

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2009

Ročník XIII, číslo 1/2009

Brno 2009

Obsah

1. **Porovnání výsledků stanovení obsahu uhlíku a dusíku v půdních vzorcích různými metodami stanovení** 1

Kolektiv
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř a
Odbor informatiky
2. **Zpracování SOP pro přípravu slabých extrakčních činidel (vodný výluh, 1M NH₄NO₃) a měření vyextrahovaných prvků metodou ICP-MS** 11

Eva Niedobová, Elena Obdržálková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
3. **Stanovení mykotoxinů T-2 toxinu a HT-2 toxinu v krmivech** 20

Romana Kalusová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
4. **Stanovení hydroxyprolinu v kuřecím mase metodou ionexové chromatografie** 29

Zora Linhová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Praha, Za Opravnou 4, 150 06 Praha 5- Motol
5. **Alkaloidy lupiny a využití lupiny v krmivářské praxi** 41

Pavel Ryšavý
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Oddělení speciálních analýz rostlin a krmiv,
582 57 Lípa u Havlíčkova Brodu 121

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Plné znění Bulletinů NRL (včetně grafů a obrázků) najdete i na našich webových stránkách v části věnované Národní referenční laboratoři (<http://www.ukzuz.cz>).

Porovnání výsledků stanovení obsahu uhlíku a dusíku v půdních vzorcích různými metodami stanovení

Jaroslava Srnková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Oddělení
mezilaboratorních porovnávacích zkoušek, Hroznová 2, 656 06 Brno
jaroslava.srnkova@ukzuz.cz

Alena Žalmanová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální
oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň
alena.zalmanova@ukzuz.cz

David Čižmár

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální
oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
david.cizmar@ukzuz.cz,

Ota Kunt

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Oddělení
speciálních analýz půd Liberec, Vaňurova 6, 460 01 Liberec
ota.kunt@ukzuz.cz

Pavel Němec

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor informatiky, Hroznová 2,
656 06 Brno
pavel.nemec@ukzuz.cz

Jiří Zbíral

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Hroznová 2,
656 06 Brno
jiri.zbiral@ukzuz.cz

1 Cíl práce

Cílem práce bylo porovnat různé metody stanovení oxidovatelného uhlíku (C_{ox}), celkového uhlíku (C_{tot}) a celkového dusíku (N_{tot}) v půdních vzorcích různými analytickými postupy tak, aby byl definován vztah mezi stávajícími, zpravidla časově náročnými postupy a postupy novými, které nevyžadují složitou úpravu vzorků a problematické chemikálie.

2 Materiál a metody

Pro úkol bylo použito devadesát vzorků zemin z archivu ÚKZÚZ. Jednalo se o suché, upravené, homogenní velkoobjemové vzorky pro mezilaboratorní porovnávací zkoušky. V laboratoři Regionálního oddělení Brno byl metodou blízké infračervené spektroskopie (NIRS) stanoven oxidovatelný uhlík (C_{ox}), celkový uhlík (C_{tot}) a celkový dusík (N_{tot}). V Oddělení speciálních analýz půd v Liberci byl klasickou titrací stanoven celkový dusík a C_{ox} . V laboratoři Regionálního oddělení v Plzni byly na přístroji pro elementární analýzu stanoveny celkové obsahy uhlíku a dusíku.

2.1 Stanovení C_{ox} , C_{tot} a N_{tot} metodou NIRS

Metodu NIRS lze použít pro stanovení oxidovatelného uhlíku C_{ox} a celkového dusíku N_{tot} ve většině lesních půd jak v organickém tak v minerálním horizontu a také pro většinu minerálních půd s přirozeným obsahem organických látek. V žádném případě ji není možno použít pro půdy s nízkým obsahem organické hmoty.

2.1.1 Princip

NIR spektroskopie je analytická metoda využívající interakce mezi dopadajícím zářením a vrstvou materiálu. Spektra se vyhodnocují složitými matematickými statistickými postupy na základě vytvořeného kalibračního modelu. Vzorky jsou analyzovány v pevném stavu, nedestruktivně.

2.1.2 Pracovní postup

Pro stanovení byl použit jednopaprskový přístroj NIRSystems 6500 s holograficky řízenou disperzní mřížkou měřící v rozsahu vlnových délek (400 – 2500) nm. K vyhodnocení byl použit program WINISI II, verze 1.02 (Infrasoft International Inc., USA) a program NIRCalibration 1.0 (Effchem, CZ). Pro měření uskutečněná v této práci bylo spektrum každého vzorku snímáno $25 \times$ s krokem 2 nm (počet bodů 1050). Maximální rychlost snímání spekter je $1,8 \text{ scan} \cdot \text{sec}^{-1}$.

NIR spektra vzorků půd (minerální, organický horizont) byla snímána v kulatých kyvetách (small ring cup) o průměru 5 cm v režimu reflektance. Každý vzorek byl změřen dvakrát, výsledná hodnota C_{ox} , C_{tot} a N_{tot} je průměrnou hodnotou paralelního stanovení. K vyjádření výsledků C_{ox} a N_{tot} v suchém vzorku metodou NIRS byla použita kalibrace na klasickou

titrační metodu. Jako další varianta byly výsledky C_{tot} a N_{tot} odečteny z kalibrací provedených na analyzátor CNS, v tomto případě jsou hodnoty vyjádřeny v sušině.

Podrobnější popis pracovního postupu je uveden v Jednotných pracovních postupech ÚKZÚZ, Analýza půd III., kapitola 1.4 (stanovení C_{ox}) a kapitola 2.1.8 (stanovení N_{tot}) [1].

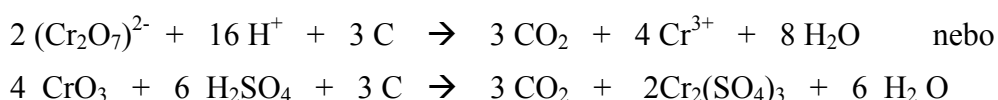
2.2 Stanovení C_{ox} titrací po oxidaci chromsírovou směsí (ÚKZÚZ)

Postup je vhodný pro většinu minerálních půd s běžným obsahem a přirozeným složením organických látek.

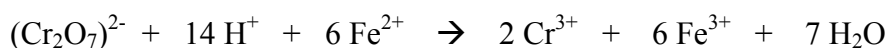
2.2.1 Princip

Oxidovatelný organicky vázaný uhlík v zemině se oxiduje kyselinou chromovou v prostředí nadbytku kyseliny sírové za definovaných podmínek. Nespotřebovaná kyselina chromová se stanoví titrací roztokem Mohrovy soli s biamperometrickou nebo vizuální indikací konce titrace.

Rovnice popisující děj při oxidaci:



Rovnice popisující děj při titraci:



2.2.2 Pracovní postup

Podrobný popis použitých pomůcek, chemikálií a pracovního postupu je uveden v Jednotných pracovních postupech ÚKZÚZ, Analýza půd III, kapitola 1.2, postup A. [1].

2.3 Stanovení N_{tot} včetně dusičnanů a dusitanů (postup podle Förstera)

Postup je vhodný pro všechny zeminy, pokud neobsahují nevýměnný NH_4^+ . Protože u anonymních vzorků zpravidla nelze odhadnout podíl NO_3^- na celkovém N, celkový dusík v zeminách se většinou stanovuje tímto postupem.

2.3.1 Princip

Dusičnany popř. dusitany přítomné ve vzorku se v prostředí kyseliny sírové navážou na aromatickou hydroxysloučeninu, nitroskupina se následně redukuje na aminoskupinu a všechny složky vzorku se rozloží Kjeldahlovým postupem varem s přísadami (viz JPP Analýza půd III, kap. 2.1.0.2). Vzniklé NH_4^+ - ionty se spolu s těmito ionty původně přítomnými ve vzorku po alkalizaci predestilují ve formě NH_3 do určitého objemu odměrného roztoku silné kyseliny. Zachycený NH_3 se pak stanoví titrací nadbytku odměrného roztoku silné kyseliny odměrným roztokem NaOH.

2.3.2 Pracovní postup

Podrobný popis použitých pomůcek, chemikálií a pracovního postupu je uveden v normě ISO 11261 [8], případně v Jednotných pracovních postupech ÚKZÚZ, Analýza půd III., kapitola 2.1.5 [1].

2.4 Stanovení celkových obsahů C_{tot} a N_{tot} na přístroji pro elementární analýzu CNS

2.4.1 Princip

Přístroj pro elementární analýzu Vario MACRO se používá ke stanovení celkového obsahu C, N, S v pevných vzorcích. Pracuje na základě katalytického spalování vzorku při vysoké teplotě v proudu velmi čistého kyslíku. Nosným plynem je velmi čisté helium. Po tepelném rozkladu vzorku se směs plynů obsahující sloučeniny C, N, S vlivem katalyzátorů převádí na CO_2 , N_2 a SO_2 . Ostatní přítomné plyny (vodní pára, halogenidy aj.) se odstraňují pomocí kondenzace a adsorpce na oxid fosforečný a stříbrnou vatu. Směs čistých analyzovaných plynů se od sebe odděluje na základě specifické adsorpce-desorbce na kolonách a následně se stanoví jejich obsah na tepelně-vodivostním detektoru v pořadí N, C a S. Přístroj je opatřen automatickým dávkovačem vzorků v podobě otočného zásobníku s kapacitou 40 míst.

2.4.2 Pracovní postup

Do cínové fólie se naváží cca 100 mg jemně mletého oxidu wolframového (WO_3) a cca 100 mg upraveného vzorku. Sn-folie se opatrně a pevně pomocí pinzet uzavře do tablety a stlačením v lisu se z ní odstraní vzduch. Stejným způsobem se připraví sada tří paralelních

navážek certifikovaných vzorků, určených pro stanovení denního faktoru měření. Stanovení hodnot slepých pokusů se provádí bez použití Sn-folie.

Pro stanovení sledovaných prvků byly použity metody předdefinované výrobcem. Pro slepý pokus byla použita metoda **blank** tj. první spalovací krok trvá 1 s při průtoku 1 ml O₂/s, druhý spalovací krok trvá 10 s při průtoku 20 ml O₂/s.

Pro stanovení denního faktoru byly použity tři vzorky půd MPZ ISE Wageningen s deklarovanými obsahy stanovovaných prvků. Výběr metod byl stejný jako pro měření vzorky a závisel na obsahu celkového uhlíku.

Metoda **soil 4 %** je určena pro vzorky, v nichž celkový obsah uhlíku nepřevyšuje 4 %. Navážka vzorku a WO₃ v poměru (1 : 1), první spalovací krok trvá 30 s při průtoku 30 ml O₂/s, druhý spalovací krok trvá 90 s při průtoku 50 ml O₂/s.

Metoda **soil 10 %** je určena pro vzorky, v nichž celkový obsah uhlíku nepřesahuje hodnotu 10 %. Navážka vzorku a WO₃ v poměru (1 : 1), první spalovací krok trvá 30 s při průtoku 30 ml O₂/s, druhý spalovací krok trvá 90 s při průtoku 75 ml O₂/s.

Meze stanovitelnosti pro N činí 500 mg/kg, pro S 1000 mg/kg, pro C byla mez stanovitelnosti vždy podstatně nižší než nejnižší obsahy C ve vzorcích půd.

3 Výsledky a diskuse

Výsledky sledovaných parametrů stanovených metodou NIRS jsou vyjádřeny jako obsah C_{ox} a N_{tot} v suchém vzorku – pro stanovení byla použita kalibrace na klasickou titrační metodu. Dále byla použita k odečtu výsledků jako další varianta kalibrace na CNS analyzátor, kdy jsou výsledky stanovené metodou NIRS vyjádřeny jako C_{tot} a N_{tot} v sušině. V případě stanovení klasickou titrací a CNS analyzátozem byla stanovena sušina, tzn. výsledky jsou k dispozici ve 100% sušině, u klasické titrace a NIRS ve vzorku vysušeném na vzduchu (běžná úprava půdních vzorků). Všechny analýzy byly provedeny ve dvou paralelních stanoveních.

V tabulce č. 1 a 2 je zpracována popisná statistika hodnot C_{ox}, C_{tot} a N stanovené různými postupy. Tyto údaje jsou také zpracovány graficky na obr. 1 a 2. Vzhledem k tomu, že metoda NIRS využívala pro kalibraci výsledky stanovené referenční metodou, nemůže být z hlediska statistického zpracování považována za nezávislou. Výsledky stanovení NIRS tedy v tomto případě pouze ukazují na kvalitu použité kalibrační křivky resp. na nejistotu stanovení oběma porovnávanými metodami. Určitým problémem při porovnání může být použití vzorků vysušených na vzduchu, kdy mezi měřením klasickou metodou a metodou NIRS byl určitý

časový posun, který mohl způsobit změny v obsahu sušiny v těchto vzorcích a tím přispět k vyšším rozdílům mezi výsledky.

Stanovení uhlíku: z regresního porovnání stanovení celkového obsahu uhlíku na CNS analyzátoru a stanovení oxidovatelného uhlíku oxidační metodou vyplývá podle očekávání, že výsledky stanovení celkového obsahu uhlíku jsou asi o 20 % vyšší. Tento výsledek byl dosažen jak pro lineární regresi metodou nejmenších čtverců, tak i pro robustní regresi. Výsledky lineární regrese uvádí obr. 3. Pro porovnání hodnot s metodou NIRS v obou případech (kalibrace na C_{ox} i C_{tot}) bylo třeba vyloučit vzorky s obsahem uhlíku pod 0,35 % vzhledem k mezi stanovitelnosti metody NIRS.

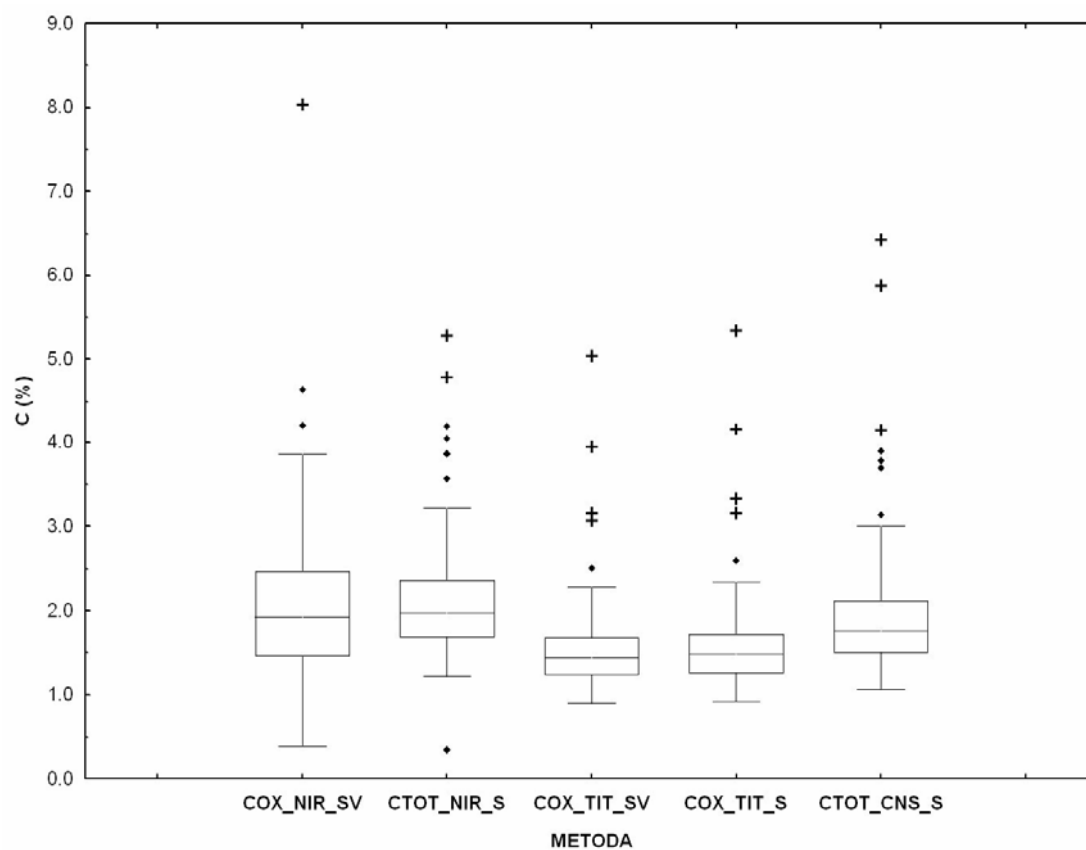
Stanovení dusíku: popisná statistika je uvedena v tabulce 2 a graficky na obr. 2. Regresní závislost mezi titračním stanovením celkového obsahu uhlíku a stanovením na analyzátoru CNS vyplývá, že rozdíly jsou sice statisticky průkazné, ale nejsou velké a v rámci běžné chyby stanovení je možné je zanedbat. Pro kvalitnější porovnání by bylo nutné provést analýzy více vzorků s vyšším obsahem dusíku. Pro porovnání hodnot získaných metodou NIRS byly vyloučeny hodnoty pod 0,04 %.

Tabulka 1. Deskriptivní statistika Cox hodnoty < 0,35 vyloučeny.

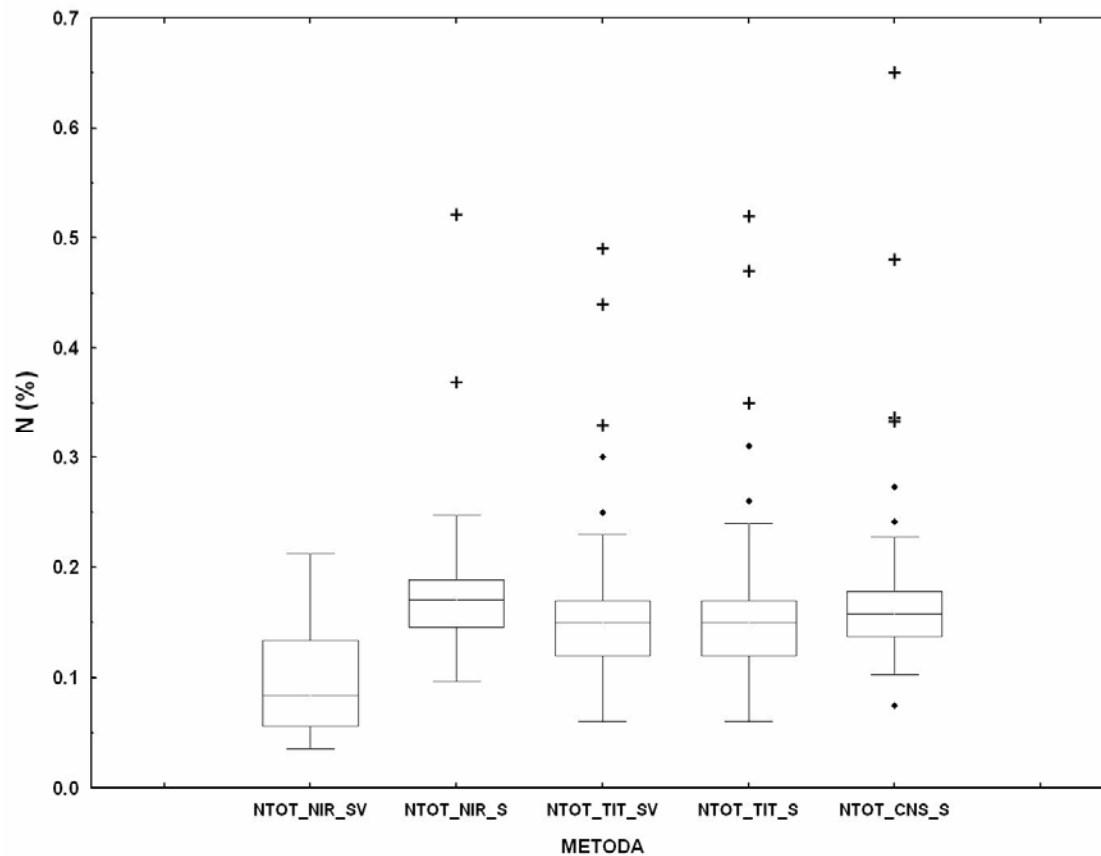
Metoda	Počet vzorků	Aritmetický průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil
COX_NIR_SV	81	2,04	1,93	0,39	8,03	1,46	2,47
CTOT_NIR_S	90	2,13	1,97	0,34	5,29	1,69	2,37
COX_TIT_SV	82	1,58	1,46	0,90	5,04	1,26	1,68
COX_TIT_S	90	1,60	1,48	0,92	5,34	1,26	1,72
CTOT_CNS_S	90	1,99	1,76	1,06	6,43	1,51	2,12

Tabulka 2. Deskriptivní statistika Ntot hodnoty < 0,04 vyloučeny.

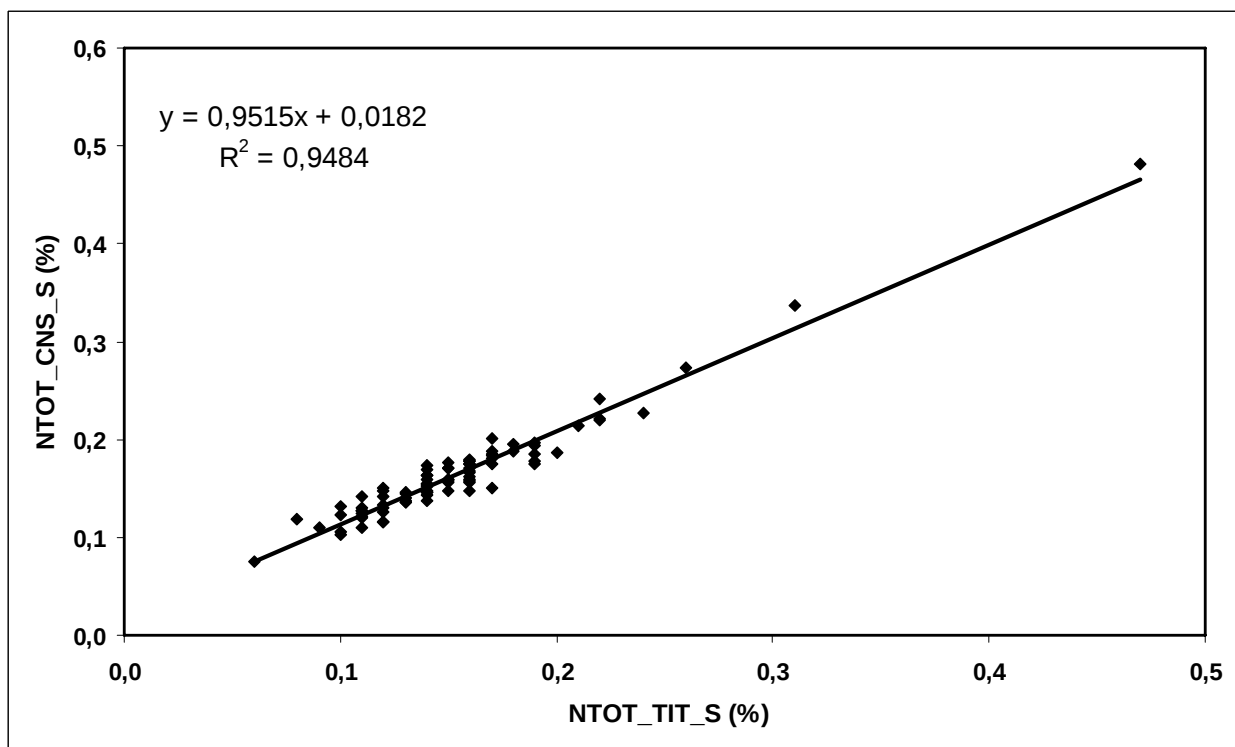
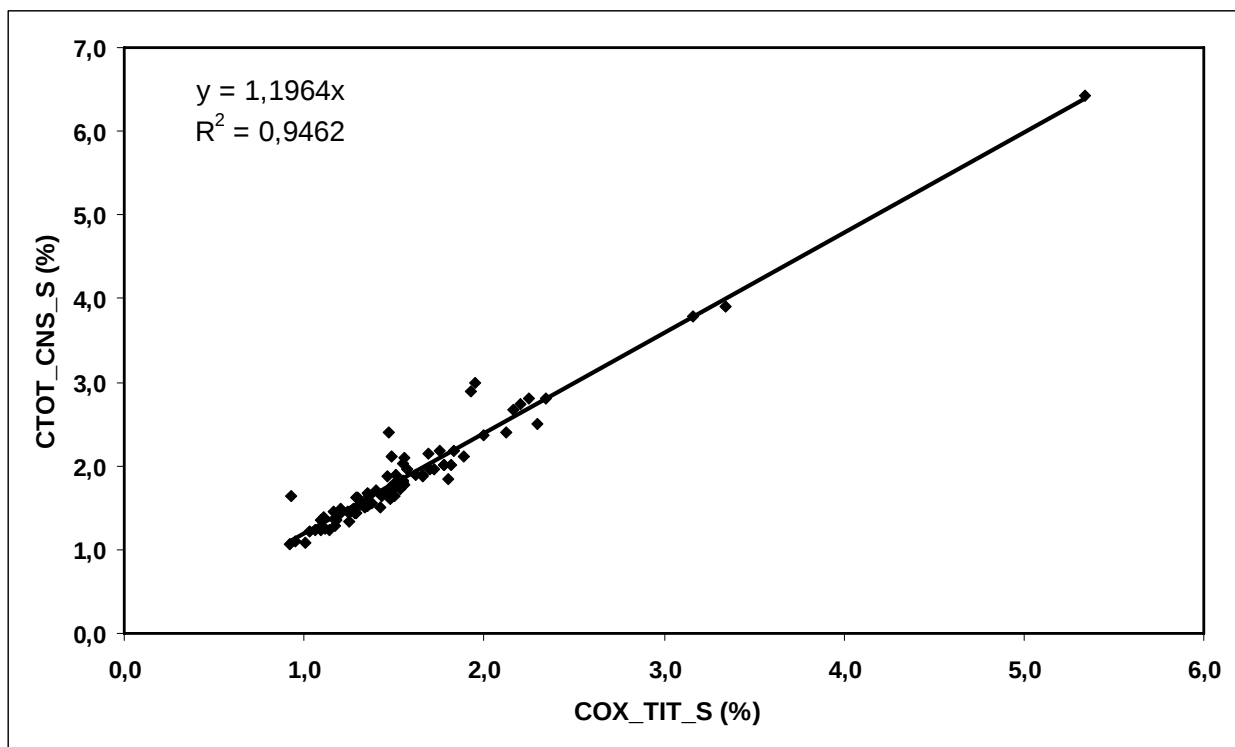
Metoda	Počet vzorků	Aritmetický průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil
NTOT_NIR_SV	51	0,10	0,08	0,04	0,21	0,06	0,13
NTOT_NIR_S	90	0,18	0,17	0,10	0,52	0,15	0,19
NTOT_TIT_SV	51	0,17	0,15	0,06	0,49	0,13	0,17
NTOT_TIT_S	90	0,16	0,15	0,06	0,52	0,12	0,17
NTOT_CNS_S	90	0,17	0,16	0,07	0,65	0,14	0,18



Obr. 1. Krabicové diagramy stanovení uhlíku různými metodami.



Obr. 2. Krabicové diagramy stanovení dusíku různými metodami.



Obr. 3. Lineární regrese pro klasické postupy a elementární analýzu.

4 Závěr

Stanovení obsahu uhlíku a dusíku v půdách metodou CNS dává spolehlivé výsledky při stanovení dusíku. V případě stanovení oxidovatelného uhlíku je třeba počítat s výsledky asi o 20 % vyššími než při klasickém postupu. Tuto skutečnost je třeba brát v úvahu při hodnocení výsledků analýz. Metoda NIRS je vhodnou alternativou, ale vyžaduje náročnou kalibraci a vhodný výběr vzorků pro kalibraci. Tato metoda je akceptovatelná pouze pro půdy s obsahem uhlíku nad 0,35 % a obsahem dusíku nad 0,04 %. Nejlepší výsledky dává pro půdy s vyšším obsahem organické hmoty (organický horizont lesních půd). Z těchto závěrů vyplývá, že metody NIRS a CNS se vhodně doplňují a společně mohou nahradit dosud používané metody stanovení, které jsou problematické především z hlediska velkého množství nebezpečných odpadů. Pro zajištění vyšší reprodukovatelnosti stanovení je vhodné uvádět výsledky přepočtené na aktuální sušinu vzorku.

5 Literatura

1. Zbíral J., Honsa I., Malý S., Čížmár D., Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ, Analýza půd III, Brno **2004**
2. Sirový V. et al.: Průzkum zemědělských půd ČSSR, souborná metodika, díl 3., Metodika laboratorních rozborů, str. 32 ad. MZVŽ. Praha **1967**.
3. Kolčava, D.: Stanovení organických látek v zeminách jako celkový C (modifikovaná ČSN 72 1021), Labtech Brno, JPP, **1996**.
4. Ševčík, T.: Stanovení Cox. JPP ÚKZÚZ, **1992**.
5. ČSN 68 4065 Příprava odměrných roztoků pro acidobazické titrace, **1983**, čl. 2.1 a 2.2
6. ČSN 68 4062 Chemické indikátory. Příprava roztoků indikátorů, **1979**, odst. 2.3.3 a 2.3.4,
7. Hoffmann G. et. al. : Methodenbuch , Band I, Die Untersuchung von Böden, kap. 2.2.3. VDLUFA - Verlag. Darmstadt **1991**.
8. ISO 11261 Soil quality - Determination of total nitrogen - Modified Kjeldahl method. First edition, **1995**.

Zpracování SOP pro přípravu slabých extrakčních činidel (vodný výluh, 1M NH₄NO₃) a měření vyextrahovaných prvků metodou ICP-MS

Eva Niedobová, Elena Obdržálková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení
Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

eva.niedobova@ukzuz.cz

elena.obdrzalkova@ukzuz.cz

1 Rozsah použití

Stanovení je vhodné pro půdy, sedimenty a příbuzné materiály.

2 Obecně

Pro sledování mobility těžkých kovů v půdách, případně jejich biodostupnosti pro rostliny, je potřeba využívat slabých extrakčních činidel jako jsou voda, dusičnan amonný, chlorid vápenatý apod. Tyto mají simulovat podmínky v půdě, resp. půdním roztoku, do kterého se případné těžké kovy z půdy uvolňují a následně je mohou přijímat rostliny. Obsahy kovů v připravených extraktech se pak pohybují v koncentracích (0 – 100) µg.l⁻¹, kdy pro velkou část prvků, zejména pro Be, Co, Mo, As, Cd, Sn, Sb, Tl se pohybují pod 10 µg.l⁻¹, případně pod 1 µg.l⁻¹. Na výše uvedená slabá extrakční činidla jsou kladeny vysoké nároky, zejména na jejich čistotu, také na časovou stabilitu, pH, minimum interferencí během analýz extraktů apod.

Metoda ICP-MS je vysoce citlivá simultánní metoda pro stanovení širokého spektra prvků. Vyznačuje se vysokou linearitou (9 koncentračních řádů) a tudíž je vhodná pro stanovení makro i mikro prvků v různých matricích. S využitím kolizně reakční cely jsou velmi efektivně eliminovány možné interferenty, jako jsou např. ArCl⁺ na hmotě 75 při stanovení arsenu apod. Vhodnými vnitřními porovnávacími prvky jsou korigovány matriční efekty v plazmatu, stejně tak případný drift v průběhu měření i ve složitějších matricích jako jsou např. výluhy půd v lučavce královské apod.

Při tvorbě metody je možné vycházet z aplikačních listů Agilent. Pokud tyto nejsou pro daný typ vzorku, je potřeba zohlednit typ vzorku a přípravy vzorku (měřicí mód, případné ředění, izotopy, vnitřní porovnávací prvek), stanovované analyty (izotopy) a jejich předpokládané obsahy (izotopy, integrační doba, počet opakování měření).

Před každým měřením na přístroji ICP-MS je potřeba naladit přístroj na dostatečnou citlivost, zvláště pak pokud je přístroj po vyčištění čoček, případně oktapólu. Ladění se provádí pro tři módy měření (normální mód, vodíkový mód a heliový mód). Během procesu ladění se obvykle optimalizují parametry: napětí na čočkách (extrakční čočky a Omega čočky) a dále některé z parametrů oktapólu a kvadrupólu. Pro měření v heliovém nebo vodíkovém módu se pak optimalizují průtoky helia či vodíku. Samotné měření je pak možné provádět buď v jednom z těchto módů, případně v tzv. Multitune módu, kdy je možné měření ve více módech. Pro zajištění linearity kalibračních závislostí je potřeba před každým měřením naladit P/A faktor a to pro každý mód, případně je možné z jednoho módu hodnoty P/A faktorů pro sledované izotopy exportovat do ostatních módů.

Standardy pro měření je vhodné připravovat ve stejné matici jako jsou vzorky, zvláště obsahu kyselin a jiných činidel použitých při rozkladech. Vnitřní porovnávací prvek do standardů a vzorků před měřením se nepřidává, ale kontinuálně se dávkuje během měření pomocí peristaltického čerpadla a T-kusu.

3 Princip stanovení

Vysušený a zhomogenizovaný vzorek je extrahován vysoce čistou demineralizovanou vodou (24 hod.) a nebo 1M dusičnanem amonným (2 hod.).

Po naředění (v případě výluhů v 1M dusičnanu amonném) je nasáván peristaltickou pumpou do zmlžovače, kde vzniká jemný aerosol, který je dále odváděn nosným plynem (argon) do plazmové hlavice. Tam vlivem vysoké teploty plazmatu dochází k desolvataci, atomizaci a ionizaci vzorku. Vzniklé ionty jsou extrahovány přes sadu kónusů, extrakčních čoček a omega čoček do kolizně reakční cely, kde jsou odstraněny interferenty, a dále do kvadrupólového analyzátoru, který na základě poměru hmoty a náboje iontu tyto propouští. Následně jsou prošlé ionty detekovány násobičem iontů.

Měření a vyhodnocení neznámých obsahů prvků v extraktech se provádí metodou kalibrační přímky s použitím vnitřního porovnávacího prvku.

4 Přístroje a pomůcky

1. Rotační třepačka (Ilabo, Česká republika)
2. Plastové nádoby (objem 50 ml a 250 ml)
3. Analytické váhy (přesnost 0,01 g)
4. Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem a kolizně reakční celou (7500ce, Agilent, Japonsko)

5. Podvarové destilační zařízení, celoteflonové (BSB-393-IR, Berghof, Německo) pro přípravu ultra čistých kyselin
6. Plastové odměrné baňky se zátkami (objem 25 ml)
7. Skleněné odměrné baňky se zátkami (objem 200 ml)
8. Plastové zkumavky o objemu (10 – 15) ml
9. Automatické pipety o objemu (20 – 5000) μl

5 Chemikálie

1. Kyselina dusičná koncentrovaná 65%, $c(\text{HNO}_3) = 14,4 \text{ mol.l}^{-1}$, podvarově destilovaná
2. Kyselina dusičná 5% (v/v), 50 ml koncentrované dusičné se naředí do objemu 1000 ml demineralizovanou vodou
3. Vysoce čistá demineralizovaná voda (Millipore, Francie)
4. Dusičnan amonný 1 mol.l^{-1} (čistota dle normy DIN 19730, Merck, Německo)
5. Komerční směsný ladící roztok Li, Y, Ca, Tl, Co, $c = 10 \mu\text{g.l}^{-1}$, (Agilent, USA)
6. Základní komerční certifikované standardní roztoky Be, V, Co, Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Mo, Sn, Sb, Tl, Pb, Ge, In, Te, Bi, $c = 1 \text{ g.l}^{-1}$, případně směsný komerční certifikovaný standardní roztok (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V, Zn) $c = 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ (Analytika, Česká republika)
7. Argon čistoty 4.8 (99,996%) nebo vyšší, vstupní tlak (700 – 750) kPa
8. Helium čistoty 4.9 (99,999%), vstupní tlak 50 kPa

6 Pracovní postup

Čištění plastových nádob pro přípravu extraktů

Plastové nádoby jsou louženy v 5% kyselině dusičné minimálně 24 hod. Poté jsou opláchnuty vysoce čistou demineralizovanou vodou a vysušeny.

Extrakce ve vysoce čisté demineralizované vodě

10 g vzorku je extrahováno ve 100 ml vysoce čisté demineralizované vody, po dobu 24 hod. Extrakce se provádí v uzavíratelných plastových nádobách (objem 250 ml) na rotační třepačce (5 otáček za minutu). Po extrakci jsou extrakty filtrovány přes $0,45 \mu\text{m}$ membránový filtr. Před filtrací jsou membránové filtry propláchnuty kyselinou dusičnou (podvarově čištěnou), dále vysoce čistou demineralizovanou vodou a následně částí extraktu. Přes takto připravený filtr se poté přefiltruje zbytek extraktu a přidá se 0,1 ml kyseliny dusičné (podvarově čištěné) na každých 10 ml extraktu. Extrakty se uchovávají v lednici.

Extrakce 1M dusičnanem amonným

10 g vzorku se extrahuje 25 ml 1M dusičnanu amonného, po dobu 2 hod., při teplotě $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Extrakce se provádí v uzavíratelných plastových nádobách (objem 50 ml) na rotační třepačce (20 otáček za minutu). Po extrakci jsou extrakty filtrovány přes $0,45 \mu\text{m}$ membránový filtr. Před filtrací jsou membránové filtry propláchnuty kyselinou dusičnou (podvarově čištěnou), dále vysoce čistou demineralizovanou vodou a následně částí extraktu. Přes takto připravený filtr se poté přefiltruje zbytek extraktu a přidá se 0,1 ml kyseliny dusičné (podvarově čištěné) na každých 10 ml extraktu. Extrakty se uchovávají v lednici.

Čištění odměrných baněk pro přípravu roztoků kalibračních standardů a vnitřních porovnávacích prvků a plastových zkumavek pro ředění mineralizátů

Plastové a skleněné odměrné baňky jsou naplněny 5% kyselinou dusičnou minimálně 24 hod. před měřením. Před vlastní přípravou kalibračních roztoků jsou vypláchnuty vysoce čistou demineralizovanou vodou. Plastové zkumavky jsou minimálně 24 hod. ponořeny v 5% kyselině dusičné, poté opláchnuty vysoce čistou demineralizovanou vodou a vysušeny. Extrakty se ředí do suchých zkumavek.

Příprava ladicího roztoku

Ze základního směsného ladicího roztoku ($c = 10 \mu\text{g.l}^{-1}$) se připraví ředěním roztok o koncentraci $1 \mu\text{g.l}^{-1}$, tzn. pipetuje se 5 ml ze zásobního roztoku ($c = 10 \mu\text{g.l}^{-1}$) do 50 ml plastové baňky, přidá se 1 ml podvarově destilované kyseliny dusičné a doplní se vysoce čistou demineralizovanou vodou po rysku.

Příprava směsných kalibračních roztoků

Ze základních certifikovaných standardních roztoků se zředěním připraví jeden směsný standardní roztok o koncentraci 10 mg.l^{-1} , tzn. z roztoků o koncentraci 1 g.l^{-1} se pipetuje $500 \mu\text{l}$ (ze zásobního roztoku o koncentraci $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ se pipetuje $5000 \mu\text{l}$) do 50 ml plastové odměrné baňky, přidá se 1 ml podvarově destilované kyseliny dusičné a doplní se vysoce čistou demineralizovanou vodou. Z takto připraveného směsného roztoku se pipetuje dále (25; 50; 250; 500; 2500) μl do 25 ml plastových odměrných baněk, přidá se 0,5 ml podvarově destilované kyseliny dusičné a doplní se po rysku vysoce čistou demineralizovanou vodou nebo se přidá 5 ml 1M dusičnanu amonného a vysoce čistá demineralizovaná voda. Takto připravené kalibrační roztoky obsahují (0,01; 0,02; 0,10; 0,20; 1,00) mg.l^{-1} analytů. Standard o koncentraci 0 mg.l^{-1} se připraví stejným způsobem vyjma pipetování roztoku analytů, tzn. pipetuje se 0,5 ml podvarově destilované kyseliny dusičné

do 25 ml plastové odměrné baňky a doplní se vysoce čistou demineralizovanou vodou nebo se přidá 5 ml 1M dusičnanu amonného a vysoce čistá demineralizovaná voda po rysku. Takto připravené roztoky jsou při uchovávání v lednici stabilní týden.

Příprava směsného roztoku vnitřních porovnávacích prvků

Ze základních certifikovaných standardních roztoků se připraví jeden směsný roztok o koncentraci 1 mg.l^{-1} . Z každého základního roztoku se pipetuje 200 μl do 200 ml skleněné odměrné baňky, přidá se 4 ml podvarově destilované kyseliny dusičné a doplní se vysoce čistou demineralizovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok je stabilní při uchovávání v lednici dva týdny.

Příprava extraktů pro analýzu

Pro měření jsou extrakty v 1M dusičnanu amonném ředěny $5 \times$ do plastových zkumavek o objemu (10 – 15) ml, tzn. pipetuje se 1000 μl extraktu a 4000 μl vysoce čisté demineralizované vody. Extrakty se ředí vždy v den měření. Extrakty ve vysoce čisté demineralizované vodě se měří neředěné.

7 Nastavení přístroje a měření

Přístroj se ovládá přes PC. Po zapálení plazmatu (Plasma ON) se nechá přístroj v chodu 15 minut. Ladění přístroje se provádí na tzv. ladící roztok ($10 \times$ zředěný), ladí se na hmoty 7 (Li), 89 (Y) a 205 (Tl). Počet countů za sekundu (cps) by měl být na uvedených hmotách $\text{Li} > 3000 \text{ cps}$, $\text{Y} > 8000 \text{ cps}$ a $\text{Tl} > 4000 \text{ cps}$. Další hodnoty, které se během ladění sledují, jsou poměry charakterizující tvorbu oxidů CeO/Ce (156/140) a dvojnásobně nabitých iontů $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^{+}$ (70/140). Hodnoty poměrů by měly být menší než 1,5 %, resp. 3 %. Parametry se uloží pod názvem Normal.u. Přístrojové parametry jsou uvedeny v tabulce č. 1, měřené izotopy jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Ladění pro heliový a vodíkový mód se provádí po ladění v normálním módu. Změní se parametry přístroje, viz. tabulka č. 1 a dá se proplachovat kolizně reakční cela (10 ml/min He, po dobu 15 minut).

Pro ladění v heliovém módu se pak nastaví průtok helia na 5 ml/min a změní se sledované parametry na hmoty 51 (ClO^{+}), 59 (Co), 75 (ArCl^{+}) a dále se sleduje poměr 51/59. Ladění se provádí zmlžováním $10 \times$ zředěného ladícího roztoku v 1% HCl. Průtok helia se zvyšuje do doby, kdy hodnota poměru 51/59 klesne na 1 % až 2 %. Takto nastavené podmínky se uloží jako He-mode.u.

Aby byla zajištěna linearita kalibračních závislostí, je potřeba po naladění systému také naladit P/A faktor. Ladí se na nejvyšší kalibrační standard z metody. Po naladění P/A faktoru, se tento uloží v příslušném módu a případně se vyexportuje do jiných módů, pokud se budou používat.

Systém se propláchne 5% kyselinou dusičnou po dobu 15 minut, následně vysoce čistou demineralizovanou vodou po dobu 15 minut. Připojí se hadička, kterou je nasáván roztok obsahující vnitřní porovnávací prvky a změří se vzestupně kalibrační roztoky a opět se propláchne, viz. výše. Změří se extrakty včetně slepých pokusů, kdy před každou sérií vzorků se opět systém propláchne (5 minut 5% kyselinou dusičnou a 5 minut vysoce čistou demineralizovanou vodou). Před každou započatou sérií se změří kalibrační standard o koncentraci $0,02 \text{ mg.l}^{-1}$ a pokud je jeho návratnost nad 90 %, pokračuje se v měření. Pokud je návratnost nižší, změří se všechny kalibrační roztoky a uloží se pod odlišným názvem (přidá se k názvu „2“ , „3“ atd.). K vzorkům příslušným dané kalibraci se přidá k názvu stejné označení. Během měření jsou zjištěné koncentrace u ředěných extraktů (extrakty v 1M dusičnanu amonném) automaticky přepočítávány na původní neředěné extrakty zadáním hodnoty 5 do políčka „Dilution“ v měřicím okně. Po ukončení měření se systém důkladně propláchne 5% kyselinou dusičnou (15 minut) a vysoce čistou demineralizovanou vodou (15 minut). Před vypnutím přístroje je nutné snížit průtoky kolizně reakčních plynů na 0 ml/min a vypnout reakční celu. Poté je možné přístroj vypnout.

Tabulka č. 1 Přístrojové parametry

Parametr	Ladění	Normální mód	Vodíkový mód	Heliový mód
		Normal.u	H2-mode.u	He-mode.u
RF power	ne	1500 W		
Sampl. Depth	ano	7 mm		
Torch-H	ano	Mm		
Carrier Gas	ano	0,8 L/min		
Makeup Gas	ano	0,2 L/min		
Nebulizer pump	ne	0,1 rps		
S/C Temp	ne	2 °C		
Extract 1	ano	1 V až 5 V		
Extract 2	ano	– 150 V až – 120 V		
Omega Bias-ce	ano	V		
Omega Lens-ce	ano	V		
Cell Entrance	ne	– 22 V		
Plyn (H ₂ , He)	ano	–	3,0 mL/min	5,5 mL/min
QP Focus	ne	3 V	– 8 V	–10 V
Cell Exit	ne	– 22 V	– 46 V	
OctP RF	ne	V		
OctP Bias	ne	– 6 V	– 19 V	
QP Bias	ne	– 3 V	– 15 V	

Tabulka č. 2 Měřené izotopy

Analyt	Izotop	Vnitřní porovnávací prvek	Měřicí mód
Berylium	9 Be	72 Ge	He
Vanad	51 V	115 In	He
Chrom	52 Cr	115 In	He
Kobalt	59 Co	115 In	He
Nikl	60 Ni	115 In	He
Měď	65 Cu	115 In	He
Zinek	66 Zn	72 Ge	He
Arsen	75 As	125 Te	He
Molybden	95 Mo	72 Ge	He
Kadmium	111 Cd	115 In	He
Cín	120 Sn	125 Te	He
Antimon	121 Sb	115 In	He
Thallium	205 Tl	125 Te	He
Olovo	208 Pb	209 Bi	He

Výsledky se vyhodnocují po skončení měření. Pokud bylo více kalibrací než jedna, vyhodnotí se postupně všechny vzorky s jejich příslušnými kalibracemi (typ kalibrace $y = ax + [\text{blank}]$). Výsledky se postupně kopírují do Excelu (software MS Office), uloží se pod příslušným datem do příslušného adresáře a vytisknou se.

8 Výpočet neznámého obsahu prvku ve vzorku

$$T = X \cdot V / m$$

T – obsah prvku ve vzorku váženého k mineralizaci ($\mu\text{g/kg}$)

X – změřená koncentrace prvku v mineralizátu ($\mu\text{g/l}$)

V – objem odměrné baňky s mineralizátem (ml)

m – navážka vzorku pro mineralizaci (g)

9 Literatura

1. Agilent Technologies, manuál k přístroji a aplikační literatura
2. ISO TC 190/SC 3 N, Soil quality – Extraction of trace elements in soils using ammonium nitrate solution

Stanovení mykotoxinů T-2 toxinu a HT-2 toxinu v krmivech

Romana Kalusová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení
Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
romana.kalusova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Metoda pro stanovení toxinů T-2 a HT-2 byla odzkoušena a následně validována v souladu se Směrnicí komise 2005/38/EC a připojena ke standardnímu operačnímu postupu (SOP) č. 33, který obsahuje metody pro stanovení mykotoxinů: fumonisinů a aflatoxinů v krmných surovinách metodou HPLC/MS. Všechny analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu ve spojení s hmotnostním detektorem – systém HPLC/MS. Pro kvantifikaci mykotoxinů byla využita technika HPLC/MS/MS.

2 Úvod

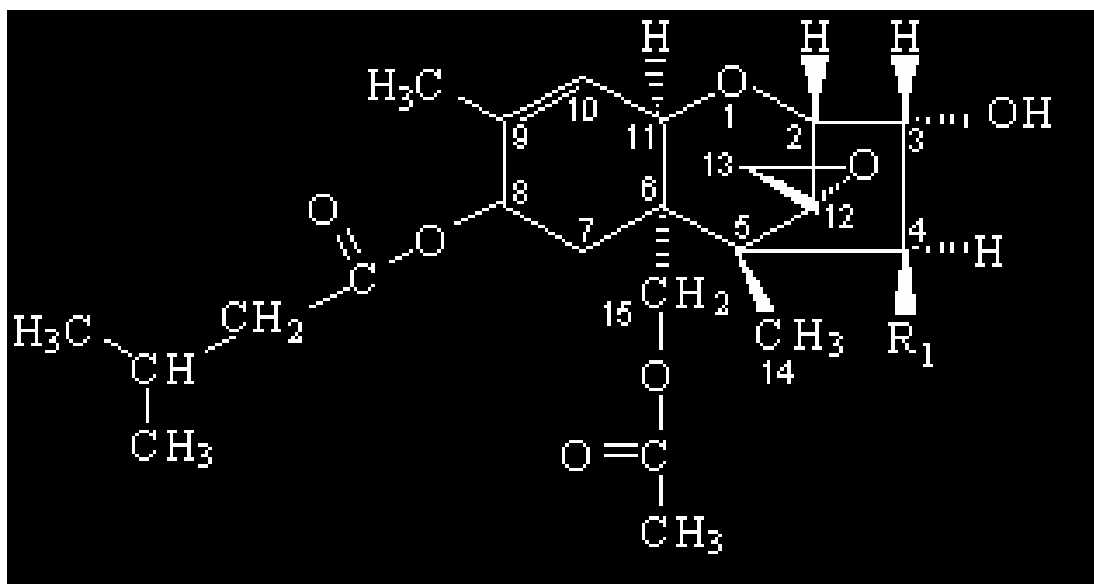
Toxiny T-2 i HT-2 patří do velké skupiny mykotoxinů zvaných trichotheceny. Nejvýznamnějším producentem těchto mykotoxinů je rod plísní *Fusarium*, méně pak rody *Myrothecium* a *Stachybotrys*. Mezi napadené plodiny patří hlavně pšenice a kukuřice, ale také sojové boby, semena různých olejnin, banány, mango a ječmen, ze kterého se pak může kontaminace dostat až do piva. Z hlediska chemické struktury jsou trichotheceny rozmanitou skupinou sloučenin. V podstatě se jedná o tricyklické seskviterpeny s šestičlenným kruhem, které mají dvojnou vazbu mezi uhlíky C-9 a C-10 a epoxyskupinu v poloze C-12, C-13. Podle charakteristických chemických vlastností se rozlišují čtyři podskupiny trichothecenů:

- podskupina A nemá na uhlíku C-8 oxoskupinu - do této podskupiny patří právě T-2 a HT-2 toxiny;
- podskupina B má na uhlíku C-8 oxoskupinu - sem patří deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) a další;
- podskupina C obsahuje další epoxyskupinu v poloze C-7, C-8 nebo C-8, C-9 (krotocin);
- podskupina D obsahuje makrocyclický kruh mezi uhlíky C-4 a C-15 (verrukariny).

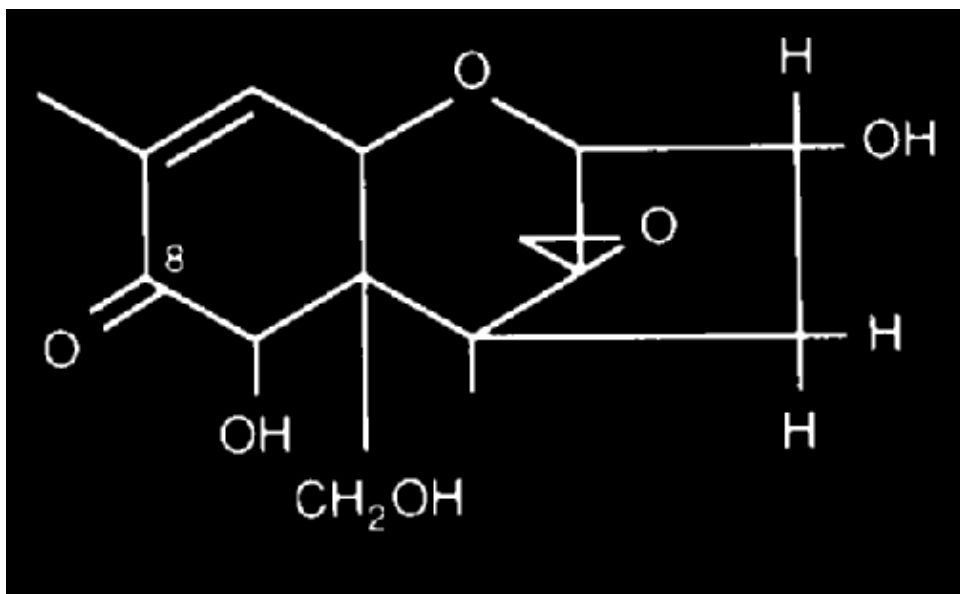
I přesto, že je dnes známo více než 150 trichothecenů, v zemědělských plodinách jich lze běžně detekovat asi jen 10. Plísně rodu *Fusarium* produkují pouze toxiny z podskupin A a B a napadené plodiny nemusejí obsahovat pouze jeden mykotoxin. V nejvyšších koncentracích bývá přítomen nejčastěji deoxynivalenol. Proto je považován za indikátor možné kontaminace dalšími trichothecenovými mykotoxiny.

Trichotheceny se projevují širokým spektrem biologických účinků jako jsou antibakteriální, antivirální, fungistatické, cytostatické účinky a některé z nich jsou fytotoxické. Toxicita pro obratlovce se pohybuje ve velkém rozmezí a na základě experimentů se zvířaty se některé trichotheceny (zvláště T-2 toxin) považují za potenciálně karcinogenní a mutagenní sloučeniny. U lidí je s expozicí T-2 toxinu spojováno onemocnění zvané alimentární toxická aleukie (ATA). Typickými příznaky intoxikace je poškození trávicího ústrojí záněty, zvracení a průjemy, typické jsou i bolesti hlavy, později dochází k rozsáhlému snížení počtu krevních destiček a bílých krvinek a ve třetí fázi se projevují různé infekce. Mimořádně vysokou toxicitou se vyznačují makrocyclické trichotheceny typu D, například akutní toxicita verrukarinu je asi desetkrát vyšší než T-2 toxinu.

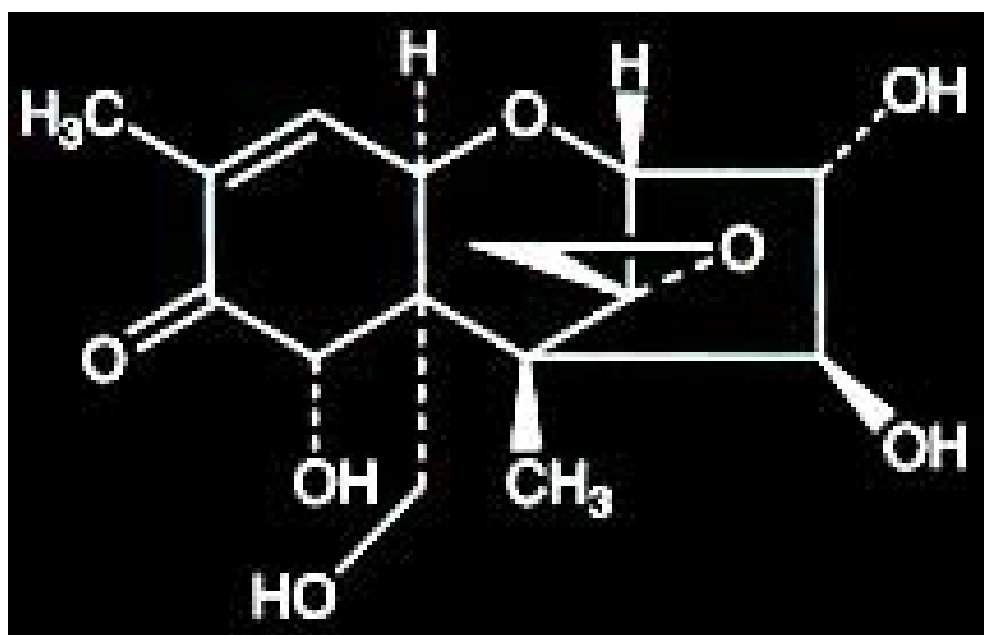
K analýze trichothecenů se nejčastěji používají chromatografické metody, chromatografie na tenké vrstvě, plynová i kapalinová chromatografie v různém uspořádání, s různými detektory. Na druhé straně ale pro stanovení těchto mykotoxinů existují i imunologické metody, jako je ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbentAssay, nebo RIA, RadioImmunoAssay.



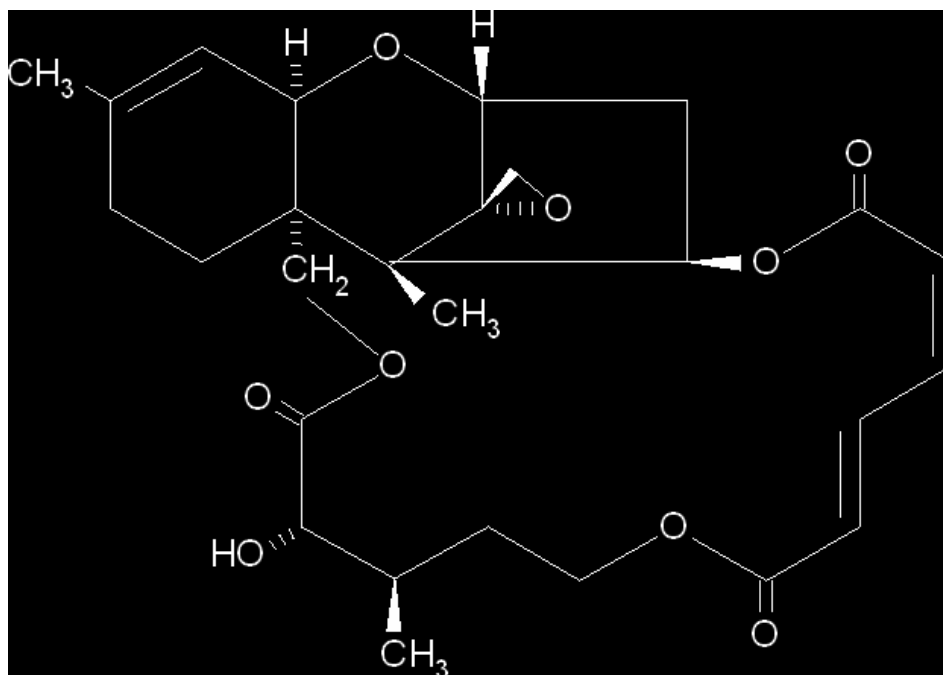
Obr. 1. Trichotheceny typu A, T-2 toxin, R₁ = Oac, HT-2 toxin, R₁ = OH



Obr. 2. Trichothecen typu B, deoxynivalenol (DON)



Obr. 3. Trichothecen typu B, nivalenol (NIV)



Obr. 4. Trichothecen typu D, verrukarin A

3 Materiál a metody

Princip metody

Vzorky krmiv se extrahují směsí (acetonitril : voda) nebo (methanol : voda). Výběr extrakčního činidla záleží na následném čištění vzorku. T-2 a HT-2 toxin jsou z těchto extraktů získávány zachycením a následnou elucí z imunoafinitních kolonek T-2TestTM nebo jsou extrakty přečištěny na SPE kolonkách Multisep 227 Trich+. Následně jsou pak vzorky odpařeny, rozpuštěny v mobilní fázi a nastříknuty do kapalinového chromatografu ve spojení s hmotnostním detektorem (systém HPLC/MS).

Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly minimálně p.a. kvality a vyšší.

- Standardní roztok T-2 toxinu, zásobní roztok o koncentraci 1250 µg/ml ve směsi (acetonitril : voda) (50 : 50, v/v), vznikl rozpuštěním 5 mg krystalického T-2 toxinu (Sigma Aldrich) ve 4 ml směsi (acetonitril : voda).
- Standardní roztok HT-2 toxinu, zásobní roztok o koncentraci 103,1 µg/ml v acetonitrilu (Biopure), objem 5 ml.
- Roztok isotopově značeného T-2 toxinu (s uhlíkem ¹³C), roztok o koncentraci 25,1 µg/ml v acetonitrilu (Biopure); objem 1,2 ml; slouží jako vnitřní standard.

Přístroje a zařízení

- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Esquire 6000 firmy Bruker Daltonics sloužil k analýze vzorků.
- Kolona Zorbax XDB C18 150 mm × 4,6 mm, s vnitřním průměrem 5 µm určena pro separaci T-2 a HT-2 toxinů.
- Laboratorní třepačka a ultrazvuková lázeň sloužící k extrakci vzorků.
- Koncentrátor vzorků – Termovap, na němž se eluáty vzorků odpařovaly.
- Zařízení pro výrobu ultračisté vody Milli-Q.

Postup stanovení

Postup přípravy vzorku je podrobně uveden v SOP č. 33.

Vzorky krmiv se extrahují ve směsi (methanol : voda) pro přečištění na imunoafinitních kolonkách (IAC) nebo ve směsi (acetonitril : voda) pro přečištění na kolonkách s pevnou fází (SPE). Čištění probíhá na T-2TestTM IAC firmy Vicam nebo na MultiSep 227 Trich+ SPE kolonkách firmy RomerLabs. Na kolonku se aplikuje i isotopově značený T-2 toxin, který se používá jako vnitřní standard. Eluát se odpaří dosucha pod proudem dusíku, rozpustí se v mobilní fázi a vzorek je připraven k analýze HPLC/MS.

Postup byl odzkoušen a zvalidován pro oba typy čištění, obě metody jsou zahrnuty ve standardním operačním postupu. V rámci validace byla stanovena opakovatelnost, správnost, mez detekce, mez stanovitelnosti a nejistota metody.

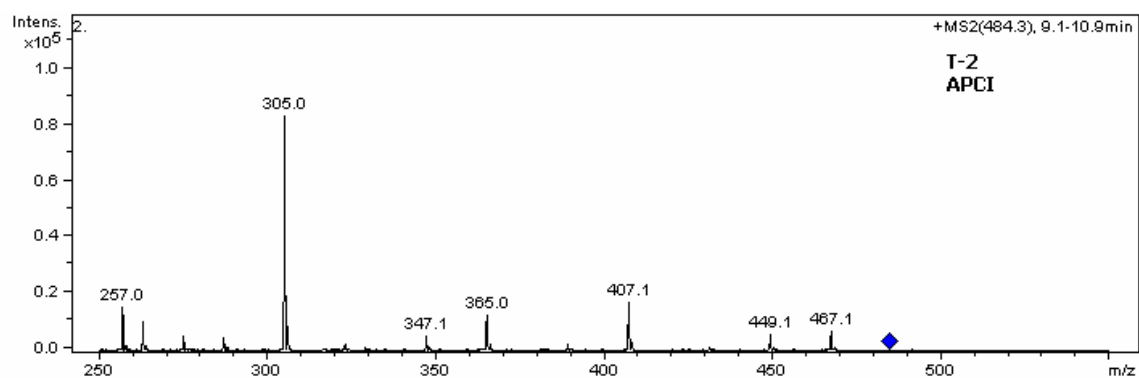
Mobilní fázi, jejíž průtok 0,5 ml/min byl řízen programem, který zajišťoval plynulý nárůst a pokles jednotlivých složek, aby mohla proběhnout gradientová eluce všech tří analytů, byla směs 10 mM octanu amonného ve vodě a acetonitrilu.

Detekci zajišťoval hmotnostní spektrometr Esquire 6000. Tento přístroj se vyznačuje jednoduchým provedením tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Obsahuje hmotnostní detektor typu iontové pasti, uvnitř níž z původních prekurzorových iontů vznikají ionty dceřiné. Tato detekce a následně kvantifikace je velmi selektivní, každý analyt vykazuje specifické hmotnostní spektrum. Analyty byly vystaveny ionizaci elektrosprejem při teplotě 350 °C, průtoku zmlžujícího plynu 50 psi a sušícího plynu 10 l/min. Ostatní parametry jako prekurzory, sledované ionty v režimu MS/MS, napětí na kapiláře apod. byly optimalizovány v průběhu validace a jsou uvedeny v SOP č. 33.

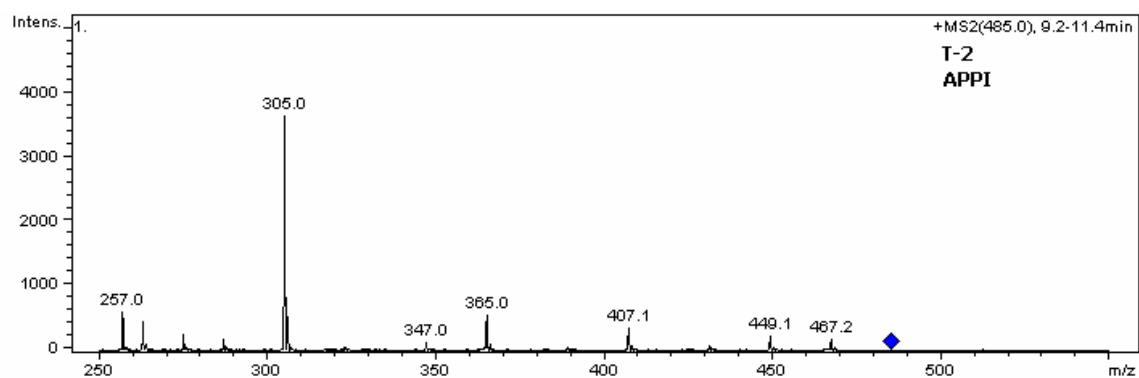
4 Výsledky a diskuse

Přímým nástřikem do hmotnostního spektrometru byly na roztocích standardů optimalizovány podmínky pro hmotnostní spektrometr, nejprve pro režim MS, později pro režim MS/MS. Metoda byla vytvořena bez vstupu mobilní fáze z kapalinového chromatografu a po optimalizaci hmotnostního spektrometru byl zahrnut do specifikací metody i vstup mobilní fáze. Tandemová hmotnostní spektrometrie MS/MS se používá pro kvantifikaci látek. Vznikající hmotnostní spektra jsou specifická pro každou jednotlivou sloučeninu.

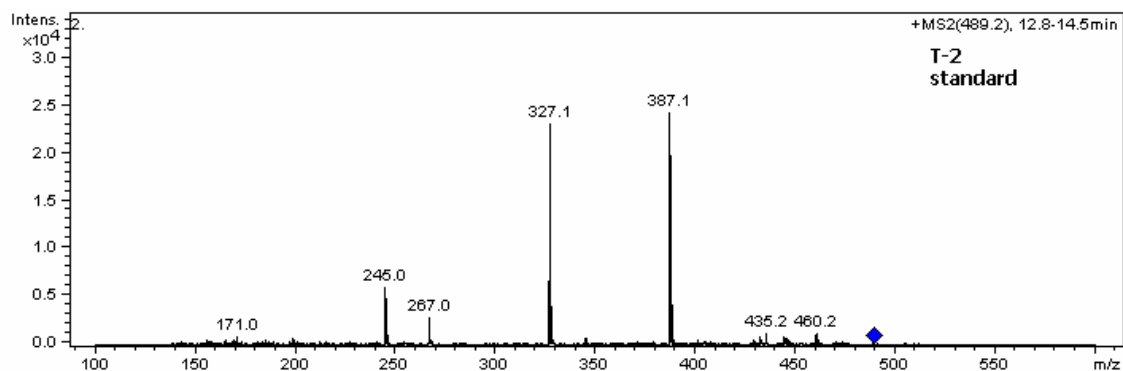
Pro analýzu T-2 a HT-2 toxinů byly postupně odzkoušeny všechny tři dostupné zdroje ionizace – chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) a ionizace elektrosprejem (ESI), která patří mezi nejběžněji používané ionizační techniky a byla také vybrána pro vytvoření validované metody. MS/MS hmotnostní spektra vzniklá za různých ionizačních podmínek jsou různá a dá se jen lehce odhadnout, jak budou vypadat. Na obrázcích 5 až 10 jsou uvedena hmotnostní spektra T-2 i HT-2 toxinu za podmínek APCI, APPI i ESI. V tabulce 1 jsou uvedeny HPLC a MS podmínky validované metody.



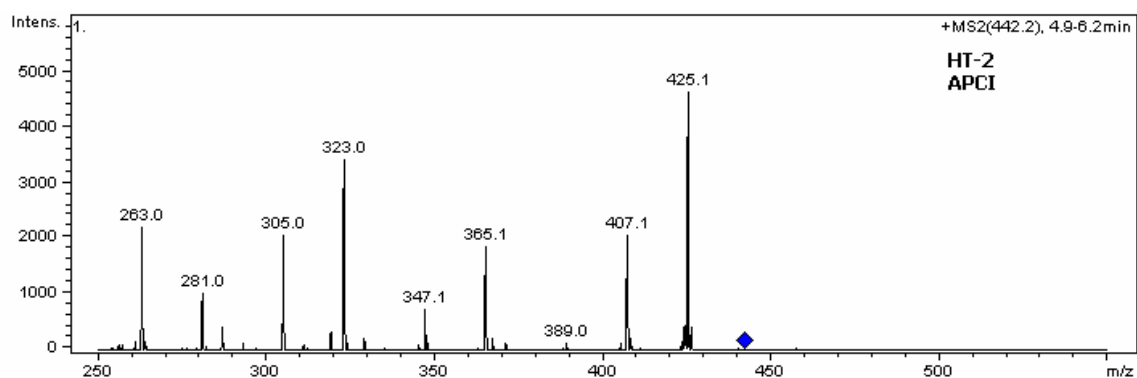
Obr. 5 MS/MS spektrum T-2 toxinu vzniklé ionizací APCI



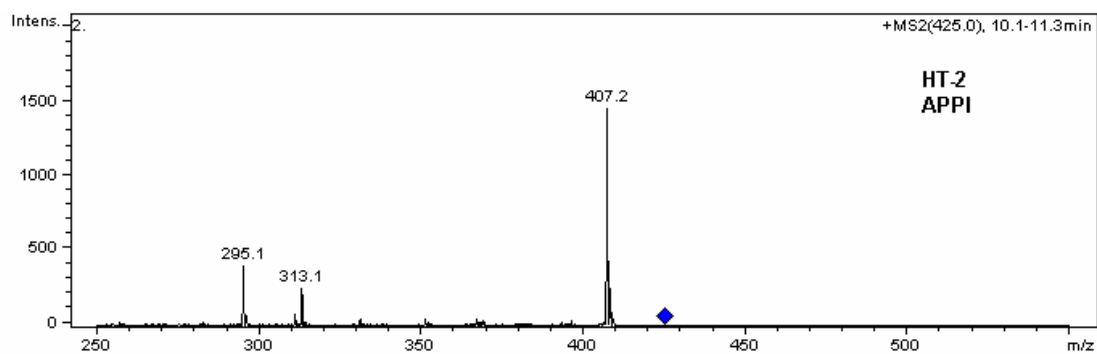
Obr. 6 MS/MS spektrum T-2 toxinu vzniklé ionizací APPI



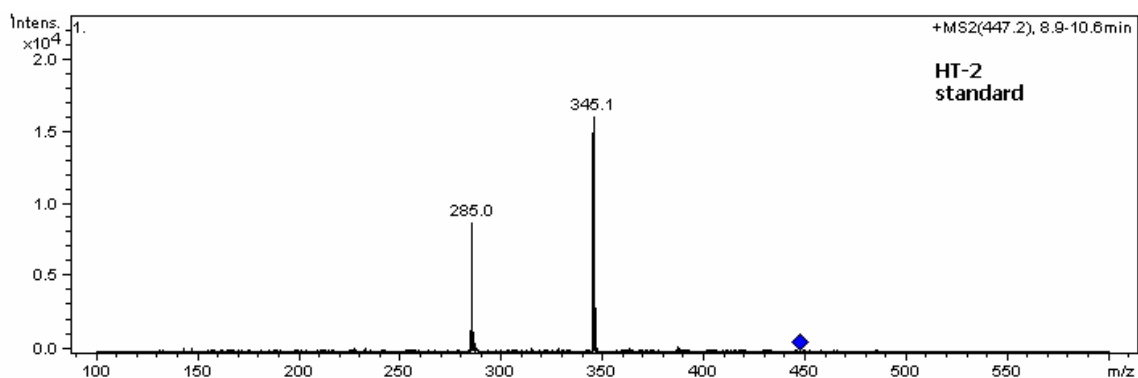
Obr. 7 MS/MS spektrum T-2 toxinu vzniklé ionizací ESI



Obr. 8 MS/MS spektrum HT-2 toxinu vzniklé ionizací APCI



Obr. 9 MS/MS spektrum HT-2 toxinu vzniklé ionizací APPI



Obr. 10 MS/MS spektrum HT-2 toxinu vzniklé ionizací ESI

Tabulka 1. Podmínky HPLC/MS/MS - metody pro stanovení T-2 a HT-2 toxinu

Kapalinový chromatograf		Hmotnostní spektrometr	
Mobilní fáze (M.F.)	10 mM octan amonný ve vodě / acetonitril	Napětí na kapiláře	4000 V
Průtok M.F.	0,5 ml/min	Zmlžovač	50,0 psi
	gradientová eluce	Sušicí plyn	10 l/min
Teplota kolony	30 °C	Sušicí teplota	350 °C
Nástřik	20 µl až 50 µl	Zdroj ionizace	Elektrosprej
		Polarita	ESI+
Podmínky MS/MS - sledované ionty:			
HT-2 (447,2 m/z)		285, 345 m/z	
T-2 (489,2 m/z)		327, 387, 245 m/z	
T-2 ¹³ C (513,3 m/z)		406, 451, 344 m/z	

T-2 a HT-2 toxin vykazují za podmínek ionizace elektrosprejem nejvyšší intenzitu v MS i MS/MS módu, a tak byl tento zdroj vybrán i pro validovanou metodu.

Vzniklou metodou HPLC/MS/MS byly proměřeny všechny validační parametry. Jejich shrnutí je uvedeno ve validačním protokolu SOP č. 33 a v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2. Validační parametry pro T-2 toxin

Opakovatelnost (střední přesnost)	17,0 %
Mez detekce - MD	2,0 µg/kg
Mez stanovitelnosti - MS	7,0 µg/kg
Nejistota	20 %
Pracovní rozsah (MD – horní bod kalibrace)	(2,0 – 1000) µg/kg

Tabulka 3. Validační parametry pro HT-2 toxin

Opakovatelnost (střední přesnost)	8,30 %
Mez detekce - MD	1,0 µg/kg
Mez stanovitelnosti - MS	3,5 µg/kg
Nejistota	20 %
Pracovní rozsah (MD – horní bod kalibrace)	(1,0 – 2000) µg/kg

5 Závěr

Metoda pro stanovení T-2 a HT-2 toxinů v krmivech byla vyvinuta a zvalidována na systému kapalinového chromatografu ve spojení s hmotnostním detektorem HPLC/MS. Ke kvantifikaci byla použita metoda HPLC/MSMS. Správnost metody byla potvrzena analýzou certifikovaného referenčního materiálu firmy R-Biopharm a také účastí v kruhovém testu maďarské národní referenční laboratoře s velmi dobrým výsledkem.

6 Literatura

1. Jan Velíšek, Chemie potravin
2. SOP č. 33, Stanovení mykotoxinů metodou HPLC/MS
3. <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Nivalenol.png>
4. <http://en.wikipedia.org/wiki/Deoxynivalenol>
5. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je06.htm>
6. <http://www.cbwinform.com/Biological/Toxins/Structures/Mycotoxins/Trichothecenes/VerrucarinA.gif>

Stanovení hydroxyprolinu v kuřecím mase metodou ionexové chromatografie

Zora Linhová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení
Praha, Za Opravnou 4, 150 06 Praha 5- Motol
zora.linhova@ukzuz.cz

1 Úvod

Tato práce vznikla na základě požadavku Oddělení biologického zkoušení krmiv, které dlouhodobě sleduje vliv složení krmných směsí na kvalitu drůbežího masa.

Hydroxyprolin je součástí kolagenu, který představuje nejrozšířenější skupinu živočišných bílkovin. Je hlavní organickou složkou podpůrného systému živočišného organismu, kostí, chrupavek, šlach, vaziva a kůže. Kromě toho je významnou složkou cévních stěn, bazálních membrán, rohovek a některých orgánů těla. Biologický význam kolagenu je tedy velký.

Původně se pro stanovení hydroxyprolinu používala spektrofotometrická metoda, ale byla velmi náročná na přípravu a poskytovala nereprodukovatelné výsledky. Proto byla vyvinuta a ověřena metoda stanovení na analyzátoru aminokyselin.

2 Stanovení hydroxyprolinu

2.1 Účel a rozsah

Tento postup specifikuje podmínky pro stanovení hydroxyprolinu v kuřecím mase. Hydroxyprolin je součástí kolagenu a dalších proteinových struktur a využívá se pro posouzení stupně degradace kolagenu.

Chemicky se jedná o

trans - 4 - hydroxy - L - prolin (HYP) – $C_5H_9NO_3$ – $M_r : 131,1 \text{ g.mol}^{-1}$

2.2 Princip

Hydroxyprolin se ze vzorku vyextrahuje roztokem kyseliny chlorovodíkové. Nejprve je nutno uvolnit aminokyselinu z bílkovinného řetězce. Peptidová vazba mezi aminokyselinami v bílkovině se hydrolyzuje vhodným činidlem a jednotlivé aminokyseliny se uvolní do roztoku. Jako hydrolyzační činidlo se používá roztok kyseliny chlorovodíkové. Z hydrolyzátů vzorku se odstraní hydrolyzační činidlo odpařením.

Obsah hydroxyprolinu se stanoví metodou ionexové chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem.

2.3 Chemikálie

2.3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok, $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

2.3.2 Argon (čistoty 5.0)

2.3.3 Citronan sodný, dihydrát, p.a.

2.3.4 Kyselina citrónová, monohydrát, p.a.

2.3.5 Chlorid sodný, p.a.

2.3.6 Azid sodný, p.a., ZMBD Chemik

2.3.7 Hydroxid sodný, čistý

2.3.8 Octan sodný, krystalický, trihydrát, p.a.

2.3.9 Kyselina octová, 99,8%, p.a.

2.3.10 Destilovaná voda

2.3.11 Thiodiglykol, koncentrovaný, ZMBD Chemik

2.3.12 Ninhydrin, ZMBD Chemik

2.3.13 Hydrindantin, ZMBD Chemik

2.3.14 Methylcellosolve, ZMBD Chemik

2.3.15 Acetátový tlumivý roztok, $\text{pH} = 5,5$

Pro přípravu dvou litrů acetátového tlumivého roztoku se naváží 1088 g octanu sodného (2.3.8), který se převede do dvoulitrové baňky. Přidá se 500 ml destilované vody (2.3.10) a 200 ml kyseliny octové (2.3.9). Nechá se úplně rozpustit. Během rozpouštění, které trvá zhruba dva týdny se postupně doplňuje destilovanou vodou až na dva litry.

2.3.16 L-hydroxyprolin, Merck

2.3.17 Ionex pro hlavní kolonu: Ostion LG ANB, $12 \mu\text{m}$

Ionex pro předkolonu: Ostion LG KS 0804

2.3.18 Ethanol, čistý, 96%

2.3.19 Standardní roztok hydroxyprolinu – 0,25 $\mu\text{mol/ml}$, ředěný tlumivým roztokem, pH 2,2

2.3.20 Tlumivé roztoky, jejich příprava a příprava ninhydrinu

2.3.20.1 Příprava ninhydrinu

Pro přípravu jednoho litru ninhydrinu se naváží 20 g ninhydrinu (2.3.12), který se převede do tmavé zásobní lahve a rozpustí v 700 ml methylcellosolvu (2.3.14). Rozpouštění probíhá za probublávání argonem pod dvoucestným kohoutem. Po rozpouštění se přidá 250 ml acetátového tlumivého roztoku (2.3.15) a dále 1 g hydrindantinu (2.3.13) rozpuštěného v 50 ml metylcellosolvu. Po uzavření se roztok nechá ještě probublávat plynem (asi 10 min) a pak se výstup ze zásobní lahve připojí na zásobní měch inertního plynu v přístroji.

2.3.20.2 Příprava tlumivých roztoků

Všechny tlumivé roztoky se filtrují pomocí filtrační nálevky (2.4.12).

2.3.20.2.1 Tlumivý roztok pro hydroxyprolin

V programu (tab. č. 1) je označován jako tlumivý roztok č. 4. Pro přípravu jednoho litru tohoto roztoku se naváží 12 g kyseliny citrónové (2.3.4), 2,8 g citronanu sodného (2.3.3), 27,56 g chloridu sodného (2.3.5) a 0,1 g azidu sodného (2.3.6). Navážky se převedou do dvoulitrové baňky (2.4.13) a doplní po rysku destilovanou vodou (2.3.10).

2.3.20.2.2 Regenerace

V programu (tab. č. 1) je označována jako tlumivý roztok č. 6. Pro její přípravu se naváží 8 g hydroxidu sodného (2.3.7) a nechá se za stálého míchání rozpustit ve 100 ml destilované vody (2.3.10). Připravený roztok se převede do baňky o objemu jednoho litru a doplní se po rysku destilovanou vodou.

2.3.20.2.3 Stáčecí tlumivý roztok, pH 2,2

Pro přípravu dvou litrů stáčecího roztoku se naváží do dvoulitrové odměrné baňky (2.4.13) 28 g kyseliny citrónové (2.3.4), 23 g chloridu sodného (2.3.5) a 0,2 g azidu sodného (2.3.6). Přidá se 10 ml thiodiglykolu (2.3.11), 500 ml destilované vody (2.3.10) a nechá se rozpustit. Poté se doplní po rysku vodou.

2.4 Přístroje a pomůcky

- 2.4.1 Automatický analyzátor aminokyselin, AAA 400
- 2.4.2 Termostat s automatickou regulací teploty
- 2.4.3 Rotační vakuová odparka
- 2.4.4 Vývěva vodní
- 2.4.5 Váhy analytické s přesností na 0,0001 g
- 2.4.6 Předvážky
- 2.4.7 Hydrolyzační teflonová nádobka s teflonovým uzávěrem, 100 ml
- 2.4.8 Baňka s kulatým dnem, se zábrusem (dále jen NZ) 29/32, 1000 ml
- 2.4.9 Erlenmayerova baňka s NZ 29/32, 250 ml
- 2.4.10 Filtrační papír, filtrační rychlost velmi vysoká, KA 1 – M, Ø 150 mm
- 2.4.11 Filtrační papír, filtrační rychlost střední, KA 5, Ø 150 mm
- 2.4.12 Filtrační nálevka se skleněnou fritou S3
- 2.4.13 Baňka s NZ 29/32, 2000 ml

2.5 Pracovní postup

2.5.1 Úprava vzorků

Vzorek kuřecího masa ze stehen se upraví v mixéru.

2.5.2 Příprava hydrolyzátů

Do hydrolyzační nádobky (2.4.7) se odváží zhruba 1,5 g vzorku s přesností na 0,0001 g. Vzorek se zakápně třemi kapkami ethanolu (2.3.18), aby se lépe smáčel a přidá se 50 ml kyseliny chlorovodíkové (2.3.1). Do suspenze se přivede argon (2.3.2) a po dobu několika sekund se nechá probublávat, aby se alespoň z části zbavila rozpuštěného vzduchu. Hydrolyzační nádobka se uzavře a umístí do termostatu (2.4.2), kde po dosažení teploty 110 °C probíhá hydrolýza 17 hodin.

Po ukončení hydrolýzy se obsah hydrolyzační baňky kvantitativně vodou (2.3.10) převede přes filtrační papír (2.4.10) do odpařovací baňky (2.4.8). Filtrát se odpaří na rotační vakuové odparce (2.4.3) za použití vodní vývěvy (2.4.4). Odpařování probíhá při teplotě 60 °C. Při odpařování do sucha vznikají ztráty jednak rozstříkem do trubice odparky a jednak degradací aminokyselin, proto se odpařuje jen do sirupovité konzistence. Do baňky se sirupovitým odparkem se přidá cca 5 ml destilované vody a znovu se odpaří. Toto se opakuje ještě jednou. Odparek se kvantitativně převede do definovaného objemu (50 ml) stáčecím tlumivým roztokem (2.3.20.2.3) o pH 2,2 a zfiltruje přes filtrační papír (2.4.11). Před nástřikem do analyzátoru (2.4.1) se tento filtrát neředí.

2.5.3 Chromatografické stanovení aminokyselin

Obsah hydroxyprolinu se stanoví metodou ionexové chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem a fotometrickým detektorem na analyzátoru aminokyselin (2.4.1). Podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 1. (Podmínky analýzy je nutno přizpůsobit stavu náplně kolony). Objem nástřiku do analyzátoru je stabilně 100 µl.

Tab. č. 1. Program pro stanovení hydroxyprolinu

Čas	Teplota kolony	Tlumivý roztok	Příkaz	Poznámka
0,00	50	4	Inject	Tlumivý roztok pro hydroxyprolin
4,00	50	4	StartEquil	
7,00	50	6	Zero	0,2M NaOH
14,00	50	4	NHD	
27,00	50	4	Load	
31,00	50	4	AcqStop	
32,00	50	4	None	

2.5.4 Kalibrace standardu hydroxyprolinu

Základní standardní roztok hydroxyprolinu (2.3.19). Do 50ml odměrné baňky se napipetuje 5 ml vnitřního standardního roztoku o koncentraci $c = 2,5 \mu\text{mol/ml}$ a doplní se po značku stáčecím roztokem (2.3.20.2.3) o pH 2,2.

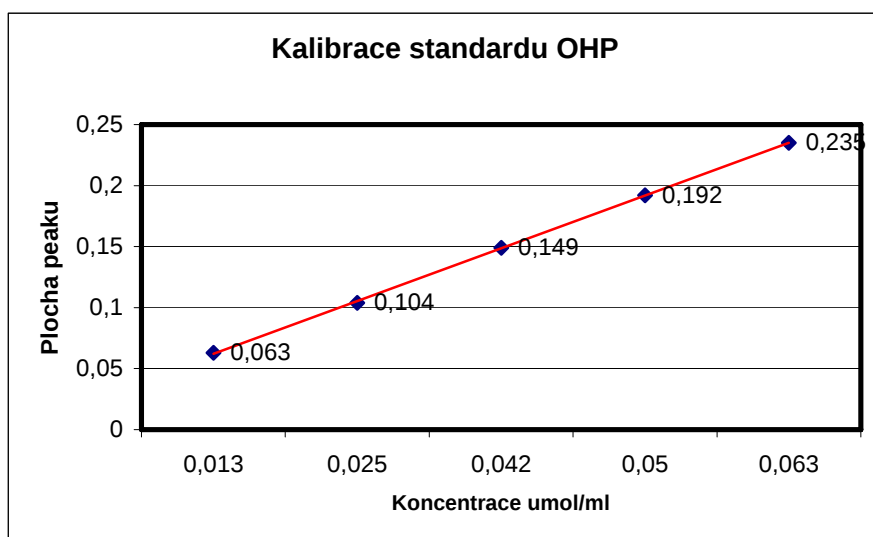
1 ml tohoto základního roztoku obsahuje 0,1 ml hydroxyprolinu

Postupně byl napipetován 1 ml základního standardu do sady o objemu (4; 5; 6; 10; 20) ml, doplněn tlumivým roztokem o pH 2,2 a promíchán. Takto připravená sada odpovídá koncentracím (0,063; 0,050; 0,042; 0,025; 0,013) $\mu\text{mol/ml}$.

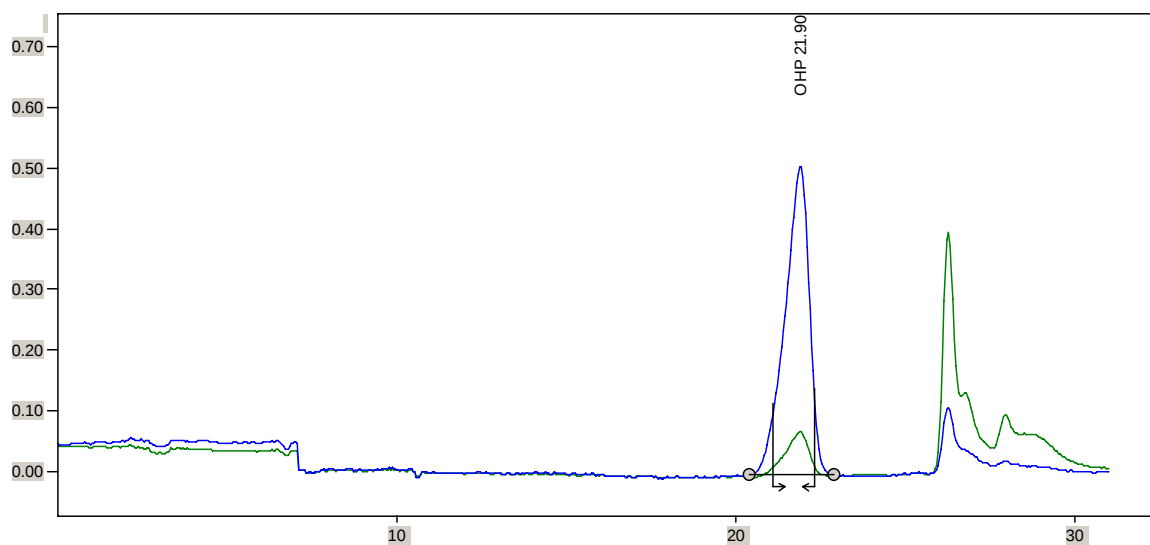
Hodnoty naměřené na analyzátoru aminokyselin jsou uvedeny v tabulce č. 2. Dále byla do grafu vynesena kalibrační přímka, jejíž ukázka je na obrázku č. 1.

Tab. č. 2. Hodnoty pro kalibrační přímku

Kalibrační úroveň	Hydroxyprolin		
	ředění	μmol/ml	plocha
1	20 ×	0,063	0,063
2	10 ×	0,050	0,104
3	6 ×	0,042	0,149
4	5 ×	0,025	0,192
5	4 ×	0,013	0,235



Obr. č. 1. Ukázka kalibrační přímky



Obr. č. 2. Ukázka chromatogramu

2.6 Výpočet a vyjádření výsledku

Výpočet obsahu hydroxyprolinu se provádí pomocí programu Chromulan. Ve vyhodnocovacím programu Chromulan se pro výpočet obsahu hydroxyprolinu v kyselých hydrolyzátech volí metoda **H_p** pro vzorky a **H** pro standardy.

Výpočet obsahu hydroxyprolinu (m_H) v nástríku v μg :

$$m_H = V_s \times c_{st} \times M_w$$

V_s objem smyčky 0,1 ml
 c_{st} koncentrace standardu 0,25 $\mu\text{mol/ml}$
 M_w molární hmotnost hydroxyprolinu ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)

Výpočet obsahu hydroxyprolinu ve vzorku v %:

$$M_H = [m_H \times (V_k/V_s) \times MF \times 1/DF] / 10$$

V_k konečný objem 50 ml
 MF multiply factor faktor ředění 1
 DF divide factor faktor navážky v mg

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení a vyjadřuje se v % s přesností na tři platné číslice.

3 Interpretace validačních parametrů

3.1 Linearita

Linearita byla měřena na pěti koncentračních hladinách v rozmezí 0,013 $\mu\text{mol/ml}$ až 0,063 $\mu\text{mol/ml}$ a byla určena z hodnot naměřených na analyzátoru aminokyselin uvedených v tabulce č. 2. Ke statistickému vyhodnocení linearity bylo použito QC testu a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tab. č. 3. Vyhodnocení linearity

Parametr	Hydroxyprolin
Vypočtený R	0,99566
R k testování	0,99000
Vypočtený QC	4,79
QC k testování	5,00

Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního a QC koeficientu.

3.2 Citlivost

Citlivost je podle IUPAC dána změnou signálu, vyvolanou změnou validované vlastnosti (tj. směrnice kalibrační přímky). V tabulce č. 2 jsou uvedeny naměřené hodnoty kalibrační přímky, z nichž se pomocí programu EffiValidation zjistila citlivost analytické metody daná směrnici kalibrační přímky, která má hodnotu 0,28943 (plocha/mg).

3.3 Mez stanovitelnosti a mez detekce

Mez stanovitelnosti je úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení. Mez detekce je úroveň, nad kterou lze odezvu vzorku odlišit od odezvy slepého pokusu. Tyto hodnoty byly vypočteny programem EffiValidation z hodnot uvedených v tabulce č. 2. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 4.

Tab. č. 4. Hodnoty meze stanovitelnosti a meze detekce

	Hydroxyprolin
Mez stanovitelnosti	0,02853 mg/kg
Mez detekce	0,01656 mg/kg

3.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty, které způsobují náhodné chyby. Stanovení opakovatelnosti bylo provedeno na vzorku kuřecího masa z osminásobného měření. Naměřené hodnoty jsou v tabulce č. 5.

Tab. č. 5. Stanovení opakovatelnosti

Číslo měření	Hydroxyprolin (%)
1	0,273
2	0,222
3	0,162
4	0,189
5	0,185
6	0,223
7	0,162
8	0,152

Po vyhodnocení programem Effi Validation 3.0 jsou hodnoty opakovatelnosti analytické metody pro hydroxyprolin 0,04097 jednotek, tj. 20,91 % relativních. Hypotéza o normalitě dat byla potvrzena.

3.6 Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s deklarovanou referenční hodnotou a byla zjišťována testem výtěžnosti, kdy k přesné navážce vzorku se zjištěným obsahem určované látky bylo postupně přidáváno stanovené množství čisté látky – ZSR (ve třech různých hladinách přídatku – 40 %, 80 %, 120 %) a zpětně vypočítaná výtěžnost. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 6. a č. 7.

Tab. č. 6. Naměřené hodnoty s přidavkem ZSR

Měření	Přídavek (%)	Hydroxyprolin (%)
1a	40	0,217
1b	40	0,260
1c	40	0,225
2a	80	0,378
2b	80	0,380
2c	80	0,365
3a	120	0,444
3b	120	0,451
3c	120	0,439

Tab. č. 7. Ověření výtěžnosti hydroxyprolinu

Úroveň	Předloženo (%)	Naměřeno (%)	Výtěžnost (%)	Přesnost	n	t-výpočet	t-kritické
1	0,199	0,19867	99,83	0,02031	3	0,02843	4,303
2	0,2776	0,234	84,29	0,02287	3	3,30215	4,303
3	0,356	0,37433	105,15	0,00814	3	3,89885	4,303
4	0,435	0,44467	102,22	0,00603	3	2,7777	4,303

Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

4 Souhrnné výsledky a validace

Validační parametr	Validační hodnota
Opakovatelnost	20,91 % relat.
Správnost	Správnost metody prokázána
Linearita	Linearita metody prokázána
Mez detekce	0,01656 mg/kg
Mez stanovitelnosti	0,02853 mg/kg
Citlivost	0,28943 (plocha/mg)

5 Závěr

V práci na téma Stanovení hydroxyprolinu v kuřecím mase metodou ionexové chromatografie byly stanoveny tyto validační parametry: opakovatelnost, správnost, linearita, citlivost, mez detekce a mez stanovitelnosti.

Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost ověřované metody k používání v Národní referenční laboratoři.

6 Literatura

1. Bruckner P., Birk D.E.: Collagen, **2005**
2. Moore S., Stein W.H.: J. Biol. Chem., **1951**, 633 (192)
3. Moore S., Spackman D.H., Stein W.H.: Anal. Chem., **1958**, 1185 (30)
4. Centner V.: Uživatelská příručka Effi Validation 3.0, EffiChem, **1999 – 2002**
5. Blažej A., Galatík A., Galatík J., Mládek M.: Technologie kůže a kožešin, SNTL Praha, **1984**

Alkaloidy lupiny a využití lupiny v krmivářské praxi

Pavel Ryšavý

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Oddělení speciálních
analýz rostlin a krmiv, č.p. 121, 582 57 Lípa u Havlíčkova Brodu
pavel.rysavy@ukzuz.cz

1 Úvod – historie a současnost

Lupina bílá (*Lupinus albus*) je společně s lupinami žlutou (*Lupinus luteus*), úzkolistou (*Lupinus angustifolius*) a andskou (*Lupinus mutabilis*) zařazena do čeledi bobovitých (Fabaceae), rod *Lupinus*. Uvádí se, že je 200 až 250 druhů v tomto rodu. Většina pochází ze Středomoří, andská z jižní Ameriky. V těchto oblastech se pěstovaly před staletími a již tehdy se využívaly pro výživu lidí a zvířat.

Z oblasti Středomoří se postupně jednotlivé druhy rozšiřovaly do střední a západní Evropy. Významnější objem pěstování je možné sledovat ve 2. pol. 19. století. Až v minulém století byly vyšlechtěny první odrůdy se sníženým obsahem hořkých látek (alkaloidů) a vyšším obsahem bílkovin, které byly vhodnější pro potravinářské a krmivářské účely.

Celkově je ve světě oseto cca 1,3 mil. ha. Nejvýznamnější pěstební oblasti jsou v Austrálii a jižní Americe (lupiny andská a úzkolistá), v Evropě pak Německo (lupina žlutá), Francie, Španělsko, Polsko, Ukrajina a Rusko (lupiny bílá a úzkolistá). V České republice se v minulosti pěstování lupiny příliš nerozšířilo. Důvodem byla především dlouhá vegetační doba a s tím související problematické dozrávání zrn, náchylnost k antraknóze a také nízké výnosy. K výraznějšímu rozšíření pěstování došlo až po roce 2004, kdy byla registrována nová francouzská odrůda lupiny bílé - Amiga. Již v roce 2004 bylo oseto 400 ha a v roce 2006 se plochy rozšířily až na 7500 ha. Z toho polovina připadla na lupinu bílou a druhá polovina na úzkolistou. Amiga si udržela cca 40 % množitelských ploch.

2 Obsah živin v semeni lupiny a její krmivářské využití

2.1 Obsahové látky v semeni lupiny

Nutriční hodnota semene lupiny je velmi vysoká. Je to plodina s vysokým obsahem dusíkatých látek a řadí se mezi osm perspektivních zdrojů rostlinných proteinů jak v produkci krmiv, tak potravin, nahrazujících živočišné bílkoviny v lidské výživě. Existují však významné rozdíly mezi jednotlivými odrůdami, především v obsahu dusíkatých látek (NL), tuku a tím související energetické hodnoty. Tyto rozdíly jsou dané jak typem odrůdy, tak klimatickými podmínkami. Existuje i velká variabilita v obsahu NL v rámci jedné odrůdy. Nejpatrnější je zřejmě u lupiny bílé, kde se obsah NL pohybuje v intervalu 30 % až 38 %; lupina žlutá má obsah NL o něco vyšší (36 % až 40 %). Obsah NL u lupiny úzkolisté je nejčastěji mezi 32 % až 36 %. Odrůdově se celkem významně liší i obsah celkové energie v lupině. Důvodem těchto rozdílů je různý obsah tuku v jednotlivých odrůdách, pohybující se v rozmezí 4 % až 12 %, přičemž obsahuje vysoký podíl nenasycených mastných kyselin s dominantním zastoupením (až 80 %) kyseliny olejové a linolové. Srovnání jednotlivých odrůd uvádí tabulka 1.

Obecně mají lupiny vyrovnaný rozsah aminokyselin, který vyhovuje požadavkům na výživu hospodářských zvířat. Lupina je výborným zdrojem esenciálních aminokyselin vyjma methioninu, který je v lupinovém proteinu deficitní. Naopak má vysoký obsah argininu, který je esenciální aminokyselinou pro drůbež a do krmných směsí ho lze přidávat pouze přes krmné komponenty (syntetický se nevyrábí).

Tab.1 Obsah dusíkatých látek, tuku a metabolizovatelné energie

Odrůda	Dusíkaté látky (%)	Tuk (%)	Metabolizovatelná energie [ME] (MJ/ kg sušiny)
Lupina bílá	30 – 38	9 – 11	14 – 16
Lupina žlutá	36 – 40	3 – 5	12,5 – 13,5
Lupina úzkolistá	32 – 36	5 – 7	13 – 14

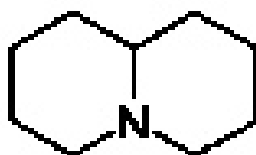
Semena lupiny obsahují relativně malá množství škrobu, který je přibližně ze dvou třetin soustředěn v jádru semene (zrna), nejčastěji se obsah pohybuje mezi 5 % až 11 % v závislosti na odrůdě. Vysoký je ale obsah tzv. neškrobových sacharidů (NSP), opět v závislosti na odrůdě tvoří průměrně 30 % až 40 % sušiny, přičemž semena lupiny úzkolisté obsahují více NSP než lupiny bílé a žluté. Z hlavních monosacharidů jsou nejvíce zastoupeny glukóza a galaktóza. Hlavní část NSP jádra semene tvoří polysacharidické β -galaktany jako složku buněčných stěn, v jádru jsou ještě zastoupeny oligosacharidické α -galaktosidy, sacharóza a její deriváty (rafinóza, stachyóza a verbaskóza). Slupka zrna tvořící 15 % až 25 % hmotnosti celého semene obsahuje převážně celulózu a hemicelulózu. Tyto nevyužitelné polysacharidy jsou také hlavní složkou vlákniny v sušině semena, která v závislosti na odrůdě kolísá od 12 % do 17 %, její hlavní část (cca 80 % až 90 %) je soustředěna ve slupce obsahující zhruba 49 % až 55 % vlákniny.

Lupina má z pohledu využitelnosti její nutriční hodnoty vysoký koeficient stravitelnosti bílkovin, u většiny odrůd je vyšší než 90 %, ale relativně nízkou využitelnost energie, cca 60 %.

2.2 Antinutriční látky

Obecně lze říci, že lupinová semena (především sladké odrůdy) na rozdíl od ostatních luštěnin obsahují vedle nevyužitelných neškrobových polysacharidů slupky-celulózy a hemicelulózy a β -galaktanů v jádře, jen velmi malá množství antinutričních látek a látek vyvolávajících alergické reakce, takže je lze na rozdíl od sojových krmiv zkrmovat bez jakékoli úpravy všem druhům a kategoriím zvířat.

Nové vyšlechtěné odrůdy (tzv. sladké) mají velmi nízký obsah fenolických látek, taninů, lektinů (protein akumulovaný v semenech nebo vegetativních částech rostliny, který způsobuje nestravitelnost nebo toxicitu pro parazity a predátory těchto částí rostlin) a na rozdíl od sóji i inhibitorů trypsinu a chymotrypsinu, takže nevyžadují tepelnou úpravu před zkrmením. Významně snížený je i obsah hořkých látek – alkaloidů. Jejich chemická struktura je odvozena od molekuly chinolizidinu (obr.1).



Obr.1, chinolizidin

Jednotlivé alkaloidy lupiny tvoří bicyklické, tricyklické a tetracyklické chinolizidiny, kterých je v rámci rodu *Lupinus* známo více než 100. V hospodářsky důležitých odrůdách lupiny jsou nejdůležitějšími alkaloidy lupanin, isolupanin, lupinin, angustifolin, spartein, 3β -hydroxylupanin, 13α -hydroxylupanin, albin a multiflorin. Jsou většinou doprovázeny celou řadou příbuzných

alkaloidů.

Jejich obsah v rostlině velmi závisí na odrůdě a klimatických podmínkách. V semenech původních hořkých odrůd lupiny úzkolisté se obsah alkaloidů běžně pohybuje mezi 2 % až 3 %, může být ale až 5 %, ve vyšlechtěných sladkých odrůdách je pouze 0,001 % až 0,05 %. Např. v Austrálii je povolen maximální obsah 0,002 %, v Chile 0,05 %. Obsah hlavních alkaloidů semen nejdůležitějších hospodářských odrůd lupiny je uveden v tabulce 2.

Tab.2 Obsah hlavních alkaloidů v semenech lupiny

Alkaloid	Obsah v % z celkového obsahu alkaloidů			
	Lupina bílá	Lupina žlutá	Lupina úzkolístá	Lupina andská
Lupanin	70	< 1	70	46
Lupinin	–	60	–	–
Angustifolin	< 1	–	10 – 16	1
Sparteín	< 1	30	< 1	16
3-hydroxylupanin	–	–	–	12
13-hydroxylupanin	8	–	12 – 38	7
Albin	15	–	–	–
Multiflorin	3	–	–	–

Alkaloidy lupiny jsou velmi stálé sloučeniny, které nevykazují žádnou výraznou reakční aktivitu ani v průběhu skladování nebo zpracování lupinových semen. Nejběžnějším způsobem snížení obsahu alkaloidů je extrakce namletých semen vodou (máčení, vaření), kdy je možné jejich obsah snížit až stokrát. Šroty se zbavují alkaloidů extrakcí ethanolem s přidávkou kyseliny chlorovodíkové (obsah poklesne z původních 3,2 % na 0,1 % až 0,2 %).

Jednotlivé alkaloidy vykazují různou toxicitu. Lze konstatovat, že nejvíce toxické jsou lupanin a spartein. U člověka platí, že požití 11 mg až 25 mg lupinových alkaloidů na 1 kg tělesné

hmotnosti způsobuje vážné zdravotní poruchy, které se projevují nervozitou, zvracením, dýchacími obtížemi, poruchami vidění, pocením, postupující slabostí a v krajním případě i komatem. U hospodářských zvířat, zejména u drůbeže, je závažnost negativních účinků přímo spojená s podílem hořké lupiny v krmné dávce. Jedná se o snížení příjmu potravy a tím i přírůstku hmotnosti, ochablost nohou, zvýšení podílu vnitřností k tělesné hmotnosti, nedostatečnou koordinaci, strnutí šíje až po svalovou paralýzu a kosterní deformace.

3 Krmivářské využití

Jak už bylo uvedeno, lupinu je možno díky nízkému obsahu antinutričních látek zkrmovat přímo v surovém stavu. Pro zajištění uspokojivého využití živin lze doporučit úpravu semen šrotováním, hrubým drcením, rozemletím, vločkováním, rozválnčováním, případně extrudací.

V krmivářství může lupina sloužit jako určitá alternativa sóji. Svým živinovým složením se blíží sójovému extrahovanému šrotu, který obsahuje více proteinu, lyzinu, methioninu, cysteinu a threoninu, ale méně vlákniny, škrobu a tuku. Odstraněním slupky, která obsahuje více než 50 % vlákniny, lze získat vysoce hodnotný produkt (jádra) s obsahem proteinu 45 % a více. Některé vysokoproteinové odrůdy dosahují dokonce vyšší nutriční hodnoty než nejkvalitnější sojové šroty. Odslupkováním se nejen zvýší obsah proteinů a s ním i obsah esenciálních aminokyselin, ale i obsah tuku a využitelných škrobových polysacharidů. Na druhou stranu se výrazně sníží obsah vlákniny a tím i nevyužitelných neškrobových polysacharidů (celulóza a hemicelulóza). Odslupkovaná semena tak mají vyšší stravitelnost živin, díky vyššímu obsahu tuku a škrobu i vyšší energetickou hodnotu a především využitelnost této energie je vyšší. Množství metabolizovatelné energie se zvyšuje o 20 % až 35 %.

Slupky jako odpadní produkt při odslupkování lupinových semen jsou svým vysokým obsahem vlákniny dobrým krmivem pro přežvýkavce (masný i mléčný skot, kozy a ovce) a některé monogastry (králíci). Stejně tak je pro tyto kategorie hospodářských zvířat vhodné zkrmování předupravených (viz.1. odstavec této kapitoly) neodslupkovaných semen tzv. sladkých (s nízkým obsahem antinutričních látek, převážně alkaloidů) odrůd lupiny i celých rostlin jako píce pro zelené krmení nebo silážování. Podíl lupinových semen v krmné směsi pro býky je doporučován do 30 %, pro dojnice do 20 %. Stravitelnost proteinu v bachoru se pohybuje od 71 % do 79 %.

Předupravená neodslupkovaná semena je možno zkrmovat také prasatům, kde lze sójový protein nahradit až 30% podílem lupiny v krmné směsi. Zastoupení lupiny v krmné směsi je možno snížit odslupkováním semene. Tím se zvýší jeho výživová i energetická hodnota. Na základě praktických zkušeností a literárních údajů je možné doporučit následující zastoupení lupiny v krmných směsích:

Předvýkrm (15 kg až 35 kg) – 10 % až 15 %;

Výkrm I (35 kg až 65 kg) – 20 % až 25 %;

Výkrm II (65 kg až 120 kg) – 30 % až 35 %;

Jalové a laktující prasnice – 20 %.

Zvýšení využitelnosti energie a stravitelnosti živin lze docílit i přidáváním exogenních enzymů do krmné dávky. Neškrobové polysacharidy jádra, galaktany a oligosacharidy galaktosidy a celulózy a hemicelulózy slupky nejsou hydrolyzovány endogenními enzymy. Tento problém je významný hlavně u drůbeže. U prasat dochází v koncovém střevě k intenzivnější fermentaci těchto látek střevní mikroflórou. Z tohoto důvodu mají semena lupiny pro prasata vyšší energetickou hodnotu než pro drůbež.

Jako velmi vhodné vysokoproteinové krmivo pro drůbež lze využívat odslupkovaná lupinová semena. Odslupkováním se odstraní značná část pro drůbež nevyužitelné vlákniny (celulóza a hemicelulóza), zvýší se obsah proteinu a metabolizovatelné energie. K dalšímu zvýšení metabolizovatelné energie a stravitelnosti živin kromě odslupkování přispívá přidávání enzymových doplňků do krmiv. Jedná se hlavně o α -galaktozidázu, která hydrolyzuje galaktany a galaktosidy obsažené v jádře. Pro využití lupiny jako krmné komponenty pro výživu drůbeže je lépe volit odrůdy s obsahem dusíkatých látek 35,5 % a více a přidávat předupravená semena lupiny do krmných směsí v množství 10 % až 20 %. Použitím vysokoproteinových odrůd lze nahradit až 50 % sojového extrahovaného šrotu v krmných směších. Z hlediska aminokyselinového složení je velmi pozitivní vysoký obsah pro drůbež esenciálního argininu. Určitým negativem je deficitní obsah methioninu, který je nutné při výrobě krmných směsí optimalizovat. Experimentálně bylo také potvrzeno zlepšení kvality vajec u nosnic při zkrmování semen lupiny v krmných směších v množství 10 %. Prokazatelně se zvýšila hmotnost produkovaných vajec, vaječné skořápky a vaječného bílku, snížil se obsah cholesterolu ve vaječném žloutku a současně zlepšila jeho barva. Přitom nebyla negativně ovlivněna produkce vajec, kvalita skořápky ani hmotnost vaječného žloutku.

Závěrem lze konstatovat, že semeno lupiny jako domácí plodiny lze využít v krmných směších pro skot, prasata i drůbež, kde může nahradit importovanou proteinovou surovinu jako je sója a její produkty.

4 Literatura

1. Zralý Z. a kolektiv, **2008** Metodika - Využití lupiny ve výživě prasat, Výzkumný ústav veterinárního lékařství v.v.v, Brno
2. Suchý P, Straková E, **2007** Metodika – Využití lupiny ve výživě drůbeže, Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i, Praha-Uhřetěves
3. Homolka P., Kouklová V., Kudrna V., Jančík F., Skřivanová V., Metodika – Využití lupiny ve výživě skotu, Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i, Praha-Uhřetěves
4. Sborník přednášek konference „Lupina 2008“ pořádané na Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno 31.1.**2008**
5. Velíšek J., **2002** Chemie potravin I. a III. díl

Bulletin Národní referenční laboratoře XIII 2009/1

Ročník: XIII, č. 1
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2009
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce: Ing. Iva Strížová
Náklad: 140 výtisků
Počet stran: 47
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196