý na *dotyk a tlak*. Dráždením receptorov vznikajú kombinované pocity, ktoré informujú o mechanických vlastnostiach skúmaných objektov, ako je *tvrdosť, súdržnosť, viskozita, pružnosť, priľnavosť*, tie vplývajú na *krehkosť, žuvateľnosť, gumovitosť, šťavnatosť* a na iné znaky. Taktiež sa získavajú informácie aj o geometrických vlastnostiach objektov, akými sú *veľkosť, tvar* a príp. *orientácia* zrn. Všetky spomínané charakteristiky spolu vytvárajú multiparametrovú vlastnosť objektu – *textúru*. Uloženie receptorov vnímavých na dotyk a tlak je na rôznych miestach tela značne rozdielne, sú rozmiestnené v rozličnej hĺbke kože a v slizniciach, ale aj v svaloch, kĺboch a vo vnútri organizmu. Na podnety dotyku a tlaku sú najcitlivejšie brušná prstov, pokožka dlane a ústna dutina.

V koži sa nachádzajú aj špecializované nervové zakončenia – termoreceptory, ktoré sú citlivé na *teplo a chlad*. Receptory na vnímanie chladu sa nachádzajú vo vrchnej vrstve kože. Receptory na vnímanie tepla sú uložené v hlbších vrstvách kože. Najviac receptorov chladu a tepla sa nachádza v tvárovej časti kože a chrbtovej časti ruky. V senzorickej analýze termoreceptory podávajú informáciu o tom, či je vzorka teplotne vhodná na konzumáciu a či je teplota optimálna.

V niektorých prípadoch sa hmatové pocity dajú objektívizovať inštrumentálnymi metódami. Na zisťovanie textúrnych vlastností sa používajú analyzátory textúry, ktoré merajú mechanické veličiny za podmienok imitujúcich namáhanie vzoriek pri konzumácii. Využívajú rôzne ďalšie mechanické testy zahrňujúce merania odolnosti vzoriek proti účinkom pôsobenia síl – stláčaním (pomocou piestu), vtláčovaním

(preníkaním sondy rôznych tvarov), nat'ahovaním, ohýbaním, krájaním, strihaním atď. Takým spôsobom sa dokážu kvantifikovať niektoré fyzikálne vlastnosti posudzovaných vzoriek, ako je tvrdosť, žuvateľnosť, stlačiteľnosť, tuhosť, drobivosť a i. Väčšina výsledkov týchto objektívnych meraní korešponduje s výsledkami senzorických metód. Pre komplexné hodnotenie je však senzorická analýza nezastupiteľná.

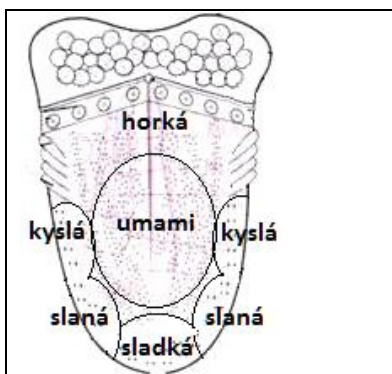
3.3.3. Chuťový orgán v senzorickej analýze

Orgánom chuti je súbor špecializovaných receptorov označovaných ako chuťové poháriky. Podnetom sú látky rozpustné vo vode alebo v slinách, ktoré sa dostanú do kontaktu s chuťovými pohárkami. Tie sú najviac zoskupené v sliznici jazyka, ale aj v sliznici tvrdého podnebia, na prednej ploche mäkkého podnebia a v sliznici hltana a príchlopky.

Orgán chuti rozoznáva 5 základných chutí: *sladkú, slanú, kyslú, horkú* a *umami*. Okrem základných chutí dokážu receptory rozpoznať aj doplnkové chute, ako je *elektrická, alkalická* a *kovová*.

Umami (z japončiny *lahodná chuť*) je popisovaná ako lahodná, výdatná, mäsová a vývaru podobná charakteristická chuť, ktorú nedokáže vyvolať žiadna kombinácia ostatných základných chutí. Je vyvolaná zriedenými roztokmi určitých aminokyselín alebo ich derivátov, ako je glutaman sodný alebo inozinan disodný. Umami bola identifikovaná už na začiatku 20. storočia v Japonsku počas výskumov zameraných na výraznú chuť vývaru z morských rias. Avšak v medzinárodnom vedeckom svete bola akceptovaná ako piata základná chuť až koncom 20. storočia, keď boli objavené nezávislé špecifické receptory pre umami.

Každý chuťový pohárik dokáže rozoznávať všetky chute aj ich kombinácie, avšak sú plochy jazyka, kde sú jednotlivé chute vnímané intenzívnejšie oproti ostatným zónam. Sladkosť sa najintenzívnejšie vníma na špičke jazyka, slanosť po stranách jazyka vpredu, kyslosť na bočných stranách vzadu, horkosť na koreni jazyka. Umami pokrýva širokú zónu najmä v strednej časti jazyka. Rozloženie receptorov je znázornené na obr. č. 43.



Obr. č. 43

Rozloženie receptorov základných chutí na jazyku

(Upravené podľa: <http://www.biologydiscussion.com/human-physiology/human-digestive-system/main-parts-of-human-digestive-system-with-diagram/52385>)

Objektivizácia analytickými metódami môže analýze chuti napomôcť len v niektorých prípadoch a iba pre jednotlivé látky. Stanovenie látok spôsobujúcich nepríjemnú chuť, napr. vzniknuté aldehydy a karbonylové zlúčeniny pri autooxidácii tuku je možné stanoviť chromatograficky, alebo sa stanoví číslo kyslosti tuku titračne.

Slanú chuť je možné objektivizovať titračne stanovením obsahu soli, sladkú chuť zase polarimetricky stanovením cukrov. Medzi výsledkami týchto metód a senzorickým hodnotením je väčšinou vysoká korelácia, týka sa však len jednotlivých chuťových látok alebo jednoduchých zmesí. Oveľa zložitejšie sa objektivizuje chutnosť produktu, ktorá sa definuje ako spoločný vnem chuti, vône a hmatu.

3.3.4. Čuchový orgán v senzorickej analýze

Receptory čuchu sú špecifické nervové bunky, uložené v sliznici hornej časti nosovej dutiny. Podnetom pre ich stimuláciu sú molekuly prchavých voňavých látok prenesené vzduchom a následne rozpustené v hlienovej vrstve sliznice. Voňavé látky sa dostávajú do čuchového orgánu pri vdychovaní, ale vystupujú aj z ústnej dutiny cez otvor spájajúci ústnu dutinu s nosnou dutinou a nosohltanom.

Psychický zážitok pri čuchovom pociťovaní sa vyjadruje pojmom pach. Pach môže byť príjemný, vyhodnotený ako vôňa (napr. kvetinová, ovocná, korenistá, živicová) alebo nepríjemný, vyhodnotený ako zápach (napr. hnilobný, pripálený). Hranica medzi týmito dvoma kvalitami však nie je presne vymedzená, pretože to, čo niekto pociťuje ako vôňu, iný môže vnímať ako zápach a naopak. Na niektoré látky je ľudský čuch veľmi citlivý, tak že dokážu vzbudiť vysokú intenzitu pocitu aj pri veľmi nízkych koncentráciách, či už pozitívnu, alebo negatívnu. Pri voňavých látkach preto neplatí vzťah, že väčší pachový podnet bol spôsobený látkou s vysokou koncentráciou a naopak. Napríklad pre

etylalkohol sa udáva dolný podnetový prah 100 mg/l, pre kyselinu octovú 25 mg/l, ale napr. pre kyselinu maslovú vznikajúcu oxidáciou masla je to iba 0,2 mg/l. Sú však látky, ktoré sú detegovateľné receptormi čuchu aj v oveľa nižších koncentráciách. Väčšinou však charakteristický pach netvorí len jedna zlúčenina, ale zmes niekedy veľmi početných látok.

Dolný podnetový prah je možné objektívnejšie zistiť pomocou olfaktometra (angl. *olfaction* čuch), čo je prístroj, ktorý sa používa v spojení s ľudským subjektom. Sledovaná voňavá látka sa dávkuje k čuchovému orgánu skúšanej osoby, presné koncentrácie sú zabezpečené kontrolovaným riedením v prúde inertného vzduchu. Postupným narieďovaním sa zisťuje najnižšia koncentrácia, ktorú ešte daná osoba dokáže pociťovať.

Senzorickú analýzu čiastočne objektivizuje plynová chromatografia spojená s technikou headspace (kap. 2.3.2.1), ktorá zabezpečuje analýzu výhradne prchavých látok bez vnášania zvyšného podielu vzorky do systému. Výhodou je jednoduchá príprava vzorky a rýchla analýza. Nevýhodou takej analýzy je, že nie každá prchavá látka je aj voňavá. Výsledkom sú síce čisté signály z prchavých látok, ale informácia o intenzite pocitu chýba. Ak sa však sledujú neznáme pachy, ktorých pôvod nemožno logicky vysvetliť ako chybu výrobku, analytické metódy sa musia použiť. Na identifikáciu neznámych látok spôsobujúcich pach je častou voľbou plynová chromatografia v kombinácii s hmotnostným detektorom.

Užitočným spojením je plynová chromatografia doplnená olfaktorickou detekciou. Plynová chromatografia dokáže rozdeliť komplex voňavej zmesi na jednotlivé látky, z ktorých niektoré sú aromatické, ale iné nemusia byť. Všetky rozdelené látky vymývané z kolóny postupujú do dvojcestného rozdeľovača. Jedna časť ide do klasického detektora, kde sa všetky zložky detegujú a následne z chromatogramu identifikujú a kvantifikujú. Druhá časť vstupuje do olfaktorického detektora, ktorý umožňuje zapojiť do analýzy aj čuchový receptor človeka. Čuchový orgán priložený k detektoru registruje vo vystupujúcom prúde iba tie látky, ktoré sú voňavé, posudzovateľ opisuje prislúchajúcu kvalitu pachu a intenzitu pocitu. Porovnaním látok vystupujúcich z olfaktorického detektora s látkami z chromatogramu je možné vyhodnotiť, ktoré z jednotlivých látok zmesi sa na pachu podieľali a v akom pomere.

3.3.5. Sluchový orgán v senzorickej analýze

Zmyslovým orgánom sluchu je ucho, receptory sú vláskové bunky nachádzajúce sa vo vnútornom uchu. Podnetom sú zvukové vlny s frekvenciou v rozsahu 16 až 20 000 Hz. Ľudský sluchový orgán nedokáže registrovať zvuk s frekvenciou mimo tohto intervalu. Maximálna citlivosť sluchu je pre tóny 1000 - 3000 Hz.

Posudzovanie sluchom sa uplatňuje hlavne v priemyselnej oblasti, napr. na hodnotenie zvukov, ktoré produkujú rôzne technické zariadenia. V senzorickej analýze potravín a kozmetiky sa jeho dôležitosť považuje za menej významnú oproti ostatným zmyslovým orgánom. Sluchové pociťovanie je zamerané najmä na vyhodnotenie zvukov pri mechanickom narušení určitých typov vzoriek. Sluch sa podieľa na informácii, či je vzorka dostatočne chrumkavá, praskavá, vržďavá, lupkavá, prípadne či sa ozve charakteristické prasknutie pri rozlomení. Hodnotí sa aj typickosť šumivého zvuku plynových bublín v perlivých alebo šumivých výrobkoch, keď plyn uniká uvoľnením tlaku alebo vzniká chemickou reakciou.

Objektivizácia senzorického hodnotenia sa môže vykonať podobnými prístrojmi, akými sa zisťujú textúrne vlastnosti. Pri stláčaní vzorky umiestnenej v špeciálnej zvukotesnej komore dochádza k mechanickému narušeniu, ktoré je sprevádzané určitým zvukom. Zvuk sa sníma cez mikrofón do zariadenia, ktoré odfiltruje prípadný šum a do zberača dát odošle na vyhodnotenie signál z vyselektovaného zvuku.

3.4. Postup pri vnímaní podnetov

Psychika človeka je nastavená tak, že najskôr hodnotí komplexnú prijateľnosť, príjemnosť vnemu. Také hodnotenie sa nazýva hedonické (angl. *hedonic* pôžitkársky) a je pomerne jednoduché.

Až pri ďalšom, hlbšom skúmaní vzorky sa človek zameria na detaily a dokáže rozanalyzovať, na základe akých vlastností vznikol prvý dojem, všíma si čiastkové vlastnosti a intenzitu vnemu. Toto hodnotenie sa nazýva intenzitné. Intenzitné hodnotenie je náročnejšie v porovnaní s hedonickým, vyžaduje viac pozornosti, skúseností a je oveľa namáhavejšie.

Hedonické posúdenie môže vykonať aj neskúsený laik pri spotrebiteľskom hodnotení, kde je názor bežného spotrebiteľa dôležitý. Vtedy sa zisťuje len obľuba, preferencie,

ochota konzumovať a kúpiť produkt, najmä pre spotrebiteľské účely, pri vývoji nových výrobkov a pod. Výsledkom hodnotenia je *stupeň príjemnosti* posudzovaného objektu.

Intenzitné hodnotenie môže vykonať iba školený posudzovateľ, schopný rozpoznať jednotlivosti, posúdiť primeranosť intenzity tým, že potlačí emotívnu stránku a odosobní sa od zaujatosti voči neobľúbenej alebo preferovanej komodite, či vplyvu iných vnemov. Výsledkom je objektívne stanovenie *intenzity niektorej z vlastností* posudzovaného objektu.

Priebeh vnímania podnetov pri posudzovaní potraviny

Prvým krokom hodnotenia je posúdenie celkového vzhľadu zrakom. Posudzuje sa farba, prípadne čírosť, lesk. K zraku sa pripája hmat, zisťuje sa konzistencia – skúmaním prstami sa sleduje plastičnosť, tuhosť, drobivosť a i., príborom napr. krájateľnosť.

Pri podávaní sústa do úst sa čuchom zisťuje pach. Keďže pri normálnom dýchaní len 5 % vdychovaného vzduchu dosiahne receptory uložené v horných záhyboch nosnej dutiny, volí sa technika *privoniavania*, ktorá pomôže zlepšiť prenos pachu do neprístupného čuchového epitelu až na 20 %. Pri technike privoniavania sa vykoná niekoľko opatrných vdychov, za ktorými nasleduje hlboký vdych.

Ďalšie hodnotenie pokračuje vložением sústa do úst. Proces senzorického posudzovania prebiehajúci v ústnej dutine pri konzumácii potravín má tri etapy: *zahryznutie*, *prežúvanie* a *prehĺtanie*. Pri zahryznutí sa hmatovými receptormi skúma tvrdosť, šŕavnatosť, v prípade chrumkavých vzoriek sa zapája aj sluch. Ak je vzorka tekutá, vpraví sa do úst lyžicou alebo z nádoby.

Vložením do úst – ochutnávaním, *degustáciou*, sa najprv zisťuje tzv. *celková chunosť*, kde sú zapojené orgány chuti aj čuchu. Pri prežúvaní, v prípade tekutej vzorky pri prevaľovaní, sa sústo mieša so slinami, sleduje sa vývoj chuti. Teplota skúmanej vzorky sa vyrovnáva s teplotou v ústnej dutine a uvoľnia sa prchavé látky. Voňavé látky sa dostávajú do nosovej dutiny k čuchovým receptorom. *Príjemné pocity* vyvolané vzájomným spolupôsobením voňavých látok na chuť aj čuch sa označujú ako *aróma*. Nežiaduce pocity z produktov kazenia potraviny alebo z cudzorodých látok napr. z obalu alebo pesticídov sa označujú ako *nechunosť* (angl. *off-favour*). Pri prežúvaní sa zapájajú aj receptory na textúru v perách a okolo zubov, zisťuje sa žuvateľnosť, viskozita a i. Niektoré parametre je potrebné posúdiť okamžite, napr. krehkosť vzorky, ktorá pôsobením slín podlieha zmenám.

Po prehĺtnutí sa senzoricky aktívne látky prestávajú uvoľňovať, látky sa z chuťových receptorov odstránia vyplavením slinami a ich prehĺtnutím. Z nosovej dutiny sa uvoľnia vydýchnutím. Mnohé potraviny spôsobujú aj tzv. *následné senzorické podnety*, ktoré nastupujú až po určitej dobe. Hodnotí sa stupeň intenzity aj týchto pocitov. Každý posudzovateľ svoje hodnotenie v každom kroku slovne opisuje.

Pred hodnotením vzoriek sa ústa preplachujú vodou, ktorá pôsobí ako neutralizátor. Jej úlohou je odstrániť zvyšky predchádzajúcej vzorky z ústnej dutiny a regenerovať receptory. Neutralizátorom na regeneráciu receptorov môže byť aj chuťovo a vôňovo indiferentná potravina, akou je napr. suché biele pečivo alebo jablko, pokiaľ tieto komodity nie sú práve predmetmi posudzovania.

3.5. Optimálne podmienky pre hodnotenie

3.5.1. Maximálna eliminácia rušivých vplyvov

Je zabezpečená vhodnými priestormi s konštantnými podmienkami prostredia.

Laboratórium na senzorické hodnotenie musí byť oddelené od ostatných prevádzkových miestností, aby sa vylúčila hlučnosť a zabezpečila ochrana pred pachmi. Požiadavky na miestnosti, ktoré slúžia senzorickej analýze, sa líšia podľa pracovnej náplne pracoviska. V prípade, že ide o pracovisko kontrolnej inštitúcie, kde sa hodnotia denne veľké série vzoriek, usporiadanie priestorov je štandardizované a musí spĺňať prísne kritériá normy STN EN ISO 8589: 2010. V prípade, ak sa pracovisko zaoberá senzorickým hodnotením len sporadicky, požiadavky sú menej náročné. Priestory vyčlenené pre senzorickú analýzu by však mali tvoriť aspoň dve oddelené miestnosti.

Jednou z nich je *prípravovňa vzoriek*, ktorá by mala byť opatrená odsávačom pár a pachov a vybavením, ktoré umožňuje pripraviť vzorku ako pri bežnom konzume. Mnohé vzorky sa musia hodnotiť aj po tepelnej úprave. K dispozícii majú byť rúry, variče, zariadenia na udržiavanie predpísanej teploty – výhrevná doska, chladiace zariadenia, ale aj homogenizátory vzoriek a iné zariadenia na prípravu vzoriek.

Musí byť zabezpečené skladovacie miesto pre vzorky, a tiež umývanie použitých a skladovanie čistých nádob.

Druhá časť laboratória je *miestnosť pre vlastné hodnotenie*. V tejto miestnosti má byť nehučné vetranie a zabezpečená čistota vzduchu. Na zachovanie *konštantných podmienok* má byť optimalizovaná teplota a vlhkosť vzduchu. Osvetlenie má byť rovnomerné, s dostatočnou intenzitou, ktoré odpovedá rozptýlenému dennému svetlu.

Na vylúčenie vplyvu premenlivosti denného osvetlenia sa preferuje umelé svetlo, imitujúce poludňajšie osvetlenie pri zatiahnutej oblohe. Steny majú byť umývateľné, neutrálnej farby – bielej, svetlobéžovej alebo svetlosivej, bez dekoratívnych prvkov. Na zabezpečenie bezpachovej atmosféry sa pri udržovaní čistoty používajú neutrálne čistiace prostriedky bez voňavých prímiesí.

Každý hodnotiteľ má mať svoj pracovný priestor oddelený od ostatných tak, aby sa prítomní navzájom nerušili a neovplyvňovali. Najlepším riešením je rad boxov zoradených vedľa seba, uzavretých spredu a z bočných strán, ako znázorňuje obr. č. 44.



Obr. č. 44

Príklad usporiadania miestnosti
pre senzorické hodnotenie

(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=8314&typ=html)

V každom boxe má byť pracovná plocha pre jedného hodnotiteľa, kde je dostatok miesta pre posudzované vzorky a tiež pre vyplňovanie protokolu alebo ovládanie počítača. Hodnotiteľ má mať k dispozícii neutralizátory chuti aj čuchu, nádobu s pitnou vodou na vyplachovanie úst a výlevku alebo nádobu na zlievky.

Skúšobná miestnosť by mala byť hneď vedľa prípravne. K podávaniu a odoberaniu vzoriek sa najlepšie osvedčilo prepojenie jednotlivých boxov čelnou stranou s prípravňou vzoriek cez otváracie okienka. Tie sa počas analýzy zatvárajú.

Nádoby, v ktorých sa vzorky podávajú, majú veľký vplyv na výsledok hodnotenia. Musia mať neutrálny vzhľad, tvar aj farbu. Najvhodnejší materiál je porcelán bielej farby a jednotného tvaru a číre sklo na hodnotenie nápojov. Vzorky pre všetkých hodnotiteľov majú byť podávané v rovnakom type nádob, s rovnakou veľkosťou, odlišnosť by vzbudzovala nežiaducu pozornosť. Niekedy sa však môže podávať referenčná vzorka v inej nádobe kvôli odlíšeniu. Pre posudzovanie niektorých nápojov sa používajú nádoby špeciálneho tvaru a objemu.

V miestnosti by malo byť aj pracovné miesto pre organizátora hodnotenia, ktorý zhromažďuje a vyhodnocuje výsledky. Ten by mal byť prítomný po celý čas, aby dohliadal na správny chod analýzy.

3.5.2. Optimalizácia psychických dispozícií hodnotiteľov

Na podporu optimálneho výkonu má hodnotiteľ pracovať v príjemnej motivujúcej atmosfére, s vľúdnym, neformálnym zaobchádzaním. Nesmie pracovať pod tlakom, má mať dostatok času na každú vzorku, vzorka musí byť v primeranom množstve aj na zopakovanie analýzy.

3.5.3. Zaistenie anonymity podávaných vzoriek

Hodnotiteľ nemá vedieť, akú vzorku hodnotí, pre objektívne posudzovanie sú vzorky označené číselnými kódmi.

3.5.4. Randomizácia vzoriek

Aby sa predišlo subjektívnemu psychologickému vplyvu pri hodnotení viacerých vzoriek, mala by byť zabezpečená náhodnosť poradia pri predkladaní vzoriek. Pri pevnom poradí by mohlo dôjsť k určitému znevýhodňovaniu niektorých vzoriek, nakoľko psychika človeka často vyhodnotí prvú vzorku len ako skúšobnú, príp. pri poslednej sa už môže prejaviť únava a znížiť koncentrácia.

3.5.5. Posudzovanie skupinou

Posudzovanie vždy vykonáva skupina hodnotiteľov, minimálny počet sú traja.

3.6. Chyby a vplyvy pri senzorickom hodnotení

Cieľom senzorickej analýzy je získať zo súboru individuálnych posudkov objektívny a dobre reprodukovateľný výsledok. Môže sa však stať, že výsledok je skreslený vplyvom prostredia, ako aj v dôsledku psychologických a psychofyzických chýb. Vtedy môže dôjsť k rozdielu medzi pozorovanou hodnotou a skutočnou hodnotou.

3.6.1. Psychologické a psychofyzické chyby

K chybám tohto druhu patrí najmä neschopnosť rozpoznávať základné chute a vône, nedostatočná prahová citlivosť, chyby adaptácie zmyslového orgánu a i.

Posudzovatelia (s výnimkou laických hodnotiteľov) sa vyberajú na základe testov, kde preukazujú schopnosť hodnotiť základné zmyslové kvality. Osoby s trvalými alebo dlhodobými poruchami receptorov nie je možné zaradiť do súboru hodnotiteľov. Ale aj u skúsenejších hodnotiteľov môže časom dôjsť k zníženiu ostrosti zmyslov a hodnotiteľ tak môže podávať menej presné výsledky. Opakovaným cvičením v mnohých prípadoch dochádza k náprave.

V praxi sa často vyskytujú chyby z adaptácie a únavy zmyslových orgánov. Adaptácia je krátkodobá fyzická únava receptora, najmä čuchu a chuti. Adaptácia čuchu nastáva v prípade dlhého pôsobenia voňavej látky so stálou intenzitou, dôsledkom čoho sa po určitej dobe pocit vône kvantitatívne znižuje. Za krátky čas po skončení pôsobenia podnetu sa citlivosť receptora upraví do pôvodného stavu, preto je dôležité medzi vzorkami, najmä s vyššou koncentráciou senzoricky aktívnych látok, dodržiavať prestávky.

Pri dlhom posudzovaní veľkého počtu vzoriek zväčša dochádza k psychologickej únave. Znižuje sa schopnosť sústredenia na hodnotenie, a tým aj schopnosť správne rozlišovať a vyjadrovať vnímané poznatky. Predchádzať psychologickej únave je možné znížením počtu hodnotených vzoriek, príp. hodnotením menších sérií vzoriek, zaradovaním prestávok, používaním neutralizátorov chuti medzi vzorkami a pod.

3.6.2. Zdravotný stav a psychická vyrovnanosť

Zdravotný stav sa veľkou mierou podieľa na správnej funkcii zmyslov. Pri ochoreniach horných dýchacích ciest sa výrazne znižuje schopnosť registrovať pach, čím sa znižuje aj kvalita pocitov. Problémy tráviaceho systému môžu spôsobovať nechutenstvo a negatívne ovplyvniť hodnotenie potraviny. V takých prípadoch je hodnotiteľ prechodne vyradený z hodnotenia.

Aj nesprávna životospráva, nedostatok vitamínov, fajčenie, pitie alkoholických nápojov, príliš slané alebo korenisté jedlá negatívne ovplyvňujú zmyslové orgány pri hodnotení, znižujú na určitú dobu citlivosť receptorov. Nedostatok vitamínu A vplýva negatívne na zrakový orgán, nedostatok B1 spôsobuje únavu a telesnú slabosť, nedostatok B3 spôsobuje zažívacie ťažkosti. Dôležité je nefajčiť a nekonzumovať výrazné aromatické jedlá a alkoholické nápoje aspoň dve hodiny pred hodnotením.

Aj výrazne parfumovaná kozmetika, zubné pasty alebo pracie prostriedky môžu rušivo ovplyvňovať hodnotenie. Hodnotiteľ by mal pred senzorickými skúškami používať iba neutrálne prostriedky.

Nedostatok spánku, starosti a psychická nepohoda môže spôsobovať problém so sústredením, ktorého dôsledkom môže byť znížená kvalita hodnotenia.

3.6.3. Vplyv času a prostredia

Optimálny čas na hodnotenie je doobedie, kedy organizmus ešte nepociťuje hlad a ešte nie je ani unavený. Za nevyhovujúci čas sa považuje doba tesne po obedňajšom jedle, nakoľko skresľuje najmä laické hodnotenie napr. v prieskume obľúbenosti výrobku. Kvôli pokročilej únave je nevhodný aj večerný čas.

Vylúčenie negatívneho vplyvu prostredia je zabezpečené najmä adekvátnym usporiadaním miestnosti, kde prebieha hodnotenie, konštantnými príjemnými podmienkami tepelno-vlhkostnej mikroklimy a vhodným osvetlením podľa kap. 3.5.1.

3.7. Hodnotitelia

Hodnotiteľov je možné rozdeliť podľa stupňa schopností, školenia a preskúšavania do štyroch skupín:

- Neškolení hodnotitelia – laici

Bežní konzumenti, neskúsení v senzorickej analýze, nie sú vyberaní podľa žiadnych kritérií. Spravidla ide o skupinu potenciálnych spotrebiteľov posudzovaných výrobkov. Keďže ide o veľký súbor hodnotiteľov, posudok jednotlivca s prípadnými zníženými zmyslovými schopnosťami nezaťažuje výsledok štatisticky významnou chybou.

- Informovaní laici

Bežní konzumenti, neskúsení v senzorickej analýze, pred hodnotením sú oboznámení o spôsobe a zmysle hodnotenia.

- Posudzovatelia

Registrované osoby, ktoré prešli školením a ich schopnosť hodnotiť základné kvality bola preukázaná testovaním. Nevyhnutný je pravidelný tréning a overovanie schopností.

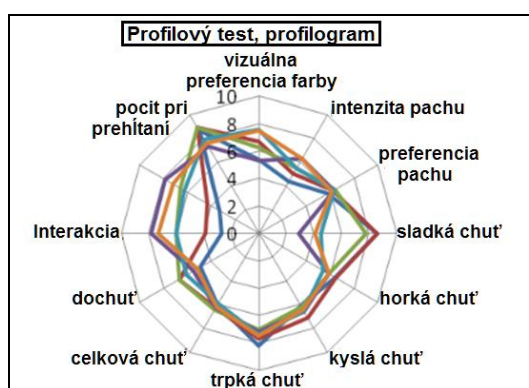
- *Znalci - experti*

Vybraní školení posudzovatelia s vysokým stupňom senzorickej citlivosti, skúsenosťami v senzorických skúškach, ktorí sú schopní vykonávať reprodukovateľné senzorické posudzovanie rôznych výrobkov.

3.8. Najpoužívanéjšie senzorické testy

Rozlišovacie

- párový test, porovnávajú sa dve vzorky – zisťuje sa preukazne vnímateľný kvalitatívny rozdiel v jednom alebo dvoch parametroch
- trojuholníkový test, hodnotí sa trojica vzoriek, dve sú rovnaké – kontrolné, jedna odlišná, hodnotí sa vnímateľný rozdiel alebo podobnosť
- tetrádový test, hodnotí sa štvorica vzoriek, jedna je predložená neanonymne ako referenčný štandard, u zvyšných troch anonymných sa hodnotí, ktoré z nich sú zhodné so štandardom
- poradový test, cieľom je usporiadať súbor vzoriek do poradia podľa stúpajúcej alebo klesajúcej intenzity hodnoteného znaku (napr. vzorky červenej farby s rôznou intenzitou, vzorky s rôznou intenzitou octovej vône a i.)
- profilové testy (obr. č. 45), celková chuťnosť sa rozdelí na čiastkové vnemy, ktoré sa sledujú izolovane



Obr. č. 45

Ukážka profilového testu

(Upravené podľa: <https://potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/234/pdf>)

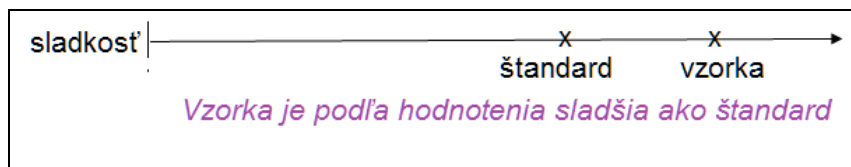
Stupnicové

využívajú sa hlavne na kvantifikáciu kvalitatívnych znakov

- číselné stupnice

- grafické stupnice

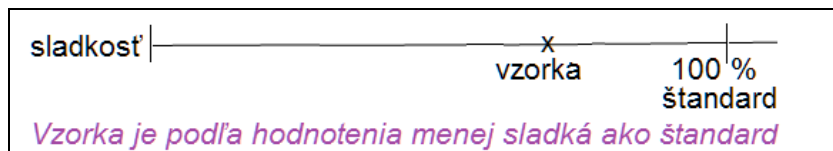
neštruktúrované úsečky, vyjadrujú smer stúpajúcej intenzity (obr. č. 46)



Obr. č. 46

Neštruktúrovaná úsečka

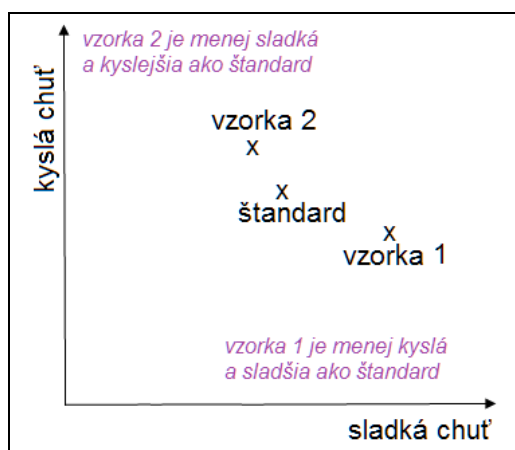
štruktúrované úsečky, úsečka má dve krajné hodnoty intenzity (obr. č. 47)



Obr. č. 47

Štruktúrovaná úsečka

plošný graf – dvojrozmerná stupnica, na posúdenie dvoch vlastností (obr. č. 48)



Obr. č. 48

Plošný graf na posúdenie dvoch vlastností

Intenzita kyslej a sladkej chuti

Preferenčné testy, zisťuje sa záujem spotrebiteľov o výrobky, veľká skupina hodnotiteľov (v obchodných centrách, na veľtrhoch a pod.)

- hlasovací test, hlasovaním sa hodnotí rovnaký druh vzorky v rôznych chuťových alebo iných variantoch

- dotazníkový test

Príklady využitia senzorickej analýzy vo verejnom zdravotníctve

Senzorické hodnotenie potravín: mäsové výroky, mäsové konzervy a nátierky, sterilizované pokrmy, ryby a rybie výrobky, lahôdkarské výrobky, šaláty, mlieko a mliečne výrobky, nápoje a i.

Senzorické hodnotenie kozmetických výrobkov: krémy, mydlá, šampóny, zubné pasty a i.

Senzorické hodnotenie pitnej vody

Otázky ku kapitole

- 25 Akým preskúšaním musí prejsť laický hodnotiteľ, aby sa mohol zúčastniť hlasovacieho testu?
- 26 Vyvoláva pach u skúseného hodnotiteľa nepríjemné pocity?
- 27 Môže neskúsený hodnotiteľ vykonávať hedonické posúdenie?

Odpovede sú na str. 93

Ukážky senzorických metód sú v prílohách D, E, F

Odpovede na otázky

1. Z nameranej absorbancie nie je možné hmotnostnú koncentráciu niklu stanoviť.
Rozsah odozvy kalibračných koncentrácií ja max 0,330, čo odpovedá pracovnému rozsahu do 50 µg/l.
2. < 16,5 µg/kg
3. CRM slúži na stanovenie presnosti metódy a na zabezpečenie kvality výsledkov
4. $11,89 \pm 0,41 [\%]^{V/V}$
5. $\rho = 2,49 \text{ mg/l}$
6. Byreta
7. Roztok činidla so známou koncentráciou, ktoré reaguje so stanovovanou látkou.
8. Použité titračné činidlo nemusí byť stále, jeho koncentrácia sa môže časom meniť.
Pre výpočty je potrebné poznať presnú hodnotu jeho koncentrácie v čase skúšky.
9. Nie. Nasala by vzdušnú vlhkosť a prach, čo by zaťažilo váženie chybou.
10. Áno. Intenzitu žiarenia ovplyvňuje okrem absorpcie stanovovanej látky aj samotné prostredie spektrofotometra, rozpúšťadlo a použité chemikálie. Na kompenzáciu tohto vplyvu je potrebné poznať absorbanciu blanku.
11. Nie. V priebehu predanalytickej fázy môže dôjsť k určitej strate analytu. Táto skutočnosť je eliminovaná, keď aj štandardy prejdú tým istým procesom, kde riziko straty analytu je porovnateľné so vzorkou.
12. Áno, pokiaľ bezfarebná látka dokáže absorbovať svetlo z neviditeľnej UV oblasti, ktorej vlnová dĺžka je v pracovnom rozsahu zariadenia.
13. Nie, obyčajné sklo neprepúšťa UV žiarenie.
14. Meraný signál vzniká pri elektrónových prechodoch v atómoch.
15. Excitovaný elektrón sledovaného prvku emitujúci fotóny pri návrate do základného stavu.
16. Lampa, v ktorej rovnaký prvok ako sledovaná látka emituje fotóny.
17. Nie, môže sa merať len jeden prvok podľa zdroja žiarenia.
18. Organické látky.

19. Áno, pokiaľ sú aspoň čiastočne prchavé pri pracovnej teplote a nerozkladajú sa teplom.
20. Nepomáha, technika headspace sa využíva len pre prchavé zložky.
21. Na sorbente v kolóne.
22. Áno, detekcia sa vykoná postrekom s vhodnými reagensiami, príp. sa pre niektoré látky využije zviditeľnenie UV žiarením.
23. Nie. Hodnota eletródového potenciálu nie je zmerateľná, meria sa len rozdiel potenciálov a na to je potrebný pár elektród, z ktorých jedna je pracovná a druhá referenčná.
24. Nie, aj voda zbavená cudzích prímiesí má svoju vodivosť vyššiu, pri teplote 25 °C je to 5,483 $\mu\text{S/m}$, nakoľko sa rozkladá na elektricky nabité ióny H^+ a OH^- .
25. Žiadne zvláštne požiadavky.
26. Pach je všeobecný termín, u každého môže vyvolávať aj nepríjemné pocity, keď ide o zápach, aj príjemné pocity, keď ide o vôňu.
27. Môže, pri spotrebiteľskom hodnotení.

Zoznam použitých skratiek

| | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAS | atómová absorpčná spektrometria |
| AES | atómová emisná spektrometria |
| BIPM | Medzinárodný úrad pre váhy a miery (z franc. <i>Bureau International des Poids et Mesures</i>) |
| CRM | certifikovaný referenčný materiál |
| DAD | detektory s diódovým poľom (angl. <i>Diode-array detector</i>) |
| ET AAS | bezplameňová AAS (angl. <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| FL AAS | plameňová AAS (angl. <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| GC | plynová chromatografia (angl. <i>Gas chromatography</i>) |
| HG AAS | hydridová AAS (angl. <i>Hydride generation Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| HPLC | vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z angl. <i>High performance liquid chromatography</i>) |
| ICP | atómová emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou - (angl. <i>Inductively coupled plasma</i>) |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| LC | kvapalinovú chromatografiu (angl. <i>Liquid chromatography</i>) |
| LOD | medza dôkazu, detekčný limit (angl. <i>Limit of detection</i>) |
| LOQ | medza stanovenia (angl. <i>Limit of quantification</i>) |
| PC | papierová chromatografia (angl. <i>Paper chromatography</i>) |
| RM | referenčný materiál |
| SMÚ | Slovenský metrologický ústav |
| SNAS | Slovenská národná akreditačná služba |
| SPE | extrakcia na tuhej fáze (z angl. <i>Solid Phase Extraction</i>) |
| ŠPP | štandardný pracovný postup |
| TLC | tenkovrstvová chromatografia (angl. <i>Thin layer chromatography</i>) |
| UPLC | ultravysoko účinná chromatografia, (angl. <i>Ultra high performance liquid chromatography</i>) |
| UV | ultrafialové žiarenie |

VIS viditeľné žiarenie

Zoznam obrázkov a tabuliek

| | | |
|------------|------------------------------------------------------------|----|
| Obr. č. 1 | Kalibračné štandardy..... | 7 |
| Obr. č. 2 | Kalibračná krivka - grafický záznam..... | 7 |
| Obr. č. 3 | Odozva kalibračných štandardov, kalibračné funkcie..... | 10 |
| Obr. č. 4 | Grafické znázornenie pracovného rozsahu metódy..... | 13 |
| Obr. č. 5 | Grafické znázornenie presnosti, správnosti, zhodnosti..... | 14 |
| Obr. č. 6 | Grafické zobrazenie neistoty..... | 18 |
| Obr. č. 7 | Odhad neistoty | 18 |
| Obr. č. 8 | Citlivosť metódy..... | 20 |
| Obr. č. 9 | Regulačný X-diagram..... | 23 |
| Obr. č. 10 | Regulačný R- diagram rozpätia..... | 24 |
| Obr. č. 11 | Spôsoby zápisu výsledkov v závislosti od koncentrácie..... | 25 |
| Obr. č. 12 | Ukážka zápisov výsledkov..... | 25 |
| Obr. č. 13 | Neistota a porovnanie s limitnou hodnotou..... | 27 |
| Obr. č. 14 | Schéma nadväznosti meraní..... | 29 |
| Obr. č. 15 | Zariadenie na odmernú analýzu..... | 33 |
| Obr. č. 16 | Elektromagnetické spektrum..... | 37 |
| Obr. č. 17 | Vznik spektra disperziou na hranole..... | 37 |
| Obr. č. 18 | Lambertov-Beerov zákon..... | 39 |
| Obr. č. 19 | Schematický náčrt spektrofotometra..... | 40 |
| Obr. č. 20 | Elektrónové prechody pri AAS..... | 43 |
| Obr. č. 21 | Schematický náčrt atómového absorpčného spektrometra..... | 44 |
| Obr. č. 22 | Zdroj žiarenia..... | 44 |
| Obr. č. 23 | Horák pre AAS..... | 45 |
| Obr. č. 24 | Monochromátor..... | 45 |
| Obr. č. 25 | Detektor..... | 46 |
| Obr. č. 26 | Odozva detektora pre FL AAS..... | 46 |
| Obr. č. 27 | Odozva detektora pre ET AAS..... | 46 |
| Obr. č. 28 | Jednouúčelový prístroj na meranie ortuti..... | 49 |
| Obr. č. 29 | Elektrónové prechody pri AES..... | 50 |
| Obr. č. 30 | Schematické znázornenie pokusu M. S. Cveta..... | 51 |
| Obr. č. 31 | Základný systém tenkovrstvovej chromatografie..... | 54 |
| Obr. č. 32 | Hodnotenie chromatogramu TLC..... | 55 |

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Obr. č. 33 | Bloková schéma chromatografu..... | 57 |
| Obr. č. 34 | Chromatogram – grafický záznam..... | 58 |
| Obr. č. 35 | Základné elučné charakteristiky v kolónovej chromatografii..... | 59 |
| Obr. č. 36 | Charakteristiky chromatografického píku..... | 61 |
| Obr. č. 37 | Príprava vzorky extrakciou SPE..... | 63 |
| Obr. č. 38 | Schematický náčrt plynového chromatografu..... | 65 |
| Obr. č. 39 | Hmotnostné spektrum – závislosť intenzity od m/z..... | 66 |
| Obr. č. 40 | Schematický náčrt kvapalinového chromatografu..... | 67 |
| Obr. č. 41 | Schéma potenciometrického merania pH..... | 71 |
| Obr. č. 42 | Zmyslové hodnotenie v senzorickej analýze..... | 77 |
| Obr. č. 43 | Rozloženie receptorov základných chutí na jazyku..... | 80 |
| Obr. č. 44 | Príklad usporiadania miestnosti pre senzorické hodnotenie..... | 85 |
| Obr. č. 45 | Ukážka profilového testu..... | 89 |
| Obr. č. 46 | Neštruktúrovaná úsečka | 90 |
| Obr. č. 47 | Štruktúrovaná úsečka..... | 90 |
| Obr. č. 48 | Plošný graf na posúdenie dvoch vlastností..... | 90 |
| Tab. č. 1 | Požiadavky Vyhlášky MZ SR 247/2017 Z. z. na vybrané ukazovatele kvality pitnej vody | 13 |
| Tab. č. 2 | Zabezpečenie kvality dosahovaných výsledkov | 22 |

Zoznam použitej literatúry

- 1 BEATY, R. D., KERBER, J. D. 1993. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*. 2nd Edition. Norwalk, CT, USA , The Perkin-Elmer Corporation, 1993. 95 p.
- 2 Brindza, J. et al. 2013. Morphological, biochemical and sensory characteristics of black mulberry fruits. In *Potravinárstvo*, 2013, vol. 7, no. 1, s. 36-44.
- 3 Burns, D. T., Szabadvary, F., Zolotov, Y. A. 2019. History of Analytical Science. In Worsfold, P., Poole, C (eds). 2019. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*. Elsevier, 2019, p. 399-410. ISBN 978-0-08-101984-9
- 4 CZOCHER, T. 2003. Získanie, štatistické spracovanie a vyhodnotenie validačných charakteristík skúšobných metód. In. Zabezpečenie kvality skúšobných laboratórií. Validácia softvéru a skúšobných metód. J. Garaj, V. Pätoprstý (eds). Bratislava, Eurachem Slovakia, 2003, s. 21-26.
- 5 ČAKRT, M. et al. 1989. *Praktikum z analytickej chémie*. Bratislava, ALFA, 1989. 644 s. ISBN 80-05-00112-6
- 6 EURACHEM. 2019. Eurachem/CITAC Guide GC Metrological Traceability in Analytical measurement. 2nd ed. S. L. R. Ellison, A. Williams (eds). Eurachem, 2019, 38 p. ISBN 978-0-948926-34-1
- 7 EURACHEM. 2012. Eurachem/CITAC Guide GC 4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3rd ed. S. L. R. Ellison, A. Williams (eds). Eurachem, 2012, 133 p. ISBN 0-948926-15-5
- 8 EURACHEM. 2014. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 2nd ed. Eurachem, 2014, 62 p. ISBN 978-91-87461-59-0
- 9 EURACHEM. 2016. Eurachem/CITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation (3rd Edition. V. Barwick (Ed). Eurachem, 2016, 59 p. ISBN 978-0-948926-32-7
- 10 FUNK, W., DAMMANN, V., DONNEVERT, G. 1995. *Quality Assurance in Analytical Chemistry*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1995. 238 p. ISBN 3-527-28668-3

- 11 GARAJ J., BUSTIN D., HLADKÝ Z. 1987. *Analytická chémia*. Bratislava, STNL/ALFA, 1987. 744 s.
- 12 CHROM ACADEMY. Sample Preparation. Solid Phase Extraction – Overview. E-learning for the analytical chemistry community. [online] [cit. 2019-11-21] Dostupné na internete:
<https://www.chromacademy.com/lms/sco53/Sample_Preparation_Solid_%20Phase_Extraction_Overview.pdf>
- 13 IUPAC. 2019. *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. A. D. McNaught, A. Wilkinson (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. [online] [cit. 2019-11-21] Dostupné na internete: <<http://goldbook.iupac.org/>>
- 14 JEŽEK, F. 2014. *Senzorická analýza potravín. Návod na cvičení*. Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. 79 s. ISBN 978-80-7305-725-1
- 15 JEŽEK, F., SALÁKOVÁ, A. 2012. *Senzorická analýza potravín*. Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. 125 s.
- 16 Labuda, J. et al. Terminológia v oblasti analytických chemických meraní. [online] [cit. 2019-11-21] Dostupné na internete:
<<http://www.chtf.stuba.sk/kalch/education/terminologia.pdf>>
- 17 MILESTONE. 2018. Milestone Helping Chemists. DMA-80. Direct Mercury Analyzer. Brochure. Milestone 2018, 8 p.
- 18 PRÍBELA, A. 1991. *Analýza potravín*. Bratislava, STU, 1991. 225 s. ISBN 80-227-0374-5
- 19 Príbel, A. 2001. *Akreditácia skúšobných laboratórií a senzorické hodnotenie potravín*. Bratislava, STU, 2001. 103 s.
- 20 ROVNÝ, I. et al. 2004. *Objektívizácia faktorov prostredia*. Bratislava, SZU, 2004. s. 2-58. ISBN 80-89171-18-4
- 21 SERBÍN, R., ŠANDREJOVÁ, J. 2017. *Pokročilé praktikum z analytickej chémie*. Košice, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, 2017. 58 s. ISBN 978-80-8152-573-5
- 22 SIROTIK, M., BLINOVÁ, L., BARTOŠOVÁ, A. 2017. Stanovenie organoleptických vlastností vôd z hľadiska správnosti a bezpečnosti manažérstva

- životného prostredia. In Manažérstvo životného prostredia 2017. – Recenzovaný zborník zo XVII. Medzinárodnej vedeckej konferencie v Bratislave. M. Rusko (ed). Žilina: Strix et SSŽP, Edícia ESE-33, 2017, s. 26-37. ISBN 978-80-89753-15-4
- 23 SLOVENSKÁ LEGÁLNA METROLÓGIA/ EURAMET. 2014. Metrológia v skratke. Doplnené vydanie. SLM/Enterprise, 2014. 86 s. ISBN 978-80-85342-35-2
- 24 ŠEVČÍK, J. G. K. 1999. Plynová chromatografie a její aplikace v organické analýze. In Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 1999. s. 103-150. ISBN 80-902432-9-0
- 25 UNIVERZITA KARLOVA. Optické metody. [online] [cit. 2019-11-21] Dostupné na internete:
<http://www.lfp.cuni.cz/biochemie/pages/vyuka/materialy/Optick%C3%A9%20metody_teorie.pdf >
- 26 *Vyhláška č. 247/2017 Z. z. Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky, ktorou sa ustanovujú podrobnosti o kvalite pitnej vody, kontrole kvality pitnej vody, programe monitorovania a manažmente rizík pri zásobovaní pitnou vodou (v znení č. 97/2018 Z. z.)*
- 27 STN EN ISO 8589: 2007, *Senzorická analýza. Všeobecný návod na usporiadanie senzorických pracovísk.*
- 28 STN EN ISO/IEC 17012: 2017, *Všeobecné požiadavky na kompetentnosť skúšobných a kalibračných laboratórií.*
- 29 STN ISO 5725-1: 2000, *Presnosť (správnosť a zhodnosť) metód a výsledkov merania. Časť 1: Všeobecné zásady a definície.*

Prílohy

Príloha A Spektrofotometria - stanovenie dusičnanov v pitnej vode

Podstatou skúšky je spektrofotometrické meranie žltej zlúčeniny pri vlnovej dĺžke 415 nm, ktorá vznikne z dusičnanov reakciou kyseliny sulfosalicylovej, vytvorenej pridaním salicylanu sodného a kyseliny sírovej do vzorky a následnou alkalizáciou. Aby sa vápenaté a horečnaté soli nezrážali hydroxidom, pridáva sa chelaton III. Na odstránenie rušivých vplyvov dusitanov sa pridáva azid sodný. V prípade, že pH vzorky je vyššie ako 8,0, vzorka sa neutralizuje kyselinou octovou.

Príprava metódy pred rutinným meraním

Pripravajú sa chemikálie a činidlá s čistotou pre analýzu (označenie *p. a.*), veľmi dôležitá je demineralizovaná voda s vhodnou vodivosťou ako rozpúšťadlo.



Chemikálie a činidlá

salicylan sodný, roztok, $\rho = 10 \text{ g/l}$
kyselina sírová, koncentrovaná
alkalický roztok hydroxidu sodného a chelatonu III
azid sodný, roztok $\rho = 0,5 \text{ g/l}$
dusičnan draselný, zásobný roztok dusičnanov,
 $\rho(\text{NO}_3)^- = 100 \text{ mg/l}$

Všetky pripravené roztoky musia byť označené štítkom

Na štítku sú zvyčajne údaje

zloženie (názov)

koncentrácia (množstvo), údaj o jednotkách

šarža/evidenčné číslo

dátum prípravy, dátum expirácie

meno pracovníka, ktorý roztok pripravil

číslo postupu, podľa ktorého postupoval

Dusičnany, zásobný roztok $\rho = 100 \text{ mg/l}$

| | |
|-----------------|------------|
| Evidenčné číslo | 2.3.16 |
| Dátum prípravy | 10.09.2019 |
| Expirácia | 10.12.2019 |
| Č. ŠPP | ŠPP 07 |
| Pripravil | Čajdová |

Na analýzu sa do odparovacej misky odpipetuje skúšobný objem $V = 5 \text{ ml}$ vzorky vody zbavenej nerozpustných látok.



Postupne sa pridá 0,5 ml roztoku azidu sodného, 0,2 ml kyseliny octovej, 1 ml roztoku salicylanu sodného a po premiešaní sa zmes odparí vo vodnom kúpeli do sucha. Pridá sa 1,00 ml kyseliny sírovej a odparok na miske sa rozpustí. Po 10 minútach sa pridá 10 ml vody a 10 ml alkalického roztoku

Zmes sa kvantitatívne preniesie do odmernej banky s objemom 50 ml a doplní po značku vodou

Rovnakým postupom sa pripraví aj **slepá vzorka** bez obsahu dusičnanov, kde sa namiesto skúšobného objemu vzorky použije 5 ml vody. Tak isto sa pripravia aj **kalibračné roztoky**, nariadené zo zásobného roztoku dusičnanov podľa tabuľky.

| Kalibračné roztoky dusičnanov v 50 ml objeme | | | | | | |
|----------------------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|------|
| Objem zásobného roztoku (ml) | 0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 |
| Prepočet na $\rho(\text{NO}_3)^-$ (mg/l) | 0 | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 |

Príprava kalibračných roztokov



Po pridaní všetkých reagensí podľa postupu a doplnení na objem 50 ml sa pre príslušné koncentrácie zistia odpovedajúce absorbancie

Na získanie parametrov kalibračnej krivky sa vykonávajú merania z viacerých súborov kalibračných roztokov pripravených v rôzne dni

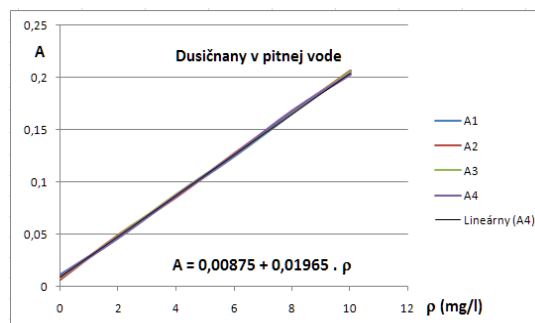
Optická dráha lúča $l = 1$ cm, vlnová dĺžka $\lambda = 415$ nm

Grafickým zobrazením závislosti je kalibračná krivka, matematickým vyjadrením je rovnica funkcie

Namerané údaje zo 4 nezávislých sérií

| Hmotnostná koncentrácia ρ (mg/l) | Absorbancia | | | |
|------------------------------------------|-------------|------------------------------------|-------|-------|
| | A_1 | A_2 | A_3 | A_4 |
| 0,0 | 0,011 | 0,007 | 0,009 | 0,010 |
| 2,0 | 0,047 | 0,049 | 0,048 | 0,047 |
| 4,0 | 0,087 | 0,086 | 0,088 | 0,087 |
| 6,0 | 0,125 | 0,127 | 0,126 | 0,126 |
| 8,0 | 0,166 | 0,167 | 0,167 | 0,168 |
| 10,0 | 0,206 | 0,206 | 0,205 | 0,203 |
| Rovnica v tvare: $y = a + b \cdot x$ | | $A = 0,00875 + 0,01965 \cdot \rho$ | | |

Kalibračná krivka $l = 1$ cm, $\lambda = 415$ nm



Pre dusičnany v sledovanom rozpätí je kalibračná krivka lineárna a možno ju vyjadriť rovnicou priamky $y = a + b \cdot x$

Na osi y je posun pri nulovej koncentrácii, spôsobený malou absorbanciou slepej vzorky

Na úspešné uvedenie do užívania sa musí metóda validovať, zdokumentovať do validačného protokolu a štandardného pracovného postupu a otestovať na kontrolných referenčných materiáloch. Až po úspešnej účasti na medzilaboratórnom porovnávaní je možné uviesť ŠPP do rutinného používania.

Stanovenie dusičnanov v pitnej vode – rutinná analýza



Odber vzoriek do sklených alebo plastových vzorkovníc, bez vzduchovej bubliny, transport v chladiacom boxe

Príjem vzorky do laboratória, pridelenie identifikačného čísla, záznam o evidencii

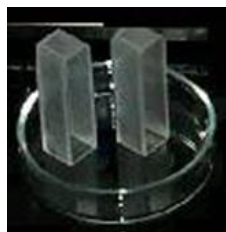
Skladovanie pred analýzou v chladničke, 2 – 5 °C, analýza najneskôr do 24 hodín

Príprava vzorky podľa ŠPP

Na analýzu sa použijú dva až tri samostatné objemy vzorky a kontrolnej vzorky – nezávislé paralelné stanovenia prejdú celým procesom

Meranie

Kontrola prístroja
Nastavia sa parametre kalibračnej krivky, vlnová dĺžka 415 nm



Kyvety $l = 1$ cm

Pri vložení kyvety s destilovanou vodou sa nastaví prístrojová nula

Vloží sa blank, zmeria sa absorbancia

Zisťuje sa štatistická významnosť rozdielu oproti blankom z kalibračnej krivky

Do kyvetového priestoru sa vloží kyveta postupne so všetkými pripravenými podielmi vzorky, zmerajú sa absorbancie

V prípade, že nameraná hodnota je mimo kalibračného rozsahu, vzorky sa musia pripraviť z menšieho objemu

Zmerajú sa aj vzorky zabezpečenia kvality

Vyhodnotenie výsledkov merania

| Nameraná absorbancia A | | Hmotnostná koncentrácia zistená z kalibračného vzťahu | | Prepočet na 1000 ml | |
|------------------------|-------|-------------------------------------------------------|----------|------------------------------------------|-------------------------|
| | | | | $\rho_{(vz)} = \rho_k \cdot 50/V$ (mg/l) | |
| $A_{(vz)1}$ | 0,058 | $\rho_{(k)1}$ | 2,5 mg/l | $\rho_{(vz)1} = 2,5 \cdot 50/5 = 25$ | $\rho_{(vz)} = 26$ mg/l |
| $A_{(vz)2}$ | 0,062 | $\rho_{(k)2}$ | 2,7 mg/l | $\rho_{(vz)2} = 2,7 \cdot 50/5 = 27$ | |

[illegible]

Príloha B AAS - Stanovenie olova v pitnej vode metódou ET AAS

Skúšobná dávka vzorky vody okyslená kyselinou dusičnou sa dávkuje do elektrotermického atomizátora. V grafitovej kyvete sa olovo zo svojich zlúčenín pôsobením vysokej teploty uvoľní vo forme voľných Pb atómov, ktoré sú schopné pohlcovať žiarenie emitované lampou s olovenou katódou. Vzniknutý signál zaznamenaný detektorom sa vyhodnocuje softvérom na základe kalibrácie.

Príprava metódy pred rutinným meraním

Pripravajú sa chemikálie a činidlá s čistotou suprapur pre stopovú analýzu, veľmi dôležité rozpúšťadlo je redistilovaná voda s vhodnou vodivosťou.



Chemikálie a činidlá

Kyselina dusičná, $w(\text{HNO}_3) = 65\%$ (m/m)

Olovo, zásobný roztok z $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\rho(\text{Pb}) = 1 \text{ mg/ml}$

Olovo, pracovný štandard, $\rho(\text{Pb}) = 40 \text{ }\mu\text{g/l}$

$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2/\text{HNO}_3$ 15%, $\rho(\text{Pd}) = 10 \text{ g/l}$, modifikátor

$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{HNO}_3$ 17%, $\rho(\text{Mg}) = 10 \text{ g/l}$, modifikátor

Roztoky štandardu sa skladujú v PVC nádobách, aby sa minimalizovala adsorpcia kovu na stenách nádoby

Všetky pripravené roztoky musia byť označené štítkom

Na štítku sú zvyčajne údaje

zloženie (názov)

koncentrácia (množstvo), údaj o jednotkách

šarža/evidenčné číslo

dátum prípravy, dátum expirácie

meno pracovníka, ktorý roztok pripravil

číslo postupu, podľa ktorého postupoval

Olovo, pracovný štandard $\rho = 40 \text{ }\mu\text{g/l}$ v HNO_3 1% (V/V)

| | |
|-----------------|------------|
| Evidenčné číslo | 2.9.25 |
| Dátum prípravy | 10.09.2019 |
| Expirácia | 11.09.2019 |
| Č. ŠPP | ŠPP 11 |
| Pripravil | Čajdová |

Prístroj: atómový absorpčný spektrometer s elektrotermickým atomizátorom

Na kalibráciu sa do meracích vialiek pripraví slepá vzorka a pracovný roztok olova $\rho(\text{Pb}) = 40 \text{ }\mu\text{g/l}$, z ktorého sa podľa zvoleného programu automatickým riedením postupne dávkujú kalibračné štandardy.

| Kalibračné roztoky olova | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------|---|---|----|----|----|----|
| Poradové číslo | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| $\rho(\text{Pb})$ ($\mu\text{g/l}$) v HNO_3 1% (V/V) | 0 | 8 | 16 | 24 | 32 | 40 |

Optimalizácia pracovných podmienok pred meraním

Pracovné podmienky

- zameria sa lúč emitovaný z lampy s dutou katódou na detektor
- nastaví sa poloha elektrotermického (ET) atomizátora
- nastaví sa poloha dávkovacej kapiláry automatického dávkovača
- nastaví sa prístrojová nula, t.j. odozva prístroja na nulovú absorbanciu

- lampa s dutou katódou pre Pb
- vlnová dĺžka : 283,3 nm
- príkion lampy : 5 mA
- šírka štrbiny: 0,5 nm
- kompenzácia pozadia: áno
- spôsob vyhodnotenia signálu: absorbancia – výška píku
- nosný plyn: dusík

Nastavenie parametrov atomizátora

| Parametre ET atomizátora | | | | | Matrica: pitná voda |
|--------------------------|-----------------------|---------|-----------------------------------------|----------------------|---------------------|
| Poradové č. kroku | Teplota v kyvete (°C) | Čas sek | Prietok dusíka (l . min ⁻¹) | Vyhodnotenie signálu | Fáza |
| 1 | 85 | 5,0 | 3,0 | Nie | Sušenie |
| 2 | 95 | 25,0 | 3,0 | Nie | |
| 3 | 95 | 25,0 | 3,0 | Nie | |
| 4 | 120 | 5,0 | 3,0 | Nie | |
| 5 | 550 | 10,0 | 3,0 | Nie | Pyrolýza |
| 6 | 550 | 5,0 | 3,0 | Nie | |
| 7 | 550 | 2,0 | 0,0 | Nie | |
| 8 | 2100 | 0,8 | 0,0 | Áno | Atomizácia |
| 9 | 2100 | 2,0 | 0,0 | Áno | |
| 10 | 2100 | 2,0 | 3,0 | Nie | |

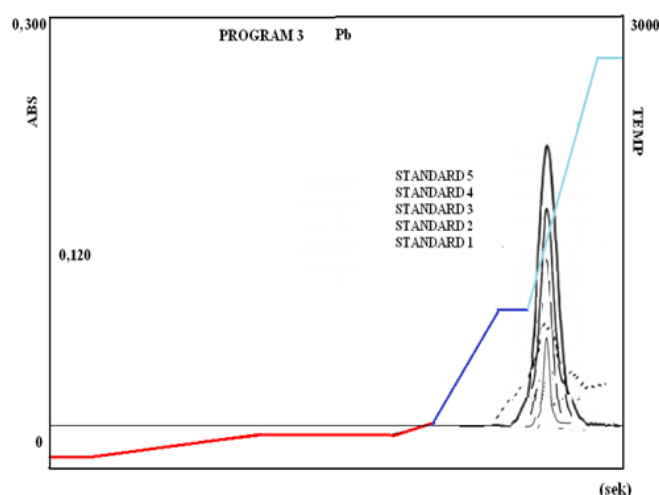
Teplotný program je rozdelený do stupňov:

1. Sušenie
2. Spaľovanie, pyrolýza
3. Atomizácia

Po meraní nasleduje fáza čistenia, kedy sa odparia zvyšky vzorky a fáza chladenia, kedy sa teplota vráti na počiatočnú hodnotu programu.

Parametre kalibračnej krivky sa získavajú z meraní viacerých súborov kalibračných roztokov vykonaných v rôzne dni.

Atomizačné píky štandardov

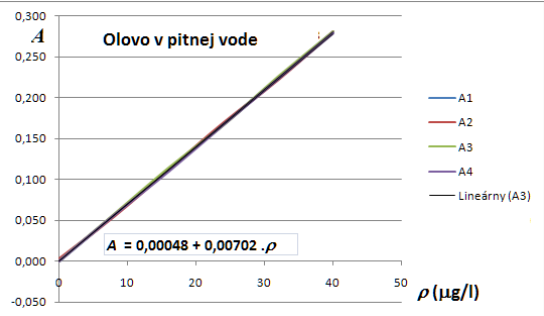


Pre každý kalibračný roztok je odozva detektora v tvare atomizačného píku.

Program umožňuje navrstviť postupne získané signály cez seba a porovnávať výšky píkov.


- | | |
|------------------|------------------|
| Štandard 0 µg/l | Štandard 24 µg/l |
| Štandard 8 µg/l | Štandard 32 µg/l |
| Štandard 16 µg/l | Štandard 40 µg/l |

Grafickým zobrazením závislosti je kalibračná krivka, matematickým vyjadrením je rovnica funkcie.

| Namerané údaje zo 4 nezávislých sérií | | | | | Kalibračná krivka |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Olovo v pitnej vode | | | | |  |
| $\rho (\mu\text{g/l})$ | A_1 | A_2 | A_3 | A_4 | |
| 0 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | |
| 8 | 0,056 | 0,055 | 0,057 | 0,056 | |
| 16 | 0,112 | 0,112 | 0,114 | 0,110 | |
| 24 | 0,167 | 0,169 | 0,167 | 0,167 | |
| 32 | 0,224 | 0,222 | 0,226 | 0,223 | |
| 40 | 0,280 | 0,280 | 0,281 | 0,279 | |
| Pre olovo v sledovanom rozpätí je kalibračná krivka lineárna a možno ju vyjadriť rovnicou priamky $y = a + bx$ | | | | | |

Na úspešné uvedenie do užívania sa musí metóda validovať, zdokumentovať do validačného protokolu a štandardného pracovného postupu a otestovať na kontrolných referenčných materiáloch. Až po úspešnej účasti na medzilaboratórnom porovnávaní je možné uviesť ŠPP do rutinného používania.

Stanovenie olova v pitnej vode – rutinná analýza

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | Odber vzoriek do plastových vzorkovníc, bez vzduchovej bubliny, transport v chladiacom boxe |
| | Príjem vzorky do laboratória, pridelenie identifikačného čísla, záznam o evidencii |
| | Skladovanie pred analýzou v chladničke, 2 – 5 °C, vzorka konzervovaná kyselinou dusičnou |
| | Príprava vzorky podľa ŠPP Na analýzu sa použijú dva až tri samostatné objemy vzorky a kontrolnej vzorky – nezávislé paralelné stanovenia prejdú celým procesom |

Pred meraním sa optimalizujú pracovné podmienky

Nastavia sa parametrv ET atomizátora

Vyhodnotenie výsledkov merania

| Nameraná absorbancia A | | Hmotnostná koncentrácia odčítaná z kalibračného vzťahu | | |
|------------------------|-------|--------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| $A_{(vz)1}$ | 0,036 | $\rho_{(vz)1}$ | 5,1 $\mu\text{g/l}$ | $\rho_{(vz)} = 5,2 \mu\text{g/l}$ |
| $A_{(vz)2}$ | 0,037 | $\rho_{(vz)2}$ | 5,2 $\mu\text{g/l}$ | |

[illegible]

Príloha C HPLC - Stanovenie kofeínu v nealkoholických nápojoch

Alikvotná časť roztoku pripraveného z analyzovanej vzorky je dávkaná na chromatografickú kolónu. Analyt sa delí od interferentov na základe rôznych interakcií s mobilnou (metanol + voda) a stacionárnou fázou (C-18), deteguje sa pri vlnovej dĺžke 280 nm. Kvantifikuje sa plocha píku, ktorá je úmerná koncentrácii analytu vo vzorke podľa kalibračnej závislosti získanej meraním štandardných roztokov so známym obsahom analytu.

Príprava metódy pred rutinným meraním

Pripravajú sa chemikálie a činidlá s čistotou pre HPLC, veľmi dôležité rozpúšťadlo je redestilovaná voda s vhodnou vodivosťou.



Chemikálie a činidlá

Metanol

Redestilovaná voda

Kofeín, základný roztok, $\rho = 100 \text{ mg/l}$

Všetky pripravené roztoky musia byť označené štítkom

Na štítku sú zvyčajne údaje

zloženie (názov)

koncentrácia (množstvo), údaj o jednotkách

šarža/evidenčné číslo

dátum prípravy, dátum expirácie

meno pracovníka, ktorý roztok pripravil

číslo postupu, podľa ktorého postupoval

| Kofeín, základný roztok $\rho = 100 \text{ mg/l}$ | |
|------------------------------------------------------|------------|
| Evidenčné číslo | 3.17.11 |
| Dátum prípravy | 10.09.2019 |
| Expirácia | 10.12.2019 |
| Č. ŠPP | ŠPP 15 |
| Pripravil | Čajdová |

Na kalibráciu sa do meracích vialiek pripraví slepá vzorka a základný roztok kofeínu $\rho = 100 \text{ mg/l}$, z ktorého sa podľa zvoleného programu automatickým riedením postupne dávkujú kalibračné štandardy.

| Kalibračné roztoky kofeínu | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------|---|----|----|----|----|----|
| Poradové číslo | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Objem (μl) zákl. roztoku ($\rho = 100 \text{ mg/l}$) | 0 | 2 | 6 | 10 | 14 | 18 |
| Kalibračný roztok kofeínu (mg/l) | 0 | 10 | 30 | 50 | 70 | 90 |

| Zostava HPLC prístroja | | | | |
|------------------------|----------------------------------------|-------------|--------------------|-----------------------------------|
| pumpa | mobilná fáza metanol : voda (30:70) | autosampler | UV-VIS detektor | separačná kolóna RP-18, 125 mm |

Pred meraním sa nastaví parametre metódy, po dôkladnom vypudení vzduchových bublín zo systému sa kolóna nechá kondicionovať 5 až 20 minút pretekaním mobilnej fázy, ktorá bude použitá pri analýze, zmeria sa prvá séria kalibračných bodov. Zistia sa základné charakteristiky pre kofeín.

Parametre metódy

- Vlnová dĺžka: 280 nm
- Nástreč na kolónu: 20 µl vzorky
- Prietok: 1,00 ml/min

Základné charakteristiky

- Doba trvania analýzy: 8 minút
- Absorbančný rozsah: 0 až 100 mV
- Retenčný čas - kofeín: 4,4 min

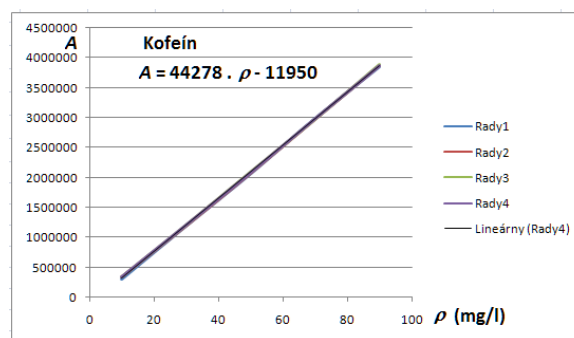
Parametre kalibračnej krivky sa získavajú z meraní viacerých súborov kalibračných roztokov vykonaných v rôzne dni.

Grafickým zobrazením závislosti je kalibračná krivka, matematickým vyjadrením je rovnica funkcie.

Namerané údaje zo 4 nezávislých sérií

| Kofeín | | | | |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Koncentrácia (mg/l) | Plochy (µV.s) | | | |
| | A ₁ | A ₂ | A ₃ | A ₄ |
| 10 | 312067 | 343457 | 345595 | 333706 |
| 30 | 1200619 | 1199620 | 1209427 | 1203222 |
| 50 | 2072143 | 2079740 | 2091439 | 2081107 |
| 70 | 2993991 | 2979666 | 2971175 | 2981611 |
| 90 | 3860653 | 3876032 | 3880224 | 3872303 |

Kalibračná krivka



Pre kofeín v sledovanom rozpätí je kalibračná krivka lineárna a možno ju vyjadriť rovnicou priamky $y = a + bx$

Na úspešné uvedenie do užívania sa musí metóda validovať, zdokumentovať do validačného protokolu a štandardného pracovného postupu a otestovať na kontrolných referenčných materiáloch. Až po úspešnej účasti na medzilaboratórnom porovnávaní je možné uviesť ŠPP do rutinného používania.

Stanovenie kofeínu vo vzorke nealkoholického nápoja – rutinná analýza



Prijem vzorky do laboratória, pridelenie identifikačného čísla, záznam o evidencii

Skladovanie pred analýzou v chladničke, 2 – 5 °C

Vzorka sa dokonale premieša, 50 ml vzorky nápoja v kadičke sa nechá odplynúť v ultrazvukovom kúpeli asi 5 minút, potom sa zriedi vodou v pomere 1:5. Zriedený roztok vzorky sa dôkladne premieša a prefiltruje

Na analýzu sa použijú dva až tri samostatné objemy vzorky a kontrolnej vzorky – nezávislé paralelné stanovenia prejdú celým procesom

Pred meraním sa nastaví pracovné podmienky, parametre metódy a kolóna sa nechá kondicionovať.

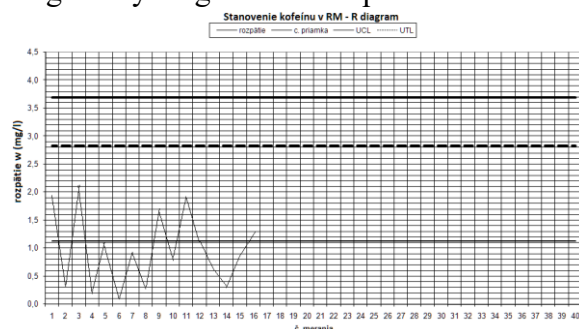
Vyhodnotenie výsledkov merania

| Výsledky merania, výpočet | | | | |
|---------------------------------------------|--------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Nameraná absorbančia A vzorky riedenej 1 :5 | | Hmotnostná koncentrácia odčítaná z kalibračného vzťahu, prepočet na riedenie | | |
| $A_{(vz)1}$ | 768464 | $\rho_{(vz)1}$ | 17,6 mg/l . 5 = 88 mg/l | $\rho_{(vz)} = 89$ mg/l |
| $A_{(vz)2}$ | 779520 | $\rho_{(vz)2}$ | 17,9 mg/l . 5 = 90 mg/l | |

Vzorky interného riadenia kvality

Vzorky interného riadenia kvality - referenčné materiály, slepé vzorky

Regulačný diagram R – rozpätie



R-diagram pre RM - kofeín

R-diagram pre slepú vzorku

Do R-diagramu sa zaznamená rozdiel hodnôt paralelných stanovení (rozpätie)

Hodnota sa porovná s varovnými a regulačnými hranicami

Kontroluje sa, či nevzniká zoskupenie tvoriace trendy

[illegible]

Príloha D Senzorická analýza – hodnotenie lahôdkarských výrobkov a šalátov

Skúšobnú skupinu tvoria minimálne 3 posudzovatelia

Hodnotí sa obal, vzhľad, konzistencia, farba, vôňa, chuť

Obal: druh obalu, etiketa, čistota a neporušenosť obalu

Vzhľad: tvar a veľkosť komponentov (kúsky, plátky, rezance, prúžky, hranolčky...), spracovanie zeleniny (čerstvá, sterilizovaná, varená), prítomnosť ďalších súčastí (saláma, syr, rybacia svalovina, huby, koreniny), druh prísad – zálievka, nálev, majonéza, prítomnosť cudzorodých častíc

Konzistencia: primeranosť, tvrdosť zeleniny, chrumkavosť, hustota, homogenita nálevu, majonézy, tuhosť, pastovitosť, prítomnosť hrudiek, vzduchových bublín, konzistencia ďalších súčastí

Farba: sfarbenie, typickosť zafarbenia

Vôňa: príjemnosť, druh vône, čistota, ovplyvnenie po použitých prísadách, prítomnosť zatuchnutého alebo cudzorodého pachu

Chuť: hodnotenie pri teplote vzorky 8 - 25 °C: lahodnosť, druh chuti, primeranosť, ovplyvnenie po použitých prísadách, harmonickosť výsledného vnemu, prítomnosť cudzorodej príchuti

Senzorické hodnotenie Krabí šalát

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| SENZORICKÉ VYŠETRENIE: | Dátum skúšky: 21.10.2019 |
| Obal: náhradný obal | |
| Obsah/ vzhľad: zmes pokrájaných kúskov zeleniny, kukurice a krabieho mäsa v majonéze | |
| Konzistencia: mäso a kukurica primerane mäkké, čerstvá zelenina chrumkavá, majonéza polotuhá | |
| Farba: jednotlivé komponenty typickej farby | |
| Vôňa: čistá, po použitých komponentoch, bez cudzích pachov | |
| Chuť: lahodná, po použití krabom mäsa a zelenine, primerane slaná, bez cudzích príchutí | |

Príloha E Senzorická analýza – hodnotenie kozmetických výrobkov

Skúšobnú skupinu tvoria minimálne 3 posudzovatelia

Hodnotí sa obal, vzhľad, konzistencia, farba, vôňa, (chuť)

Obal: druh obalu, etiketa, čistota a neporušenosť obalu

Vzhľad: tvar, špeciálne tvarovanie, deformácie (mydlá), vzhľad povrchu - hladkosť, lesk, reliéf, vady povrchu – prítomnosť škvŕn, prítomnosť vzduchových bubliniek, homogenita (emulzie, pasty, krémy), čírosť, zákal, prítomnosť prísad alebo cudzorodých prímiesí

Konzistencia: po otvorení, pri normálnej teplote:

pevné vzorky: pevnosť, krehkosť, lá mavosť, tuhosť

tekuté vzorky: viskozita, prítomnosť sedimentu, u emulzií a krémov oddelenie tukovej a vodnej fázy

práškové vzorky (zásypy, púdre): sypkosť, prítomnosť hrudiek

po aplikácii na ruku (krémy, emulzie): roztierateľnosť, vstrebateľnosť, doba vstrebania, mazľavosť, pre tyčinky na pery ľahkosť oteru

po aplikácii s vodou (mydlá, šampóny): penivosť

Farba: zafarbenie, jednotnosť odtieňa

Vôňa: príjemnosť, druh a intenzita vône – ovplyvnenie po použitých prísadách, harmonickosť výsledného vnemu, prítomnosť cudzorodého pachu

(Chuť): len pre zubné pasty, ústne vody, tyčinky na pery - druh a intenzita chuti – ovplyvnenie po použitých prísadách, prítomnosť cudzoro dej chuti

Senzorické hodnotenie Kozmetické výrobky

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| SENZORICKÉ VYŠETRENIE: Krém 30 ml | Dátum skúšky: 21.10.2019 |
| Obal: originálny obal kovový, opatrený etiketou, neporušený, čistý, po otvorení ochranná fólia | |
| Obsah/ vzhľad: hladký homogénny krém, bez vzduchových bublín, bez cudzorodých prímiesí | |
| Konzistencia: po otvorení krémovitá, bez oddelených fáz, bez hrudiek; po aplikácii dobre roztierateľná, doba vstrebania 10 s | |
| Farba: biela, jednotná | |
| Vôňa: čistá, príjemná, málo výrazná, bez cudzích pachov | |
| Chuť: - | |

Príloha F Senzorická analýza – hodnotenie pitnej vody

Hodnotí sa pach, v opodstatnených prípadoch chuť

Farba, zákal – hodnotí sa spektrofotometricky

Pach

Čuchová skúška sa vykonáva pri teplote vody 20 °C a 60 °C. Intenzita pachu sa hodnotí slovným popisom a prislúchajúcim stupňom, ako je uvedené v tabuľke. Vyhláška MZ SR č. 247/2017 Z. z. týkajúca sa požiadaviek na kvalitu pitnej vody v znení č. 97/2018 Z. z. považuje za prijateľné prvé dva stupne.

| Intenzita pachu pitnej vody | | |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Stupeň | Slovná charakteristika | Prejav zápachu |
| 0 | Nijaký | Zápach nie je možné zistiť |
| 1 | Veľmi slabý | Zápach nezistí spotrebiteľ, ale môže ho zistiť odborník |
| 2 | Slabý | Zápach zistí spotrebiteľ, pokiaľ je naň upozornený |
| 3 | Badateľný | Zápach možno zistiť |
| 4 | Zreteľný | Zápach vzbudzuje pozornosť a tým aj nechť vodu používať |
| 5 | Veľmi silný | Zápach je taký silný, že sa voda stáva nevhodnou na pitie |

Chuť

Pitná voda by mala byť bez chuti. V prípade neprítomnosti cudzorodých chutí sú chuťové vlastnosti vody podmienené prítomnosťou a kombináciou látok, ktoré majú špecifickú chuť. Výsledná chuť závisí od pomeru medzi vápenatými a horečnatými iónmi a koncentráciou hydrogenuhličitanov, síranov a chloridov. Rozpustený oxid uhličitý vo vyššej koncentrácii môže maskovať nepríjemné chuťové vnemy. Intenzita chuti sa hodnotí slovným popisom a prislúchajúcim stupňom, ako je uvedené v tabuľke.

Vyhláška MZ SR č. 247/2017 Z. z. týkajúca sa požiadaviek na kvalitu pitnej vody v znení č. 97/2018 Z. z. považuje za prijateľné prvé dva stupne.

| Intenzita chuti pitnej vody | |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Stupeň | Slovný popis |
| 0 | Žiadna intenzita |
| 1 | Sotva znateľná intenzita na jazyku po vyprázdnení úst |
| 2 | Znateľná intenzita bez doznievania po vyprázdnení úst |
| 3 | Dobre znateľná intenzita s krátkym i dlhým doznievaním po vyprázdnení úst |
| 4 | Silná intenzita v celej ústnej dutine so silným a dlhým doznievaním po vyprázdnení úst |
| 5 | Extrémna intenzita v celej ústnej dutine s veľmi silným až bolestivým vnemom, ktorý okamžite otupí schopnosť receptorov |