Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř

Bulletin 2012

Ročník XVI, číslo 2/2012

Brno 2012

Obsah

1. **Stanovení dusičnanů, síranů a chloridů ve vodách a vodných extraktech půd metodou iontové chromatografie**
Eva Fojtlová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 1

2. **Stanovení kyseliny benzoové v krmivech metodou HPLC s UV detekcí**
Marta Mádlová a kol.
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Praha,
Za opravnou 4, 150 00 Praha 5 – Motol 13

3. **Zavedení techniky UHPLC**
Marie Mrkvicová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 26

4. **Vývoj kalibrační rovnice na tvrdost zrna a sušinu v celém zrnu pšenice metodou FT-NIR spektroskopie**
David Čižmár, Radvana Šulová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 35

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení dusičnanů, síranů a chloridů ve vodách a vodných extraktech půd metodou iontové chromatografie

Eva Fojtlová

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

1 Cíl práce

Cílem práce bylo převedení stanovení dusičnanů, chloridů a síranů ve vodách a ve vodných extraktech půd technikou kapilární elektroforézy na stanovení technikou iontové chromatografie.

2 Materiál a metody

K zavedení a ověření metody byly použity vzorky vod z lysimetrů, vody závlahové, srážkové, studniční a vodné extrakty půd. Vodné extrakty půd se připravovaly podle postupu uvedeného v ČSN ISO 11048 Kvalita půdy – Stanovení síranů rozpustných ve vodě a síranů rozpustných v kyselině.

Koncentrace sledovaných iontů byla velmi rozdílná a pohybovala se od téměř nulových hodnot až po řádově stovky mg/l.

Vzorky byly analyzovány na Iontovém chromatografu ICS 3000 firmy Dionex.

Sestava chromatografu obsahuje tyto moduly:

AS Autosampler AS40,

DP isokratické a gradientové čerpadlo, mixer, degaser,

DC termostatovaný prostor, ve kterém jsou umístěny kolony, vodivostní detektor,

ampérometrický detektor, supresor,

EG eluent generátor (automaticky generuje mobilní fázi požadované kvality),

UV VIS detektor, typ AD 25.

Součástí dodávky byla analytická kolona AS 9 HC a předkolona AG 9 HC.

Vzorky vod se před nástřikem upravovaly pouze filtrací nebo odstřeďováním, v případě potřeby ředěním. Chromatografické podmínky byly nastaveny podle doporučení výrobce analytické kolony. K detekci se používal vodivostní detektor v kombinaci se supresorem, který snižuje vodivost eluentu a zvyšuje tak citlivost měření.

Anionty byly identifikovány porovnáním jejich retenčních časů s retenčními časy standardních roztoků. Vzorky byly vyhodnoceny kvantitativně pomocí externí kalibrace.

2.1 Princip metody

Anionty jsou separovány kapalinovou chromatografií. Jako stacionární fáze se používá měnič aniontů. Jako mobilní fáze se používají soli slabých jedno- nebo dvoj- sytných kyselin (např. uhličitanů, hydrogenuhličitanů). K detekci se užívá vodivostní detektor v kombinaci se supresorem.

2.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1. Vysoce čistá demineralizovaná voda s měrným odporem minimálně 18,2 MΩ, odplyněná.
2. Uhličitan sodný.
3. Uhličitan sodný, roztok, c = 0,5 mol/l.

   Příprava: 26,4973 g uhličitanu sodného (2) se rozpustí v asi 400 ml vody (1), doplní se vodou do objemu 500 ml. Lze použít i komerčně dodávaný roztok.
4. Uhličitan sodný, roztok, c = 9 mmol/l.

   Příprava: 18 ml roztoku uhličitanu sodného (3) se pipetuje do 1000ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku.
5. Základní směsný standardní roztok o koncentraci 1 000 mg Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}/l. Dodává se komerčně.

6. Pracovní roztok I o koncentraci 100 mg Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}/l.

   Příprava: 10 ml základního směsného roztoku (5) se napipetiuje do 100ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku. Roztok je stálý 1 týden při teplotě 4 ^oC.

7. Pracovní roztok II o koncentraci 10 mg Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}/l.

   Příprava: 10 ml pracovního roztoku I (6) se pipetuje do 100ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku. Roztok se připravuje v den použití.

2.3 Přístroje a pomůcky

1. Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
2. Iontový chromatograf ICS 3000 Dionex.
3. Analytická kolona AS9HC (2 × 250) mm s předkolonou, Dionex.
4. Laboratorní odstředivka.
5. Automatické pipety.
6. Zařízení pro membránovou filtraci s membránovými filtry o velikosti porů 0,45 μm.
7. Jednorázové mikrofiltry s porozitou 0,22 μm.
8. Zařízení pro přípravu vysoce čisté demineralizované vody – Millipore.

2.4 Pracovní postup

2.4.1 Úprava vzorku

Před nástřikem se ze vzorku odstraní nerozpuštěné částice buď odstředěním (10 min; 10 000 g) nebo filtrací přes jednorázové mikrofiltry.

2.4.2 Měření na ICS 3000

Chromatografické podmínky se nastaví podle tabulky č.1.

Tabulka č.1. Chromatografické podmínky.

Kolona	AS9-HC (2 × 250) mm, Dionex
Předkolona	AG9-HC (2 × 50) mm, Dionex
Eluent	9,0 mM Na_2CO_3
Průtok eluentu	0,25 ml/min
Detekce	Vodivostní detektor
Supresor	ASRS-ULTRA, 2mm, Recycle mode
Objem nástřiku	10 μl
Teplota na koloně	25 ^{o}C

Kalibrace

Kalibrační roztoky se připraví ředěním pracovního roztoku I (6), pracovního roztoku II (7), popřípadě přímým ředěním základního roztoku (5).

Připraví se 5 až 10 kalibračních roztoků pokrývajících co nejrovnoměrněji zvolený koncentrační rozsah. Postupuje se například tak, jak je dále uvedeno pro rozsah (0,1 – 20) mg/l.

Do sady 100ml odměrných baněk se pipetuje (1; 5; 10) ml pracovního roztoku II (7) a (2,5; 5; 20) ml pracovního roztoku I (6). Baňky se doplní vodou (1) po značku a dobře se promíchají.

S využitím pracovního roztoku II (7) se získá kalibrační řada o koncentracích (0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20) mg Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}/l. Kalibrační roztoky se připravují v den použití.

Po nastavení chromatografických podmínek a ustálení chodu iontového chromatografu se kalibrační roztoky změří .

Ze získaných dat se sestrojí kalibrační křivka. Pro kvantitativní vyhodnocení se používá její lineární část.

Měření vzorku

Po kalibraci přístroje se změří za stejných podmínek vzorek. Jednotlivé anionty se identifikují porovnáním retenčních časů píků roztoku vzorku s retenčními časy píků roztoku standardu. Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnějšího standardu.

Jestliže koncentrace aniontu v analyzovaném vzorku přesáhne koncentrační rozsah kalibrace, vzorek se naředí. Je možno postupovat také tak, že se provede kalibrace s vyšším kalibračním rozsahem, pokud to výměnná kapacita kolony dovolí, a vzorek se znovu analyzuje.

2.4.3 Výpočet a vyjadřování výsledků

Hmotnostní koncentrace aniontu v roztoku se vypočte z plochy jeho píku pomocí kalibrační funkce a výsledek se přepočte podle případného ředění vzorku.

Pro výpočet se využívá software přístroje. Výsledky se vyjadřují v mg/l.

Norma ČSN ISO 103404-1 Jakost vod – Stanovení rozpuštěných aniontů metodou kapalinové chromatografie iontů – Část 1: Stanovení bromidů, chloridů, fluoridů, dusičnanů, dusitanů, fosforečnanů doporučuje uvádět výsledky na dvě platné číslice.

2.5 Diskuse a výsledky

Podle uvedeného postupu byla provedena řada měření. Získané výsledky byly statisticky zpracovány.

Vzhledem k tomu, že metoda vychází z ČSN ISO 103404–1, byla metoda verifikována. Byla určena přesnost, správnost, nejistota, mez detekce a stanovitelnost. Všechna měření splňovala základní retenční charakteristiky převzaté z citované normy.

Validační parametry byly vypočteny pomocí sofwaru Effivalidation (Effichem).

Správnost

K vyhodnocení správnosti byla použita metoda pro velký koncentrační rozsah s tím, že k dispozici byl slepý pokus a standard stanovované látky. Pomocí chemikálií analytické čistoty byly připraveny roztoky solí ve vodě o různých koncentracích, které se opakovaně měřily.

Výsledky (mg/l) včetně vyhodnocení uvádějí tabulky č. 2 až č. 7 .

Tabulka č. 2. Správnost: chloridy – naměřená data.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Správnost: velký koncentrační rozsah - slepý pokus k dispozici: regresně
VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 1

Jednotky:

DATA:

Úroveň	Popis	Předloženo	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6	Měření 7	Měření 8	Měření 9	Měření 10
1	chloridy	0,5	0,515	0,5128	0,5023							
2		1	0,9784	0,9769	0,9866							
3		5	4,8148	4,7647	4,765							
4		10	9,9189	9,8998	9,8867							
5		15	15,1769	15,2145	15,2281							

Tabulka č. 3. Správnost: chloridy – vyhodnocení.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Správnost: velký koncentrační rozsah - slepý pokus k dispozici: regresně
VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 1

VYHODNOCENÍ:

Parametr	Teoreticky	Naměřeno	Přesnost	Výtěžnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Úsek	0	-0,0965	0,09131		-0,38709 - 0,194	Přijata
Směrnice	1	1,0115	0,01089	101,15295	0,97686 - 1,04619	Přijata

Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Tabulka č. 4. Správnost: dusičnany – naměřená data.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Správnost: velký koncentrační rozsah - slepý pokus k dispozici: regresně
VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 2

Jednotky:

DATA:

Úroveň	Popis	Předloženo	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6	Měření 7	Měření 8	Měření 9	Měření 10
1	dusičnany	0,5	0,4782	0,5303	0,5296							
2		1	0,9981	1,0205	1,0109							
3		5	5,0041	4,944	4,936							
4		10	9,9139	9,9619	9,9612							
5		15	14,936	15,0693	15,0669							
6		20	20,5746	20,6036	20,6106							

Tabulka č. 5. Správnost: dusičnany – vyhodnocení.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Správnost: velký koncentrační rozsah - slepý pokus k dispozici: regresně
VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 2

VYHODNOCENÍ:

Parametr	Teoreticky	Naměřeno	Přesnost	Výtěžnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Úsek	0	-0,0984	0,11195		-0,40917 - 0,21239	Přijata
Směrnice	1	1,0221	0,01	102,21405	0,99437 - 1,04991	Přijata

Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Tabulka č. 6. Správnost: sírany – naměřená data.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Správnost: velký koncentrační rozsah - slepý pokus k dispozici: regresně
VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 3

Jednotky:

DATA:

Úroveň	Popis	Předloženo	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6	Měření 7	Měření 8	Měření 9	Měření 10
1	sírany	0,5	0,5152	0,4841	0,4821							
2		1	1,0069	0,9956	1,0061							
3		5	5,084	4,9638	5,008							
4		10	9,8061	9,8808	9,8841							
5		15	14,9775	15,0499	14,983							
6		20	20,3247	20,2994	20,3572							

Tabulka č. 7. Správnost: sírany – vyhodnocení.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Správnost: velký koncentrační rozsah - slepý pokus k dispozici: regresně
VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 3

VYHODNOCENÍ:

Parametr	Teoreticky	Naměřeno	Přesnost	Výtěžnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Úsek	0	-0,0638	0,08112		-0,28899 - 0,16141	Přijata
Směrnice	1	1,0114	0,00725	101,13703	0,99124 - 1,0315	Přijata

Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Opakovatelnost

Pro výpočet byla využita paralelní měření. Vyhodnocení je uvedeno v tabulkách č. 8 až č. 12.

Tabulka č. 8. Opakovatelnost: chloridy – mez stanovitelnosti (MS) až 3 × MS.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Opakovatelnost: z paralelních měření
VALIDOVANÁ VLASTNOST: chloridy MS - 3MS

VYHODNOCENÍ:

Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
0,25598	0,0125	4,88394	3

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 0,0125 jednotek, tj. 4,88 %.

Tabulka č. 9. Opakovatelnost: chloridy – nad 3 × MS.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Opakovatelnost: z paralelních měření
VALIDOVANÁ VLASTNOST: chloridy nad 3 MS

VYHODNOCENÍ:

Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
30,17912	2,11733	7,01589	166

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 2,11733 jednotek, tj. 7,02 %.

Tabulka č. 10. Opakovatelnost: dusičnany – MS až 3 × MS.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Opakovatelnost: z paralelních měření
VALIDOVANÁ VLASTNOST: dusičnany MS - 3MS

VYHODNOCENÍ:

Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
0,61904	0,03547	5,72951	12

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 0,03547 jednotek, tj. 5,73 %.

Tabulka č. 11. Opakovatelnost: dusičnany – nad 3 × MS.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Opakovatelnost: z paralelních měření
VALIDOVANÁ VLASTNOST: dusičnany nad 3MS

VYHODNOCENÍ:

Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
70,06318	4,31952	6,16518	130

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 4,31952 jednotek, tj. 6,17 %.

Tabulka č. 12. Opakovatelnost: sírany – nad 3 MS.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Opakovatelnost: z paralelních měření
VALIDOVANÁ VLASTNOST: sírany

VYHODNOCENÍ:

Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
64,21192	3,2604	5,07758	191

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 3,2604 jednotek, tj. 5,08 %.

Opakovatelnost se pro sírany v koncentračním rozsahu MS až 3 × MS nepočítala, protože tak nízké koncentrace se u reálných vzorků nevyskytují a nebyla k dispozici potřebná data.

Nejistota měření

K dispozici byl dostatečný počet paralelních měření shromážděný za dostatečně dlouhý časový úsek, a proto se pro výpočet nejistoty měření laboratoře použil výpočet z rozdílu paralelních stanovení. Získaná hodnota je skutečně dosažená reálná nejistota. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 13 až č. 17.

Tabulka č. 13. Nejistota: chloridy – MS až 3 × MS.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Nejistoty
PARAMETR: Nejistoty: z přesnosti - paralelní měření k dispozici
VALIDOVANÁ VLASTNOST: Cl MS - 3MS n = 3

VYHODNOCENÍ:

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	0,25598
St. nejistota	0,0125
Rel. st. nejistota (%)	4,88394
Faktor pokrytí	2
Rozšířená st. nejistota	0,025
Rel. rozšířená nejistota	9,76788

Závěr: Rozšířená st. nejistota je 0,025. Relativní rozšířená nejistota je 9,77 %.

Tabulka č. 14. Nejistota: chloridy – nad 3 × MS.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Nejistoty
PARAMETR: Nejistoty: z přesnosti - paralelní měření k dispozici
VALIDOVANÁ VLASTNOST: Cl nad 3MS

VYHODNOCENÍ:

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	30,17912
St. nejistota	2,11733
Rel. st. nejistota (%)	7,01589
Faktor pokrytí	2
Rozšířená st. nejistota	4,23467
Rel. rozšířená nejistota	14,03179

Závěr: Rozšířená st. nejistota je 4,23467. Relativní rozšířená nejistota je 14,03 %.

Tabulka č. 15. Nejistota: dusičnany – MS až 3 × MS.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Nejistoty
PARAMETR: Nejistoty: z přesnosti - paralelní měření k dispozici
VALIDOVANÁ VLASTNOST: NO3 MS - 3MS

VYHODNOCENÍ:

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	0,61904
St. nejistota	0,03547
Rel. st. nejistota (%)	5,72951
Faktor pokrytí	2
Rozšířená st. nejistota	0,07094
Rel. rozšířená nejistota	11,45901

Závěr: Rozšířená st. nejistota je 0,07094. Relativní rozšířená nejistota je 11,46 %.

Tabulka č. 16. Nejistota: dusičnany – nad 3 × MS.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Nejistoty
PARAMETR: Nejistoty: z přesnosti - paralelní měření k dispozici
VALIDOVANÁ VLASTNOST: NO3 nad 3MS

VYHODNOCENÍ:

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	70,06318
St. nejistota	4,31952
Rel. st. nejistota (%)	6,16518
Faktor pokrytí	2
Rozšířená st. nejistota	8,63904
Rel. rozšířená nejistota	12,33036

Závěr: Rozšířená st. nejistota je 8,63904. Relativní rozšířená nejistota je 12,33 %.

Tabulka č. 17. Nejistota: sírany – nad 3 × MS.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf
VALIDACE: Nejistoty
PARAMETR: Nejistoty: z přesnosti - paralelní měření k dispozici
VALIDOVANÁ VLASTNOST: SO4

VYHODNOCENÍ:

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	64,21192
St. nejistota	3,2604
Rel. st. nejistota (%)	5,07756
Faktor pokrytí	2
Rozšířená st. nejistota	6,52079
Rel. rozšířená nejistota	10,15511

Závěr: Rozšířená st. nejistota je 6,52079. Relativní rozšířená nejistota je 10,16 %.

Nejistota pro sírany v koncentračním rozsahu MS až 3 × MS se nepočítala, protože tak nízké koncentrace se u reálných vzorků nevyskytují a nebyla k dispozici potřebná data.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly stanoveny ze signálu slepého pokusu.

Tabulka č. 18. Meze stanovitelnosti.

	Mez stanovitelnosti (mg/l)
Chloridy	0,1
Dusičnany	0,3
Sírany	0,4

Retenční charakteristiky

Retenční čas – píky jednotlivých aniontů se identifikují porovnáním retenčních časů s píky kalibračních roztoků. Podle ČSN ISO 103404–1 odchyka retenčních časů v jedné sérii vzorků nesmí překročit +/– 10 %.

Rozlišení – norma udává, že v chromatogramech vzorků a roztoků standardů nesmí rozlišení píků R mezi sledovaným iontem a jemu nejbližším iontem klesnout pod hodnotu 1,3.

3 Závěr

V laboratoři byla úspěšně zavedena metoda stanovení chloridů, dusičnanů a síranů ve vodách a vodných výluzích půd metodou iontové chromatografie. V období let 2007 až 2010 bylo každoročně analyzováno 140 až 200 vzorků vod.

4 Literatura

1. ČSN EN ISO 10304–1 Jakost vod – Stanovení rozpuštěných anionů metodou kapalinové chromatografie iontů – Část 1: Stanovení bromidů, chloridů, fluoridů, dusičnanů, dusitanů, fosforečnanů a síranů.
2. Product manual Ionpac AG9-HC a Ionpac AS9-HC, dokument No 031267, Dionex Corporation, 2003.
3. ČSN ISO 11048 Kvalita půdy – Stanovení síranů rozpustných ve vodě a síranů rozpustných v kyselině.

Stanovení kyseliny benzoové v krmivech metodou HPLC s UV detekcí

Marta Mádlová a kol.

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Praha, Za opravnou 4, 150 00 Praha 5 – Motol
marta.madlova@ukzuz.cz

1 Úvod

Kyselina benzoová (lat. *acidum benzoicum*) je nejjednodušší aromatická jednosytná karboxylová kyselina. Za normálních podmínek to je bezbarvá krystalická látka, mírně rozpustná ve vodě (3,4 g/l při 25 °C) a velmi rozpustná ve většině organických rozpouštědel. Jedná se o slabou kyselinu, běžně používanou jako konzervační prostředek nebo jako léčivo proti kožním infekcím.

2 Zdůvodnění a cíl práce

Práce je zaměřena na stanovení kyseliny benzoové v krmivech. Kyselina benzoová se v krmivářství používá jako doplňková látka v kategorii 1j (technologické doplňkové látky, funkční skupina regulátory kyselosti), 4c (zootechnické doplňkové látky, funkční skupina látek, které příznivě působí na životní prostředí) a 4d (zootechnické doplňkové látky, funkční skupina jiné zootechnické doplňkové látky). Cílovými zvířaty pro tuto doplňkovou látku jsou selata po odstavu a prasata ve výkrmu.

Kyselina benzoová je řádně registrovaná doplňková látka, která se přidává do krmiv v koncentraci (0,5 – 1) %. Pro kontrolu dodržování povolených koncentrací je třeba vyhledat a zavést spolehlivou analytickou metodu a validovat ji pro dané druhy krmiv.
Při vyhledávání vhodné analytické metody stanovení kyseliny benzoové laboratoř vycházela ze zprávy EU RL a vědeckých posudků EFSA.

Při posuzování žádosti o registraci kyseliny benzoové (Vevo Vitall) uvádí EU RL ve své zprávě jako vhodnou pro úřední kontrolu stanovení kyseliny benzoové metodu HPLC, která

vychází z postupu uvedeného v normě pro mléko a mléčné produkty ISO 9231:2008 (ISO 9231|IDF 139:2008 specifies a method for the determination of the benzoic and sorbic acid contents in milk and milk products) a žadatel o registraci odzkoušel její použitelnost i pro matrice premix a krmná směs.

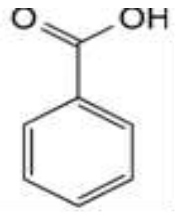
3 Účel, princip a rozsah metody

Metoda se používá ke stanovení obsahu kyseliny benzoové v krmných směsích.

Jedná se o metodu kapalinové chromatografie s gradientovou elucí na reverzní fázi s UV detekcí při vlnové délce $\lambda = 278$ nm.

Kyselina benzoová se ze vzorků získává extrakcí roztokem 50 mM hydroxidu sodného. Obsah kyseliny benzoové se vyhodnotí metodou externí matriční kalibrace.

Tabulka č. 1 a obrázek č. 1. Kyselina benzoová



Sumární vzorec	$C_7H_6O_2$
CAS Number	[65-85-0]; (E 210)
M_r	122,12 g/mol
pK_a	4,19 (25 ºC)
Teplota tání	122 ºC
Orální LD_{50}	500 mg/kg
Kožní LD_{50}	10000 mg/kg

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie

Všechny uvedené chemikálie jsou čistoty p.a. nebo vyšší.

1. Kyselina chloristá, < 70%.
2. Acetonitril, Eluent B.
3. Kyselina fosforečná, 85%.
4. Hydroxid sodný.
5. Destilovaná voda.
6. Kyselina benzoová, standardní látka, 99,9%, $C_7H_6O_2$, M_r = 122,12 g/mol.
7. Kyselina fosforečná, roztok, c = 1 mol/l.

   Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří asi 500 ml vody (5), přidá se 68 ml kyseliny fosforečné (3) a doplní vodou (5) po značku.
8. Kyselina fosforečná, roztok, c = 10 mmol/l, Eluent A.

   Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 10 ml kyseliny fosforečné (7) a doplní se vodou (5) po značku.
9. Kyselina chloristá, roztok, c = 0,3 mol/l.

   Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří asi 500 ml vody (5), přidá se 26 ml kyseliny chloristé (1) a doplní se vodou (5) po značku.
10. Hydroxid sodný, roztok, c = 1 mol/l.

    Příprava: 40 g hydroxidu sodného (4) se rozpustí ve vodě (5) do 1000 ml.
11. Hydroxid sodný, roztok, c = 50 mmol/l.

    Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 50 ml hydroxidu sodného (10) a doplní se vodou (5) po značku.
12. Základní standardní roztok kyseliny benzoové, c = 1 g/l.

    Příprava: Naváží se 100 mg kyseliny benzoové (6), kvantitativně se převede do 100ml odměrné baňky pomocí roztoku hydroxidu sodného (11) a doplní se (5) po značku.

4.2 Přístroje a pomůcky

1. Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí DIONEX UltiMate 3000.
2. Vodní lázeň.
3. Membránové filtry 0,45 µm.
4. Analytické váhy s přesností 0,1 mg.
5. Ultrazvuková lázeň.

5 Pracovní postup

5.1 Úprava vzorku

Vzorek se upravuje homogenizací a mletím na částice o velikosti (0,5 – 1,0) mm tak, aby nedošlo k přehřátí vzorku během homogenizace.

5.2 Kalibrace

Do 250ml baněk se naváží přesně asi 1 g negativní matrice. K navážkám se přidá 0 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml a 40 ml základního standardního roztoku (12), což odpovídá koncentracím 0 mg/l, 100 mg/l, 200 mg/l, 300 mg/l a 400 mg/l kyseliny benzoové. Dále se postupuje jako při přípravě vzorků extrakcí.

Kalibrační křivka se sestrojí z hodnot ploch píků odpovídajících jednotlivým kalibračním bodům.

5.3 Příprava vzorku a extrakce

Do 250ml baněk se naváží přesně asi 1 g zkoušeného vzorku. Ke kalibračním i zkoušeným vzorkům se přidá 40 ml hydroxidu sodného (11). Směs se promíchá a zahřívá se 1 h pod zpětným chladičem na 95 ºC. Poté se vzorky ochladí a kvantitativně převedou do 100ml odměrných baňek a doplní po značku kyselinou chloristou (9). Roztok se protřepe a ponechá v klidu, dokud se vzniklá sraženina neusadí. Několik mililitrů z horní části roztoku se odebere k filtraci a asi 1 ml se přefiltruje přes membránový filtr 0,45 µm (PTFE, 25 mm). Filtrát se použije k nástřiku do HPLC systému.

5.4 Chromatografické podmínky HPLC stanovení

Kalibrační roztoky a zkušební vzorky se měří za separačních podmínek chromatografického systému, viz. tabulka č.2.

Tabulka č. 2. Chromatografické podmínky stanovení kyseliny benzoové.

Kolona	Eclipse XDB Phenyl, (4,6 × 150) mm, 5 µm
Mobilní fáze	Eluent A – 10mM kyselina fosforečná (8)
	Eluent B – acetonitril (2)
Průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
Teplota kolony	40 ºC
Teplota autosampleru	Laboratorní
UV detektor	278 nm
Objem nástřiku	10 µl
RT kyseliny benzoové	4,71 min
Doba analýzy	15 min pro uvedenou kolonu

Tabulka č. 3. Gradientové podmínky pumpy.

Čas	**Eluent A**	**Eluent B**
(min)	(%)	(%)
0	90	10
11	25	75
12	90	10
15	90	10

5.5 Výpočet

Obsah kyseliny benzoové X (mg/kg) se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m_a} \qquad (1)$$

c koncentrace kyseliny benzoové odečtená z kalibrační křivky (mg/l),

V objem extraktu (ml),

m_a hmotnost zkušebního vzorku (g),

R ředění.

6 Diskuse a výsledky

Po zjištění obsahu kyseliny benzoové ve zkoušeném vzorku byla zvýšena navážka na 5 g. Zjištěné hodnoty výtěžnosti z reálného vzorku v porovnání s výsledky ze slepých vzorků vedou k předpokladu, že objem extrakčního činidla mohl být nedostačující.

Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí software Effivalidation 3,0.

6.1 Kriteria separace

Dobrá chromatografická separace má splňovat následující kriteria:

Kapacitní faktor, který charakterizuje retenci analytu vzhledem k mrtvému objemu kolony, má být podle FDA větší než 2.

Faktor asymetrie, který charakterizuje chvostování píků, má být z důvodu správné integrace píku menší než 2.

Počet teoretických pater, který charakterizuje separační schopnosti použité chromatografické kolony, má být větší než 2000.

Při dodržení uvedených chromatografických podmínek splňuje separace všechna tato kritéria. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4. Chromatografické podmínky.

Kriterium	Teorie	Experiment
Kapacitní faktor	> 2	3,037
Faktor symetrie	< 2,0	1,01
Počet teoretických pater	> 2000	41985

6.2 Opakovatelnost – přesnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty, které způsobují náhodné chyby. Opakovatelnost byla stanovena z 9 navážek jednoho vzorku krmiva. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5. Stanovení opakovatelnosti.

Navážka	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
mg/kg	3100,8	3071,05	3084,25	3076,83	3042,11	3059,12	3082,35	3050,78	3068,63

Pro všechny výsledky byla potvrzena hypotéza o normalitě dat a použití Grubbsova, Dixonova a Grubbsova párového testu nepotvrdilo přítomnost odlehlých bodů.

Tabulka č. 6. Statistické parametry.

Obsah	Průměr měření (mg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
Kyselina benzoová	3070,7	0,59

6.3 Správnost

Správnost byla zjištěna testem výtěžnosti přidáním známého množství stanovované látky ke slepému vzorku bez obsahu stanovovaného analytu (postup A). Dále byla ověřena výtěžnost metody u vzorku se známým obsahem (postup B). Výtěžnost byla vypočtena podle vztahu

$$\mathrm{Re}\,c(\%) = \frac{c_{\exp}}{c_{teor}} \times 100 \qquad (2)$$

c_{exp} výsledná hodnota obsahu analytu získaná experimentem,

c_{teor} teoretická hodnota obsahu analytu přidaného do testovacího vzorku.

6.3.1 Postup A

Správnost byla stanovena testem výtěžnosti přidáním standardních přídavků ke slepému vzorku. Výtěžnost pro kyselinu benzoovou byla určena jako průměrná výtěžnost ze všech přídavků ke slepému vzorku a je uvedena v tab. 7.

Tabulka č. 7. Správnost - přídavek ke slepému vzorku.

Popis	Předloženo (mg/l)	Nalezeno (mg/l)	Nalezeno (mg/l)	Nalezeno (mg/l)	Nalezeno (mg/l)
Hladina 1	100	99,981	105,547	100,125	105,900
Hladina 2	200	200,269	211,851	199,452	211,759
Hladina 3	300	299,848	316,452	301,568	317,287
Hladina 4	400	400,359	427,554	424,467	426,886

Tabulka č.8. Statistické parametry.

Popis	Předloženo (mg/l)	Nalezeno (mg/l)	Výtěžnost (%)	Přesnost	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
Hladina 1	100	102,89	102,89	3,2776	4	1,76244	3,182	Přijata
Hladina 2	200	205,83	102,92	6,9043	4	1,68959	3,182	Přijata
Hladina 3	300	308,79	102,93	9,3634	4	1,87715	3,182	Přijata
Hladina 4	400	419,82	104,95	13,0393	4	3,03951	3,182	Přijata

6.3.2 Postup B

K přesně známé navážce vzorku se zjištěným obsahem určované látky byl přidán základní standardní roztok kyseliny benzoové (12) v množství, které odpovídá 56 %, 83 % a 113 % obsahu analytu v původním vzorku (10 ml, 15 ml a 20 ml). Na každé úrovni bylo provedeno 6 měření. Mírou správnosti je odchylka průměru nalezeného množství od teoretického množství přídavku vyjádřená v procentech (výtěžnost). Výtěžnost pro kyselinu benzoovou byla určena jako průměrná výtěžnost ze všech tří úrovní, viz. tab. č. 10.

Tabulka č. 9. Správnost – přídavek ke vzorku se zjištěným obsahem určované látky.

Popis	Předloženo (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)
Hladina 1	2057,94	1762,21	1734,33	1724,51	1716,24	1761,84	1768,81
Hladina 2	3188,82	2663,34	2628,98	2555,96	2520,36	2534,99	2570,84
Hladina 3	4115,88	3468,31	3474,01	3437,23	3446,25	3438,45	3400,08

Tabulka č. 10. Statistické parametry.

Popis	Předloženo (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
Hladina 1	2057,94	1744,66	84,78	22,391	6	34,272	2,571	Zamítnuta
Hladina 2	3188,82	2579,08	80,88	55,829	6	26,753	2,571	Zamítnuta
Hladina 3	4115,88	3444,06	83,68	26,466	6	62,179	2,571	Zamítnuta

6.4 Linearita a pracovní rozsah metody

Linearita byla určena z hodnot naměřených v kalibrační přímce uvedených v tabulce č. 11. Linearita kalibrační křivky byla ověřena v rozsahu koncentrací (100 – 400) mg/l ve 4 kalibračních hladinách (100; 200; 300; 400) mg/l a každý kalibrační bod byl připraven čtyřikrát. Požadavek na linearitu křivky je dán korelačním koeficientem s hodnotou od 0,99 do 1,0 a vyhodnocením kalibrační křivky pomocí QC testu. Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Tabulka č. 11. Linearita stanovení kyseliny benzoové.

Popis	Koncentrace (mg/l)	Plocha-1	Plocha-2	Plocha-3	Plocha-4	Průměr ploch
Hladina1	100	3,0785	3,2828	3,1020	3,2845	3,187
Hladina2	200	6,1664	6,5891	6,1794	6,5678	6,376
Hladina3	300	9,2325	9,8425	9,3431	9,8407	9,565
Hladina4	400	12,3273	13,2981	13,1507	13,2400	13,004

Tabulka č. 12. Statistické parametry.

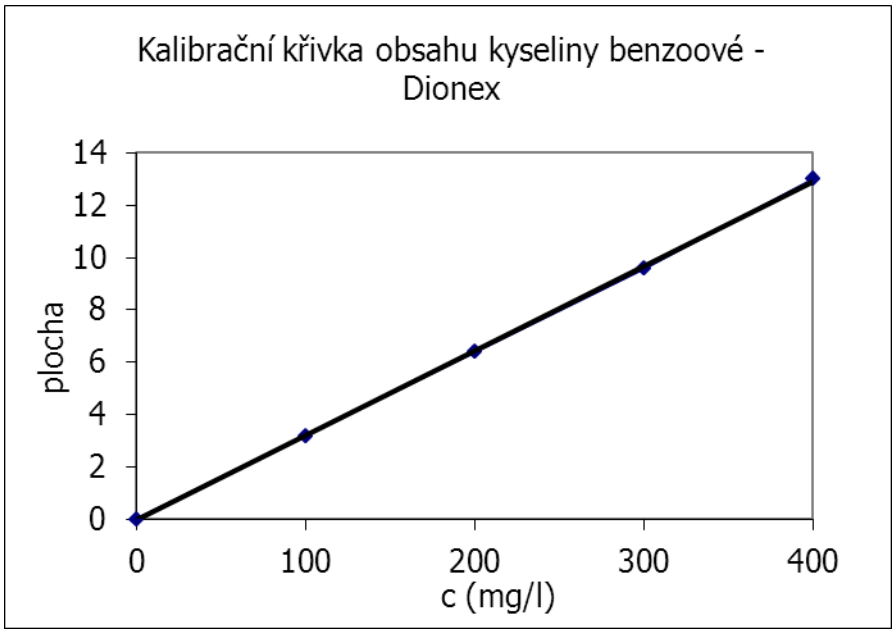
Vypočtený korelační koeficient	Testovaný korelační koeficient	Vypočtený QC	Testovaný QC	Hypotéza
0,99982	0,9900	0,99	5,00	Přijata

Na základě hodnot korelačního a QC koeficientu byla prokázána linearita metody.

6.5 Citlivost

Citlivost metody se definuje jako rozdíl v koncentraci analytu, který odpovídá nejmenšímu rozdílu, jenž může být detekován při odezvě instrumentace metody. Matematicky se jedná o směrnici kalibrační přímky. Tabulka č. 11 uvádí naměřené hodnoty kalibrační přímky. Kalibrační přímka je zobrazena na obr. č. 2.

Citlivost analytické metody je dána směrnicí kalibrační křivky a odpovídá 0,03264 pro kyselinu benzoovou.



Obr. č. 2. Kalibrační křivka.

6.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce je úroveň, nad kterou lze odezvu vzorku odlišit od odezvy slepého pokusu. Mez stanovitelnosti je úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení. Tyto hodnoty byly vypočteny z hodnot uvedených v tabulce č. 11.

Tabulka č. 13. Mez detekce a mez stanovitelnosti.

Parametr	**Hodnota (mg/kg)**	**Hodnota (%)**
Mez detekce	1663,7	0,17
Mez stanovitelnosti	2614,3	0,26

7 Souhrn statistických údajů metody

Tabulka č. 14. Souhrn statistických údajů metody.

Validační parametr	**Validační hodnota**
Opakovatelnost	0,59 % rel.
Správnost	Správnost metody prokázána
Linearita	Linearita metody prokázána
Pracovní rozsah	(100 – 400) mg/l
Mez detekce	0,17 %
Mez stanovitelnosti	0,26 %
Citlivost	0,03264

8 Závěr

V rámci práce byl sestaven pracovní postup a stanoveny tyto validační parametry:

Opakovatelnost,

Správnost,

Linearita,

Citlivost,

Mez stanovitelnosti.

Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost ověřované metody k používání v rámci laboratorního zkoušení.

Vzhledem k malému množství vzorku s obsahem kyseliny benzoové nebyla potvrzena závislost nižší výtěžnosti analytu na vyšších navážkách. Pro potvrzení vyslovené teorie by bylo třeba další ověření extrakčního postupu (zejména poměr vzorek – objem extrakčního činidla). Potvrzující data budou v laboratoři doměřena.

V průběhu práce byly také získány další informace o nových možnostech pro stanovení kyseliny benzoové (nové typy kolon a další způsoby extrakce analytu). Proto se bude v této práci ještě pokračovat.

9 Literatura

1. EURL Evaluation Report on the Analytical Methods submitted in connection with the Application for the Authorisation of Feed Additives according to Regulation (EC) No 1831/2003 Dossier FAD-2010-0029, Gerhard Buttinger, 1.7.2011.
2. The EFSA Journal (2007) 457, 1–14: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety and efficacy of VevoVitall® (benzoic acid) as feed additive for pigs for fattening; (Question No EFSA-Q-2006-056).
3. The EFSA Journal (2005) 290, 1–13: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety and efficacy of the product VevoVitall® as a feed additive for weaned piglets in accordance with Regulation (EC) No 1831/2003; (Question No EFSA-Q-2005-007).
4. ISO 9231:2008 Milk and milk products – Determination of the benzoic and sorbic acid contents (2008).
5. CRL Evaluation Report on the Analytical Methods submitted in connection with the Application for the Authorisation as a Feed Additive according to Regulation (EC) No 1831/2003 for Dossier EFSA-Q-2006-056, Giuseppe Simone, 2006.
6. European Commission (2002): Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the use of benzoic acid in feedingstuffs for pigs for fattering, Adopted on 15 November 2002.
7. Austrian Agency for Health and Food Safety GmbH: Determination of Benzoic and Sorbic Acid in Feedingstuffs using HPLC (FMT_VIE_FANA_041), 2008.
8. Centner V. Uživatelská příručka EffiValidation 3.0, EffiChem, 1999-2005.
9. Saad, B.; Bari, Md. F.; Saleh, M. I.; Ahmad, K.; Talib, Mohd. K. Mohd., Journal of Chromatography A, 1073, 2005, 393–397.

Zavedení techniky UHPLC

Marie Mrkvicová

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

1 Souhrn

Náhradou za dosluhující HPLC–1100 fy Agilent Technologies byl na pracoviště zakoupen nový přístroj UHPLC–1290 od téhož výrobce. Stávající metody se postupně převádějí na nový přístroj. V této práci jsou shrnuty zkušenosti z přenosu metody „Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC“. Pro nedostatek reálných vzorků z úřední kontroly byly k práci použity několikanásobné analýzy jednoho vzorku krmné směsi a jednoho vzorku premixu (vzorky z MPZ–2011, ÚKZÚZ Brno).

2 Úvod

UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) je relativně novou separační technikou v oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Separační proces využívá sorbentů připravených patentovanou technologií „bridged hybrid particle“, které vynikají svojí mechanickou pevností a mimořádnou separační účinností. Proto může separační proces probíhat za velmi vysokých tlaků (až 1200 bar). UHPLC přináší řadu výhod proti klasické HPLC technice: zvýšení separační účinnosti, snížení meze detekce, zvýšení citlivosti, zkrácení času analýzy a celkové snížení nákladů z důvodu menší spotřeby rozpouštědel. Jsou známy také negativní efekty: zvýšené nároky na čistotu rozpouštědel používaných jako mobilní fáze, vyšší cena kolon, snížená životnost kolon. Vysoký zpětný tlak má vliv na životnost celého UHPLC systému. UHPLC technika je vhodná zejména pro rutinní analýzy v laboratořích zpracovávajících velká množství vzorků v krátkém čase, proto našla uplatnění v řadě aplikací zejména ve farmaceutickém průmyslu. V neposlední řadě se UHPLC využívá ve spojení s moderními citlivými hmotnostními spektrometry pro analýzu širokého spektra

kontaminantů, které se vyskytují v potravinách, krmivech a v životním prostředí ve stopových koncentracích (např. rezidua pesticidů, léčiv, rostlinných toxinů a mykotoxinů).

3 Experimentální část

3.1 Teorie převodu metody

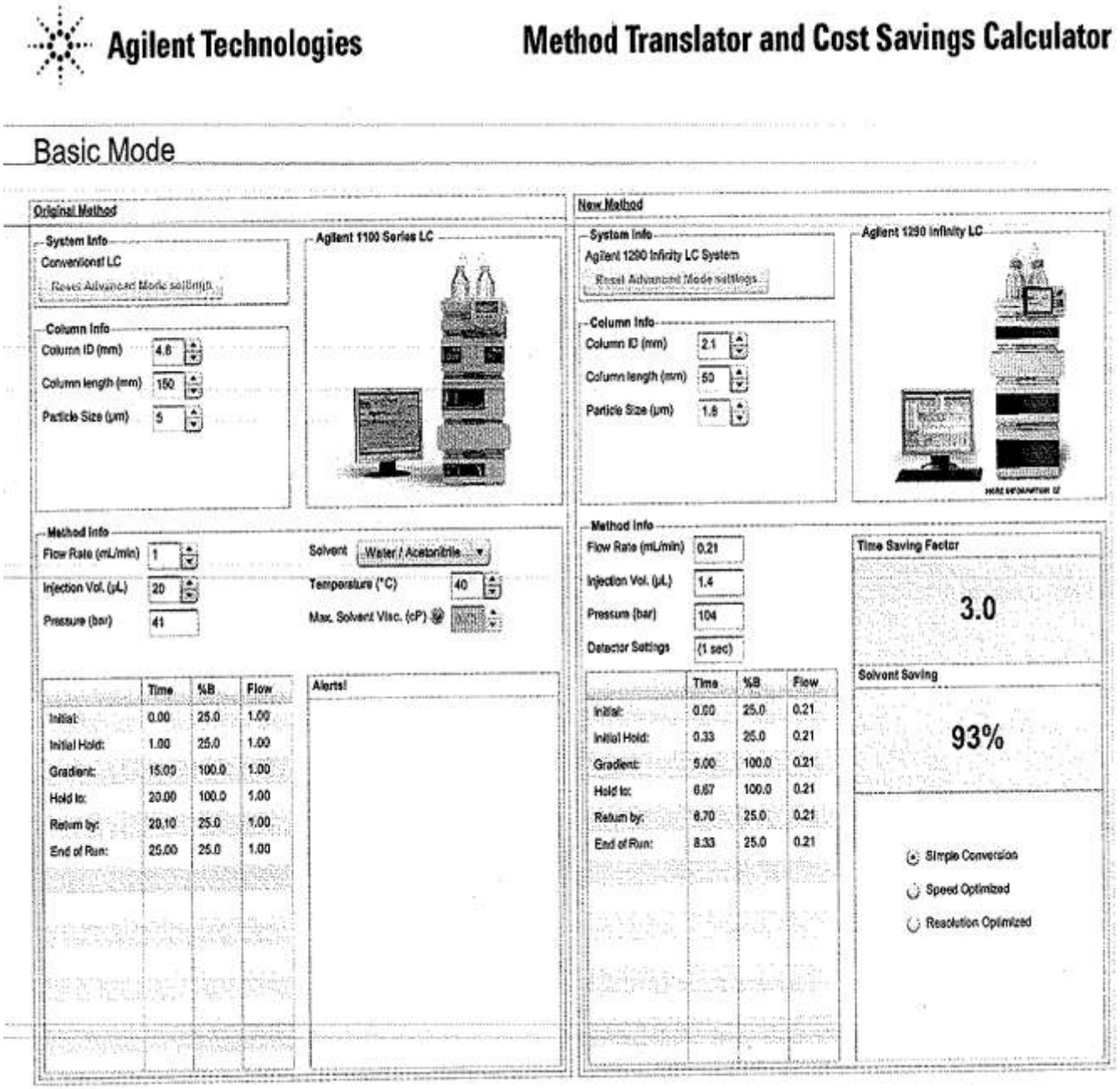
Pro převod metody byla vybrána akreditovaná metoda „Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC“. V případě zachování stejné stacionární fáze a složení mobilní fáze je převod metody HPLC na metodu UHPLC jednoduchý, vycházející z několika základních chromatografických rovnic. Při převodu metody je třeba změnit pouze objemový průtok mobilní fáze, velikost nástřiku a dobu analýzy (v případě gradientové eluce nutná korekce na mrtvý objem, aby nedošlo ke „zpoždění“ gradientu na počátku kolony). Pro transfer metod lze s výhodou využít tzv. kalkulátory převodu metod, které jsou volně přístupné na internetu – viz tabulka č. 1.

Tabulka č. 1. Table 4: Method translation programs and services for HPLC.

Table 4: Method translation programs and services for HPLC.

Name of Program	Source	Location
Acquity UPLC Calculator	Waters	www.waters.com
Agilent Method Translator and Intelligent System Emulation Technology	Agilent Technologies	www.chem.agilent.com/
DryLab 2010	Molnar Institute; Shimadzu	www.molnar-institute.com www.shimadzu.com
HPLC Calculator	University of Geneva, Switzerland	www.unige.ch/sciences/pharm/fanal/lcap/divers/downloads.php
HPLC Method Development Calculator	Thermo	www.thermo.com/columns
HPLC Performance Optimization Calculators	Gustavus Adolphus College	http://homepages.gac.edu/~dstoll/calculators/optimize.html
Method Transfer Services	Crawford Scientific	www.crawfordscientific.com/
U-HPLC Calculator	PerkinElmer	www.perkinelmer.com
Rapid Separation LC (RSLC) Method Transfer Calculator	Dionex	www.dionex.com

Laboratoř využívá Agilent Method Translator.



Všechny kalkulátory vycházejí ze stejných rovnic, takže poskytují srovnatelné výsledky.

3.2 Použité kolony, instrumentace

Pro přístroj Agilent 1290 Infinity výrobce doporučuje používat kolony Zorbax RRHD (1,8 µm, 1200 bar), které jsou plněny stejnými sorbenty jako ostatní kolony Zorbax v zrnění 1,8 µm, 3,5 µm nebo 5,0 µm. Tak lze metody bez problémů převádět v obou směrech. Kolony Zorbax RRHD se dodávají s těmito stacionárními fázemi

- StableBond – fáze odolná vůči nízkému pH a vysokým teplotám,
- Eclipse Plus – fáze pro dobrý tvar píků u bazických sloučenin při středním pH,
- Eclipse XDB-C18 – fáze pro střední oblast pH,
- Extend-C18 – fáze vhodná pro extrémně baziské mobilní fáze, až do pH 11,5,
- StableBond Aq – vhodná pro 100% vodné mobilní fáze,
- HILIC Plus – pro "hilic – chromatografii".

Kolony se výrábějí v délkách (50; 100; 150) mm o průměru (2,1; 3,0) mm.

Druhý typ kolon, které doporučuje výrobce, jsou kolony Agilent Poroshell 120. Jsou to kolony s částicemi o velikosti 2,7 µm. Tyto částice nejsou pórovité v celém objemu, ale mají pórovitý pouze povrch. Díky tomu molekuly analytu difundují pouze do malé hloubky a kolony poskytují o (40 – 50) % nižší zpětný tlak v porovnání s RRHD kolonami. Současně však mají srovnatelnou účinnost a vysoké rozlišení a lze je použít i pro systémy do 400 bar a 600 bar. Kolony Poroshell 120 se dodávají v délkách (30; 50; 75; 100; 150) mm o průměru (2,1; 3,0; 4,6) mm s fázemi SB-C18, EC-C18 a EC-C8. Pro měření vzorků na UHPLC byly použity tyto čtyři kolony

- Zorbax Eclipse Plus-C18, RRHD, (2,1 × 50) mm, 1,8µm, (dodána s přístrojem),
- Zorbax Eclipse Plus-C18, RRHD, (3,0 × 100) mm, 1,8µm,
- Zorbax SB-C18, RRHD, (3,0 × 100) mm, 1,8µm,
- Poroshell 120 EC-C18, (3,0 × 100) mm, 2,7µm.

Pro měření vzorků na HPLC byla použita kolona Purospher Star, RP-C18, (4,6 × 150) mm, 5 µm.

3.3 Postup stanovení

3.3.1 Postup stanovení nikarbazinu na HPLC – Agilent 1100

Postupovalo se přesně podle JJP – Zkoušení krmiv, postup č. 360 – Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC. Gradient k promývání kolony se nepoužil, měřily se pouze dva vzorky a kolona byla promyta až po ukončení měření.

Separační podmínky jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Separační podmínky.

Kolona	Purospher Star, RP-C18, (4,6 × 150) mm, 5µm
Mobilní fáze	Acetonitril/voda, 570/430, (v/v)
Průtok	0,8 ml/min
Teplota	40 °C
Objem nástřiku	10 µl
Retenční čas	(7 – 8) min
Detekce	UV, 351 nm
Tlak na koloně	60 bar
Kalibrace	(2,0; 4,0; 8,0; 20) mg/l

3.3.2 Postup stanovení nikarbazinu na UHPLC – Agilent 1290

Postupovalo se jako v bodě 3.3.1, ale k separaci byly použity kolony uvedené v bodě 3.2. Objem nástřiku byl snížen na 5 µl pro všechny testované kolony, měřilo se při průtoku (0,2; 0,6; 1,0) ml/min. Zbývající separační podmínky byly nezměněné.

4 Výsledky a diskuse

Výsledky měření jsou shrnuty v tabulkách č. 3 až č. 5.

Tabulka č. 3. Výsledky měření obsahu nikarbazinu na HPLC – Agilent 1100, akreditovaná metoda.

Vzorek	Nikarbazin (mg/kg)	Vzorek	Nikarbazin (mg/kg)
421-1	42,63	422-1	51669
421-2	41,65	422-2	51039
421-3	43,62	422-3	53662
421-4	43,56	422-4	51580
421-5	42,78	422-5	51480
421-6	44,57	422-6	52558
421-7	43,59	422-7	51779
421-8	43,33	422-8	51823

Tabulka č. 4. Výsledky měření obsahu nikarbazinu (mg/kg) na UHPLC – Agilent 1290.

Vzorek	Eclipse Plus, (2,1 × 50) mm			Eclipse Plus, (3,0×100) mm			SB, (3,0 × 100) mm			Poroshell 120EC, (3,0×100)		
	0,2 ml	0,6 ml	1,0 ml	0,2 ml	0,6 ml	1,0 ml	0,2 ml	0,6 ml	1,0 ml	0,2 ml	0,6 ml	1,0 ml
421-1	42,29	41,64	42,90	42,99	42,70	43,00	44,07	43,65	43,56	44,01	44,21	43,69
421-2	42,20	41,34	41,89	41,63	41,53	42,54	41,73	41,73	41,48	41,79	41,89	41,09
421-3	43,81	43,73	43,76	43,57	43,73	43,90	43,95	43,56	43,95	43,70	43,60	43,18
421-4	43,63	43,72	43,51	43,96	43,65	43,75	43,74	43,44	43,24	43,37	43,36	43,00
421-5	42,54	42,08	42,40	42,36	41,97	42,51	42,49	42,49	42,19	42,25	42,20	41,72
421-6	43,38	43,19	43,86	43,64	43,25	43,82	43,07	43,79	43,70	43,76	43,67	43,39
421-7	43,06	42,53	43,30	43,15	42,41	42,89	42,91	42,79	42,84	42,68	42,53	42,27
421-8	42,93	42,92	43,24	43,11	42,44	42,93	43,22	43,10	42,73	43,32	43,03	42,86
422-1	51996	52089	51702	52226	52264	52436	52257	52568	52363	52226	52321	52322
422-2	51024	51170	50413	51570	51269	51666	51228	51618	51587	51394	51389	51445
422-3	53283	53919	53171	53633	53410	53821	53774	53990	53853	53821	53958	54004
422-4	51395	51698	51480	51810	51704	52061	51912	52107	52047	51969	51947	52094
422-5	51558	51791	51503	51808	51702	52114	52006	52253	52076	51958	51957	52137
422-6	52463	52798	52542	52949	52778	53187	53120	53307	53246	53128	53119	53277
422-7	51747	52243	51940	52351	52162	52999	52976	52966	52843	53162	53069	52986
422-8	51960	52313	51985	52304	52207	52536	52465	52655	52345	52188	52398	52450

Tabulka č. 5. Porovnání parametrů měření na UHPLC – Agilent 1290.

Parametr	Eclipse Plus, (2,1×50) mm			Eclipse Plus, (3,0×100) mm			SB, (3,0 × 100) mm			Poroshell 120EC, (3,0×100)		
	0,2 ml	0,6 ml	1,0 ml	0,2 ml	0,6 ml	1,0 ml	0,2 ml	0,6 ml	1,0 ml	0,2 ml	0,6 ml	1,0 ml
N	10103			25613			24301			20862		
USP	1,205	1,070	1,009	1,088	1,063	1,030	1,081	1,072	1,038	1,167	1,096	1,030
P	173	438	645	89	270	445	93	276	452	56	168	277
RT	1,651	0,550	0,321	5,998	2,067	1,244	5,937	2,028	1,164	5,035	1,670	1,001
LD	0,055	0,074	0,178	0,011	0,059	0,131	0,107	0,142	0,181	0,070	0,058	0,081
LQ	0,183	0,247	0,594	0,038	0,197	0,437	0,360	0,475	0,604	0,235	0,193	0,268
Opakovat.	1,37	1,87	1,57	1,54	1,59	1,33	1,68	1,52	1,68	1,69	1,71	1,82
Nejistota	3,79	4,39	4,42	3,66	3,64	3,76	4,32	3,97	3,94	4,34	4,41	4,30

N – počet teoretických pater,

USP Tailing factor – charakterizuje souměrnost píků,

P – tlak (bar),

RT – retenční čas (min),

LD – mez detekce (mg/kg),

LQ – mez stanovení (mg/kg),

Opakovatelnost – relativní (%),

Nejistota – relativní (%).

Výsledky měření obs hu nikarbazinu na obou přístrojích jsou statisticky srovnatelné a také všechny 4 kolony jsou pro danou metodu použitelné. Za povšimnutí stojí především kolona Poroshell, která je použitelná nejen pro UHPLC, ale i pro HPLC (určena pro tlaky do 600 bar). Doba analýzy je srovnatelná s RRHD kolonami, ale tlak na koloně o stejných rozměrech je přibližně poloviční. Použitím UHPLC přístroje došlo v souladu s teoretickými předpoklady ke snížení spotřeby rozpouštědel a zkrácení doby analýzy.

5 Závěr

Technika UHPLC byla úspěšně zavedena do praxe. Výsledky naměřené a vypočítané při převodu metody "Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC" budou použity jako příloha k validačnímu protokolu dané metody. Podobně se postupuje i při převodu ostatních metod.

Použití stejného sorbentu u kolon pro HPLC a UHPLC dovoluje převádění metod v obou směrech. Je potřeba pouze změnit průtok, velikost nástřiku a dobu analýzy. K výpočtu je možné použít kalkulátor převodu metod. Při vývoji nových metod se doporučuje použít krátké kolony pro rychlou optimalizaci teploty, průtoku, velikosti nástřiku a dalších parametrů. Pro takto optimalizovanou metodu je výhodné přejít na delší kolonu pro získání vyššího rozlišení.

6 Literatura

1. http://www.hplc.cz/UPLC/index.htm, staženo 20.5.2011.
2. Uživatelská příručka EffiValidation, verze 3.0.
3. Aplikační literatura Agilent Technologies,5990-4166EN, Several Zorbax RRHD 1,8 µm Selectivities Facilitate Method Development, 2011.
4. Chromatography Online, Ronald E. Majors., Method Translation in Liquid Chromatography, 1.6.2011.
5. Aplikační literatura Dionex, Technical Note 75, Easy Method Transfer from HPLC to RSLC with the Dionex Method Speed-Up Calculator.
6. RNDr. Milan Kalina, Nové UHPLC kolony a jejich alternativy, Chemagazin, Číslo 2, Ročník XX (2010).
7. Jednotné pracovní postupy – Zkoušení krmiv, 15.10.2009.

Vývoj kalibrační rovnice na tvrdost zrna a sušinu v celém zrnu pšenice metodou FT-NIR spektroskopie

David Čižmár, Radvana Šulová

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

1 Souhrn

Metodou FT-NIR spektroskopie byly vytvořeny a optimalizovány kalibrační modely pro stanovení obsahu sušiny, N-látek, škrobu a tvrdosti v pšenici obecné. Všechny vzorky, u nichž byl znám koncentrační obsah sledovaných parametrů získaných pomocí laboratorních referenční metod (LRM), pocházely z laboratoře odrůdového zkušebnictví. Příslušné kalibrační modely pak byly následně ověřeny pomocí Studentova t testu na porovnání dvou analytických metod. Výsledky ukázaly, že metoda FT-NIR spektroskopie je vhodná pro stanovení obsahu sušiny, N-látek, škrobu a tvrdosti v pšenici obecné.

2 Úvod

Obiloviny tvoří ekonomicky, agronomicky i spotřebitelsky nejdůležitější skupinu plodin v celé struktuře rostlinné výroby. Mají rozhodující postavení ve výživě člověka, protože patří mezi hlavní energetickou složku potravy. V některých oblastech světa jsou téměř výhradní potravinou (rýže). Kromě lidské výživy slouží celé rostliny nebo zrna ke krmení hospodářských zvířat. Výhodou většiny obilovin je jejich vysoká koncentrace užitných látek [1].

K nejvýznamnějším obilovinám patří pšenice, ječmen, žito, oves, tritikale, rýže, kukuřice, čirok, proso, mohár, čumíza a amaranthus (laskavec). Z hlediska způsobu pěstování, charakteru produktu a jeho využití se do této skupiny řadí také pohanka [1].

Z biologického hlediska obiloviny patří do čeledi rostlin lipnicovitých (*Poaceae*), botanická třída jednoděložných. Pouze přičleněná pohanka patří do čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*).

Obiloviny jsou jednoleté plodiny. Jarní formy se sejí a sklízejí v jednom vegetačním období. Ozimé obiloviny se vysévají počátkem podzimu a sklízejí se v létě následujícího roku.
V současné době u nás převažují ozimé formy obilovin. Díky delší vegetační době ve srovnání s jarními formami mají ozimé obiloviny větší časový prostor na tvorbu asimilačního aparátu a dosahují vyššího sklizňového výnosu. Ozimé formy jsou rozhodující při pěstování pšenice obecné, pšenice tvrdé, ječmene, žita (výhradně), tritikale (výhradně) [1].

Z jarních obilovin se v ČR pěstuje pšenice, ječmen, oves, kukuřice, okrajově proso [2].

V této práci se věnuje pozornost pšenici obecné.

Pšenice obecná

Rod pšenice (*Triticum L.*) náleží do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Zahrnuje několik druhů a velký počet forem a odrůd. Nejvíce produkčně využívané jsou 2 druhy: pšenice obecná (*Triticum aestivum L.*) , (obr.1) a pšenice tvrdá (*Triticum durum*) [2].

Pšenice obecná je u nás nejrozšířenější plodinou. Zaujímá téměř čtvrtinu orné půdy v ČR a polovinu ploch všech obilovin. Pěstuje se ve dvou formách – ozimé (94 %) a jarní (6 %) [2].

Obr č. 1. Pšenice obecná [3].

Za pravlast pěstování pšenice se považuje území Přední a Malé Asie. Počátky pěstování pšenice úzce souvisejí se vznikem zemědělství v 10. – 8. tisíciletí př.n.l. Archeologické nálezy z tohoto období dokazují pěstování pšenice jednozrnky (*Triticum monococcum L.*) a pšenice dvouzrnky (*Triticum dicoccum*). V 6. tisíciletí př.n.l. se již začala pěstovat pšenice obecná (*Triticum aestivum L.*) a pšenice špalda (*Triticum spelta L.*), která je známá jen z archeologických nálezů v Evropě. V současné době je pěstování pšenice nejrozšířenější v Rusku, USA, Kanadě, Indii, Francii, Španělsku a v Rumunsku, dále v zemích Jižní Ameriky, Austrálii a Jižní Africe [1].

Z chemického hlediska pšeničné zrno obsahuje průměrně 13,6 % vlhkosti, (10 – 16) % bílkovin, 63,8 % bezdusíkatých extraktivních látek, 2,20 % tuku, 2,4 % buničiny a 2 % popela [1].

Dusíkaté látky jsou souborem látek v rostlinném organismu, které kromě tří základních biogenních prvků obsahují ještě dusík, často síru a někdy fosfor. V rostlinách se nalézají vedle sebe nízkomolekulární dusíkaté látky (aminokyseliny a amidy) a vysokomolekulární látky (bílkoviny).

Kvalitu bílkovin určuje složení aminokyselin. Zvláště významné jsou tzv. esenciální aminokyseliny, které lidský organismus není schopen syntetizovat a musí je přijímat ve formě potravy. Patří k nim především valin, izoleucin, leucin, threonin, methionin, hystidin, lyzin, tryptofan a fenylalanin. Obsah a složení bílkovin sledují převážně šlechtitelé [1].

Další podstatnou část pšeničného zrna tvoří sacharidy, mezi které patří především škrob, hemicelulóza a celulóza [1].

Obsah škrobu v pšeničném zrnu kolísá od 50 % do 70 % a jeho množství závisí stejně jako množství bílkovin na odrůdě, geografické oblasti a pěstitelských podmínkách [1].

Pšeničné zrno dále obsahuje (1,4 – 1,6) % lipidů, které jsou nerozpustné ve vodě. Kromě vlastních tuků se na tvorbě lipidů podílejí i fosfatidy, jejichž hlavní složkou je lecitin, důležitý pro látkovou výměnu v lidském a zvířecím organismu.

V pšeničném zrnu se také nacházejí některé významné vitamíny – thiamin (B_1), riboflavin (B_2), pyridoxin (B_6), kyselina nikotinová (PP), tokoferol (E) a další [1].

Obsah minerálních látek se v pšeničném zrnu pohybuje převážně od 1,7 % do 2,0 %. Z biogenních prvků převažují fosfor a draslík [1].

Hlavní využití pšenice je pro výrobu chleba (chlebová plodina) představující základní zdroj lidské výživy. V potravinářském průmyslu se pšenice využívá také k výrobě krup, těstovin a cukrářských výrobků.
Pšeničné šroty a otruby představují vysoce koncentrované krmivo, vhodné pro všechny druhy hospodářských zvířat.
Pšenice rovněž nachází uplatnění při výrobě škrobu a etanolu [1].

Cílem práce bylo vytvořit a optimalizovat kalibrační modely pro stanovení sušiny, dusíkatých látek (N-látek), škrobu a tvrdosti metodu NIR spektroskopie a zároveň vyhodnotit možnosti využití této moderní analytické metody na predikci vybraných parametrů v pšenici obecné.

3 Materiál a metody

3.1 Princip stanovení sušiny, dusíkatých látek (N-látek), škrobu a tvrdosti

Vytvoření NIR kalibračního modelu pro daný parametr spočívá ve vztažení informace získané absorpcí v NIR oblasti s hodnotou stanovenou laboratorní referenční metodou (LRM) do vzájemného poměru a získání regresní závislosti.

Následující část stručně popisuje klasické laboratorní metody mokré chemie, pomocí kterých byly získány referenční hodnoty použité pro kalibraci NIR spektrometru. Výsledek referenčních hodnot v kalibraci se uvádí jako průměr ze dvou paralelních stanovení.

Stanovení obsahu vlhkosti

Stanovení obsahu vlhkosti vychází z normy ČSN ISO 712 [4]. Tato norma platí pro stanovení vlhkosti v obilovinách a výrobcích z obilovin. Obsah vlhkosti se stanoví vážkově jako úbytek po vysušení vzorku při 130 ºC.

Stanovení obsahu dusíkatých látek (N-látek)

Stanovení obsahu dusíkatých látek (hrubého proteinu) vychází z normy ČSN EN ISO 20483 [5]. Norma platí pro stanovení obsahu dusíkatých látek v obilovinách a luštěninách.

Dusíkaté látky se stanoví metodou podle Kjeldahla titračně alkalimetricky (acidimetricky) po mineralizaci vzorku horkou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru převedením

na síran amonný, vytěsněním amoniaku hydroxidem sodným a jeho předestilováním do kyseliny sírové (borité).

Obsah dusíku se vypočítá z množství uvolněného amoniaku a obsah dusíkatých látek pak vynásobením získané hodnoty dusíku odpovídajícím faktorem. Pro stanovení dusíkatých látek v pšenici byl uvedenou normou stanoven přepočítávací faktor 5,7.

Stanovení obsahu škrobu

Stanovení obsahu škrobu vychází z normy ČSN EN ISO 10520 [6], která platí pro stanovení obsahu škrobu v potravinách.

Obsah škrobu se stanoví polarimetricky po hydrolýze vzorku kyselinou chlorovodíkovou a odstranění bílkovin Caressovými činidly, polarimetricky změřením optické otáčivosti a korekcí na opticky aktivní látky rozpustné ve směsi etanol-voda.

Stanovení tvrdosti

Stanovení tvrdosti zrna vychází z americké standardní normy AACC 55-30 [7] Index velikosti částic pro pšenici (Particle size index – PSI).

Metoda spočívá ve standardním mletí zrna a prosévání na sítě 0,075 mm. Nižší podíl propadu sítem je u tvrdšího endospermu s nižší hodnotou PSI %. Zrno se mele na laboratorním mlecím automatu Buhler MLU 202.

Hodnota PSI se vypočítá dle vztahu

PSI % = (hmotnost propadu pod sítem 0,075 mm (g)/hmotnost vzorku (g)) × 100

3.2 Stanovení metodou NIR spektroskopie

Pro vytvoření přesného NIR kalibračního modelu je obecně základním požadavkem dostatečný počet analyzovaných vzorků. Rozsah analyzovaných vzorků odrůdového zkušebnictví klasickými laboratorními metodami (LRM) je mimořádný. ÚKZÚZ je v rámci ČR unikátním pracovištěm zaměřeným na tento typ laboratorního testování. Požadavek na dostatečné množství vzorků pro vytvoření robustních kalibračních modelů byl spolehlivě splněn. V případě pšenice bylo proměřeno celkem 114 vzorků pro kalibraci parametru sušiny, 174 vzorků na parametr N-látky, 206 vzorků na parametr škrob a 220 vzorků na parametr PSI. Vzorky použité na kalibraci NIR spektrometru pocházely ze všech regionálních pracovišť ÚKZÚZ a byly nashromážděny za období asi 2 let.

Všechny vzorky pšenice pro stanovení všech parametrů byly před měřením pomlety na laboratorním mlýnku Mill 3100 a následně prosety přes síto 1 mm. NIR spektra takto připravených vzorků byla nasnímána v křemenných kyvetách o průměru 3 cm v režimu reflektance. NIR měření byla prováděna v blízké infračervené spektrální oblasti přístrojem Nicolet Antaris s Fourierovou transformací. Spektrální reflektance udávaná jako průměr ze 120 spekter byla zobrazena jako logaritmus inverzní reflektance (log 1/R) v 0,5 nm intervalech v rozsahu vlnových délek (1000 – 2500) nm. Každý vzorek byl změřen dvakrát. Pro další vývoj kalibračního modelu pak bylo použito průměrné spektrum.

Pro správný vývoj NIR kalibračního modelu je důležité, aby koncentrační rozsah kalibrovaného parametru byl co možná nejvyšší. Koncentrační rozsahy pro stanovované parametry ve vzorcích pšenice uvádí tabulka č. 1.

Tabulka č. 1. Složení vzorků pšenice použitých pro kalibraci přístroje Nicolet Antaris měřených v reflektanci.

	Sušina (%)	N-látky (%/s)	Škrob (%/s)	PSI (%)
N_K (počet vzorků)	114	174	206	220
Minimum	87,57	8,41	61,92	9,20
Maximum	91,37	17,92	73,70	28,70
Průměr	88,81	13,01	67,35	16,07

Důležitým předpokladem vytvoření úspěšného kalibračního modelu je dále skutečnost, že laboratorní referenční metoda používaná pro kalibraci NIR spektrometru je dostatečně přesná. Výsledky referenčních hodnot obou parametrů získaných klasickými metodami mokré chemie jsou prezentovány jako průměr paralelních stanovení.

V prvním kroku před vlastní regresní tvorbou kalibračního modelu byla na jednotlivé soubory kalibračních spekter (vzorků) aplikována matematická korekce spekter SNV, která eliminuje vliv velikosti částic. Tento krok je velmi důležitý u vzorků, které před vlastní NIR analýzou prošly úpravou sítováním. Na takto upravených NIR spektrech pro všechny parametry byla provedena analýza hlavních komponent, která je vhodná pro detekci a určení odlehlých měření vzorků (spekter). Metodou hlavních komponent (PCA) byla identifikována odlehlá měření, ale současně bylo ověřeno, zda tímto vylučováním nebyly označeny důležité

kalibrační vzorky (extrémní body, které mohou odpovídat např. nové plodinové odrůdě nebo koncentrační abnormalitě), čímž by byla snížena robustnost vytvářeného kalibračního modelu.

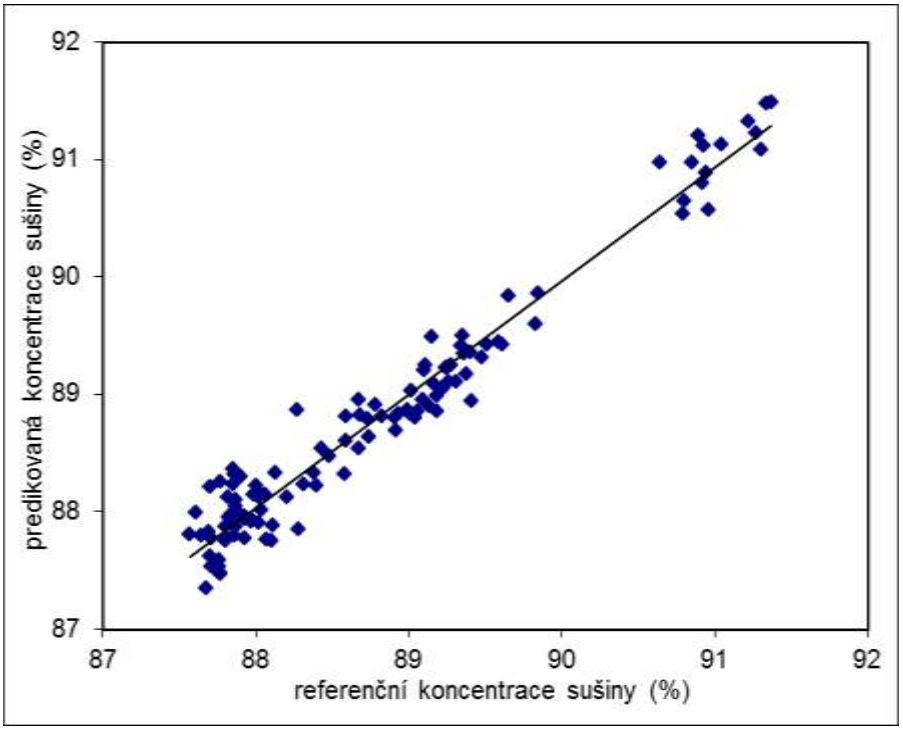
Takto upravené kalibrační soubory pro stanovení vybraných parametrů v pšenici po vyloučení odlehlých měření byly dále korigovány regresní metodou PLS. Následně byly jednotlivé kalibrační modely optimalizovány tak, aby poskytovaly co nejvyšší hodnotu korelačního koeficientu R a zároveň co nejnižší střední kvadratickou chybu predikce RMSECV při optimálním počtu latentních proměnných (hlavních komponent) v modelu.

V průběhu tvorby kalibračního modelu byly vybrány vhodné vlnové délky, tj. takové, u kterých se absorpcí záření v NIR spektru projevila zřejmá korelace s laboratorní referenční hodnotou. Výsledkem optimalizace kalibračního modelu je získaný graf referenčních *versus* NIR predikovaných koncentrací (kalibrační závislost, kalibrační křivka) a hodnota střední kvadratické chyby predikce RMSECV a korelačního koeficientu R.

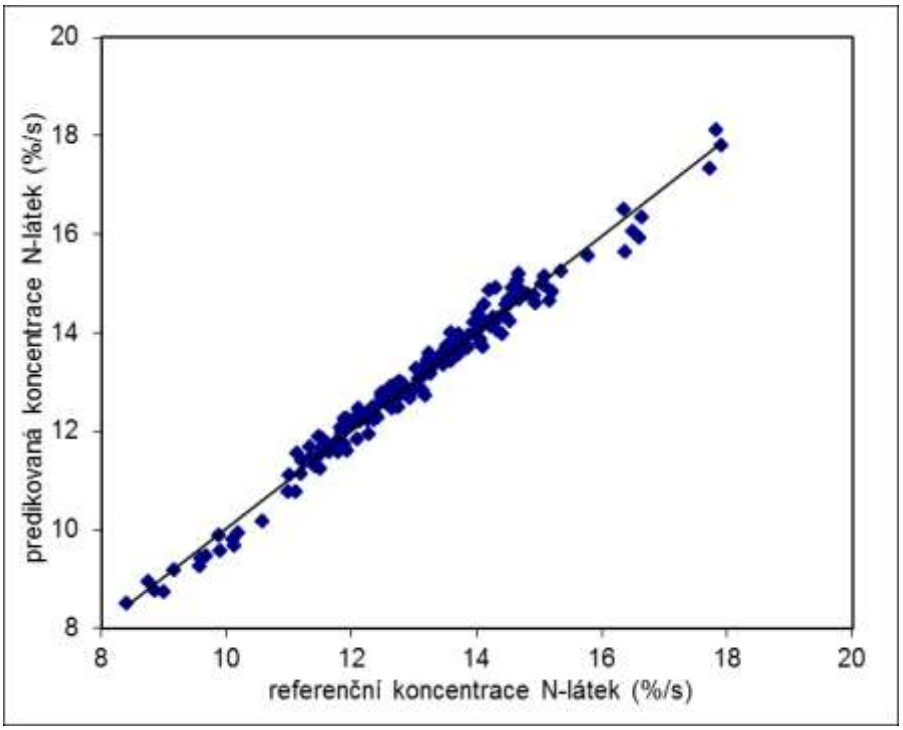
4 Výsledky a diskuse

Prvotní snahou práce bylo vytvořit kalibrační model pro parametr tvrdost (PSI) ve vzorcích pšenice bez vlastní předúpravy vzorků před samotným měřením metodou NIR spektroskopie. Důvodem byl fakt, že všechna měření laboratorní referenční metodou probíhají externě mimo pracoviště ÚKZÚZ, kde jsou vzorky upraveny mletím na laboratorním mlýnu Buhler 202, který není součástí vybavení brněnské laboratoře ÚKZÚZ. Proto pro další zjednodušení a zrychlení analýzy metodou NIR spektroskopie byla pro vývoj kalibrace na daný parametr navržena možnost vzorky před NIR měřením neupravovat mletím a analyzovat celá zrna nemletých vzorků. Kalibrační model vytvořený na celých zrnech vzorků pšenice na parametr tvrdost byl velmi nespolehlivý. Jeden z nejdůležitějších kvalitativních parametrů kalibračního modelu v NIR spektroskopii – korelační koeficient (R) – dosahoval velmi nízké hodnoty (0,64).

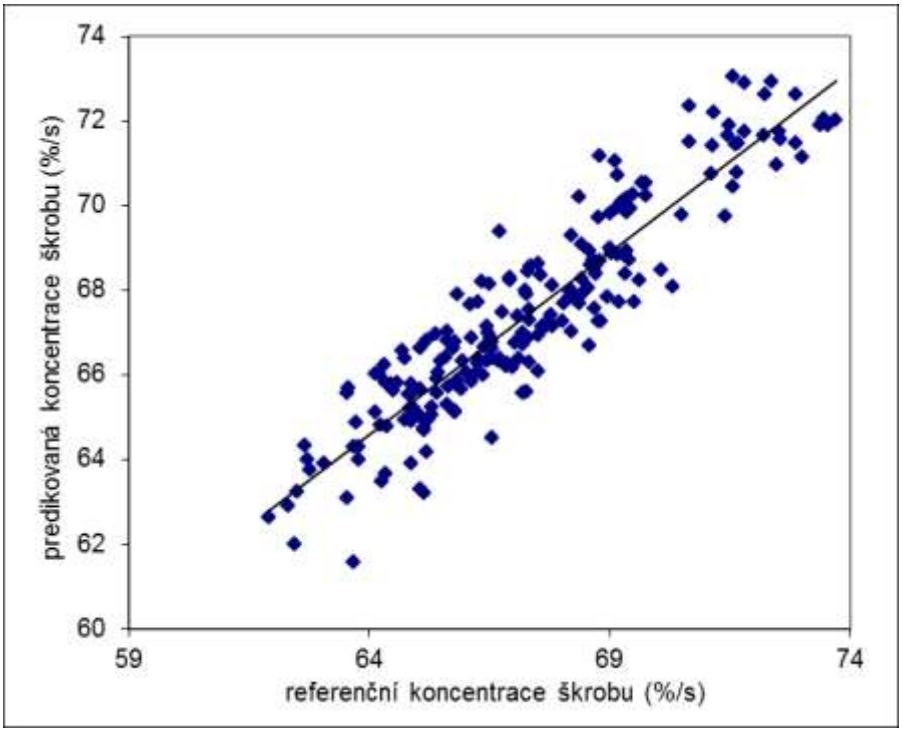
Na základě těchto negativních výsledků bylo další úsilí zaměřeno na vytvoření kalibračních modelů pro všechny stanovované parametry metodou NIR spektroskopie ve vzorcích pšenice předupravených standardním mletím na laboratorním mlýnku Mill 3100. Na takto upravených vzorcích byly vytvořeny a optimalizovány kalibrační modely pro parametry sušinu, N-látky, škrob a PSI v pšenici, kalibrační závislosti jsou zobrazeny graficky na obrázcích č. 2 až č. 5.



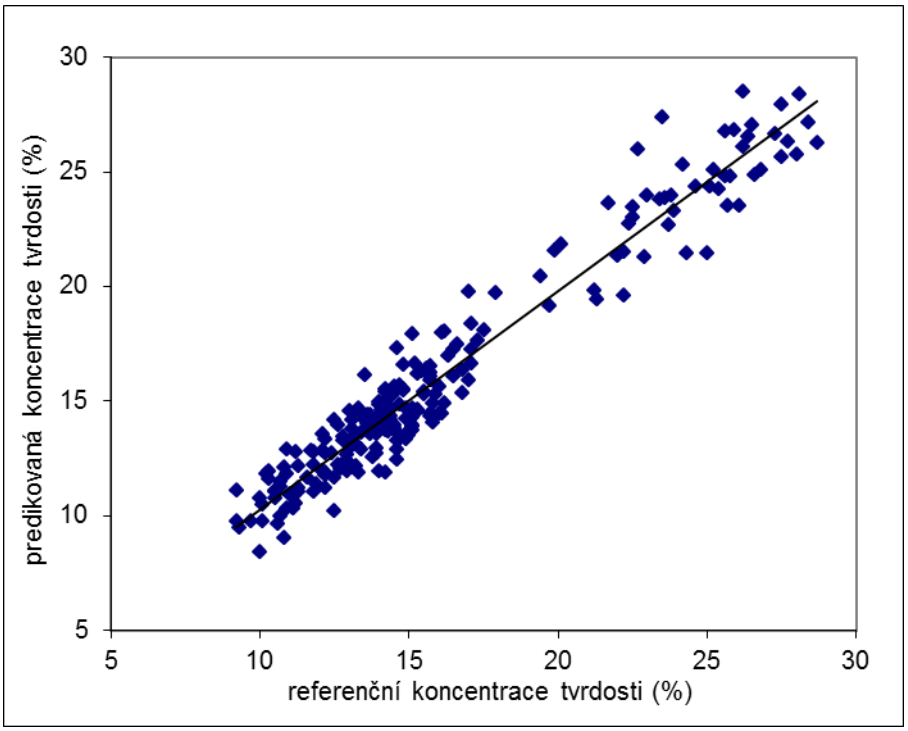
Obr. č. 2. Kalibrační závislost pro parametr sušina (%).



Obr. č. 3. Kalibrační závislost pro parametr N-látky (%/s).



Obr. č. 4. Kalibrační závislost pro parametr škrob (%/s).



Obr. č. 5. Kalibrační závislost pro parametr tvrdost (PSI) (%).

Souhrnný přehled získaných kvalitativních parametrů kalibračních modelů stanovených regresní metodou PLS pro vybrané parametry v pšenici uvádí tabulka č. 2.

Tabulka č. 2. Kvalitativní parametry kalibračních modelů vzorků pšenice.

Parametr	**RMSECV**	**R**
Sušina (%)	0,22	0,98
N-látky (%/s)	0,24	0,99
Škrob (%/s)	1,10	0,92
Tvrdost PSI (%)	1,21	0,97

Legenda:
RMSECV – střední kvadratická chyba predikce (CV – příčné validace);
R – korelační koeficient.

Z tabulky č. 2 je zřejmé, že pro všechna stanovení parametrů jako jsou obsah sušiny, N-látek, škrobu a tvrdosti byly získány vysoké hodnoty korelačního koeficientu (0,98; 0,99; 0,92; 0,97).

Predikční schopnosti těchto vytvořených kalibračních modelů pro jednotlivá stanovení ve vzorcích pšenice byly ověřovány na souboru nezávislých vzorků, které nebyly zahrnuty do vývoje kalibračních modelů. Následným porovnáním výsledků získaných LRM a metodou NIR spektroskopie na testování shodnosti výsledků se ověřovala nulová hypotéza, tzn., že rozdíl $|\bar{x}_A - \bar{x}_B|$ není statisticky významný na zvolené hladině významnosti α = 0,05. Pro testování shodnosti se použil Studentův test *t* [8]. Vypočtené hodnoty *t* testu byly porovnány s kritickou hodnotou t_α. Získané výsledky pro jednotlivé parametry prezentuje tabulka č. 3.

Tabulka č. 3. Kvalitativní parametry porovnání 2 analytických metod.

Parametr	**k**	$\bar{x}_A$ **(LRM)**	$\bar{x}_B$ **(NIR)**	**α**	**t**	$\mathbf{t_{\alpha(0,05)}}$
Sušina (%)	15	88,007	88,010	0,05	0,10	2,145
N-látky (%/s)	15	13,309	13,286	0,05	0,30	2,145
Škrob (%/s)	15	68,557	68,284	0,05	0,34	2,145
Tvrdost (%)	15	15,360	15,037	0,05	0,27	2,145

Legenda:

k – počet vzorků;

$\bar{x}_A$ (LRM) – průměrná koncentrace získaná laboratorní referenční metodou;

$\bar{x}_B$ (NIR) – průměrná koncentrace získaná metodou NIR spektroskopie;

α – zvolená hladina významnosti (0,05);

t – vypočtená hodnota Studentova testu *t*;

t_α – kritická (tabulková) hodnota Studentova testu *t*.

Z tabulky č. 3 je zřejmé, že vypočtené hodnoty *t* pro sušinu, N-látky a škrob a tvrdost jsou nižší oproti tabulkové (kritické) hodnotě t_α. Z toho vyplývá, že metoda NIR spektroskopie v porovnání s laboratorní referenční metodou poskytuje statisticky shodné výsledky pro stanovení vybraných parametrů ve vzorcích pšenice obecné.

5 Závěr

Na dostatečně obsáhlém souboru vzorků pšenice obecné byly optimalizovány kalibrační modely pro stanovení vybraných nutričních parametrů jako jsou sušina, N-látky, škrob a tvrdost metodou FT-NIR spektroskopie.

Z prezentovaných grafů kalibračních závislostí a hodnot kvalitativních parametrů (RMSECV, R) vytvořených kalibračních modelů na vzorcích upravených standardním mletím je zřejmé, že hodnoty sušiny, N-látek, škrobu a tvrdosti stanovené laboratorní referenční metodou predikované metodou NIR spektroskopie spolu vysoce korelují (R = 0,98; 0,99; 0,92; 0,97).

Zároveň byly ověřeny predikční schopnosti kalibračních modelů a tedy i porovnány 2 analytické metody. Prezentované výsledky potvrdily vhodnost metody NIR spektroskopie, kterou lze doporučit pro predikování těchto sledovaných parametrů v pšenici obecné.

6 Literatura

1. Špaldon, E. a kol.: Rostlinná výroba. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1976.
2. Pulkrábek, J., Capuchová, I.: Speciální fytotechnika, ČZU, Praha.
3. www.vurv.cz
4. ČSN ISO 712, Obiloviny a výrobky z obilovin – Stanovení vlhkosti – Referenční metoda, 4/2010.
5. ČSN EN ISO 20483, Obiloviny a luštěniny – Stanovení obsahu dusíku a výpočet obsahu dusíkatých látek – Kjeldahlova metoda, 4/2007.
6. ČSN EN ISO 10520, Přírodní škrob – Stanovení obsahu škrobu – Ewersova polarimetrická metoda, 6/1999.
7. Faměra, O., Rijáková, B., Hálová, I., Erhartová, D.: Tvrdost zrna pšenice jako ukazatel charakteristiky mletí, Obilnářské listy –XVIII. ročník, č. 3/2010.
8. Eckschlager, K., Horsák, I., Kodejš, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. SNTL/ALFA Praha, 1980.

Bulletin Národní referenční laboratoře XVI 2012/2

Ročník:	XVI, č. 2
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2012
Odpovědný redaktor:	Ing. Iva Strížová
Počet stran:	46

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196