

Národní referenční laboratoř

Bulletin 2019

Ročník XXIII, číslo 1/2019

Brno 2019

Obsah

- 1 Rozšíření metod pro hodnocení ekotoxikologických testů v souvislosti se zavedením nových postupů v aktualizované verzi programu ToxRat.**
Malý Stanislav
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie
Hroznová 2, 656 06 Brno 1

- 2 Využití NIR spektroskopie pro stanovení vybraných parametrů ve vzorcích brambor**
Radvana Šulová, Alena Balarinová, David Čížmár
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno
Hroznová 2, 656 06 Brno 27

- 3 Stanovení obsahu kofeinu v krmivech**
Šárka Plhalová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Opava
Jaselská 16, 746 23 Opava 38

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Rozšíření metod pro hodnocení ekotoxikologických testů v souvislosti se zavedením nových postupů v aktualizované verzi programu Toxrat

Stanislav Malý

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

1 Úvod

K vyhodnocení výsledků ekotoxikologických testů používá laboratoř ekotoxikologie (NRL – OMB) program ToxRat. V roce 2015 byla na trh uvedena verze 3.2, která jednak rozšiřuje škálu statistických testů (analýza trendu, nelineární regrese), jednak umožňuje při regresní analýze se spojitými daty pracovat s jednotlivými naměřenými hodnotami místo průměrů a zavádí možnost uživatelského nastavení některých parametrů regrese. Kromě toho výrobce změnil doporučenou kritickou p -hodnotu pro testování normality a homogenity variancí z hodnoty 0,05 na 0,1. Tato hodnota, která může být nastavena uživatelem, ovlivňuje volbu vlastních testů a následně může ovlivnit hodnoty EC_x, a NOEC/LOEC. Z důvodu srovnatelnosti výsledků bylo provedeno vyhodnocení vybrané sady historických dat pomocí aktuální verze softwaru ToxRat a vypočtené hodnoty EC_x a NOEC / LOEC, případně jejich konfidenční intervaly, byly porovnány s výsledky získanými pomocí předchozí verze 2.10. Získaná data budou sloužit jako podklad pro aktualizaci metodiky pro hodnocení ekotoxikologických dat v laboratoři ekotoxikologie NRL-OMB.

2 Software

Ke statistické analýze byl použit software ToxRat (ToxRat Solutions GmbH, SRN), verze 2.10 a 3.2.

3 Terminologie

Údaje v závorce udávají termíny používané programem ToxRat.

1. konfidenční interval (*confidence limit*) – $x\%$ konfidenční interval pro daný parametr je interval hodnot, který s $x\%$ pravděpodobností zahrnuje skutečnou hodnotu stanovovaného parametru
2. kvantová data (*quantal response*) – data, která vznikají, když je určitá vlastnost každého jedince zaznamenávána jako přítomná či nepřítomná (např. mortalita)
3. spojitá data (*metric response*) – data, která mohou (teoreticky) nabývat jakékoliv hodnoty v otevřeném intervalu (např. aktivita nitrifikátorů)
4. diskrétní data – data, které mají konečný nebo počítatelný počet hodnot
 - uvedená metodika uvádí hodnocení tzv. dat na poměrové škále, jako je např. počet juvenilů. Tato data mohou být seřazena a rozdíly mezi nimi mohou být kvantifikovány. Dalším charakteristickým rysem je existence nulové hodnoty, která má fyzikální smysl, což umožňuje výpočet poměrů mezi daty.
Diskrétní data mohou být často vyhodnocována jako by byla spojitá.
5. účinná koncentrace (*effective concentration, EC_x*) – koncentrace zkoušené látky v testovacím médiu, která způsobí v průběhu časového intervalu $x\%$ změnu v reakci (např. mortalita) nebo $x\%$ změnu výsledku (např. nitrifikace)
6. nejnižší koncentrace, ve které byl pozorován účinek (*lowest observed effect concentration, LOEC*) – nejnižší koncentrace ze zkušebních koncentrací, ve které byl pozorován statisticky významný rozdíl ve srovnání s kontrolou. Všechny testované koncentrace vyšší než LOEC by měly vykazovat stejný nebo větší účinek než účinek pozorovaný při LOEC. Jestliže tyto podmínky nejsou splněny, je třeba vysvětlit, jakým způsobem byly LOEC a od něj odvozený NOEC stanoveny. Stanovení hodnoty LOEC vyžaduje provedení více statistických testů.
7. koncentrace, ve které nebyl pozorován žádný účinek (*no observed effect concentration, NOEC*) – zkušební koncentrace těsně pod LOEC
8. nulová hypotéza, H_0 – tvrzení, že „není rozdíl“ mezi testovanými daty. Je předmětem statistického testování
9. alternativní hypotéza, H_A – přijímá se, pokud na základě statistické analýzy byla odmítnuta nulová hypotéza
10. chyba prvního druhu – pravděpodobnost zamítnutí nulové hypotézy, pokud tato je pravdivá. Je kontrolována pomocí hodnoty p .

11. chyba druhého druhu – pravděpodobnost, že nebude zamítnuta nulová hypotéza, i když neplatí
12. síla testu – udává pravděpodobnost zamítnutí nulové hypotézy, pokud tato neplatí
13. p hodnota – pravděpodobnost, že při platnosti nulové hypotézy bude nalezen daný nebo ještě větší rozdíl mezi zásahem a hodnotou odpovídající nulové hypotéze (pozn. nulové hypotéze odpovídá např. počet juvenilů nebo rychlost nitrifikace v kontrole, zásahem odpovídající hodnoty ve vzorku ošetřeném testovaným materiálem)
14. kritická hodnota, hladina signifikantnosti, α – pravděpodobnost použitá jako kritérium pro zamítnutí nulové hypotézy. Pokud vypočtená hodnota p při daném testu je menší než kritická hodnota, H_0 se zamítá. Nejčastěji používanou kritickou hodnotou je 0,05.
15. trend, monotónní odpověď – model, který předpokládá, že pro střední hodnoty jednotlivých dávek platí $\mu_0 \geq \mu_1 \geq \mu_2 \geq \mu_3 \geq \dots \geq \mu_k$, případně, že platí opačná nerovnost. Nulová a alternativní hypotéza mohou být popsány takto: $H_0 : \mu_0 = \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$ a $H_A : \mu_0 \geq \mu_1 \geq \mu_2 \geq \mu_3 \geq \dots \geq \mu_k$.
16. single-step postup, pairwise comparison – jsou založeny na testování všech kombinací kontroly a jednotlivých zásahů. Existují i testy, kdy se porovnávají pouze zásahy s kontrolou, ale bez daného pořadí jednotlivých testů. Příkladem tohoto přístupu je Fisherův exaktní test, Mann-Whitneyův U-test test nebo Dunnettův test (zásahy vs kontrola). Chyba, že jeden nebo více testů chybně zamítne nulovou hypotézu je kontrolována pomocí hodnoty nazývané family-wise error rate.
17. step-down postup – je založen na postupném testování seřazených hypotéz, které se týkají průměrů, pořadí nebo trendů. Např. v případě trendů se nejprve testuje hypotéza, že nebyl nalezen trend v odpovědi se vzrůstající dávkou, přičemž do výpočtu jsou zahrnuty všechny zásahy a kontrola. V případě, že test je signifikantní a nulová hypotéza se zamítá, odstraní se nejvyšší dávka a výpočet se opakuje. Takto se postupuje, dokud první test je nesignifikantní. Nejvyšší dávka v tomto testu potom odpovídá hodnotě NOEC. Podmínkou použití step-down testů je monotónnost v datech. Jejich výhodou v porovnání se single-step postupy je větší síla testu, tedy vyšší pravděpodobnost odhalení efektu, pokud existuje. Příkladem step – down postupu jsou testy Williamsův, Jonckheere Terpstrův nebo Cochran – Armitageův.
18. korekce p a α hodnoty (Bonferroniho, Bonferroniho-Holmova) – při provedení většího počtu testů, jako je např. sekvence porovnání zásahů mezi sebou a vůči kontrole, dochází k významnému zvýšení pravděpodobnosti, že některá z H_0 bude nesprávně zamítnuta.

Proto byly navrženy postupy korekce p (Bonferroni-Holmova) nebo α hodnoty (Bonferroni) tak, aby celková pravděpodobnost chyby prvního druhu zůstala na požadované hladině (např. 0,05). Potíž s Bonferroniho korekcí je ta, že se jedná o příliš konzervativní přístup, který umožní zamítnutí H_0 jen ve velmi málo případech. ToxRat pracuje s Bonferroni-Holmovou korekcí.

4 Data

Pro porovnání kvantových dat, která v našem případě představovala mortalita, byly použity výsledky třech testů s chvostoskokem *Folsomia candida* (JPP 31300.1). Testované materiály jsou označeny jako T6 – T8.

Pro porovnání dat, která byla hodnocena jako spojitá, byly použity výsledky z pěti laboratorních testů (T1 – T5) s roupicí *Enchytraeus crypticus* (JPP 31290.1). Hodnoceným endpointem byl počet juvenilů na konci testu. Součástí sady byla jak data, kde byl zjevný vztah dávka-odpověď, tak data, která působila při vyhodnocení potíže, např. z důvodu, že pouze nejvyšší koncentrace vedla k významnému snížení počtu juvenilů.

Původní data jsou spolu s grafickým zobrazením dávka-odpověď uvedena v příloze.

5 Statistické testy

Aktuální verze softwaru ToxRat 3.2 v podstatě kopíruje postup doporučený metodickými postupy ISO (ISO/TS 20281:2006) a OECD (OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 54). V těchto dokumentech čtenář najde podrobné vysvětlení jednotlivých testů i celkového přístupu k hodnocení ekotoxikologických dat.

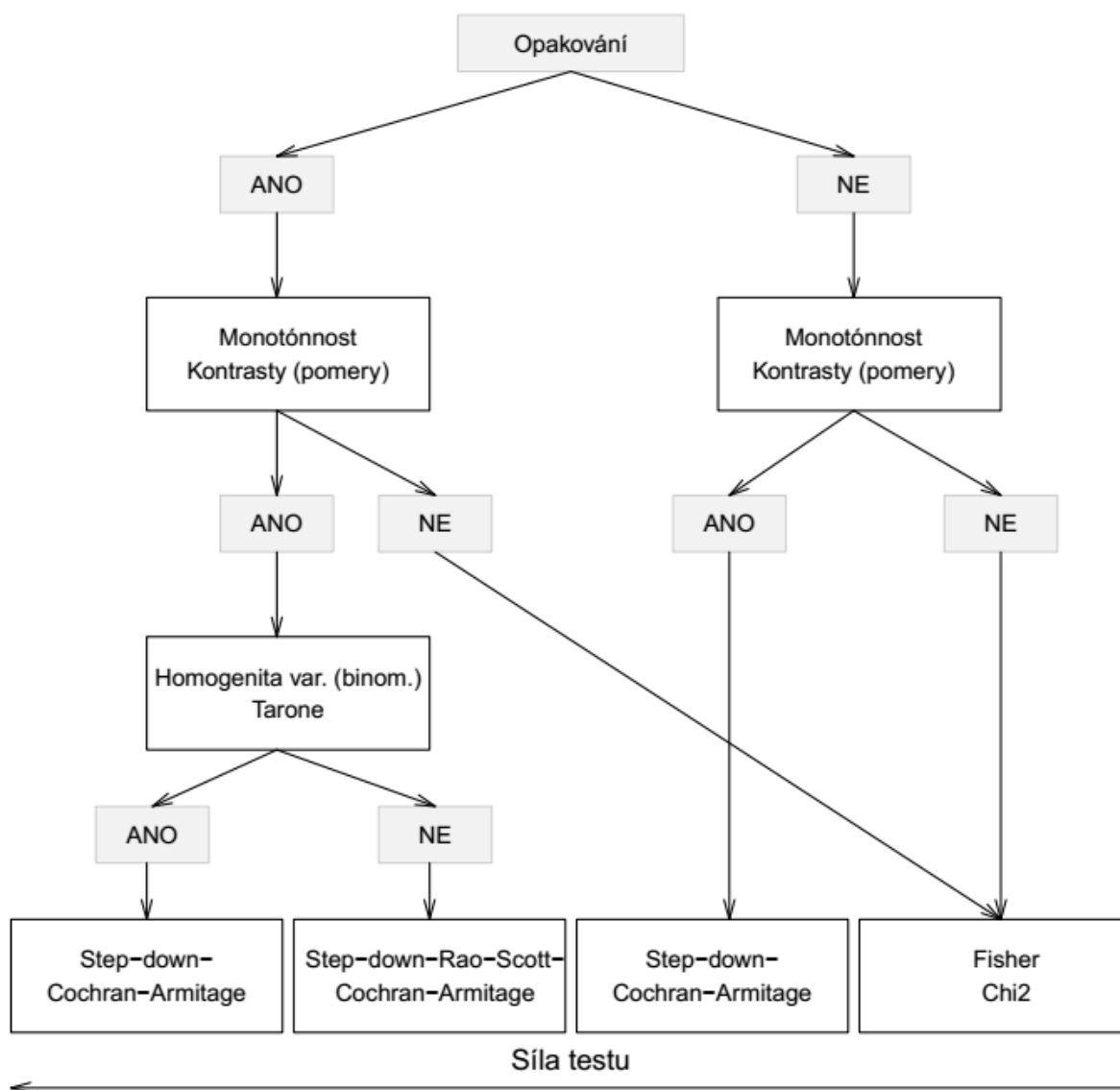
Doporučené schéma pro výpočet hodnot NOEC / LOEC kvantových a spojitých dat pomocí softwaru ToxRat 3.2 ukazují obr. 1 a 2. Nejdůležitější změnou ve verzi 3.2 jsou testy založené na analýze trendu. Výběr testu závisí na požadavcích na data, které musí být pro daný test splněna. V závislosti na testu se jedná o normalitu, homogenitu variancí nebo lineární trend. Princip stanovení hodnot NOEC / LOEC je uveden v části Terminologie. Síla testů klesá ve schématech zleva doprava, ve stejném směru klesají i požadavky na data. V praxi to znamená, že sice můžeme použít testy napravo od toho, ke kterému nás přivedlo dané schéma, ale nalezené hodnoty NOEC / LOEC mohou být vyšší, příp. se vůbec nemusí podařit jejich stanovení.

Výpočet EC_x pro kvantová data se provádí pomocí lineární regrese založené na logit, normálním a weibullovu rozdělení. Ve druhém případě se jedná o známou probit regresi. Data vstupující do analýzy jsou vyjádřena jako procento inhibice vzhledem ke kontrole. Pro výpočet konfidenčních intervalů byl využit předvolený Fiellerův teorém. Signifikantnost modelu byla testována pomocí hodnot pChi a pF. První z nich kvantifikuje shodu mezi daty naměřenými a vypočtenými pomocí použitého modelu (goodness of fit) a vztahuje se k pravděpodobnosti, že data jsou rozptýlena kolem křivky proložené díky náhodné variabilitě (nulová hypotéza). V případě, že hodnota pChi < 0,05, nulovou hypotézu zamítáme a musíme použít jiný model. Je žádoucí, aby hodnota pChi byla co nejbližší jedničce a pokud je menší než 0,7, doporučuje se vyzkoušet jinou funkci. Hodnota pF testuje signifikantnost vztahu dávka-odpověď. Počítá se pravděpodobnost, že díky náhodné variabilitě získáme nalezený vztah dávka-odpověď, ačkoliv v populaci žádná závislost odpovědi na dávce neexistuje. V praxi to znamená, že závislost dávka-odpověď je považována za signifikantní, pokud pF < 0,05. Nově byly do programu ToxRat přidány testy vycházející z interpolace, které umožňují stanovení EC₅₀ (Spearman – Kärberův test, klouzavý průměr, binomický test).

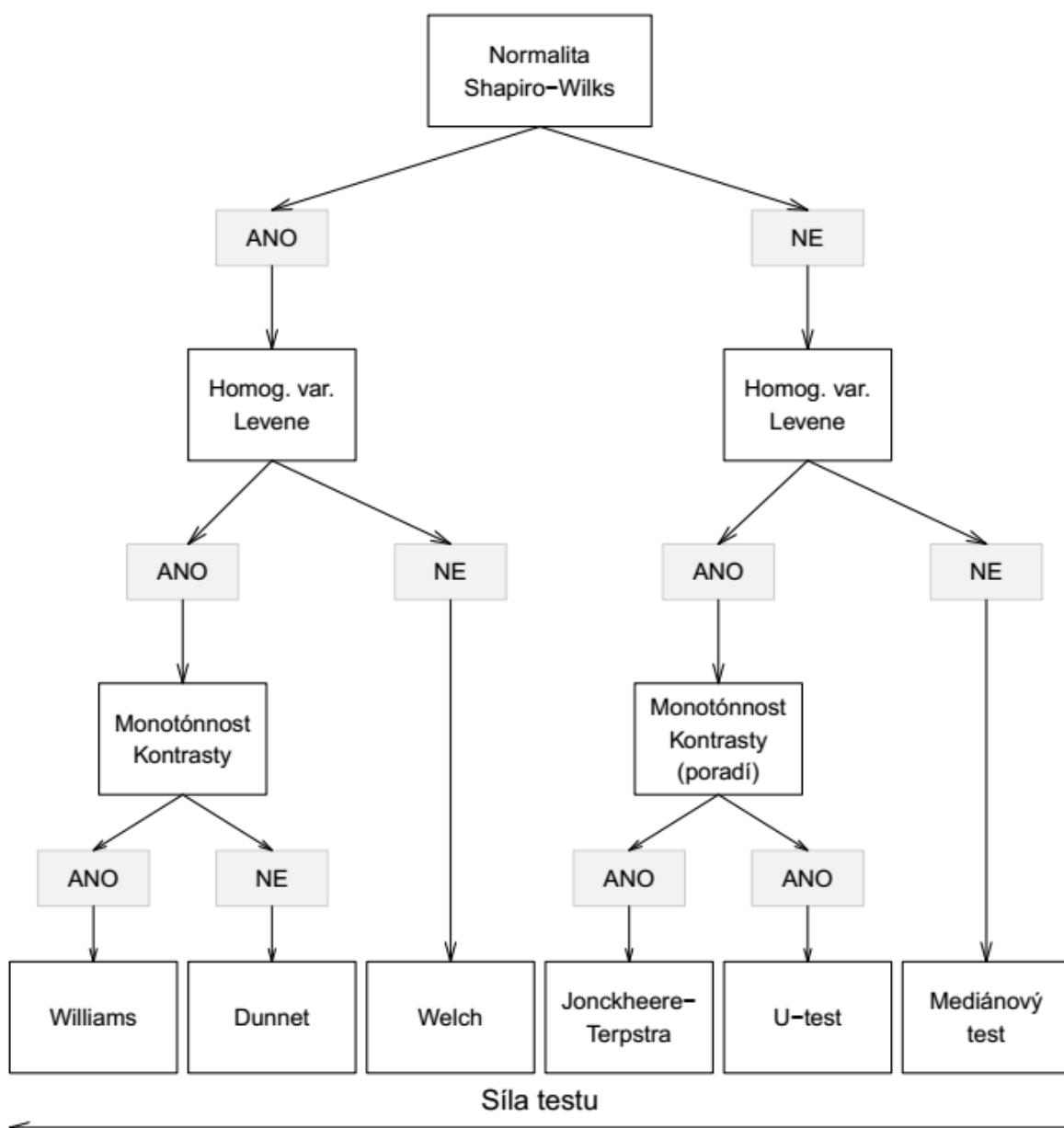
Významné změny doznal výpočet EC_x pro spojitá data, kde se jako první volba používá 2,3 nebo 4-parametrická nelineární regrese, která nepředpokládá normalitu a homogenitu variancí. Při nelineární regresi se pracuje s původními daty. K dispozici jsou tři skupiny funkcí (kumulativní distribuční funkce, CDF) založené na normálním, logit a weibullovu rozdělení. Hodnoty EC_x mohou být výrazně ovlivněny jedním ze tří možných způsobů vážení dat vstupujících do analýzy (viz níže). ToxRat 3.2 umožňuje provádět výpočet jak na všech datech, tak na průměrech z každé koncentrace. Pro optimalizaci parametrů byla použita Levenbergova-Marquardtova metoda, která je založena na Monte Carlo simulačních testech. Pro hodnocení modelů byly použity parametry, které se jednak vztahují k celému modelu, jednak významnosti regresních koeficientů. V prvním případě se jedná o analýzu variance charakterizující signifikantnost vztahu dávka-odpověď (pF musí být menší než 0,05), ve druhém se testuje H₀ říkající, že odchylky mezi naměřenými a vypočtenými hodnotami jsou náhodné (lack of fit, pF musí být větší než 0,05; nejlépe co nejbližše maximální hodnotě 1). Významnost jednotlivých koeficientů regresního modelu byla zjišťována *t*-testem. Pokud je *p*-hodnota pro některý z koeficientů větší než 0,05, je třeba vyzkoušet jednodušší model. Hodnota R² odpovídá standardnímu koeficientu determinace. Významnost jednotlivých kritérií pro hodnocení modelu klesá v pořadí, jak byly výše uvedeny. Obecně platí zásada, že se použije nejjednodušší model dávající

uspokojivé výsledky (parsimonní model). Zároveň je třeba upozornit, že vždy byla provedena grafická kontrola proložení dat.

Ačkoliv pro analýzu spojitých dat je doporučena nelineární regrese, je možno využít i lineární regresi zmíněnou výše. V tomto případě se pro výpočet konfidenčního intervalu nabízí volba s korekcí variance. Její použití ve spojení s výpočtem založeným na průměrech ale může vést k příliš širokým konfidenčním intervalům. V případě srovnávacích testů s daty hodnocenými pomocí předchozích verzí programu ToxRat je třeba uvedenou volbu vypnout.



Obr. 1. Doporučené schéma výpočtu hodnot NOEC / LOEC pro kvantová data. Uvedeny jsou zkrácené názvy testů. Fisherův test a test χ^2 jsou počítány s Bonferroni-Holmovou korekcí.



Obr. 2. Doporučené schéma výpočtu hodnot NOEC / LOEC pro spojitá data. Uvedeny jsou zkrácené názvy testů. Welchův test, U-test a mediánový test jsou počítány s Bonferroni-Holmovou korekcí.

6 Výsledky a diskuse

6.1 Kvantová data – mortalita chvostoskoka *Folsomia candida*

NOEC / LOEC

Výsledky stanovení NOEC/LOEC pomocí obou verzí programu ToxRat shrnují tabulky 1 a 2.

Tabulka 1. Hodnoty NOEC / LOEC mortality chvostoskoka *Folsomia candida* stanovené programem ToxRat 2.10

Vzorek	Test	NOEC	LOEC
T6	Fisherův exaktní test	38	75
T7	s Bonferroniho korekcí	160000	320000
T8		230000	378000

Všechny hodnoty jsou v $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$

Tabulka 2. Hodnoty NOEC / LOEC mortality roupice *Enchytraeus crypticus* stanovené programem ToxRat 3.2

Vzorek	Test	NOEC	LOEC
T6	Rao	< 38	38
T7	Cochran	40000	80000
T8	Rao	230000	378000

Všechny hodnoty jsou v $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Cochran – step-down Cochranův-Armitageův test, Rao - step-down Raoův-Scottův-Cochranův-Armitageův test

Porovnání výpočtů NOEC / LOEC potvrzuje skutečnost, že testy založené na analýze trendu (step-down Cochranův-Armitageův test, down Raoův-Scottův-Cochranův-Armitageův test) jsou silnější než testy založené na vzájemném porovnání zásahů a kontroly (Fisherův exaktní test s Bonferroniho korekcí). Prakticky se tato skutečnost projevila nižšími hodnotami NOEC/LOEC u vzorků T6 a T7 vypočtenými pomocí nové verze programu ToxRat. V této souvislosti je třeba zmínit, že u materiálu T7 se navíc mezi oběma rozdílnými hodnotami ($40\,000\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ vs $160\,000\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) nacházela ještě další testovaná dávka $80\,000\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Samozřejmě platí, že postupy použité ve verzi ToxRat 2.10 jsou dostupné i ve verzi ToxRat 3.2.

EC_x

Regresní modely založené na třech rozděleních, logit, probit a weibullovu, dávají srovnatelné výsledky pro EC_x (Tabulka 3, obr. 3). V případě vzorku T8 byly regresní modely

nesignifikantní. Porovnání kritérií regrese (pChi, pF) a hodnot EC_x, včetně 95% konfidenčních intervalů, dalo pro daný typ analýzy shodné výsledky v obou verzích programu ToxRat (data nejsou ukázána).

Tabulka 3. Porovnání regresních modelů založených na logit, probit a weibullovu rozdělení (ToxRat 3.2).

Vzorek	Regrese	Parametr (kg.ha ⁻¹)	Průměr (kg.ha ⁻¹)	Dolní 95% CI (kg.ha ⁻¹)	Horní 95% CI (kg.ha ⁻¹)
T6	Logit	EC ₂₀	29.6	0.179	65.7
		EC ₅₀	77.5	11.6	167
	Probit	EC ₂₀	29.4	1.14	63.4
		EC ₅₀	77.7	18.9	149
	Weibull	EC ₂₀	24.6	1.22	56.4
		EC ₅₀	85.9	24.1	146
T7	Logit	EC ₁₀	49100	21500	77600
		EC ₂₀	136000	88000	228000
	Probit	EC ₁₀	45900	21900	72300
		EC ₂₀	131000	84000	235000
	Weibull	EC ₁₀	50400	21500	79000
		EC ₂₀	140000	90500	222000

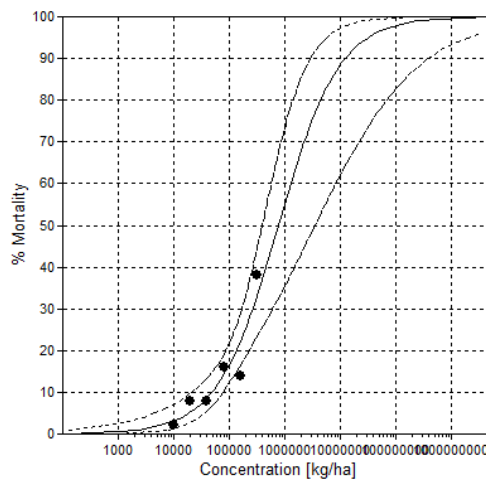
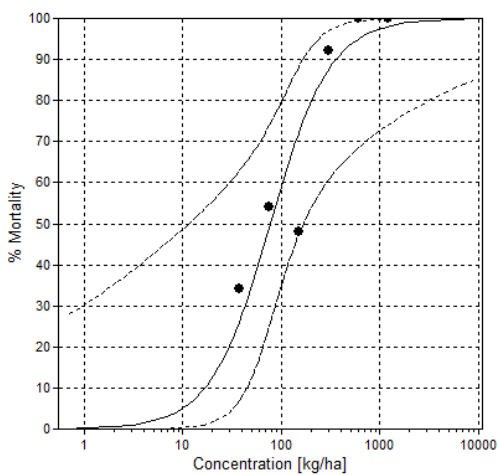
Hodnoty EC₁₀ pro T6 a EC₅₀ pro T7 nelze stanovit. CI – konfidenční interval

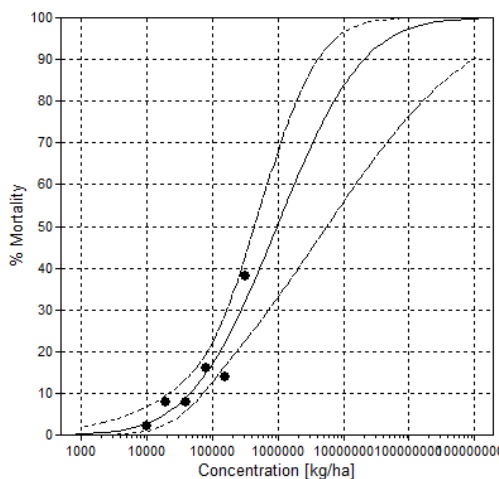
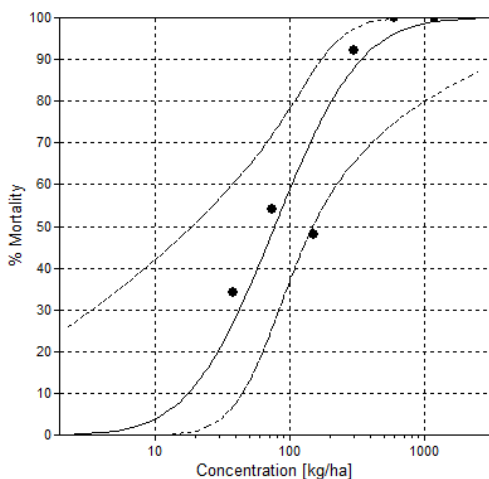
Hodnoty EC₅₀ pro vzorek T6 byly kromě regrese vypočítány i pomocí interpolačních metod (ToxRat 3.2) a výsledky porovnány s logit regresí (Tabulka 4). S výjimkou binomického testu byly hodnoty srovnatelné, konfidenční intervaly vypočtené interpolačními metodami byly ale užší. Je třeba zmínit, že regresní modely mají před interpolačními přednost a pokud se podaří vytvořit vytvořit regresní model, výpočet se provádí pomocí regrese. Navíc interpolací lze stanovit pouze EC₅₀. Z uvedeného důvodu nešlo interpolaci aplikovat na data T7 a T8, které ani při nejvyšší dávce nezpůsobily 50% mortalitu.

Tabulka 4. Porovnání různých postupů pro výpočet EC50 a odpovídajících konfidenčních intervalů pro vzorek T6 (ToxRat 3.2).

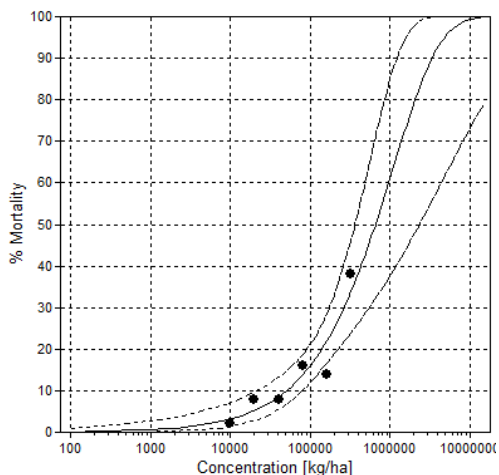
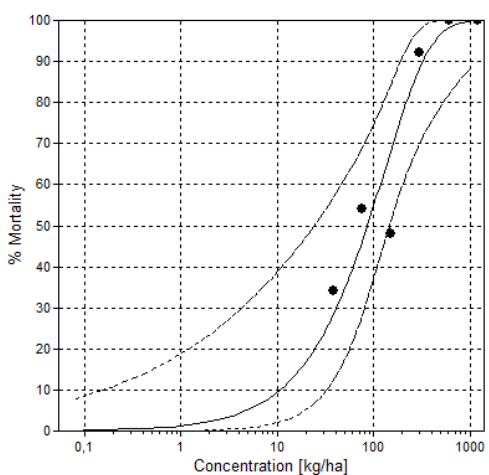
	EC ₅₀ (kg.ha ⁻¹)	Dolní 95% CI (kg.ha ⁻¹)		Horní 95% CI (kg.ha ⁻¹)
Logit regrese	77,5	11,6		167
Spearman Kärber	87,9	73,9		105
Spearman Kärber, trimm 35%	92,3	60,0		142
Klouzavý průměr (Moving average)	89,5	63,3		127
Binomický test	181	38		300

CI – konfidenční interval, trimm 35% - pouze dávky způsobující inhibici mezi 35% a 65% jsou zahrnuty do výpočtu.





(pokrač.)



Obr. 3. Grafické znázornění modelu založeného na logit, probit a weibullově funkci (shora dolů) vztahu mezi mortalitou roupice *Enchytraeus crypticus* a dávkou aplikovaného přípravku T6 a T7 (levý resp. pravý sloupec). Zobrazena je vlastní funkce a 95% konfidenční intervaly (ToxRat 3.2).

6.2 Spojitá data – reprodukce roupice *Enchytraeus crypticus*

NOEC / LOEC

Ve výpočtu hodnot NOEC / LOEC metrických dat nacházíme mezi oběma verzemi programu ToxRat několik odlišností. Zatímco v původní verzi byla předvolená kritická hodnota signifikantnosti pro testy normality a homogenity variancí 0,05, v aktuální je to 0,01. Prakticky to znamená uvolnění nároků na data. V případě, že se výsledná p -hodnota daného testu bude nacházet v rozmezí 0,01 – 0,05, H_0 se nebude zamítat a budeme předpokládat splnění požadavků na normalitu a/nebo homogenitu variancí. Druhou významnou novinkou je zavedení analýzy trendu (Williamsův test, Jonkheere-Terpstrův test) pro stanovení NOEC / LOEC, které předchází analýza trendu prováděná na všech datech pomocí kontrastů.

Přes uvedené významné výpočtové rozdíly byly všechny hodnoty NOEC / LOEC stanovené

oběma verzemi programu ToxRat shodné (tabulky 5 a 6) shodné. Je třeba zmínit, že v případě vzorku T1 se mírně lišily výsledky Shapiro-Wilkova testu na normalitu. Rozdíl způsobily data při nejvyšší testované dávce 800 kg.ha⁻¹, kdy došlo ke 100% inhibici reprodukce ve všech opakováních. Ve verzi programu 2.10 se tato data neberou do výpočtu, v novější je pravděpodobně algoritmus výpočtu mírně odlišný a s daty se počítá. Tento předpoklad potvrzuje skutečnost, že pokud v programu ToxRat 3.2 tato data z výpočtu manuálně odstraníme, získané výsledky jsou shodné s předchozí verzí programu. V případě ostatních vzorků nikdy k úplné inhibici nedošlo a výsledky testů normality jsou shodné. Naopak není jasné, z jakého důvodu se v obou verzích programu liší výsledky Levenova testu na homogenitu variancí. Výsledky ze stávající verze odpovídají výpočtu pomocí programu R.3.2.3 (balíček car). Pokud data nespĺňují požadavky na homogenitu variancí a/nebo normalitu, je možné je transformovat a testování požadavků opakovat. V tomto VÚ data nebyla transformována a v případě nehomogenity variancí a/nebo narušení normality byly použity neparametrické testy.

Tabulka 5. Hodnoty NOEC / LOEC inhibice reprodukce roupice *Enchytraeus crypticus* stanovené programem ToxRat 2.10.

Vzorek	Normalita	Homogenita	Test	NOEC	LOEC
T1	0.832	0.054	Dunnett	50.0	100
T2	0.125	0.443	Dunnett	10000	20000
T3	0.001	0.061	U-test (B.-H.)	200	400
T4	0.258	0.057	Dunnett	100000	200000
T5	0.309	0.348	Dunnett	4000	8000

Všechny hodnoty jsou v kg.ha⁻¹. Normalita – Shapiro-Wilkův test, *p* hodnota; Homogenita Levenův test na homogenitu variancí, *p* hodnota. Červeně jsou označeny testy, kde byla zamítnuta H₀ na hladině signifikantnosti 0,05. U-test (B.-H.) – neparametrický U-test s Bonferroni-Holmovou korekcí.

Tabulka 6. Hodnoty NOEC / LOEC inhibice reprodukce rouspice *Enchytraeus crypticus* stanovené programem ToxRat 3. 2.

Vzorek	Normalita	Homogenita	Trend	Test	NOEC	LOEC
T1	0.747	0.004		Welch	50,0	100
T2	0.125	0.398	<0.001	Williams	10000	20000
T3	<0.001	0.022	<0.001	Jon-Ter.	200	400
T4	0.258	0.059	<0.001	Williams	100000	200000
T5	0.309	0.216	<0.001	Williams	4000	8000

Všechny hodnoty jsou v kg.ha⁻¹. Normalita – Shapiro-Wilkův test, p hodnota; Homogenita – Levenův test na homogenitu variancí, p hodnota; Trend – zamítnutí nulové hypotézy o rovnosti středních hodnot znamená přijetí alternativní hypotézy o jejich trendu v jejich řadě, Welch – Welchův t-test s Bonferroni-Holmovou korekcí, Jon.-Ter. - Jonckheere-Terpstrův test. Červeně jsou označeny testy, kde byla zamítnuta H₀ na hladině signifikantnosti 0,01.

EC_x

Nejvýznamnější změnu v porovnání s předchozí verzí softwaru představuje možnost stanovení hodnot EC_x v případě spojitých dat nelineární regresí. Tento postup navíc umožňuje vážení dat, které se aplikuje v případě, že původní analýza nedala uspokojivé výsledky. K použití vah (1/Y², 1/var (Y)) bylo přistoupeno u vzorků T3 a T4, kde byl vztah dávka-odpověď méně zřetelný. Hodnoty EC₁₀, EC₂₀ a EC₅₀ vypočtené nelineární regresí s funkcí založené na normálním, logit a weibulovu rozdělení byly porovnány s hodnotami EC_x stanovenými pomocí lineární regrese (logit, probit, Weibull), která představovala jedinou volbu ve verzi 2.10.

Přehled vypočtených hodnot EC_x nelineární a lineární regresí pro vzorky T1 – T5 je uveden v tabulkách 7 – 15. Současně jsou uvedeny i parametry pro hodnocení signifikantnosti jednotlivých modelů. V případě, že některé kritérium statistické významnosti nebylo splněno, hodnoty EC_x nejsou uvedeny. V případě nelineární regrese to znamenalo i požadavek na signifikantnost všech regresních koeficientů (p < 0,05). Uvedeny jsou výsledky tříparametrického modelu, který dával uspokojivé výsledky. Dvouparametrické modely byly vždy nesignifikantní, čtyřparametrické nevedly k úspěchu tam, kde výpočet tříparametrického selhával. Pro ilustraci jsou na obr. 4–7. uvedeny grafy vztahu dávka-odpověď s proložením pomocí jak lineární, tak nelineárních regrese pro vzorek T2 s těsným regresním vztahem, tak pro vzorek T4, kde rozptyl dat kolem regresní křivky byl větší.

Porovnání hodnot EC_x vypočtených lineární regresí v obou verzích softwaru ToxRat ukázalo prakticky totožné výsledky, pokud byla pro výpočet ve verzi 3.2 použita volba bez korekce variance.

V případě vzorků T1 a T2, kde existuje zřetelný vztah dávka-odpověď (viz příloha), výsledky ukazují velmi dobrou shodu mezi EC_x a jejich konfidenčními intervaly vypočtenými různými postupy. U vzorku T1 byly v případě lineární regrese získány mírně nižší výsledky EC_x, rozdíl mezi oběma přístupy byl ale akceptovatelný. V některých případech se potvrdila skutečnost, že výpočet na průměrech s korekcí variance vede k extrémně širokým konfidenčním intervalům (např. T2, lineární, logit/weibull, horní 95% v tabulce 10). Obecně platilo, že výpočet na průměrných hodnotách vedl k rozšíření konfidenčních intervalů. Výraznější rozdíly v hodnotách EC_x vypočtených různými postupy byly nalezeny u vzorků T3, T4 a T5, kde pouze nejvyšší dávky způsobovaly významný efekt. Nalezené rozdíly v EC_x byly nižší pro EC₅₀ než pro EC₂₀ a EC₁₀. Použití vah při nelineární regresi u vzorku T4 dalo srovnatelné hodnoty EC_x s výpočtem bez vážení (tabulka 13). Použití korekce variance často vedlo k tomu, že nebylo možno spočítat konfidenční intervaly, zejména pro průměrné hodnoty (viz např. tabulky 12 a 15). V některých případech se daný model nepodařilo vypočítat vůbec (např. T4, lineární, všechny funkce, průměry; T5, nelineární, všechny funkce). Rozdíly mezi výsledky získanými v rámci jednoho typu analýzy (nelineární, lineární regrese) byly menší než při porovnání výstupů z obou typů analýz. Jako příklad mohou sloužit hodnoty EC₁₀ a EC₂₀ u vzorku T4 (tabulky 13 a 14). V obou případech je rozptyl v rámci nelineární i lineární regrese velmi nízký, poměr mezi hodnotami vypočtenými nelineární a lineární regresí ale činí přibližně 1,7 pro EC₁₀ a 1,4 pro EC₂₀. Za zmínku stojí, že pro EC₅₀ je tento poměr 0,95. Situace je poněkud odlišná v případě konfidenčních intervalů, kdy lze nalézt významné rozdíly i v rámci daného typu analýzy.

6.3 Závěr

Zavedení analýzy trendu vedlo ke snížení hodnot NOEC / LOEC v případě kvantových dat. Ačkoliv se významně změnil přístup k výpočtu NOEC / LOEC spojitého dat, hodnoty vypočtené pomocí původních i nových postupů byly shodné. Nelineární a lineární regrese dává srovnatelné hodnoty EC_x, pokud existuje zřetelný vztah dávka-odpověď. Regrese by se měla provádět na všech hodnotách, protože výpočet na průměrech vede k rozšíření konfidenčních intervalů. Rozdíly mezi výstupy různých regresních modelů jsou větší pro konfidenční intervaly než pro vlastní hodnoty EC_x.

Tabulka 7. Stanovení hodnot ECx vzorku T1 nelineární regresí.

Funkce	Data	R ²	pF	pFlack	EC10	EC10_do	EC10_ho	EC20	EC20_do	EC20_ho	EC50	EC50_do	EC50_ho
Nor_3	Vše	0,998	<0,001	0,369	85,5	71,8	102	102	86,0	120	142	116	174
	Prum	0,950	<0,001	-	85,5	66,7	110	102	85,0	121	142	115	175
Log3	Vše	0,991	<0,001	0,458	83,0	67,9	94,9	101	87,4	113	142	128	155
	Prum	0,960	<0,001	-	83,0	68,4	94,6	101	87,8	112	142	129	155

Tabulka 8. Stanovení hodnot ECx vzorku T1 lineární regresí.

Funkce	Počet	Corvar	R ²	p(Chi2):	pF	EC10	EC10_do	EC10_ho	EC20	EC20_do	EC20_ho	EC50	EC50_do	EC50_ho
Log	Vše	ANO	0,704	1,0000	<0,001	74	51,1	89,8	92,6	71,3	108	136	118	157
Log	Prum	ANO	0,907	1,0000	0,003	75,1	0,501	109	93,5	3,85	129	136	70,9	307
Log	Vše	NE	0,704	1,0000	<0,001	74	59,2	85,5	92,6	78,9	103	136	124	149
Log	Prum	NE	0,907	1,0000	0,003	75,1	45,2	94,0	93,5	65,6	112	136	114	164
Prob	Vše	ANO	0,701	1,0000	<0,001	77,2	69,5	83,9	93,8	86,6	100	136	130	143
Prob	Prum	ANO	0,894	0,9990	0,004	78	56,1	93,1	94,5	74,2	109	136	120	156
Prob	Vše	NE	0,701	1,0000	<0,001	77,2	62,3	88,7	93,8	80,0	105	136	124	149
Prob	Prum	NE	0,894	0,9990	0,004	78	44,8	97,9	94,5	63,4	114	136	113	166
Wei	Vše	ANO	0,936	1,0000	0,002	63,6	7,64	96,9	87,2	21,5	121	141	86,8	197
Wei	Prum	ANO	0,936	1,0000	0,002	63,6	7,64	96,9	87,2	21,5	121	141	86,8	197
Wei	Vše	NE	0,768	1,0000	<0,001	64,6	50,3	76,4	88,0	73,9	99,4	140	128	152
Wei	Prum	NE	0,936	1,0000	0,002	63,6	37,6	82,7	87,2	60,8	106	141	119	163

Tabulka 9. Stanovení hodnot ECx vzorku T2 nelineární regresí.

Funkce	Data	R ²	pF	pFlack	EC10	EC10_do	EC10_ho	EC20	EC20_do	EC20_ho	EC50	EC50_do	EC50_ho
Nor_3	Vše	0,869	<0,001	0,294	8690	4270	18800	21600	10300	45400	117000	44400	295000
Nor_3	Prum	0,981	<0,001	-	8960	2890	27700	21600	9450	49700	117000	39500	329000
Log3	Vše	0,873	<0,001	0,258	7830	2850	14200	21000	10800	32200	114000	83900	145000
Log3	Prum	0,987	<0,001	-	7830	2250	15300	21000	9350	33900	114000	79200	150000
Wei_3	Vše	0,863	<0,001	0,152	6320	1510	13700	20100	7770	34800	115000	78800	153000
Wei_3	Prum	0,971	<0,001	-	6320	807	16400	20100	4970	39700	115000	67800	163000

Tabulka 10. Stanovení hodnot ECx vzorku T2 lineární regresí.

Funkce	Počet	Corvar	R ²	p(Chi2):	pF	EC10	EC10_do	EC10_ho	EC20	EC20_do	EC20_ho	EC50	EC50_do	EC50_ho
Log	all	ANO	0,783	1,0000	<0,001	8320	2690	14900	22000	11400	32200	116000	84100	192000
Log	mean	ANO	0,943	1,0000	0,001	8470	NA	25000	22300	32,7	48700	116000	54200	8590000
Log	all	NE	0,783	1,0000	<0,001	8320	4800	12100	22000	15800	28000	116000	95300	150000
Log	mean	NE	0,943	1,0000	0,001	8470	2830	15000	22300	11700	32400	116000	84500	189000
Prob	all	ANO	0,797	1,0000	<0,001	8940	6520	11500	21600	17700	25500	117000	101000	139000
Prob	mean	ANO	0,951	1,0000	<0,001	9110	3410	15500	21900	12000	31400	117000	84200	194000
Prob	all	NE	0,797	1,0000	<0,001	8940	5470	12600	21600	15900	27200	117000	95500	153000
Prob	mean	NE	0,951	1,0000	<0,001	9110	3640	15200	21900	12500	31000	117000	85400	188000
Wei	all	ANO	0,776	1,0000	<0,001	7230	2050	13700	22100	10700	32900	119000	88000	183000
Wei	mean	ANO	0,927	1,0000	0,002	7370	NA	24100	22300	22,8	49400	119000	55600	3030000
Wei	all	NE	0,776	1,0000	<0,001	7230	3820	11100	22100	15200	28700	119000	98400	150000
Wei	mean	NE	0,927	1,0000	0,002	7370	1610	14900	22300	9400	34600	119000	84900	197000

Tabulka 11. Stanovení hodnot ECx vzorku T3 nelineární regresí.

Funkce	Data	Váha	R2	pF	EC10	EC10_do	EC10_ho	EC20	EC20_do	EC20_ho	EC50	EC50_do	EC50_ho
Nor_3	Prum	W1	0,996	<0,001	72,1	70,8	73,4	95,9	94,7	97,2	166	163	168
Nor_3	Prum	W3	0,973	<0,001	180	95,7	339	205	134	320	262	160	432
Log_3	Prum	W1	0,995	<0,001	106	72,5	142	134	93,2	176	200	142	259
Log_3	Prum	W3	0,978	<0,001	175	108	224	201	136	254	257	195	320

Tabulka 12. Stanovení hodnot ECx vzorku T3 lineární regresí.

Funkce	Počet	Corvar	R ²	p(Chi2):	pF	EC10	EC10_do	EC10_ho	EC20	EC20_do	EC20_ho	EC50	EC50_do	EC50_ho
Log	all	ANO	0,432	1,0000	<0,001	179	NA	NA	206	NA	NA	262	NA	NA
Log	mean	ANO	0,973	1,0000	<0,001	182	NA	NA	209	NA	NA	263	NA	NA
Log	all	NE	0,432	1,0000	<0,001	179	138	206	206	172	234	262	231	317
Log	mean	NE	0,973	1,0000	<0,001	182	165	196	209	193	223	263	246	285
Prob	all	ANO	0,487	1,0000	<0,001	182	119	218	207	154	246	264	222	349
Prob	mean	ANO	0,98	1,0000	<0,001	184	NA	NA	208	NA	NA	265	NA	NA
Prob	all	NE	0,487	1,0000	<0,001	182	145	208	207	175	233	264	235	310
Prob	mean	NE	0,98	1,0000	<0,001	184	167	197	208	194	221	265	249	284
Wei	all	ANO	0,552	1,0000	<0,001	165	NA	NA	204	NA	NA	280	NA	NA
Wei	mean	ANO	0,984	1,0000	<0,001	175	NA	NA	213	NA	NA	285	NA	NA
Wei	all	NE	0,552	1,0000	<0,001	165	116	199	204	158	236	280	243	316
Wei	mean	NE	0,984	1,0000	<0,001	175	153	194	213	192	230	285	267	302

Tabulka 13. Stanovení hodnot ECx vzorku T4 nelineární regresí.

Funkce	Data	Váha	R ²	pF	pFlack	EC10	EC10_lo	EC_10_up	EC20	EC20_lo	EC_20_up	EC50	EC50_lo	EC_50_up
Nor_3	Vše		0,547	<0,001	0,189	106000	65700	170000	132000	82000	214000	204000	105000	377000
Nor_3	Vše	W1	0,769	<0,001	0,106	126000	65700	242000	150000	77400	290000	207000	83700	481000
Nor_3	Vše	W3	0,876	<0,001	0,302	102000	70600	147000	129000	89000	186000	200000	123000	319000
Nor_3	Prum		0,811	0,015	-	106000	47500	236000	132000	73200	240000	204000	90000	436000
Nor_3	Prum	W1	0,938	0,002	-	111000	51500	240000	137000	77700	243000	204000	95100	418000
Nor_3	Prum	W3	0,969	<0,001	-	102000	58500	178000	129000	85500	194000	200000	117000	335000
Log_3	Vše		0,549	<0,001	0,204	102000	16700	148000	132000	41900	174000	203000	168000	239000
Log_3	Vše	W3	0,877	<0,001	0,316	101364	43120	130021	130311	75283	154327	200209	185445	215318
Log_3	Prum	W3	0,97	<0,001	-	101364	34763	132425	130311	65961	156367	200209	183994	216804

Tabulka 14. Stanovení hodnot ECx vzorek T4 lineární regresí.

Funkce	Počet	Corvar	R ²	p(Chi2):	pF	EC10	EC10_do	EC10_ho	EC20	EC20_do	EC20_ho	EC50	EC50_do	EC50_ho
Log	all	ANO	0,341	1,0000	<0,001	60400	NA	NA	95900	NA	NA	211000	NA	NA
Log	all	NE	0,341	1,0000	<0,001	60400	19800	87600	95900	51500	123000	211000	167000	352000
Prob	all	ANO	0,336	1,0000	<0,001	63600	31200	86100	96100	63200	119000	212000	172000	311000
Prob	all	NE	0,336	1,0000	<0,001	63600	22200	90300	96100	52500	124000	212000	166000	369000

Model nešlo spočítat v případě, že byly pro výpočet použity průměrné hodnoty.

Tabulka 15. Stanovení hodnot ECx vzorku T5 lineární regresí.

Funkce	Počet	Corvar	R ²	p(Chi2):	pF	EC10	EC10_do	EC10_ho	EC20	EC20_do	EC20_ho	EC50	EC50_do	EC50_ho
Log	all	ANO	0,59	1,0000	<0,001	4410	NA	NA	5170	NA	NA	6810	NA	NA
Log	mean	ANO	NA	NA	NS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Log	all	NE	0,59	1,0000	<0,001	4410	3360	5080	5170	4250	5760	6810	6250	7240
Log	mean	NE	NA	NA	NS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Prob	all	ANO	0,665	1,0000	<0,001	4370	3100	5140	5070	3920	5760	6750	6010	7320
Prob	mean	ANO	0,674	0,9330	0,045	1800	960	2710	3030	1940	4750	8190	5140	20100
Prob	all	NE	0,665	1,0000	<0,001	4370	3540	4960	5070	4320	5590	6750	6260	7160
Prob	mean	NE	0,674	0,9330	0,045	1800	NA	5300	3030	100	119000	8190	3220	NA
Wei	all	ANO	0,666	1,0000	<0,001	1220	556	1930	2580	1580	4090	7950	4860	20184
Wei	mean	ANO	0,69	0,9980	0,041	1420	NA	4350	2850	NA	NA	8180	2910	NA
Wei	all	NE	0,666	1,0000	<0,001	1220	782	1680	2580	1900	3460	7950	5610	13400
Wei	mean	NE	0,69	0,9980	0,041	1420	NA	3890	2850	233	44000	8180	3110	NA

Legenda k tabulkám 7 – 15.

XX_do – dolní 95% konfidenční interval

XX_ho - horní 95% konfidenční interval

Corvar – korekce vzhledem k varianci kontroly

Nor – funkce normálního rozdělení

Log – funkce logit

Vše – pro výpočet byla použita všechna data

Prum – pro výpočet byly použity průměrné hodnoty pro každou dávku

pomlčka – uvedená hodnota není součástí výpočtu

NA – nelze spočítat

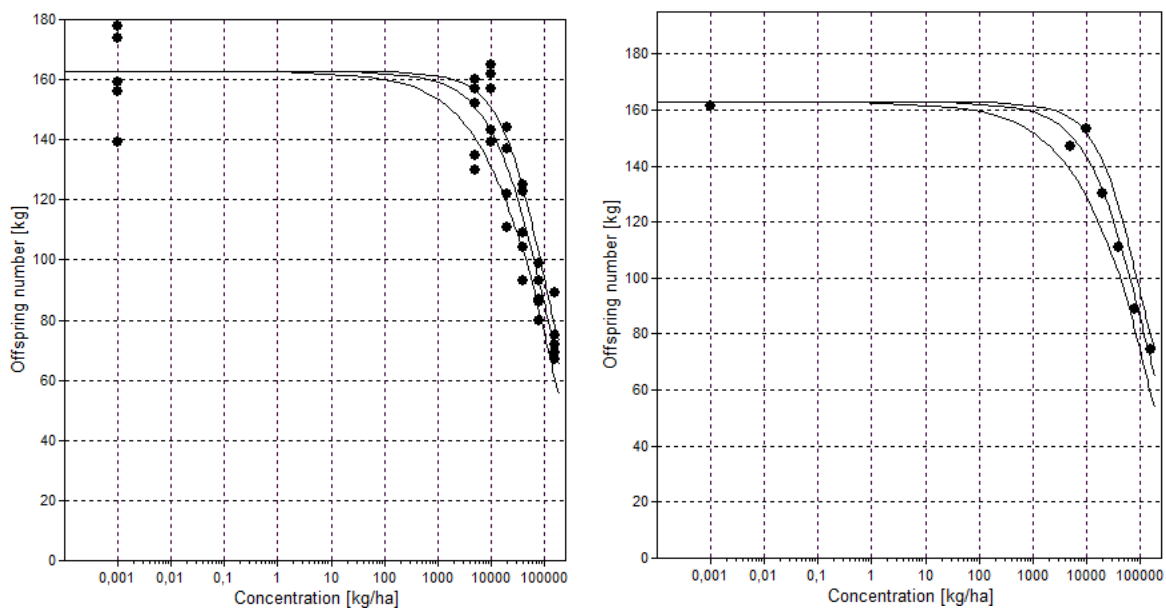
Corvar – korekce variance

W1 – relativní váha ($1/Y^2$)

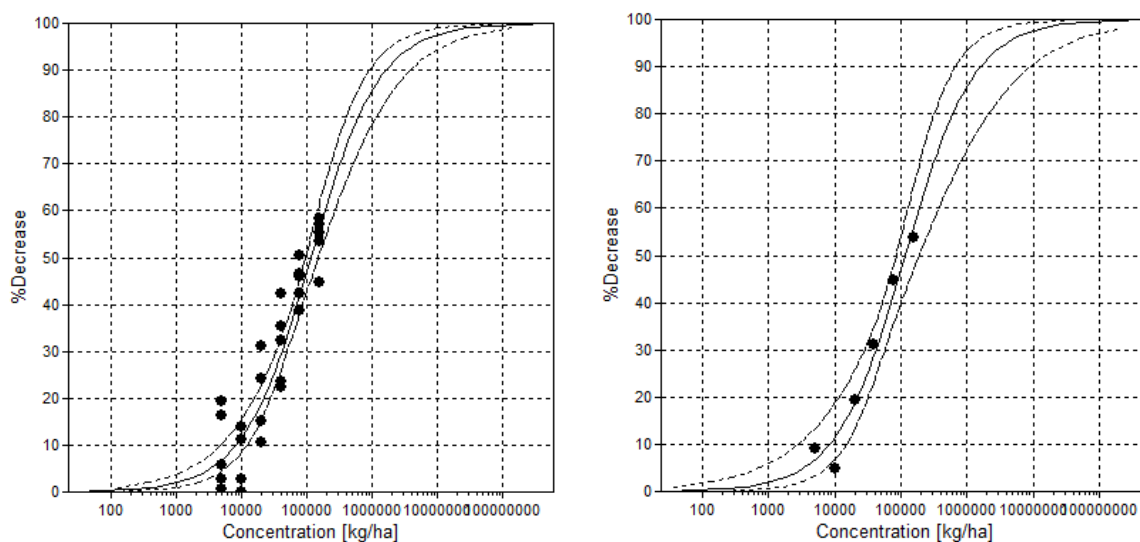
W1 – váha vzhledem k varianci ($1/\text{var}(Y)$)

Nepodařilo se vytvořit model dávka-odpověď pro vzorek T5 pomocí nelineární regrese.

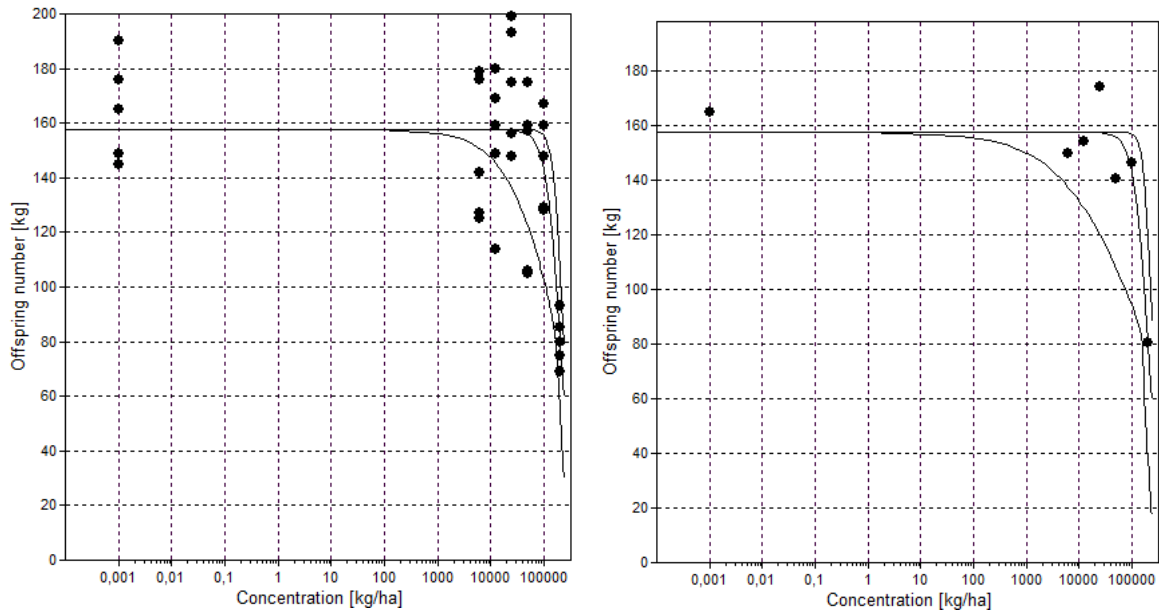
V případě, že hodnoty ECx nejsou uvedeny, buď regresní model nešlo spočítat nebo nebyl signifikantní.



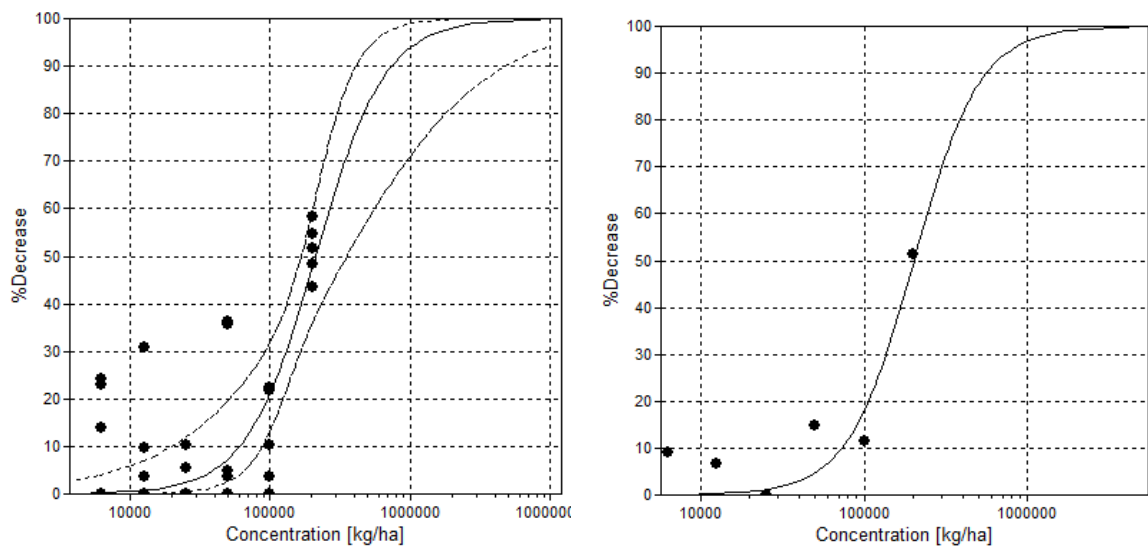
Obr. 4. Graf nelineární regrese s funkcí logit závislosti počtu juvenilů roupice *Enchytraeus crypticus* na dávce testovaného materiálů T2. Vlevo je graf pro všechna data, vpravo pro průměry. Zobrazeny jsou 95% konfidenční intervaly.



Obr. 5. Graf lineární regrese s funkcí logit závislosti počtu juvenilů roupice *Enchytraeus crypticus* na dávce testovaného materiálů T2. Vlevo je graf pro všechna data, vpravo pro průměry. Zobrazeny jsou 95% konfidenční intervaly. Obrázky zobrazují modely spočtené bez korekce variance.



Obr. 6. Graf nelineární regrese s funkcí logit závislosti počtu juvenilů roupice *Enchytraeus crypticus* na dávce testovaného materiálů T4. Vlevo je graf pro všechna data, vpravo pro průměry. Zobrazeny jsou 95% konfidenční intervaly. Obrázky zobrazují modely spočtené bez použití vah.



Obr. 7. Graf lineární regrese s funkcí logit závislosti počtu juvenilů roupice *Enchytraeus crypticus* na dávce testovaného materiálů T4. Vlevo je graf pro všechna data, vpravo pro průměry. Zobrazeny jsou 95% konfidenční intervaly. Obrázky zobrazují modely spočtené bez korekce variance.

Literatura

- ISO/TS 20281, Water quality - Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data. ISO, **2006**.
- JPP 31300.1, Zkouška inhibice reprodukce a mortality chvostoskoka *Folsomia candida*. Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III, ÚKZÚZ, Brno, **2011**.
- JPP 31290.1, Zkouška inhibice reprodukce roupice *Enchytraeus crypticus*. Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III, ÚKZÚZ, Brno, **2011**.
- OECD Series on testing and assessment Number 54, Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD, **2006**.

Příloha

Data použitá pro statistické testy. První řádek obsahuje dávku testovaného přípravku.

Její hodnoty jsou v různých jednotkách, což na výpočet nemá vliv.

Data T1, počet juvenilů *Enchytraeus crypticus*

0	25	50	100	200	400	800
166	110	169	117	25	9	0
173	175	126	104	40	8	0
152	150	165	128	19	8	0
152	142	133	134	29	8	0
159	157	151	139	29	8	0

Data T2, počet juvenilů *Enchytraeus crypticus*

0	5000	10000	20000	40000	80000	160000
174	157	157	137	93	93	89
156	152	162	111	104	87	69
178	130	143	122	125	99	72
159	135	165	137	123	80	67
139	160	139	144	109	86	75

Data T3, počet juvenilů *Enchytraeus crypticus*

0	25	50	100	200	400	800
145	179	250	185	98	15	1
154	148	264	148	150	12	4
145	156	231	69	114	8	3
177	142	260	261	140	13	0
171	134	162	162	161	11	0

Data T4, počet juvenilů *Enchytraeus crypticus*

0	6250	12500	25000	50000	100000	200000
165	142	114	193	175	167	93
149	125	149	148	157	159	75
190	179	159	199	105	148	69
145	127	169	156	159	128	85
176	176	180	175	106	129	80

Data T5, počet juvenilů *Enchytraeus crypticus*

0	250	500	1000	2000	4000	8000
195	212	174	252	194	138	69
210	204	212	250	200	215	69
207	208	175	258	188	218	41
197	259	213	250	170	194	46
170	184	216	238	188	207	76

Data T6, počet uhynulých dospělých jedinců *Folsomia candida* z původního počtu deset

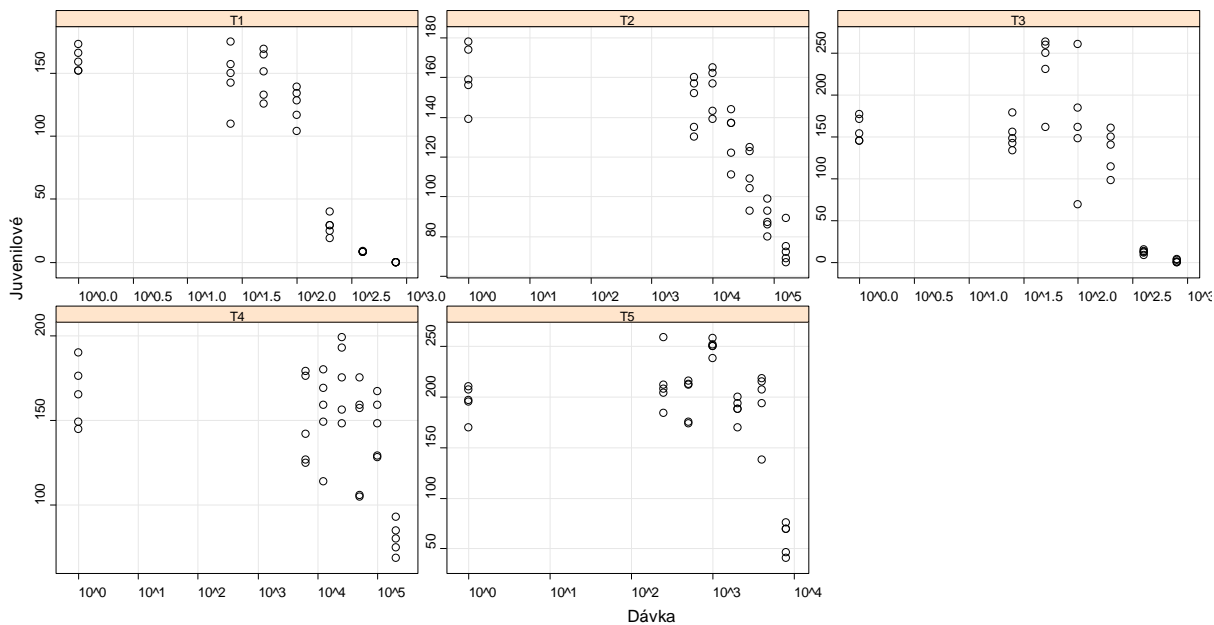
0	38	75	150	300	600	1200
2	3	10	3	10	10	10
1	4	4	6	10	10	10
4	3	5	6	10	10	10
1	4	4	5	10	10	10
2	3	4	4	6	10	10

Data T7, počet uhynulých dospělých jedinců *Folsomia candida* z původního počtu deset

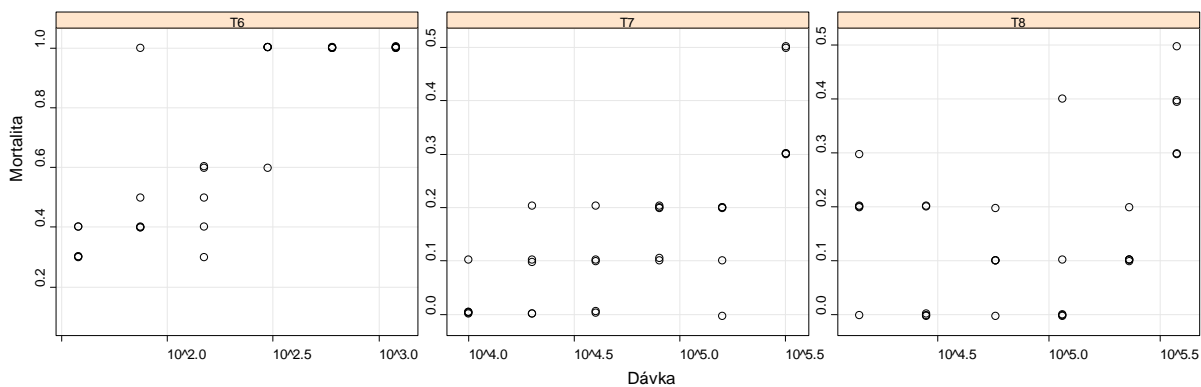
0	10000	20000	40000	80000	160000	320000
0	1	2	1	2	0	3
2	0	1	0	1	2	3
0	0	1	0	2	2	5
0	0	0	2	1	2	5
0	0	0	1	2	1	3

Data T8, počet uhynulých dospělých jedinců *Folsomia candida* z původního počtu deset

0	14000	28000	57500	115000	230000	378000
0	3	0	1	0	1	4
2	0	2	1	1	1	3
0	2	0	1	4	1	4
0	2	0	2	0	2	5
0	2	2	0	0	1	3



Grafické zobrazení vztahu dávka-odpověď pro testy s reprodukci roupice *Enchytraeus crypticus*. Data na ose x jsou na logaritmické škále.



Grafické zobrazení vztahu dávka-odpověď pro testy s mortalitou chvostokoka *Folsomia candida*. Mortalita je vyjádřena jako poměr uhynulých jedinců k celkovému počtu (10) vložených do testu. Data na ose x jsou na logaritmické škále.

Využití NIR spektroskopie pro stanovení vybraných parametrů ve vzorcích brambor

Alena Balarinová, Radvana Šulová, David Čížmár

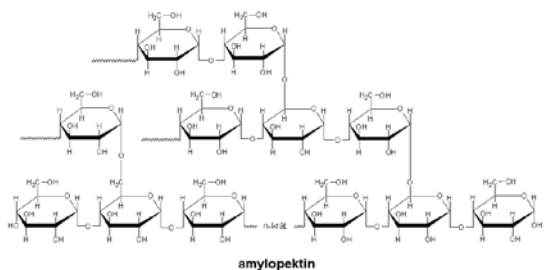
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

1 Úvod

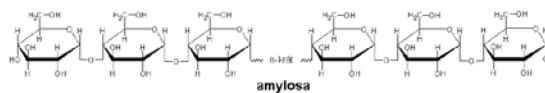
Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) je jednoletá hlíznatá okopanina patřící do čeledi lilkovitých (Solanaceae). Chemické složení hlízy je do značné míry diferencované a obsahy výživových látek se s časem neustále mění, což byl hlavní důvod, proč bylo nezbytně nutné pracovat s celými hlízami.

Bramborová hlíza je složena z velkého množství živin, z nichž největší je zastoupení sacharidů, a to jak složitých (škroby a polysacharidy), tak jednoduchých (glukóza, fruktóza nebo sacharóza).

Obsah škrobu se pohybuje v rozmezí 13–24 % čerstvé hmoty (č. h.), jako průmyslové odrůdy jsou označovány ty s obsahem nad 18 % č. h. Škrob se skládá ze dvou hlavních složek, a to polysacharidů amylopektinu (80 %) a amylozy (20 %). Jejich rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti jsou dány jejich odlišným uspořádáním D-glukózových řetězců (viz Obr. 1. a 2.)



amylopektin



amyloza

Obr. 1. Amylopektin

Obr. 2. Amylóza

Ostatní polysacharidy (celulóza, hemicelulóza, pektiny, hexózy a pentózy) jsou označovány jako vláknina. Jejich obsah je cca 2,2 g ve 100 g brambor.

Obsah cukrů v bramborách se průměrně pohybuje kolem asi 0,5 % č. h. Nejvíce je zastoupena sacharóza, glukóza a fruktóza. Poslední dva zmíněné jsou označovány jako redukující cukry a jejich obsah je v bramborách často kontrolován. Důvodem je vznik hnědých produktů při procesu smažení. Ty vznikají při reakci s aminokyselinami (Maillardova reakce) právě

při vyšším obsahu redukujících cukrů. Obsahy konkrétních sacharidů jsou – sacharóza: 0,09–0,25 % v sušině, glukóza: 0,02–0,2 % v sušině, fruktóza: 0,11–0,4 % v sušině. Množství cukrů je výrazně ovlivňováno skladovacími podmínkami.

Dusíkaté látky v bramborách lze rozdělit na bílkovinnou a nebílkovinnou frakci. Podíl bílkovinné části se pohybuje v širokém rozmezí a to mezi 35–70 %. Jako příčiny bývají udávány například změny podmínek prostředí nebo odrůda bramboru. Bílkovina je tvořena hlavně globuliny (tuberin), albuminy (tuberinin), protaminy a gluteiny (oba méně). Nebílkovinný dusík je zastoupen volnými aminokyselinami (asi 3,5 %), kdy se navíc hodnoty indexu esenciálních aminokyselin pohybují okolo 83 % vaječného standardu a je ceněný i vysoký obsah lyzinu. Další nebílkovinný dusík tvoří amidy, bazické dusíkaté sloučeniny nebo například purinové deriváty adeninu.

Hlíza má navíc vysoký obsah vody (hlavně u dříve dozrávajících odrůd), který zaujímá asi 76 % č. h. Její funkce je hlavně metabolická a obsah se během pěstování i skladování rapidně mění. Sušina hlízy se v průměru pohybuje okolo 24 % (13–37 %) č. h., přičemž je tvořena ze 70 % škrobem; 9,5 % N-látkami; 3 % sacharidy; 2,5 % organickými kyselinami; 2,5 % minerálními látkami, 1 % tuku a asi 0,5 % vitaminů. Kromě zmíněných látek se v hlízách nachází také polyfenoly, karotenoidy nebo glykoalkaloidy.

Důvodem pro zavedení alternativní metody pro analýzu brambor bylo zvýšené množství požadavků na stanovení základních výživových látek jako je sušina, škrob, dusíkaté látky a cukr ze strany Sekce zemědělských vstupů.

Stanovení klasickými laboratorními referenčními metodami je poměrně dlouhé a ekonomicky náročné, a proto bylo nutné uvažovat o jiné dostatečně přesné metodě, která by analýzy výše zmíněných parametrů nahradila. Na základě odborné literatury a rešerží byla v ONRL Brno OdTO vybrána metoda NIR spektroskopie, která splňuje hned několik požadavků (rychlost, přesnost, správnost, ekonomičnost, nízké ekologické zatížení prostředí, nedestruktivní využití vzorku) na analýzu v moderní zemědělské laboratoři.

Jelikož NIR spektroskopie je metodou sekundární, bylo cílem práce nejprve stanovení vzorků laboratorními referenčními metodami a následné vytvoření a ověření vhodných kalibračních modelů pro jednotlivé parametry a současně vyhodnocení predikčních schopností těchto modelů pro další využití v praxi.

2 Materiál a metody

2.1 Laboratorní referenční metody pro stanovení vybraných parametrů u brambor

2.1.1 Stanovení vlhkosti

Stanovení obsahu vlhkosti v bramborách vychází z normy ČSN 46 70 92-3. Obsah vlhkosti je stanoven gravimetricky jako úbytek po vysušení vzorku při 55 °C a dosušení při 105 °C. Měření je prováděno ve třech opakováních.

2.1.2 Stanovení obsahu dusíkatých látek (hrubý protein)

Stanovení obsahu hrubého proteinu vychází z normy ČSN ISO 1871 a Nařízení Komise (ES) 152/2009 zveřejněného v Úředním věstníku EU dne 27. 1. 2009 (L 54/15-19, 2009). Dusíkaté látky se stanoví metodou dle Kjeldahla. Nejprve je provedena mineralizace vzorku kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru a kyselý roztok je dále alkalizován hydroxidem sodným. Následně je takto vytěsněný amoniak jímán do kyseliny borité a titrován standardním roztokem kyseliny sírové. Stanovení je prováděno ve dvou paralelních opakováních a musí být splněna podmínka opakovatelnosti. Ta je dána koncentrační hladinou dusíkatých látek (viz Tabulka 1.).

Tabulka 1. Opakovatelnost pro stanovení obsahu N-látek

Obsah N-látek	Opakovatelnost
< 20 %	0,2 % abs.
20–40 %	1,0 % rel.
> 40 %	0,4 % abs.

2.1.3 Stanovení obsahu škrobu

Stanovení obsahu škrobu vychází z normy ČSN 46 7092-21 a Nařízení Komise (ES) 152/2009 zveřejněného v Úředním věstníku EU (L 54/47-49, 2009). Škroby jsou stanovovány polarimetricky (měření optické otáčivosti) po hydrolýze kyselinou chlorovodíkovou a odstranění bílkovin Carrezovými činidly. Měření je prováděno ve dvou opakováních a opakovatelnost je dána pro dvě koncentrační hladiny (viz Tabulka 2.).

Tabulka 2. Opakovatelnost pro stanovení obsahu škrobu

Koncentrační hladina	Opakovatelnost
< 40,0 %	0,4 % abs.
≥ 40,0 %	1,0 % rel.

2.1.4 Stanovení obsahu cukrů

Stanovení obsahu cukrů vychází z Nařízení Komise (ES) 152/2009 zveřejněného v Úředním věstníku EU (L 54/42-45, 2009). Provádí se titračně dle Luff-Schoorla, kdy metoda umožňuje stanovení obsahu redukujících cukrů (vyjádřených jako glukóza) a zároveň i veškerých cukrů po inverzi (vyjádřených jako sacharóza).

U analýzy se postupuje ve dvou krocích, nejprve se stanovují redukující cukry (glukóza a fruktóza) a to samostatně bez hydrolýzy, a následně je provedena hydrolýza, při které dochází k rozštěpení sacharózy na zmíněné dva monosacharidy. V obou případech jsou cukry stanoveny metodou dle Luff-Schoorla, tzn. redukující cukry redukují za varu v alkalickém prostředí měďnatou sůl na oxid měďný. Nezareagovaný přebytek měďnaté soli se stanoví jodometricky. Stanovení se provádí ve dvou paralelních opakováních a opakovatelnost je dána pro dvě koncentrační hladiny (viz Tabulka 3.).

Tabulka 3. Opakovatelnost pro stanovení obsahu cukrů

Koncentrační hladina	Opakovatelnost
1,5–10 %	0,3 % abs.
≥ 10 %	3 % rel.

2.2 Stanovení metodou NIR spektroskopie

Obecně platí, že vytvoření NIR kalibračního modelu pro požadovaný parametr spočívá ve vztažení informace získané absorpcí záření v NIR oblasti k hodnotě stanovené laboratorní referenční metodou (LRM). Takto je získán vzájemný poměr a z něho regresní závislost.

Pro vytvoření vhodného kalibračního modelu platí základní požadavek, a to dostatečné množství vzorků, které splňují požadavky na standardně analyzované vzorky. Také jejich příprava musí být stejná, jak pro analýzu LRM, tak metodu NIR spektroskopie. Koncentrační rozsah stanovovaného parametru by měl být co nejširší (viz Tabulka 4.) a kalibračních vzorků by mělo být nejméně 50. Čím vyšší je počet vzorků, tím je model robustnější a méně náchylný ke změnám při zařazení nových kalibračních vzorků, stejně jako k chybám měření. Samozřejmostí je využití dostatečně přesných LRM. Pokud je to možné, je vždy nutné provádět stanovení referenčními metodami v paralelním opakování. Pro tvorbu kalibračního modelu je použita jejich průměrná hodnota.

Vzorky, které byly využité pro tvorbu kalibračních rovnic u brambor, pocházely z regionálního pracoviště ÚKZÚZ Lípa (Pracoviště brambor), přičemž hlavní shromažďování dat probíhalo v letech 2012–2016. Během této doby bylo analyzováno více než 120 vz. resp. 160 vz. (sušina,

škrob) brambor různých varných typů a ranosti (viz Tabulka 4.). V loňském a letošním roce se pokračovalo s optimalizací stávajících kalibračních modelů, a zároveň se započalo s tvorbou nových modelů za využití jiné měřící kyvety.

Tabulka 4. Složení vzorků brambor použitých pro kalibrační modely.

	Sušina (%)	N-látky (%/s)	Škrob (%/s)	Cukr (%/s)	Cukr/h (%/s)
N_K (počet vzorků)	174	120	165	117	122
Minimum	12,96	6,33	52,54	0,03	0,12
Maximum	35,56	11,53	80,01	8,36	9,89
Průměr	20,99	9,13	70,22	2,55	3,89

Měření bylo prováděno na přístroji Nicolet Antaris s Fourierovou transformací, za použití transreflektanční kyvety s výškou reflexní plochy 1 mm a rozlišením 2 cm⁻¹; v rozsahu vlnových délek 1000–2500 nm. Každý vzorek byl z důvodu vysoké vlhkosti vzorku (rozmělnění kuchyňským mixerem) snímán ve čtyřech opakováních a bylo vybráno nejpřesnější spektrum (dle křížové validace), aby byla zajištěna co největší přesnost pro daný kalibrační model. Pro jeho tvorbu byl použit software TQ Analyst.

Prvním krokem tvorby kalibračního modelu bylo zvolení PLS algoritmu kvantitativní analýzy, vložení hodnot referenčních metod a následná optimalizace modelu. Ta spočívala nejprve v použití matematické korekce spekter SNV, která eliminuje vliv velikosti částic. Na takto upravených spektrech byla provedena analýza hlavních komponent (PCA), která je vhodná k identifikaci odlehlých měření (spekter) a zároveň ověří, zda případně vyloučené vzorky nejsou důležité pro vlastní kalibraci (např. extrémní body odpovídající nové odrůdě nebo koncentrační abnormalitě), což by mělo za následek snížení robustnosti vytvářeného modelu.

Další optimalizace se týkala úpravy spekter na základě hodnot korelačního koeficientu R a středních kvadratických chyb predikce (jak kalibrace RMSEC, tak křížové validace RMSECV). K tomu bylo využito několika metod – první derivace spekter, vyhlazení spekter dle Norrisova derivačního filtru, vyloučení odlehlých spekter dle diagnostiky Spectrum outlier za využití Chauvenetova testu, a v neposlední řadě kontrola celého modelu křížovou validací. Dle grafu diferencí výsledků bylo nutné provést kontrolu odlehlých výsledků, zjištěných zmíněnou křížovou validací, a tyto z kalibračního modelu odstranit.

Dalšími prvky využitelnými pro tvorbu kalibračního modelu je také diagnostika PRESS, která určuje ideální množství PLS faktorů (hlavních komponent) pro dostatečné popsání modelu. Množství použitých faktorů udává minimum tzv. PRESS křivky, a zároveň vyjadřuje nejnižší

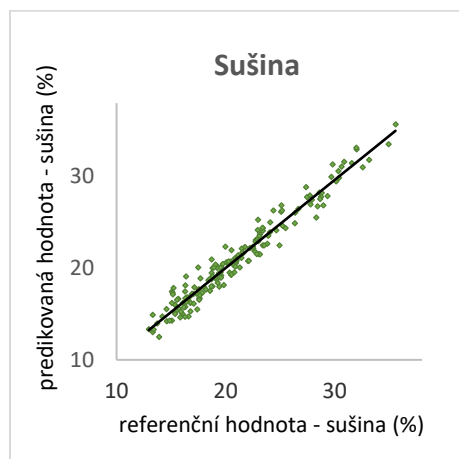
chybu měření. Důležitý je také výběr vhodného rozmezí vlnových délek, a to takového, ve kterém je zřejmá největší korelace s laboratorními referenčními hodnotami.

Výsledkem takto optimalizovaného kalibračního modelu je graf referenčních versus NIR predikovaných koncentrací (kalibrační závislost) a z něj vyplývající hodnota korelačního koeficientu (požadavek na co nejvyšší) a hodnota střední kvadratické chyby predikce křížové validace RMSECV (požadavek na co nejnižší, ale zároveň reálnou hodnotu, co nejvíce podobnou chybě měření LRM). Jako kontrola vytvořeného kalibračního modelu slouží validace – interní (křížová validace; použita přímo při tvorbě modelu) a externí za využití neznámých vzorků nezahrnutých do tvorby kalibračního modelu. Kontrola se provádí na základě porovnání dvou metod (LRM vs. NIR) na shodnost rozdílů výsledků pomocí Studentova t-testu. Výsledky jsou porovnány s kritickými hodnotami t_{α} pro hladinu významnosti 0,05.

3 Výsledky a diskuze

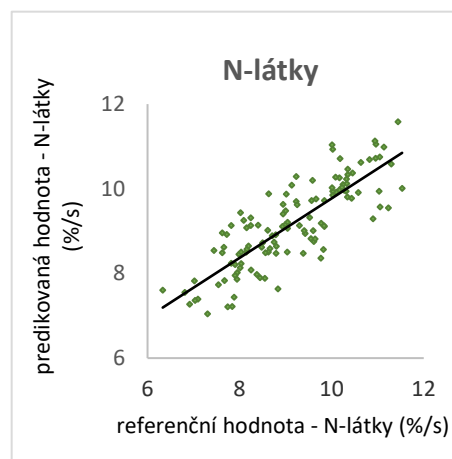
3.1 Výsledky

Na základě výsledků LRM byly vytvořeny kalibrační modely pro pět stanovovaných parametrů metodou NIR spektroskopie ve vzorcích brambor. Kalibrační závislosti jsou graficky znázorněny na obrázcích 3–7.



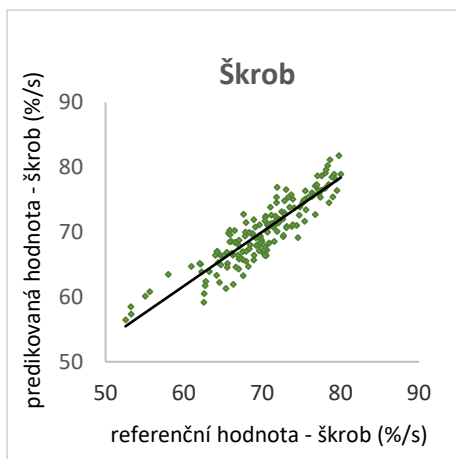
Obr. 3.

Obr. 3. Kalibrační závislost pro parametr sušina (%)

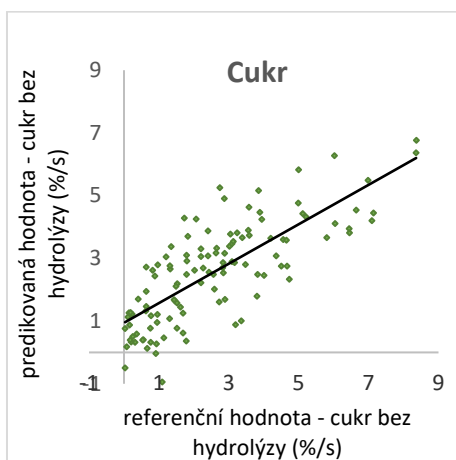


Obr. 4.

Obr. 4. Kalibrační závislost pro parametr N-látky (%/s)

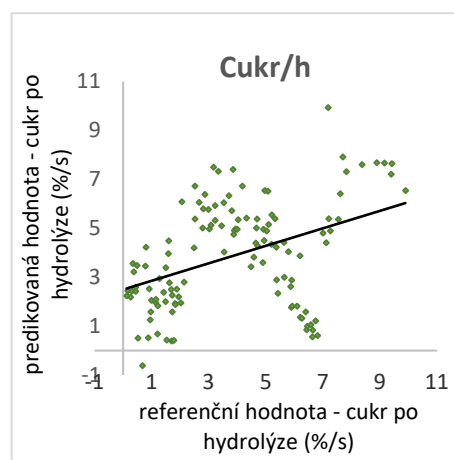


Obr. 5. Kalibrační závislost pro parametr škrob (%/s).



Obr. 6.

Obr. 6. Kalibrační závislost pro parametr cukr (%/s).



Obr. 7.

Obr. 7. Kalibrační závislost pro parametr cukr po hydrolýze (%/s).

Souhrnný přehled získaných kvalitativních parametrů kalibračních modelů pro vybrané parametry v bramborách je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5. Kvalitativní parametry kalibračních modelů pro vzorky brambor.

Parametr	RMSECV	R
Sušina (%)	1,05	0,9777
N-látky (%/s)	0,67	0,8277
Škrob (%/s)	2,35	0,9031
Cukr (%/s)	1,24	0,7752
Cukr/h (%/s)	1,41	0,8223

Legenda: RMSECV – střední kvadratická chyba predikce křížové validace; R – korelační koeficient

Z tabulky 5 je zřejmé, že získané hodnoty korelačního koeficientu pro parametry sušina, N-látky a škrob jsou vysoké a to 0,98; 0,83; 0,90. Chybám stanovení pro tyto parametry odpovídají i hodnoty RMSECV.

Predikční schopnosti těchto kalibračních modelů pro jednotlivá stanovení 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, že rozdíl $|\bar{x}_A - \bar{x}_B|$ není statisticky významný na zvolené hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Pro testování shodnosti byl využit Studentův t-test. Vypočtené hodnoty t-testu byly porovnány s kritickou hodnotou t_α . Výsledky pro jednotlivé parametry jsou znázorněny v tabulce 6.

Studentův t-test:

Hladina významnosti: $\alpha = 0,05$

Kritická hodnota (13 vz): $t_\alpha = 1,782$

Př. parametr – sušina:

$$t = |\bar{x}_A - \bar{x}_B| \sqrt{\frac{n \times (n-1)}{\sum(D_i - \bar{D})^2}}$$

$$t = |29,59 - 29,31| \sqrt{\frac{13 \times 12}{8,98}}$$

$$t = 1,167$$

$$t_\alpha = 1,782$$

$$t < t_\alpha$$

Tabulka 6. Kontrola predikčních schopností jednotlivých kalibračních modelů Studentovým t-testem.

Parametr	n	\bar{x}_A (LRM)	\bar{x}_B (NIR)	α	t	t_α (0,05)
Sušina (%)	13	29,59	29,31	0,05	1,17	1,782
N-látky (%/s)	13	7,70	7,80	0,05	0,86	1,782
Škrob (%/s)	13	75,51	75,75	0,05	0,79	1,782
Cukr (%/s)	13	1,39	0,55	0,05	2,08	1,782
Cukr/h (%/s)	13	2,48	1,67	0,05	2,03	1,782

Legenda: n – 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 t-testu; t_α – kritická (tabulková) hodnota Studentova t-testu

Z tabulky 6 je zřejmé, že vypočtené hodnoty t pro parametry sušina, N-látka a škrob jsou nižší oproti tabulkové hodnotě t_{α} . Z čehož vyplývá, že metoda NIR spektroskopie poskytuje statisticky shodné výsledky a je tedy vhodná jako náhrada pro stávající laboratorní referenční metody. Pro parametry cukr a cukr po hydrolýze byly hodnoty t vyšší než kritická hodnota t_{α} a lze tedy říci, že metoda NIR spektroskopie neposkytuje statisticky shodné výsledky a pro stanovení těchto parametrů ve vzorcích brambor je tedy nevhodná.

3.2 Diskuze

Bramborové hlízy jsou nehomogenní materiál s velmi různorodým a proměnlivým složením, z čehož plyne i velká variabilita v obsazích jednotlivých složek. Tato skutečnost musela být zohledněna jak při stanovení LRM, tak metodou NIR spektroskopie. Obdobné problémy byly řešeny i v odborné literatuře týkající se NIR spektroskopie a bylo ověřeno, že nejmenší chyby predikce dosahovaly vzorky mixované a homogenizované. Jinými slovy, během stanovení NIR spektroskopii je nanejvýš nutné udržet vzorek v co nejvíce homogenizovaném stavu. V našem případě, v zájmu zachování co největší přesnosti, se jednalo o opakované promíchávání vzorku a vícenásobné snímání na přístroji. (pozn. včetně testování jiného typu kyvety)

Dalším problémem, se kterým se lze při vytváření kalibračního modelu setkat, je nejnižší možná stanovitelná koncentrace, která se uvádí okolo 1 g/kg (Míka, 2008). Toto je pravděpodobně jeden z důvodů nevyhovujících kalibračních modelů pro parametry cukr a cukr po hydrolýze, kdy se část vzorků svým obsahem cukrů blížila mezi stanovení. Jak již bylo zmíněno, tyto kalibrační modely i přes snahu o co nejlepší optimalizaci, nepřinesly požadované výsledky. Nejen, že se nepodařilo najít co nejnižší chybu predikce křížové validace a nejvyšší kalibrační koeficient, ale ani vytvoření reálného modelu použitelného pro neznámé vzorky nebylo úspěšné (pozn. chyba křížové validace musí odpovídat chybě stanovení LRM).

Důležitým faktem, který je nutné zmínit, je ten, že v našich podmínkách se u metody NIR standardně pracuje s koncentracemi látek vyjádřenými v sušině. Při porovnání výsledků s odbornou literaturou, která výsledky obsahů látek v ovoci a zelenině častěji uvádí v čerstvé resp. původní hmotě, je tedy nutné zvolit přepočítání ze sušiny zpět do čerstvé hmoty.

Vytvořené kalibrační modely ovšem nelze považovat za definitivní. Je důležité říci, že každý vyhovující model je nutné rekalibrovat (tzn. doplňovat o nové vzorky) a následně opět optimalizovat. Rekalibrací a zmíněnou optimalizací se totiž zvyšuje robustnost celého modelu a tím i jeho přesnost a predikční schopnosti.

4 Závěr

Cílem této práce bylo ověřit možnosti využití NIR spektroskopie pro stanovení hlavních výživových parametrů u brambor. Pro tvorbu kalibračních modelů bylo analyzováno více než 100 vz. (cukr, cukr/h, N-látky), respektive 150 vz. (sušina a škrob) různých odrůd brambor, varného typu i ranosti. Vzorky byly stanoveny laboratorními referenčními metodami a zároveň NIR spektroskopii. Z prezentovaných grafů kalibračních závislostí a hodnot kvalitativních parametrů (RMSECV, R) vytvořených kalibračních modelů je zřejmé, že hodnoty korelačních koeficientů pro sušinu a škrob stanovené LRM a predikované metodou NIR spektroskopie spolu vysoce korelují (0,98; 0,90), zatímco u stanovení N-látek, cukru a cukru po hydrolýze byly hodnoty korelačního koeficientu nižší (0,83; 0,78 a 0,82). V případě N-látek byla ovšem střední kvadratická chyba predikce křížové validace (RMSECV) odpovídající chybě stanovení laboratorní referenční metodou, a z toho důvodu lze potvrdit, že vytvořený kalibrační model je pro stanovení tohoto parametru vhodný, i vzhledem ke zmíněné nižší hodnotě korelačního koeficientu. Tato situace neplatí u parametrů cukr a cukr po hydrolýze, kdy nejen že byla nízká hodnota korelačního koeficientu (R), ale zároveň se metodou NIR spektroskopie nepodařilo ideálně přiblížit chybě stanovení laboratorní referenční metodou. Z tohoto důvodu lze tvrdit, že pro parametry cukr a cukr po hydrolýze není využití metody NIR spektroskopie vhodné. Závěrem lze tedy říci, že metodou NIR spektroskopie lze parametry sušina, škrob a N-látky predikovat a je možné stanovení laboratorními referenčními metodami metodou NIR spektroskopie nahradit.

5 Literatura

1. Čepl, J. a kol., 2009: Konzumní brambory na poli, zahradě a v kuchyni. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský. 203 s. ISBN 978-80-86940-23-0.
2. Čepl, J. a kol., 2012: Máme rádi brambory. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský. 111 s. ISBN 978-80-7434-060-4.
3. Hartmann, R., BÜNING-PFAUE, H., 1998: NIR determination of potato constituents. *Potato Research*. 41 (4): 327–334. ISSN 1871-4528.
4. Hodonská, A., 2008: Senzorická analýza brambor. Zlín. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
5. Hrabě, J., Rop, O., Hoza, I., 2005: Technologie výroby potravin rostlinného původu. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická. 178 s. ISBN 80-7318-372-2.
6. Kozelková, M., 2012: Využití FT NIR spektroskopie v mlékárenském průmyslu. Brno. Doktorská disertační práce. Nepubl. Mendelova univerzita v Brně. Agronomická fakulta. Ústav technologie potravin.
7. López, A. a kol., 2013: A review of the application of Near-Infrared Spectroscopy for the analysis of potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (23): 5413–5424.

8. Míka, V. a kol., **2008**: Spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR). Výběr praktických aplikací v zemědělství. Metodika pro praxi. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. 48 s. ISBN 978-80-87011-53-9.
9. Nařízení komise (ES) č. 152/**2009** ze dne 27. ledna **2009**, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv. Úřední věstník Evropské unie. L 54. CS verze dokumentu z 26. 2. **2009**. [online]
10. Úřední věstník Evropské unie L 54/15-19, 42-45, 47-49. [online]
11. ČSN 46 70 92-3: Metody zkoušení krmiv-Část 3: Stanovení obsahu vlhkosti. **1999**
12. ČSN 46 7092-21: Metody zkoušení krmiv-Část 21: Stanovení obsahu škrobu, **1998**
13. ČSN ISO 1871: Potraviny a krmiv-Obecné pokyny pro stanovení dusíku metodou podle Kjeldahla. 10/**2010**.

Stanovení obsahu kofeinu v krmivech

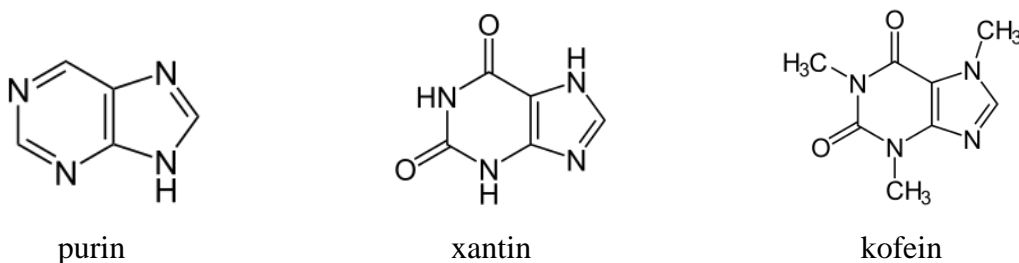
Šárka Plhalová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Opava, Jaselská 16, 746 23 Opava

1 Úvod

Kofein spolu s theobrominem a theophylinem patří mezi rostlinné alkaloidy. Jedná se o ethylderiváty xantinu. Jsou to alkaloidy s purinovým jádrem, skupinově označované také jako xantinové alkaloidy. Jsou přirozeně obsaženy v mnoha vyšších rostlinách, většinou všechny tři společně, vždy však s výraznou převahou jednoho z nich. Prvořadým smyslem alkaloidů obsažených v rostlinách je zřejmě vlastní ochrana rostliny před živočichy jako jsou hmyz, larvy a brouci. Mezi rostliny s nejvyšším obsahem methylxantinů patří cesmína paraquayská, kávovník, čajovník, kola a kakaovník. Methylxantiny v nízkých nebo terapeutických dávkách stimulují kardiovaskulární systém a centrální nervový systém, ale v případě příjmu vyšších dávek dochází u zvířat ke klinickým projevům otravy.

Kofein, 1,3,5 - trimethylxantin, patří podle struktury mezi purinové alkaloidy, které jsou odvozeny od purinu, respektive od produktu jeho oxidace xantinu (Obr. 1).



Obr. 1. Chemické vzorce purinových alkaloidů.

3 Materiál a metody

3.1 Princip metody

Obsah kofeinu se stanoví po extrakci vzorku směsí rozpouštědel chloroform – amoniak metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Chloroform.
- 2 Mořský písek.
- 3 Amoniak, koncentrovaný, vodný roztok 25%.
- 4 Amoniak, roztok 20%.
Příprava: 400 ml koncentrovaného amoniaku (3) se smíchá se 100 ml vody (12) a promíchá.
- 5 Acetonitril pro HPLC.
- 6 Octan sodný, krystalický.
- 7 Octan sodný, roztok $c = 0,01$ mol/l.
Příprava: 0,8203 g krystalického octanu sodného (6) se rozpustí ve vodě (12) v 1000 ml odměrné baňce a doplní po značku.
- 8 Kofein, min. 99%.
- 9 Kofein, základní standardní roztok, $c = 0,1$ g/l.
Příprava: 100 mg kofeinu (8) se rozpustí v 1000 ml odměrné baňce v cca 500 ml vody za použití ultrazvukové lázně. Po rozpuštění a vytemperování se doplní po značku vodou (12).
- 10 Mobilní fáze, pH = 4, octan sodný (7) + acetonitril (5).
Příprava: Octan sodný (7) a acetonitril (5) se smíchají v poměru 9 + 1 (V/V).
Hodnota pH se zkontroluje na pH metru. Pokud pH neodpovídá požadované hodnotě, upraví se pomocí kyseliny octové (11).
- 11 Kyselina octová, koncentrovaná.
- 12 Voda (deionizovaná nebo demineralizována).

3.3 Přístroje a pomůcky

- 1 Ultrazvuková lázeň.
- 2 Extrakční zařízení podle Soxhleta nebo Twisselmana.
- 3 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detektorem.
- 4 Zmýdelňovací baňky, 250 ml.
- 5 Extrakční patrony, cca 30 × 90 mm.
- 6 Nástříkový filtr Nylon, 0,45 μm.
- 7 pH metr.

4 Pracovní postup

4.1 Extrakce

Krmné suroviny

Do nízké kádinky o objemu 150 ml se naváží asi 30 g mořského písku (2) a 1 g zhomogenizovaného vzorku. Obsah kádinky se dobře promíchá a převede do extrakční patrony (5). Zbytky vzorku na stěnách kádinky se důkladně setřou vatou, která se použije na uzavření extrakční patrony. Obsah patrony se před uzavřením zvlhčí 5 ml roztoku amoniaku (4) a patrona se ponechá v uzavřené nádobě přes noc.

Patrona se vloží do extrakčního zařízení (2) a extrahuje se 150 ml chloroformu (1) po dobu 7 h. Poté se rozpouštědlo odpaří do sucha a jeho zbytky se odstraní proudem dusíku. Odparek se rozpustí ve 100 ml mobilní fáze (10) v ultrazvukové lázni (1) při 60 °C a zfiltruje přes hustý filtr. Před nástřikem na analytickou kolonu se ještě podle potřeby naředí a přefiltruje přes nástřikový filtr (6).

Krmné směsi

Do extrakční patrony se naváží 5 až 10 g zhomogenizovaného vzorku. Zvlhčí se 10 ml roztoku amoniaku (4) a uzavře vatovou zátkou. Patrona se ponechá v uzavřené nádobě přes noc.

Patrona se vloží do extrakčního zařízení (2) a extrahuje se 150 ml chloroformu (1) po dobu 7 h. Poté se rozpouštědlo odpaří do sucha a jeho zbytky se odstraní proudem dusíku. Odparek se rozpustí ve 100 ml mobilní fáze (10) v ultrazvukové lázni (1) při 60 °C a zfiltruje přes hustý filtr. Před nástřikem na analytickou kolonu se ještě podle potřeby naředí a přefiltruje přes nástřikový filtr (6).

4.2 Chromatografické stanovení

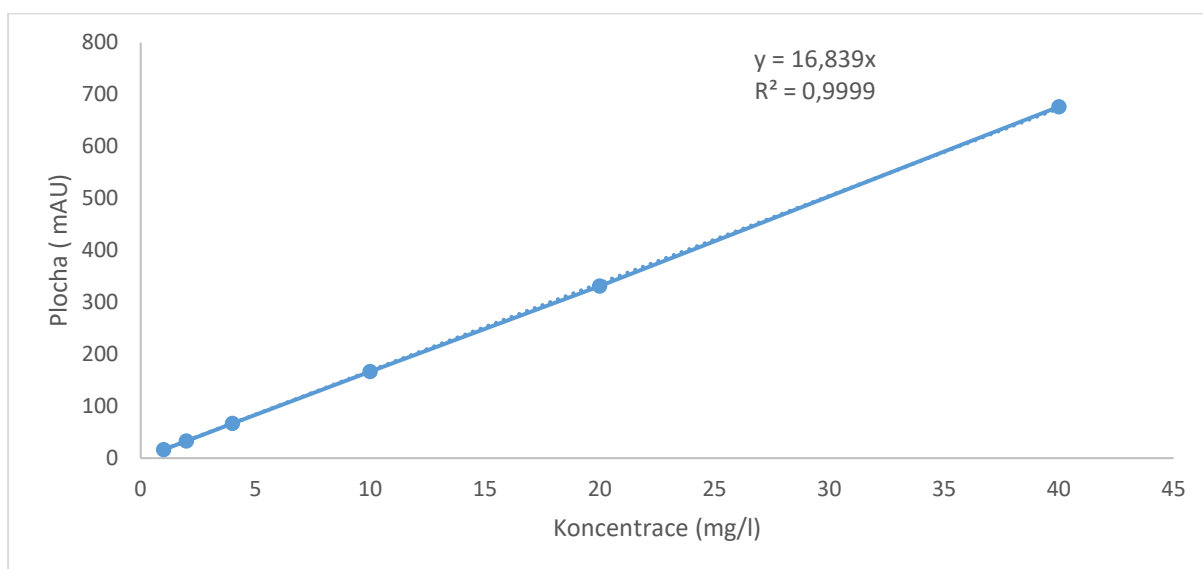
Obsah kofeinu se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s použitím UV detekce.

Kalibrace

Do sady 100ml odměrných baněk se pipetuje postupně (1; 2; 4; 10; 20; 40) ml základního standardního roztoku kofeinu (9), doplní se vodou (12) po značku a promíchá. Sada kalibračních roztoků odpovídá koncentraci kofeinu (1; 2; 4; 10; 20; 40) mg/l. Takto připravené roztoky se nástřikují na analytickou kolonu HPLC. Hodnoty odpovídajících ploch píků slouží k sestrojení kalibrační křivky. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č.1.

Tabulka 1. Příprava kalibrační křivky.

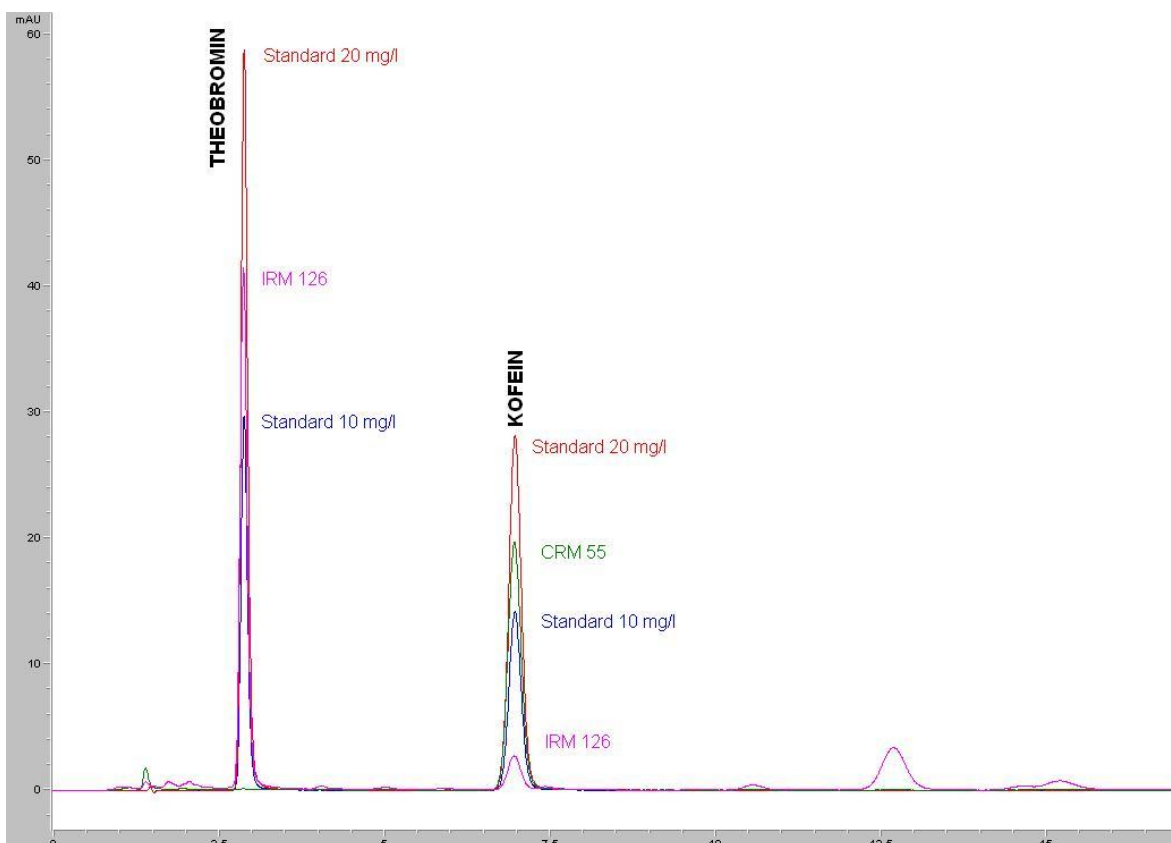
Koncentrace mg/l	1	2	4	10	20	40
Odezva (plocha) mAU	16,48	32,66	66,80	166,8	331,5	676,7

**Obr. 2. Kalibrační přímka kofeinu.****Separální podmínky HPLC**

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému (tabulka č.2).

Tabulka 2. Příklad podmínek chromatografického stanovení.

Kolona	Nucleodur PolarTec, 5 μm, 150\times3 mm (Macherey-Nagel)
Mobilní fáze	(10)
Průtok mobilní fáze	0,7 ml/min
Teplota kolony	okolí
Detektor UV	280 nm
Objem nástřiku	5 μ l
Retenční čas kofeinu při lab. teplotě	6,9 min
Retenční čas theobrominu při lab. teplotě	2,8 min



Obr. 3. Ukázka chromatogramu kofeinu a theobrominu.

5 Výpočet

Obsah kofeinu (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m}$$

c koncentrace kofeinu ve zkušební vzorku, zjištěná z kalibračního grafu (mg/l)

V objem mobilní fáze, ve kterém je rozpuštěn odparek (ml)

m hmotnost zkušební vzorku (g)

R ředění

6 Výsledky a diskuse

6.1 Validace

Validace metody byla provedena na reálných vzorcích krmných směsí s využitím certifikovaného materiálu mleté kávy (CRM 55). V rámci validace byly hodnoceny parametry linearita, opakovatelnost, správnost, mez detekce a stanovitelnosti, citlivost a nejistoty měření.

Linearita

Linearita byla určena z hodnot naměřených kalibračních standardů. Získané hodnoty, které jsou uvedeny v tabulce č.2, byly vloženy do programu EffiValidation 3.0. Linearita byla ověřena v rozsahu koncentrací 1 – 40 mg/l. Vyhodnocení je uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3. Linearita: Korelační a QC koeficient.

Vypočtený korelační koeficient	Testovaný korelační koeficient	Vypočtený QC	Testovaný QC	Hypotéza
0,99995	0,99000	1,17	5,00	Přijata

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

Opakovatelnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty způsobené náhodnými chybami. Tento validační parametr byl stanoven dvěma způsoby. Jednak vícenásobným měřením certifikovaného materiálu za podmínek měření opakovatelnosti, tj. v jedné laboratoři, stejným analytikem, na stejném přístroji, v co nejkratším čase a z paralelních měření reálných vzorků. Hodnoty měření reálných vzorků jsme rozdělili do dvou koncentračních hladin. 1. koncentrační hladina 3,01 – 100 mg/kg kofeinu a 2. koncentrační hladina >100 mg/kg kofeinu. Naměřené hodnoty byly zpracovány pomocí programu EffiValidation 3.0. Jednotlivá měření a vyhodnocení jsou uvedena v tabulkách č. 4 – 9.

Tabulka 4. Opakovatelnost - vícenásobné měření CRM 55.

Vzorek	Měření						Průměr mg/kg
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	
CRM 55	14710	15090	14799	15179	14490	15185	14909

Tabulka 5. Vyhodnocení: Opakovatelnost – vícenásobné měření CRM 55.

Vzorek	Opakovatelnost mg/kg	Relativní opakovatelnost %	Požadovaná opakovatelnost %
CRM 55	286,04	1,92	10,0

Tabulka 6. Opakovatelnost: Paralelní měření reálných vzorků, konc. hladina (3,01-100) mg/kg.

Vzorek	Materiál	Měření 1 mg/kg	Měření 2 mg/kg	Průměr mg/kg
107	KS selata	18,19	17,48	17,84
109	KS selata	17,82	16,88	17,35
114	KS králíci	6,930	6,172	6,551
115	KS nosnice	9,858	9,564	9,711
159	KS selata	29,05	28,71	28,88
160	KS prasata	24,86	24,62	24,74
168	Cukrovinky	48,32	45,16	46,74
169	Cukrovinky	67,75	64,49	66,12
172	KS prasata	5,666	5,647	5,657
173	KS prasata	20,99	20,47	20,73
175	KS prasata	10,35	10,60	10,48
193	KS prasata	20,61	20,27	20,44
194	KS dojnice	20,04	21,58	20,81

Tabulka 7. Vyhodnocení: Opakovatelnost z paralelních měření reálných vzorků, konc. hladina (3,01-100) mg/kg.

Průměr měření	Opakovatelnost mg/kg	Relativní opakovatelnost %	Požadovaná opakovatelnost %
22,77	0,9934	4,36	10,0

Tabulka 8. Opakovatelnost: Paralelní měření reálných vzorků, konc. hladina > 100 mg/kg.

Vzorek	Materiál	Měření 1 mg/kg	Měření 2 mg/kg	Průměr mg/kg
162	Kakaové slupky	1189	1153	1171
163	Kakaové slupky	1263	1328	1296
164	Kakaové slupky	1236	1206	1221
165	Kakaový, částečně loupaný extrah šrot	1320	1252	1286
166	Kakaový, částečně loupaný extrah. šrot	1385	1306	1346
167	Cukrovinky	394,7	379,4	387,1
170	Cukrovinky	269,1	269,9	269,5
171	Cukrovinky	275,3	274,5	274,9

Tabulka 9. Vyhodnocení: Opakovatelnost z paralelních měření reálných vzorků, konc.hladina >100 mg/kg

Průměr měření	Opakovatelnost mg/kg	Relativní opakovatelnost %	Požadovaná opakovatelnost %
906,3	33,09	3,65	10,0

Závěr: Opakovatelnost paralelních stanovení splňuje požadovanou opakovatelnost do 10 %.

Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s deklarovanou referenční hodnotou. Pro stanovení správnosti metody byl použit referenční materiál CRM

Fapas – ground coffee (CRM 55). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu EffiValidation 3.0. Naměřené hodnoty a vyhodnocení jsou uvedeny v tabulkách č. 10 a č. 11.

Tabulka 10. Správnost – Omezený koncentrační rozsah, referenční materiál k dispozici.

Vzorek	Měření						Průměr mg/kg
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	
CRM 55	14710	15090	14799	15179	14490	15185	14909

Tabulka 11. Vyhodnocení: Správnost – Omezený koncentrační rozsah, referenční materiál k dispozici.

Vzorek	Referenční hodnota mg/kg	Naměřeno mg/kg	Výtěžnost %	Referenční přesnost mg/kg	Přesnost mg/kg	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
CRM 55	14500	14909	102,8	1100	286,0	přijata	přijata

Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky přesné a správné výsledky.

Mez detekce a stanovitelnosti

Mez detekce je úroveň, nad kterou lze odezvu vzorku věrohodně odlišit od odezvy slepého pokusu, tzn., že nad ní lze provést kvalitativní stanovení. Mez stanovitelnosti je minimální hodnota, nad kterou lze provést kvantitativní stanovení. Meze byly vypočteny z velikosti hodnoty signálu slepého pokusu. Podmínkou je mít k dispozici chromatogram slepého pokusu a směrnici kalibrační přímky. Naměřené hodnoty byly zpracovány programem EffiValidation 3.0. Vyhodnocení je uvedeno v tabulce č. 12.

Tabulka 12. Vyhodnocení: Meze - ze signálu slepého pokusu.

Maximální kolísání základní linie	0,028 mAU
Směrnice kalibrační přímky	0,100
Mez detekce	0,8 mg/kg
Mez stanovitelnosti	2,8 mg/kg

Citlivost

Citlivost je změna odezvy vyvolaná jednotkovou změnou koncentrace. Je dána směrnicí kalibrační přímky. K určení citlivosti byla použita data uvedená v tabulce č. 1 a byla

vyhodnocena pomocí programu EffiValidation 3.0.

Závěr: Citlivost analytické metody daná směrnici kalibrační přímky je 16,90.

Nejistoty

Relativní standardní nejistota a relativní rozšířená nejistota byly stanoveny z hodnot paralelních stanovení 21 vzorků krmných směsí. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulkách č. 6 a č. 8. Výpočet byl proveden v programu EffiValidation 3.0 - Nejistoty z přesnosti - paralelní měření k dispozici. Vypočtené nejistoty pro stanovení obsahu kofeinu jsou uvedeny v tabulce č. 13 a č. 14.

Tabulka 13. Nejistoty z přesnosti – paralelní měření k dispozici, konc. rozsah (3,01 – 100) mg/kg.

Vypočtená hodnota [mg/kg]	22,77
Standardní nejistota [mg/kg]	0,99
Relativní standardní nejistota [%]	4,36
Faktor pokrytí	1,96
Rozšířená standardní nejistota [mg/kg]	1,95
Relativní rozšířená nejistota [%]	8,55

Tabulka 14. Nejistoty z přesnosti – paralelní měření k dispozici, konc. rozsah >100 mg/kg.

Vypočtená hodnota [mg/kg]	906,1
Standardní nejistota [mg/kg]	33,27
Relativní standardní nejistota [%]	3,67
Faktor pokrytí	1,96
Rozšířená standardní nejistota [mg/kg]	65,21
Relativní rozšířená nejistota [%]	7,19

6.2 Porovnání výsledků

Bylo vybráno šest vzorků krmných směsí, ve kterých byl stanoven obsah kofeinu metodou HPLC a metodou LC-MS na pracovišti Odboru NRL Brno. Získané hodnoty byly zpracovány pomocí programu EffiValidation 3.0. Porovnání výsledků bylo provedeno t-testem. Naměřené hodnoty a vyhodnocení je uvedeno v tabulkách č. 15 a č. 16.

Tabulka 15. Hodnoty obsahu kofeinu v mg/kg.

Vzorek	Metoda HPLC	Metoda LC-MS
159	28,88	28,38
160	24,74	23,70
172	5,66	6,48
173	20,73	21,89
175	10,48	13,56
194	21,44	18,90

Tabulka 16. Srovnání 2 metod/laboratoří: t-test na rozdíl výsledků.

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza
-0,16333	1,95589	-2,21625 - 1,88958	Přijata

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky.

7 Závěr

V rámci vývojového úkolu č. 10.01/2016 byla v laboratoři ONRL Opava již zavedená metoda stanovení theobrominu v krmivech technikou HPLC s UV detekcí rozšířena o další parametr kofein, a to pro obsahy nad 3 mg/kg kofeinu.

Byly stanoveny validační parametry linearita, opakovatelnost, správnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, citlivost a nejistoty měření. Bylo prokázáno, že ověřovaná metoda stanovení kofeinu je způsobilá k používání pro zkoušení krmiv na obsah nežádoucích látek.

8 Literatura

1. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10542.1.
2. Centner, V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0
3. Vrtalová J.: Bakalářská práce: Přídavné látky v potravinách, Fakulta zdravotnických studií, **2014**
4. Fuksová H.: Bakalářská práce: Aplikace metody HPLC ke stanovení methylxantinů v potravinách, Masarykova univerzita, Ústav chemie, **2008**
5. Faltýnková M.: Bakalářská práce: Charakteristika kofeinu a možnosti jeho stanovení, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, **2011**
6. Svobodová Z. a kolektiv: Veterinární toxikologie v klinické praxi, **2008**

Bulletin Národní referenční laboratoře XXIII 2019/1

Ročník: XXIII, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2019

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 49

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196