

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2014

Ročník XVIII, číslo 2/2014

Brno 2014

Obsah

1. **Zavedení metody stanovení vitamínu D v krmivech s využitím techniky LC**
Martina Bolechová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
2. **Stanovení obsahu dusitanů a dusičnanů v silážích a senážích**
Eva Fojtlová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 12
3. **Vývoj kalibrační rovnice na olej ve vzorcích máku metodou FT-NIRS**
David Čížmár, Radvana Šulová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 31

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Zavedení metody stanovení vitamínu D v krmivech s využitím techniky LC

Martina Bolechová, spolupráce Zuzana Nehybová, Petra Kosubová, Hana Tkadlečková

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

1 Souhrn

V laboratoři NRL-RO Brno byla zavedena metoda pro stanovení cholekalciferolu (vitamín D₃) v krmivech. Metoda přípravy vzorku vychází z normy ČSN EN 12821 (560047). Zpracované vzorky se analyzují ultra-účinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrickou detekcí (UPLC-MS/MS). Tato metoda je vhodná pro stanovení vitamínu D₃ v premixech, v minerálních krmivech a v kompletních krmných směsích obsahujících i méně než 2000 m.j./kg vitamínu D₃.

2 Úvod

NRL-RO Brno kontroluje deklaraci o množství cholekalciferolu (vitamínu D₃) v premixech, minerálních krmivech a v kompletních krmných směsích (KKS). Množství tohoto vitamínu se v jednotlivých kontrolovaných komoditách liší. V premixech je obvyklé zastoupení vitamínu D₃ v řádech statisíců m.j./kg a v minerálních krmivech v řádech desetitisíců m.j./kg. Kompletní krmné směsi obsahují nejméně vitamínu D₃, (maximálně 10000 m.j./kg), přičemž nejčastější koncentrační výskyt je v této matici v rozmezí od 2000 m.j./kg do 5000 m.j./kg. Množství vitamínu D₃ v KKS upravuje legislativa a liší se podle druhu zvířete, pro které je krmivo určeno [1]. V případě požití krmiva s příliš vysokým obsahem vitamínu D (např. vitamín D₃ nebo vitamín D₂) může dojít k poškození zdraví zvířete s následkem smrti vlivem tzv. hyperkalcémie.

Vitamín D₃ se stanovuje v NRL-RO Brno podle akreditovaného postupu, který vychází z normy ČSN EN 12821 (560047) [2]. Pro stanovení celkového obsahu vitamínu D₃ se vzorek nejdříve zmýdelní hydroxidem draselným s následnou extrakcí do hexanu. Obsah vitamínu D₃ se stanoví chromatograficky pomocí UPLC-MS/MS.

Metoda stanovení byla v první fázi optimalizována pro analýzu vitamínu D₃ v premixech a v minerálních krmivech, tj. v materiálech s vysokými obsahy vitamínu D₃. Tato metoda však nebyla vhodná pro analýzu kompletních krmných směsí, která se vyznačují vysokou variabilitou a složitostí a zároveň velice nízkými obsahy vitamínu D₃. Původní měřicí metoda byla proto přepracována tak, aby bylo možné ověření deklarovaných obsahů vitamínu D₃ v kompletním krmivu s obsahem pod 2000 m.j./kg.

Cílem práce bylo zavést metodu pro stanovení vitamínu D₃, která bude splňovat potřebná identifikační kritéria [3] na hladině alespoň 2000 m.j./kg a umožní jednoduchou kvantifikaci nízkých obsahů vitamínu D₃ v KKS.

3 Materiál a metody

Seznam použitých chemikálií a činidel, příprava vzorků k analýze a koncové stanovení jsou uvedeny v JPP Zkoušení krmiv, postup 10271.1 [4], který je zveřejněn na www.ukzuz.cz. Sledovaným analytem je cholekalciferol (vitamín D₃). Podmínky měření uvádějí tabulky 1 a 2.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky UPLC stanovení.

Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Předkolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Nástřik	2,5 μl
Slabý promývací roztok	Deionizovaná voda/methanol (90/10)
Silný promývací roztok	Methanol
Mobilní fáze A	0,1% kyselina mravenčí v deionizované vodě
Mobilní fáze B	0,1% kyselina mravenčí a 1mM mravenčan amonný v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Gradient mobilní fáze	0 min (90 % B) – 2 min (98 % B) – 2,9 min (98 % B) – 3 min (90 % B) – 5 min (90 % B) – 10 min (10 % B)

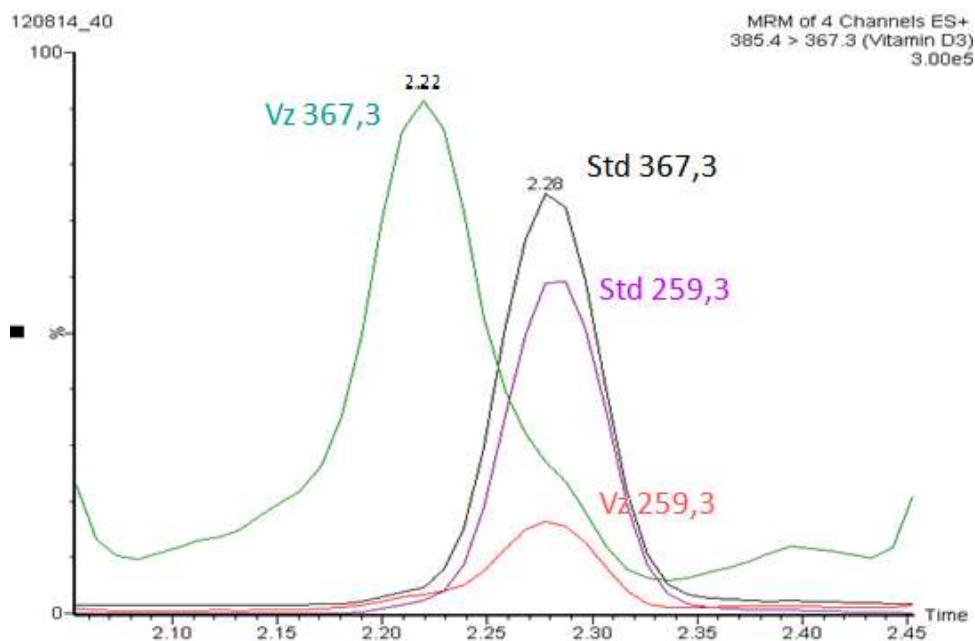
Tabulka 2. Podmínky stanovení pro Xevo TQ MS Waters.

	RT (min)	Prekursor ion (m/z)	CV (V)	Produktový ion (m/z)	CE (V)
Vitamín D₃	2,27	385,4	22	259,3	12
				247,4	12

4 Výsledky a diskuse

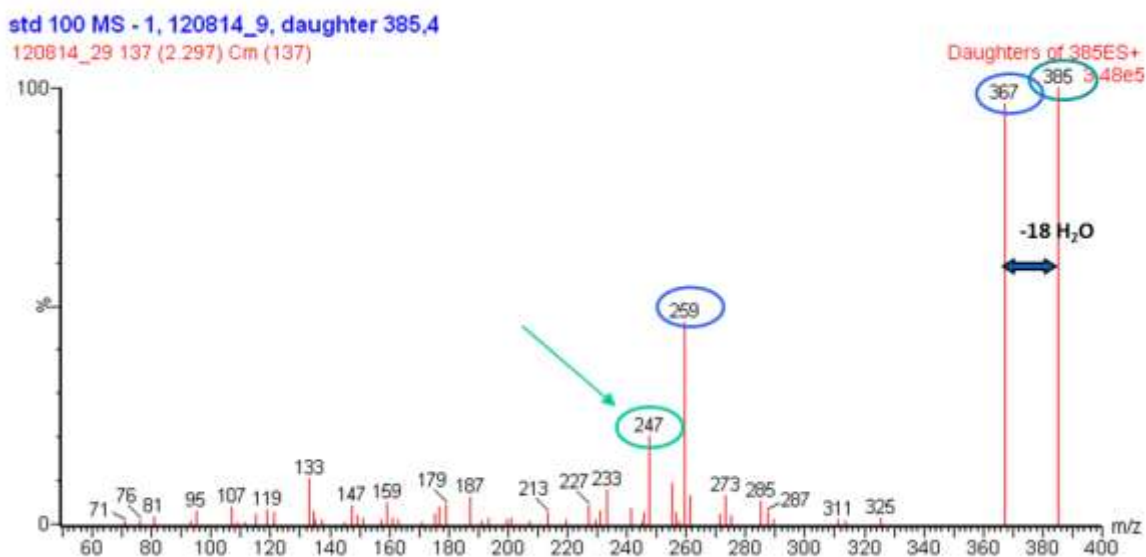
4.1 Selektivita metody

Jedním z důležitých validačních parametrů je selektivita stanovení. Selektivita je definována jako schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V hmotnostní spektrometrii je mírou selektivity hmotnostní spektrum, které je charakteristické pro každou látku. Selektivita detekce je splněna v případě, že poměr intenzity sledovaných iontů zůstává zachován u standardu i reálných vzorků. Přítomnost charakteristických iontů a jejich poměr jsou důležitá identifikační kritéria pro potvrzení identity sledované látky. V případě analýzy vitamínu D₃ se v MRM (multi reaction monitoring) módu původně sledovaly dva přechody (m/z 385,4 $\rightarrow$ m/z 367,3 a m/z 385,4 $\rightarrow$ m/z 259,3) a jejich vzájemný poměr. Mezi identifikační kritéria se v případě stanovení zahrnující chromatografickou separaci řadí také retenční čas (RT) [3]. Při analýze reálného vzorku byla po aplikaci pomalého průtoku mobilní fáze (0,4 ml/min) zvýšena vedle citlivosti také chromatografická separace, díky níž bylo možné pozorovat významné ovlivnění kvantifikačního MRM přechodu (m/z 385,4 $\rightarrow$ m/z 367,3) maticí, jak je patrné z obrázku 1. Ačkoliv je pík analytu ve vzorku při m/z 367,3 (Vz 367,3) stále v tolerovaném 2,5% rozmezí retenčního času standardu (Std 367,3 a Std 259,3) [3], je zde patrná koeluce několika píků, viditelná nad druhým píkem m/z 259,3 (Vz 259,3) ve vzorku. Při kvantifikaci využívající přechod m/z 385,4 $\rightarrow$ m/z 367,3 by tedy mohlo dojít k nadhodnocení obsahu analytu ve vzorku.



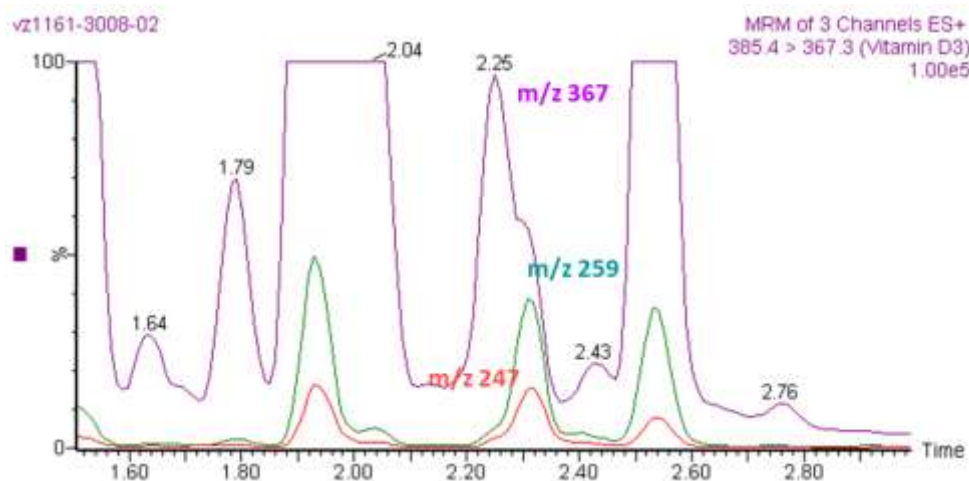
Obrázek 1. MRM přechody pro sledování vitamínu D3 ve vzorku (Vz 367,3 a Vz 259) a ve standardu (Std 367,3 a Std 259,3).

Původní kvantifikační přechod m/z 385,4 $\rightarrow$ m/z 367,3 odpovídající ztrátě molekuly vody byl shledán nespecifickým pro stanovení vitamínu D₃ ve složitých maticích jako KKS a bylo nutné nalézt jiný přechod, který by nebyl ovlivněn koextrakty přítomnými v těchto maticích. Z produktového spektra iontu m/z 385,4 (obrázek 2) byl vybrán přechod m/z 385,4 $\rightarrow$ m/z 247,4.



Obrázek 2. Produktové spektrum iontu m/z 385,4.

Následná analýza vzorků kompletních krmiv potvrdila nespecifičnost přechodu m/z 385,4 $\rightarrow$ m/z 367,3 (obrázek 3) a zároveň možnost použití iontu m/z 259,3 ke kvantifikaci a iontu m/z 247,4 ke konfirmaci pro sledování vitamínu D₃ v kompletní krmné směsi, neboť jejich poměr zůstává v reálných vzorcích zachován.



Obrázek 3. MRM přechody pro sledování vitamínu D₃ ve vzorku kompletní krmné směsi.

4.2 Zvýšení citlivosti metody

Mez stanovitelnosti, nebo také limit kvantifikace (LOQ), je úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení. Mez stanovitelnosti původní metody (3200 m.j./kg) byla vhodná pouze pro účely sledování vitamínu D₃ v premixech a v minerálním krmivu, kde se hodnoty tohoto analytu pohybují nad 10000 m.j./kg. Pro kontrolu obsahu vitamínu D₃ v KKS bylo nutné limit kvantifikace snížit alespoň na 2000 m.j./kg [1].

Chromatografické podmínky byly optimalizovány s cílem zvýšit citlivost metody. Nejdříve byl testován vliv průtoku mobilní fáze (MF). Snížením průtoku z původní hodnoty 0,65 ml/min na 0,4 ml/min došlo k nárůstu odezvy na dvojnásobek (obrázek 4). Poté následovalo testování vlivu složení MF. Byly testovány tři typy MF:

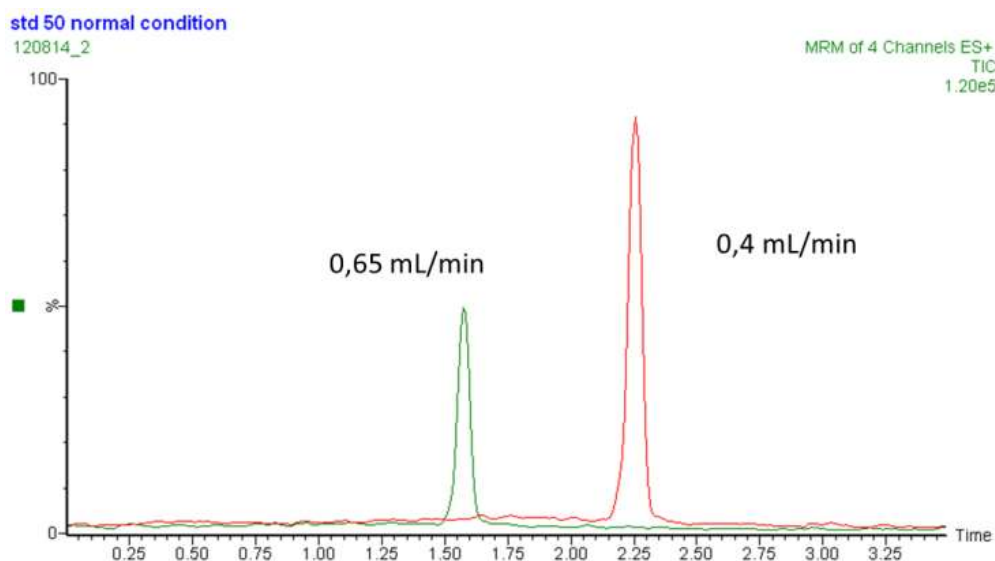
A: 0,1% CH₃COOH v H₂O a 0,1% CH₃COOH v MeOH (původní složení),

B: 0,1% HCOOH v H₂O a MeOH;

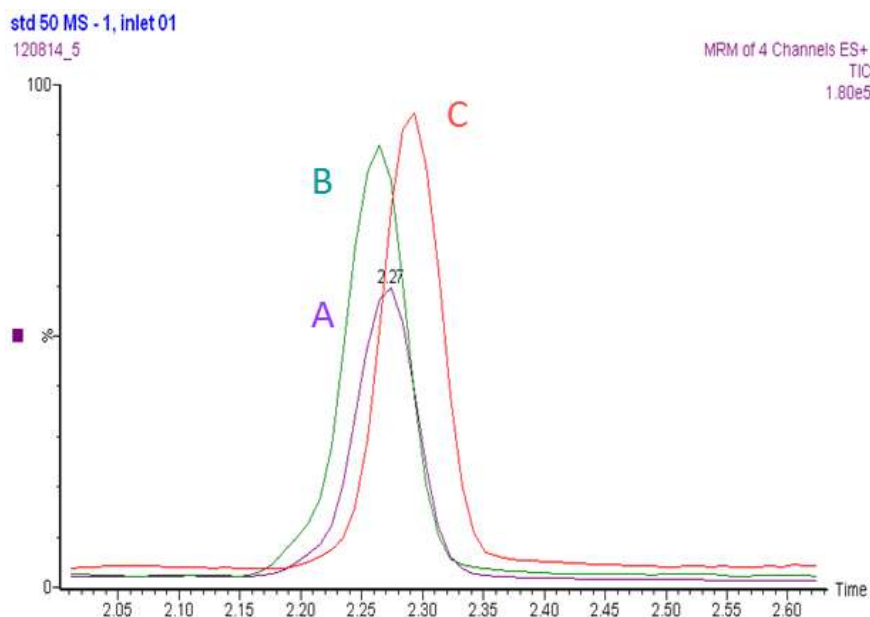
C: 0,1% HCOOH v H₂O a 0,1% HCOOH + 1mM HCOONH₄ v MeOH.

Na zvýšení citlivosti měla nejvýznamnější vliv MF obsahující aditivum kyselinu mravenčí a její amonnou sůl (C) (obrázek 5). Experimentálně byl tedy opět prokázán pozitivní vliv kyseliny mravenčí na zvýšení signálu analytu při elektrosprejové ionizaci při detekci kladných

iontů (ESI^+). Modifikovaná metoda umožnila snížení limitu kvantifikace z 3200 m.j./kg na 500 m.j./kg.



Obrázek 4. Testování vlivu průtoku MF na intenzitu signálu.



Obrázek 5. Testování složení MF.

A – 0,1% CH_3COOH v H_2O a MeOH (původní složení),

B – 0,1% HCOOH v H_2O a MeOH,

C – 0,1% HCOOH v H_2O a 0,1% HCOOH + 1mM HCOONH_4 v MeOH.

4.3 Nejistota stanovení

Stanovení nejistoty vychází z vícenásobného měření vitamínu D₃ v krmivu s obsahem 500 m.j./kg, tj. s obsahem v oblasti limitu kvantifikace (tabulka 3). Rozšířená nejistota odpovídá směrodatné odchylce dat stanovených pro hodnocení přesnosti vynásobené faktorem pokrytí 2. Požadavek na nejistotu byl splněn [3].

Tabulka 3. Nejistota stanovení.

Měření	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
m.j./kg	462,1	596,6	453,3	374,9	380,3	403,9	18,6

4.4 Kvantifikace vitamínu D₃

V případě LC-MS analýz je vlivem ionizace pozorován matriční efekt (ME). Jedná se o ovlivnění signálu analytu přítomností matrice. Koncentrace vypočtená z externí kalibrace v rozpouštědle tak může být nadhodnocená nebo podhodnocená v závislosti na tom, jestli se uplatňuje tzv. pozitivní nebo negativní ME. Z hlediska komplexnosti matrice jsou minerální krmiva a premixy poměrně jednoduché matrice. Ke kvantifikaci vitamínu D₃ může být snadno použita externí kalibrace v rozpouštědle, neboť lze případné ME snadno ošetřit. Díky vysokému obsahu vitamínu D₃ v premixech a minerálních krmivech a zároveň nízkému limitu kvantifikace se může extrakt například zredit, přičemž dochází ke snížení obsahu matričních koextraktů, a tím k eliminaci případných ME.

Tento přístup však nelze aplikovat v případě přípravy vzorku KKS pro LC-MS/MS analýzu vitamínu D₃. Krmné směsi představují různorodé vícesložkové matrice s nízkými obsahy vitamínu D₃, u jejichž přípravy k analýze se často využívá zkoncentrování extraktu, které vede zároveň ke zkoncentrování matričních koextraktů způsobujících ME. V takovém případě je kvantifikace pomocí externí kalibrace v rozpouštědle zcela nevhodná. Stále však existuje několik kvantifikačních přístupů, které lze využít.

Jedním z nich je kvantifikace na externí kalibraci v matici. Tento způsob kvantifikace je ovšem nejen komplikovaný, ale navíc nepokryje variabilitu krmných směsí, ve kterých se vitamín D₃ stanovuje.

Dalším kvantifikačním přístupem je použití standardního přídatku. Jedná se o spolehlivou metodu kvantifikace vhodnou pro vzorky s vysokou variabilitou složení, jejichž hlavními

nevýhodami jsou zvýšená časová a finanční náročnost, neboť je nutné provést analýzy ve více opakováních a s přidavky standardu vitamínu D₃.

Třetím kvantifikačním přístupem je použití interního standardu (IS). Předpoklady pro správnou funkci IS je splnění následujících kritérií: látka má být

- (i) stabilní,
- (ii) dobře mísitelná se vzorkem,
- (iii) strukturně podobná analytu,
- (iv) s retenčním časem, který je shodný nebo velice podobný RT sledovaného analytu,
- (v) nepřítomna ve vzorku před analýzou.

Pro testování metody IS při kvantifikaci vitamínu D₃ v KKS byly vybrány následující sloučeniny: izotopově značený deuterovaný analog vitamínu D₃ (D₃-vitamín D₃) a ergokalciferol (vitamín D₂).

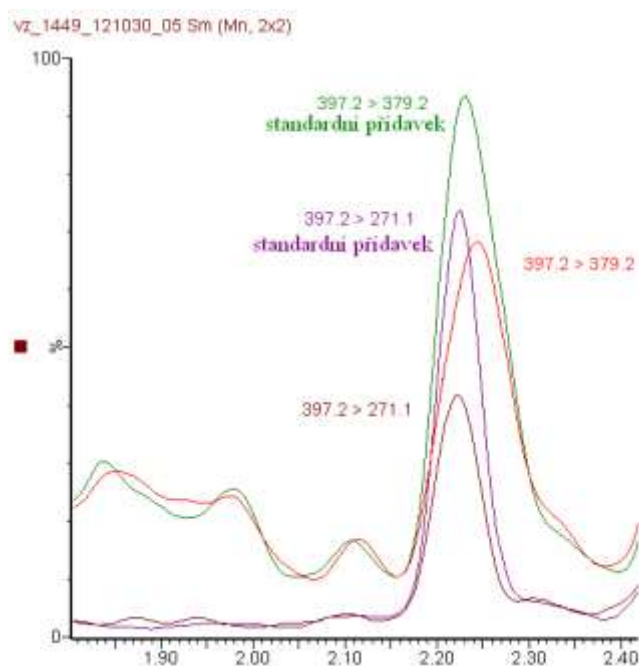
Po optimalizaci MRM podmínek pro sledování D₃-vitamínu D₃ a vitamínu D₂ byla zjišťována linearita kalibrační křivky závislosti poměru plochy píku vitamínu D₃ a aplikovaného IS na koncentraci vitamínu D₃ (tabulka 4).

Tabulka 4. Linearita kalibračních závislostí v rozsahu koncentrací vitamínu D₃ (2,5 – 250) ng/ml.

Plocha píku (vitamín D ₃ /IS)	Kvantifikační MRM (m/z)	R ²
Vitamín D ₃ /-	385,4 → 259,3	0,999655
Vitamín D ₃ /D ₃ -vitamín D ₃	385,4 → 259,3/388,4 → 247,1	0,999464
Vitamín D ₃ /D ₃ -vitamín D ₃	385,4 → 259,3/388,4 → 370,2	0,999053
Vitamín D ₃ /D ₃ -vitamín D ₃	385,4 → 259,3/388,4 → 259,1	0,999926
Vitamín D ₃ /Vitamín D ₂	385,4 → 259,3/397,2 → 271,1	0,996272
Vitamín D ₃ /Vitamín D ₂	385,4 → 259,3/397,2 → 379,2	0,986569

Tabulka 4 uvádí vedle korelačních koeficientů kalibračních závislostí s IS pro srovnání také hodnotu pro externí kalibraci nativního vitamínu D₃. Podmínka linearity byla splněna ve všech případech použití interního standardu s výjimkou použití nespecifického MRM

přechodu m/z 397,2 $\rightarrow$ m/z 379,2 pro ergokalciferol odpovídajícímu ztrátě molekuly vody. Pro účely kvantifikace vitamínu D_3 v krmných směsích metodou IS byl vybrán D_3 -vitamín D_3 . Vitamín D_2 nebyl shledán vhodným pro tyto účely z důvodu jeho přirozeného výskytu v některých krmných materiálech, například v KKS pro drůbež (obrázek 6). Identifikace ergokalciferolu proběhla na základě specifity MRM přechodů, standardního přidavku a porovnáním retenčních časů se standardem.



Obrázek 6. Potvrzení přítomnosti ergokalciferolu standardním přidavkem ve vzorku krmné směsi pro drůbež.

4.5 Ověření správnosti stanovení vitamínu D_3

Ověření správnosti stanovení vitamínu D_3 v krmných směsích bylo provedeno pomocí IRM ALVA 2011 (tabulka 5). Jedná se o KKS pro králíky. Ukazatelem správnosti metody bylo zvoleno z-skóre, které je počítáno podle následujícího vztahu:

$$z\text{-skóre} = (x_{\text{lab}} - x_{\text{ref}}) / \sigma_p \quad (1)$$

kde

x_{lab} ... je naměřená hodnota

x_{ref} ... je přidělená hodnota

σ_p ... je směrodatná odchylka pro daný parametr

Kvantifikace byla provedena třemi způsoby. Tabulka 5 zahrnuje výsledky získané metodou standardního přídatku a metodou externí kalibrace s korekcí ME pomocí interního standardu (D_3 -vitamín D_3 a ergokalciferolu). Referenční obsah vitamínu D_3 v IRM – ALVA 2011 byl (1354 ± 639) m.j./kg. Povolený rozsah z-skóre je v intervalu –2 až 2.

Tabulka 5. Ověření správnosti pomocí IRM – ALVA 2011.

Kvantifikace	Metoda standardního přídatku	IS (D_3 -vitamín D_3)			IS (vitamín D_2)	
Kvantifikační produktový ion (m/z)	259,3	247,1	370,2	259,1	271,1	379,2
Stanovený obsah vitamínu D_3 (m.j./kg)	1621	1776	1840	1880	n.d.	n.d.
z-skóre	0,42	0,66	0,76	0,82	x	x

n.d. ... nedetekován

Metoda standardního přídatku a metoda vnitřního standardu s použitím D_3 -vitamínu D_3 poskytla správné výsledky (tabulka 5). Z měření správnosti dále vyplynulo, že ergokalciferol není vhodné použít jako IS pro kvantifikaci vitamínu D_3 , neboť jej vlivem složitosti matrice nebylo možno ve vzorku detekovat.

4.6 Analýza krmných surovin živočišného původu

Krmné směsi jsou obecně tvořeny čtyřmi základními složkami: obilovinami, bílkovinnou složkou, minerálními látkami a vitamínovým premixem. Tyto směsi mohou v některých případech obsahovat v různém množství krmné suroviny živočišného původu, jako například masokostní, rybí nebo krevní moučky. Živočišný podíl může přirozeně obsahovat některé sloučeniny, kterými se zároveň kompletní krmivo při výrobě obohacuje. Je tedy pravděpodobné, že se některé doplňkové látky mohou vyskytovat v kompletním krmivu nad deklarovaným množstvím.

Pro potvrzení této úvahy byla během optimalizace provedena pilotní studie na přítomnost vitamínu D_3 ve vzorku rybích mouček, které mohou být součástí krmných směsí například pro psy a kočky. Provedená analýza potvrdila přítomnost vitamínu D_3 , a to v množství od 3328 m.j./kg do 13328 m.j./kg. Je-li tedy do krmiva s deklarovanou hodnotou vitamínu D_3 2000 m.j./kg dávkováno například 5 % rybí moučky s přirozeným obsahem vitamínu D_3

13328 m.j./kg, celkové množství vitamínu D₃ je 2670 m.j./kg krmiva. Je možné, že krmná směs s přídatkem živočišné složky obsahující přirozeně vitamín D₃ a s nadávkovaným vitamínem D₃ ve formě premixu, může obsahovat vyšší množství vitamínu D₃ než je jeho deklarovaná hodnota.

5 Závěr

Práce byla zaměřena na optimalizaci podmínek stanovení vitamínu D₃ v KKS s využitím UPLC-MS/MS systému. Optimalizovaná metoda je charakterizována nízkými limity kvantifikace a specificitou detekce. Zavedení IS eliminujícího ME umožňuje jednoduchou kvantifikaci analytu v různorodých KKS. Metoda byla dále ověřena pomocí IRM.

Validované parametry splňovaly legislativní požadavky [3]. Vyvinutá metoda je tedy vhodná pro stanovení vitamínu D₃ v krmivech.

Výsledky pilotní studie analýzy rybích mouček poukázaly na přirozenou přítomnost vitamínu D₃ v těchto živočišných tkáních. Může tak docházet k navýšení množství vitamínu D₃ v kompletních krmných směsích, vyrobených s přídatkem této složky.

6 Literatura

1. Vyhláška č. 356/2008 Sb. ze dne 16. září 2008, kterou se provádí zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
2. ČSN EN 12821 Potraviny – Stanovení vitamínu D metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – Stanovení cholekalciferolu (D3) nebo ergokalciferolu (D2).
3. Rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků (oznámeno pod číslem K(2002) 3044). Text s významem pro EHP (2002/657/ES).
4. JPP ÚKZÚZ: Zkoušení krmiv – postup 10271.

Stanovení obsahu dusitanů a dusičnanů v silážích a senážích

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

Odbor krmiv požadoval stanovení obsahu dusitanů a dusičnanů. Pro jednotlivé druhy krmiv udává platná legislativa pouze obsah dusitanů (vyjádřený jako obsah dusitanu sodného), přičemž v silážích a senážích není jeho obsah limitován vůbec. Proto se práce zaměřila na vývoj metody na stanovení obsahu dusitanů ve všech druzích krmiv, které jsou uvedeny v legislativě.

Maximální obsah dusitanů jako nežádoucí látky pro jednotlivé typy krmiv byl stanoven v době řešení této práce Směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2002/32/ES ze dne 7. května 2002 o nežádoucích látkách v krmivech. Příloha 1 uváděla maximální povolené limity pro obsah dusitanů takto: pro rybí moučky 60 mg NaNO₂/kg, pro kompletní krmné směsi 15 mg NaNO₂/kg.

V roce 2010 Směrnice Komise 2010/6/EU ze dne 9. února 2010 změnila přílohu 1 Směrnice 2002/32/ES a stanovila povolené obsahy dusitanů v krmivech takto:

- krmné suroviny s výjimkou rybí moučky 15 mg NaNO₂/kg,
- rybí moučka 30 mg NaNO₂/kg,
- kompletní krmiva s výjimkou krmiv pro psy a kočky 15 mg NaNO₂/kg,
- u kompletních krmiv pro psy a kočky s obsahem vlhkosti přesahujícím 20% není obsah limitován,
- obsah dusitanů není limitován v silážích.

Nařízení komise EU č. 574/2011 ze dne 16. června 2011 dále změnilo přílohu 1 směrnice 2002/32/ES a uvádí tyto limity:

- krmné suroviny s výjimkou rybí moučky 15 mg NaNO₂/kg,
- rybí moučka 30 mg NaNO₂/kg,
- kompletní krmiva s výjimkou krmiv pro psy a kočky 15 mg NaNO₂/kg,
- u kompletních krmiv pro psy a kočky s obsahem vlhkosti přesahujícím 20% není obsah limitován,
- obsah dusitanů není limitován v silážích a ve výrobcích a vedlejších výrobcích z cukrovky a třtiny cukrové a z výroby škrobu.

2 Materiál a metody

První fázi práce byla zaměřena na stanovení dusitanů pomocí iontové chromatografie. K zavedení metody byl vybrán soubor vzorků, ve kterém byly zastoupeny kompletní krmné směsi pro prasata a drůbež a rybí moučky.

Při zavádění metody se vycházelo z ČSN EN 12014-4 Potraviny – Stanovení obsahu dusičnanů a/nebo dusitanů – Část 4: IC metoda stanovení obsahu dusičnanů a dusitanů ve výrobcích z masa. Dále se vycházelo z aplikačního listu č. 112 od firmy Dionex: Determination of Nitrate a Nitrite in Meat Using High-Performance Anion –Exchange Chromatography.

Princip metody spočívá v tom, že dusitany se ze vzorku extrahují teplou vodou, vodný roztok se čistí buď pomocí přídavku acetonitrilu nebo pomocí SPE kolonek plněných silikagelem s navázanými C18 skupinami. Dusitany obsažené v roztoku se stanoví pomocí iontové chromatografie a UV detektoru při vlnové délce 205 nm.

Vzorky byly analyzovány na Iontovém chromatografu ICS 3000 od 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,

UV VIS detektor, typ AD 25.

K separaci byla použita aniontová kolona AS11 HC s příslušnou předkolonou AG 11 HC.

Byl použit eluent generátor s náplní KOH. Mobilní fáze byla generována v koncentraci od 2mM KOH do 100 mM KOH. K detekci se používal UV VIS detektor, vlnová délka 205 nm. Píky byly identifikovány porovnáním jejich retenčních časů s retenčními časy píků standardních roztoků. Kvantitativní vyhodnocování se provádělo pomocí externí kalibrace.

Dále byla pro stanovení dusitanů ověřována spektrofotometrická metoda. Vycházelo se z metody uvedené ve Sborníku metod VD LUFA a z metody uvedené v ČSN EN 12014-3 Potraviny – Stanovení obsahu dusičnanů a/nebo dusitanů – Část 3: Spektrofotometrické stanovení obsahu dusičnanů a dusitanů ve výrobcích z masa po enzymatické redukci dusičnanů na dusitany.

Princip metody spočívá v tom, že dusitany ve vodném extraktu vzorku reagují s kyselinou sulfanilovou (diazotace) a s N-(naphtyl 1)-ethylendiamoniumdichloridem (kopulace) za vzniku barevné sloučeniny, která se měří spektrofotomericky při vlnové délce 550 nm.

Extrakty byly měřeny na UV VIS spektrofotometru Cary 50 Varian.

2.1 Chromatografická metoda

2.1.1 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1. Voda, (ultračistá).
2. Acetonitril.
3. Základní standardní roztok dusitanu, $c = 1,000 \text{ g/l}$. Dodává se komerčně.
4. Pracovní roztok I., o koncentraci $100 \text{ mg NO}_2^-/\text{l}$.

Příprava: 10 ml základního standardního roztoku (3) se pipetuje do 100ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku. Roztok je při teplotě 4°C stálý 1 týden.

5. Pracovní roztok II., o koncentraci $10 \text{ mg NO}_2^-/\text{l}$.

Příprava: 10 ml pracovního roztoku I (2.1.4) se napipetuje do 100 ml odměrné baňky a doplní se vodou po značku. Roztok se připravuje v den použití.

2.1.2 Přístroje a pomůcky

1. Analytické váhy s přesností $0,0001 \text{ g}$.
2. Magnetická míchačka.
3. Filtrační papír.

4. Membránové filtry, porozita 0,45 μm a 0,22 μm .
5. Iontový chromatograf ICS 3000 (Dionex) s eluent generátorem a náplní KOH a UV detektorem.
6. Aniontová analytická kolona, AS11-HC s předkolonou AG 11-HC (Dionex).
7. SPE kolonky (např: Supelco Supelclean ENVI-18, Dionex On Quard II RP).

2.1.3 Pracovní postup

Extrakce a předčištění

Do 150ml konické baňky se přesně naváží asi 10 g vzorku, přidá se 50 ml vody (1) o teplotě (60 – 70) °C a míchá se na magnetické míchačce 15 min.

Obsah baňky se kvantitativně převede do 200ml odměrné baňky a po vytemperování se doplní vodou (1) po značku a promíchá. Roztok se filtruje nejprve přes papírový filtr, potom přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 μm . V případě, že filtrát není čirý, filtruje se ještě přes membránový filtr s porozitou 0,22 μm .

Přefiltrovaný vodný extrakt se dále čistí pomocí SPE kolonky, vzorek se jímá přímo do vialky. Při práci s kolonkou se postupuje podle pokynů výrobce.

Pro slepé stanovení se místo navážky vzorku použije 10 ml vody (1).

Celá analýza včetně měření na iontovém chromatografu musí být provedena během jednoho pracovního dne.

Měření na ICS 3000

Nastavení chromatografických podmínek

Chromatografické podmínky se nastaví podle hodnot uvedených v tabulce 1.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky.

Kolona	AS11-HC (2 × 250) mm
Předkolona	AG11-HC (2 × 50) mm
Teplota kolony	25 °C
Detekce	UV, 205 nm
Objem nástřiku	25 µl
Průtok	0,35 ml/min
Eluent	2 mM KOH (1. – 15.) min 60 mM KOH (16.– 26.) min 2 mM KOH (27. – 42.) min

Kalibrace

Kalibrační roztoky se připraví ředěním pracovního roztoku I (4) a pracovního roztoku II (5).

Připraví se 5 až 10 kalibračních roztoků tak, aby pokrývaly co nejrovnoměrněji zvolený koncentrační rozsah. Postupuje se například tak, jak je dále uvedeno pro rozsah (0,1 – 2) mg/l.

Do řady 100ml odměrných baněk se pipetuje (1; 3; 5; 8; 10) ml pracovního roztoku II (5) a 1,5 ml, 2 ml pracovního roztoku I (4). Baňky se doplní vodou (1) po značku a dobře se promíchají. Získá se tak řada kalibračních roztoků o koncentracích (0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5; 2) mg NO²⁻/l.

Kalibrační roztoky se připravují v den použití.

Po nastavení chromatografických podmínek a ustálení chodu iontového chromatografu se proměří kalibrační roztoky. Ze získaných dat se sestrojí kalibrační křivka. Pro kvantitativní vyhodnocování se používá její lineární část.

Měření vzorku

Po kalibraci přístroje se za stejných podmínek změří vzorek.

Dusitany se identifikují porovnáním retenčních časů píků roztoku vzorku s retenčními časy píků roztoku standardu. Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnějšího standardu.

Některé vzorky mohou vyžadovat úpravu koncentrace eluentu nebo teploty na koloně, aby došlo k rozlišení dusitanového píku od píků neznámých komponent vzorku.

Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah dusitanů ve vzorku X v mg/kg se vypočte podle vztahu

$$X = V \times A/m$$

kde

- X je koncentrace dusitanů ve vzorku v mg/kg,
 V celkový objem extraktu v ml,
 A koncentrace odečtená z kalibrační křivky v mg/l,
 m hmotnost zkušební vzorku v g.

2.2 Spektrofotometrická metoda

2.2.1 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1. Voda, (ultračistá).
2. Hydroxid sodný.
3. Hydroxid sodný, 2% roztok.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží 2 g hydroxidu sodného (2) a rozpustí se ve vodě (1). Po vytemperování se doplní vodou po značku a promíchá.

4. Síran zinečnatý heptahydrát.
5. Síran zinečnatý, $c = 0,42$ mol/l.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží 12 g síranu zinečnatého (4), rozpustí se ve vodě (1), doplní po značku a promíchá.

6. Kyselina chlorovodíková, 35% w/w.
7. Hydroxid amonný, 26% w/w.

8. Pufrovací roztok, pH (9,6 – 9,7).

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije asi 500 ml vody (1), přidá se 20 ml kyseliny chlorovodíkové (6) a 50 ml hydroxidu amonného (7). Po vytemperování se doplní vodou po značku a promíchá. Pomocí pH metru se změří pH a v případě potřeby se upraví na požadovanou hodnotu přidavkem kyseliny nebo hydroxidu.

9. Kyselina sulfanilová.

10. Kyselina octová, 96% w/w.

11. Kyselina octová, 60% w/w.

12. Kyselina sulfanilová roztok.

Příprava: 1 g kyseliny sulfanilové (9) se rozpustí v 70 ml vody (1) a přidá se 30 ml kyseliny octové (10). Roztok se skladuje při pokojové teplotě.

13. N-(naphtyl 1)-ethylendiamoniumdichlorid.

14. N-(naphtyl 1)-ethylendiamoniumdichlorid roztok.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží 0,1 g N-(naphtyl 1)-ethylendiamoniumdichloridu a rozpustí se v kyselině octové (11). Roztok se uchovává v ledničce a je stálý jeden týden.

15. Vybarvovací činidlo.

Příprava: Stejně množství roztoku kyseliny sulfanilové (12) a N-(naphtyl 1)-ethylendiamoniumdichloridu (14) se smíchá bezprostředně před použitím.

16. Dusitan sodný.

17. Základní standardní roztok dusitanu sodného o koncentraci 500mg/l.

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se naváží 250 mg dusitanu sodného (16), rozpustí se ve vodě (1), přidá se 100 ml pufrovacího roztoku (8), doplní se vodou (1) po značku a promíchá. Roztok je při teplotě 4 °C stálý jeden týden.

18. Pracovní standardní roztok dusitanu sodného o koncentraci 5 mg/l.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se napipetuje 1 ml základního standardního roztoku (17) a doplní se vodou (1) po značku.

2.2.2 Přístroje a pomůcky

1. Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
2. Magnetická míchačka.
3. Vodní lázeň.
4. Spektrofotometr Cary 50 Varian.
5. Filtrační papír.

2.2.3 Pracovní postup

Extrakce

Do konické baňky se naváží 10 g vzorku, přidá se 70 ml vody (1), 12 ml roztoku hydroxidu sodného (3) a obsah se 5 min promíchává pomocí magnetické míchačky. Poté se pomocí pH papírku určí pH suspenze. Pokud je nižší než 7, upraví se její hodnota na pH 7 až 8.

Baňka se umístí na vodní lázeň vytemperovanou na 50 °C a 30 min se zahřívá s občasným mícháním a protřepáváním. Potom se přidá 10 ml roztoku síranu zinečnatého (4), promíchá a nechá se ještě 10 min na vodní lázni.

Po vyjmutí z vodní lázně se vzorek ochladí na laboratorní teplotu a kvantitativně se převede do 200ml odměrné baňky, doplní vodou (1) po značku a promíchá. Filtruje se, přičemž prvních 20 ml filtrátu se nepoužije.

Stejným postupem se provádí slepé stanovení bez navážky vzorku.

Kalibrace

Do řady 50ml odměrných baněk se pipetuje (0; 1; 2; 4; 6; 10) ml pracovního standardního roztoku dusitanu sodného (18). Do každé baňky se přidá 9 ml pufrovacího roztoku (8), 5 ml kyseliny octové (11) a bezprostředně nato 10 ml vybarvovacího roztoku (15). Baňky se doplní vodou (1) po značku, promíchají a nechají stát v temnu 25 min.

Koncentrace v baňkách jsou (0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 1) mg NaNO_2/l .

Po této době se změří absorbance roztoků při 550 nm, přičemž roztok o obsahu 0,0 mg NaNO_2/l slouží jako srovnávací.

Z naměřených hodnot se sestrojí kalibrační přímka.

Měření vzorku

10 ml filtrátu se napipetuje do 50ml odměrné baňky a v následujícím pořadí se přidá 9 ml pufovacího roztoku (8), 5 ml kyseliny octové (11) a bezprostředně nato 10 ml vybarvovacího roztoku (15). Potom se baňka doplní vodou (1) po značku, promíchá se a nechá stát v temnu 25 min. Po této době se změří absorbance roztoku při 550 nm.

Jestliže hodnota absorbance překročí maximální hodnotu použité kalibrační přímky, analýza se buď opakuje s menší navázkou vzorku, nebo se filtrát naředí. Nelze ředit konečný vybarvený roztok

Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah dusitanu sodného X v mg/kg se vypočte podle vztahu

$$X = ((Y-Z) \times 200)/m \times F$$

Y je hodnota odečtená z kalibrační přímky v mg/l,

Z hodnota slepého stanovení odečtená z kalibrační přímky v mg/l,

m navážka vzorku v g,

F ředicí faktor.

3 Diskuse a výsledky

3.1 Chromatografická metoda

Povolený obsah dusitanů v krmivech se podle platné legislativy pohybuje v rozmezí (15 – 30) mg NaNO₂/kg, to znamená (10 – 20) mg NO₂⁻/kg. Při zvolené navážce a ředění představují povolené limity koncentrace 0,5 mg NO₂⁻/l pro KKS a krmné suroviny a 1,0 mg NO₂⁻/ l pro rybí moučky. Z toho vyplývá, že je nutno bezpečně stanovit koncentraci nižší než 0,5 mg NO₂⁻/l.

Podle doporučení firmy Dionex byla použita analytická kolona AS11HC (4.2). Použití této kolony v kombinaci s eluent generátorem umožnilo vyzkoušet celou řadu variant chromatografických podmínek, zejména koncentrací elučního činidla.

Použití eluent generátoru také umožnilo pročištění kolony po každém nástřiku.

Z vodného extraktu vzorku je nutno před nástřikem na IC odstranit všechny látky, které jednak mohou rušit vlastní stanovení a také látky, které sice vlastní dělení neruší, ale způsobují svým charakterem nevratné poškození analytické kolony.

Organické látky byly z vodného extraktu odstraněny jednak pomocí acetonitrilu a jednak pomocí SPE kolonek. Čištění pomocí acetonitrilu se ukázalo jako málo účinné. Bylo vyzkoušeno několik typů SPE kolonek speciálně určených pro iontovou chromatografii (Macherey-Nagel PS-RP, Supelco Supelclean ENVI-18, Waters Sep-Pak Plus C18, Dionex On Gard II RP). Nejlépe se osvědčily kolonky Dionex On Gard II RP a Supelco Supelclean ENVI-18.

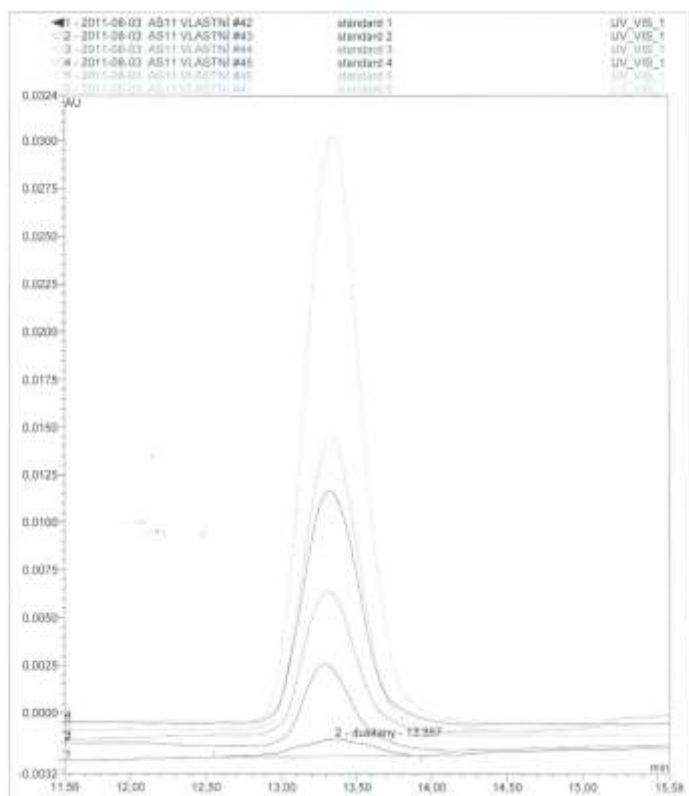
Mezi ionty, které ruší stanovení dusitanů, patří zejména chloridy.

Norma ČSN EN ISO 10304-1 Jakost vod - *Stanovení rozpuštěných aniontů metodou kapalinové chromatografie iontů – Část 1: Stanovení bromidů, chloridů, fluoridů, dusičnanů, dusitanů, fosforečnanů a síranů*, která se podrobně zabývá stanovením aniontů ve vodných roztocích (odpadních vodách), uvádí jako rušivé vlivy, kdy už není dosaženo požadovaného rozlišení ($R > 1,3$), maximální koncentraci chloridů pro UV detekci 500 mg/l a pro CD detekci 100 mg/l. Aplikační list 112 firmy Dionex uvádí pro UV detekci maximální koncentraci 400 mg Cl⁻/l.

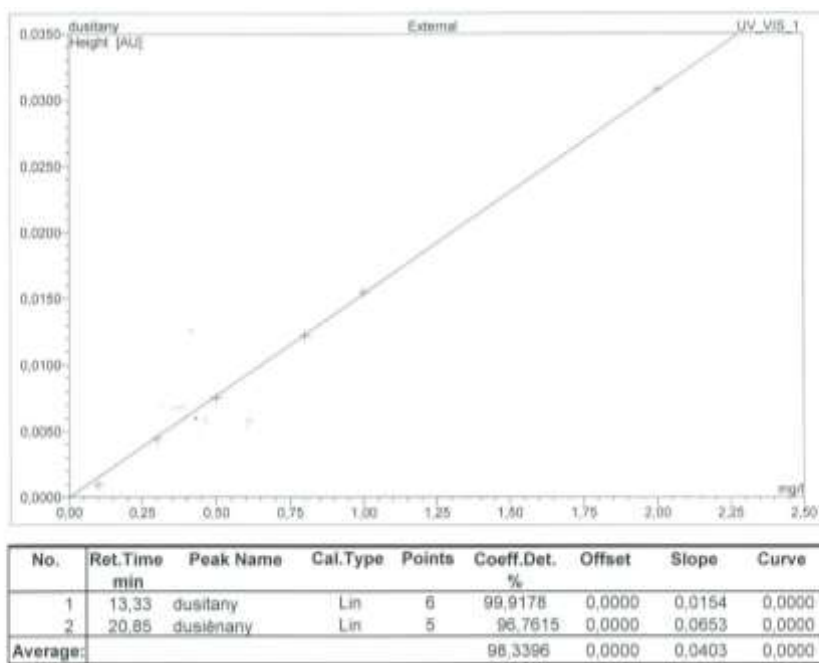
Koncentrace chloridů ve vodných extraktech vzorků krmiv je značně rozdílná, tak jako samotný charakter vzorků (suroviny rostlinného původu, rybí moučka, kompletní krmné směsi) a pohybuje se v řádech desítek mg/l (např. pro objemové krmivo, pšenici) až po téměř 1000 mg/l (např. rybí moučky).

Za optimální koncentraci pro bezpečné dělení a tudíž správnou identifikaci píků byla zvolena koncentrace 2 mM KOH. Jedná se o koncentraci velmi nízkou, což má za následek pomalou eluci a tudíž také nízkou citlivost.

Byla provedena kalibrace a na základě získaných parametrů (směrnice kalibrační přímky „výška píku – koncentrace“, maximální kolísání nulové linie) byly pomocí EFFI VALIDATION 3 vypočteny meze detekce a meze stanovitelnosti.



Obrázek 1. Chromatogramy standardů dusitanů (0,1 – 2,0) mg/l.



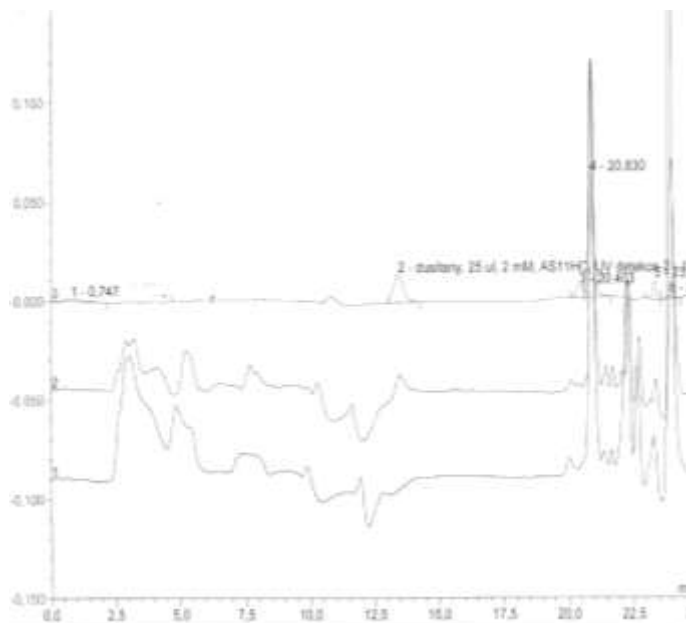
Obrázek 2. Kalibrační přímka pro koncentrační rozsah (0,1 – 2,0) mg NO²⁻/l.

Tabulka 2. Mez detekce a stanovitelnosti – vyhodnocení.

 your validation software	ANALYTICKÁ METODA: - voda - Stanovení aniontů - iontová chromatograf		
	VALIDACE: Plná validace		
	PARAMETR: Meze: ze signálu slepého pokusu v chromatografii		
	VALIDOVANÁ VLASTNOST: -		
VYHODNOCENÍ:			
Měření na mezi detekce	Měření na mezi stanovitelnosti	Validovaná vlastnost na mezi detekce	Validovaná vlastnost na mezi stanovitelnosti
0,003	0,01	0,21898	0,72993
Závěr: Mez det./stanovit. je 0,003 resp. 0,01. Val.vlastnosti na mezi det./stanovit. je 0,21898 resp. 0,72993.			

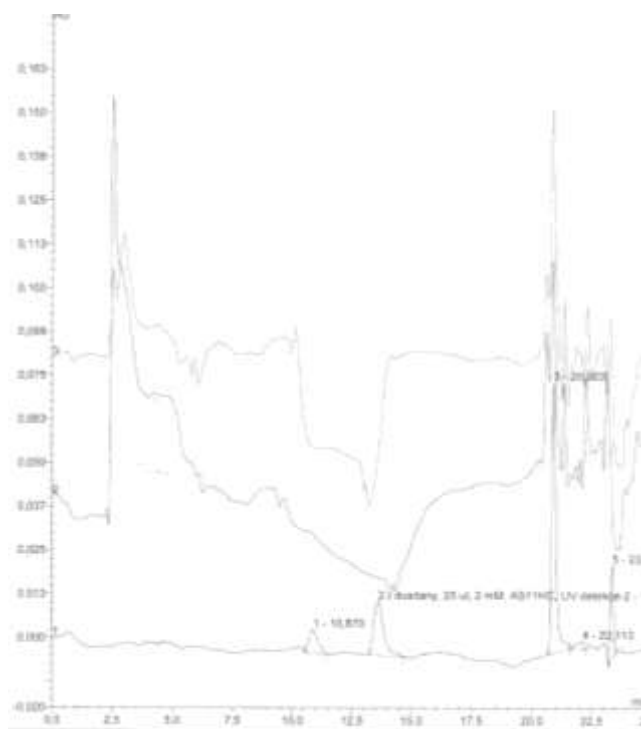
Mez stanovitelnosti 0,730 mg NO₂⁻/l, to je 14,590 mg NO₂⁻/kg (21,90 NaNO₂/kg) je pro účely laboratoře příliš vysoká. Nutno ovšem podotknout, že norma ČSN EN 12014-4 Potraviny – Stanovení obsahu dusičnanů a/nebo dusitanů – Část 4: IC metoda stanovení obsahu dusičnanů a dusitanů ve výrobcích z masa, ze které se vycházelo, byla validovaná pro obsahy nad 40 mg NO₂⁻/kg.

Na obrázku 3 a 4 jsou uvedeny chromatogramy reálných vzorků.



Obrázek 3. Chromatogram vz. č. 531 – KKS pro králíky.

Chromatogram 1- vzorek 531, chromatogram 2 - vzorek 531 spikovaný , chromatogram 3 - spike (standard)



Obrázek 4. Chromatogram vz. č. 414 – rybí moučka.

Chromatogram 1- spike, chromatogram 2 - vzorek 414 , chromatogram 3- vzorek 414 spikovaný

Negativní pík chloridů byl u vzorku č. 414 natolik výrazný, že znemožňoval stanovení dusitanů (koncentrace chloridů ve výluhu byla 840 mg/l).

Chloridy je možno z extraktu odstranit popřípadě snížit jejich koncentraci pomocí speciálních SPE kolonek pro iontovou chromatografii. Jedná se o silné katexy v Ag^+ formě. Byly vyzkoušeny kolonky Macherey-Nagel PS-Ag^+ , Altech Extrakt –CleanTM SPE IC-Ag, Dionex OnQuard II Ag/H. Výrobce kolonek upozorňuje na nízkou výtěžnost dusitanů. Při jejich použití dochází k poklesu pH vzorku, a to může mít za následek rozklad dusitanů, které jsou v kyselém prostředí nestabilní. To se v praxi potvrdilo, a proto se od postupu úpravy vzorku pomocí SPE kolonek v Ag^+ formě ustoupilo. Kromě toho se doporučuje zařadit za SPE Ag^+ další SPE kolonky, jejichž úkolem je odstranit stopy stříbra, které se mohou dostat do vzorku a které poškozují analytickou kolonu.

Pracnost a finanční náročnost takovéto přípravy vzorku před jeho nástřikem na kolonu je považována za nepřijatelnou.

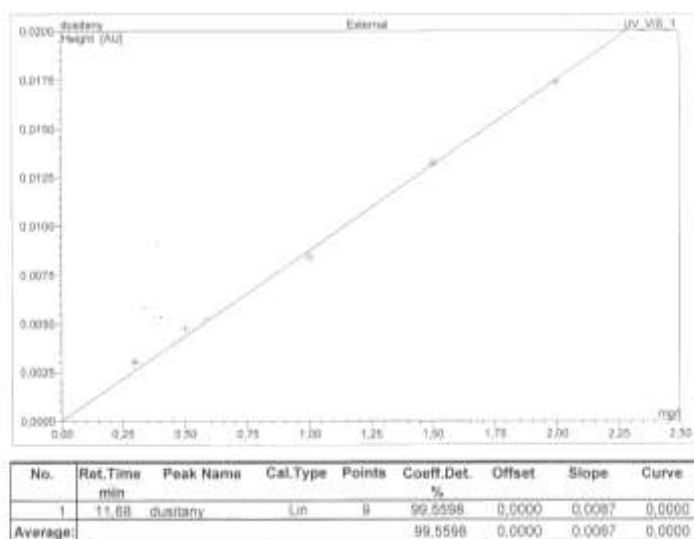
V průběhu měření docházelo k poměrně rychlému klesání citlivosti a selektivity kolony.

Soubor vlivů, které u takto složitých matic poškozují kolonu, se obtížně definuje.

Faktem je, že kolona byla permanentně přetěžována. V jednom nástřiku by nemělo být více než 10 nanomolů analytu, ale k ředění vzorku (snížení navážky) nebylo možné přistoupit, protože by se tím ještě snížila koncentrace hledaného analytu. Hlavní rozpor je ve značně rozdílné koncentraci dusitanů a „znečišťujících“ látek.

Při praktickém používání kolony bylo zřetelně vidět, jak její citlivost klesá.

Na obrázku 5 je zobrazena kalibrační přímka a v tabulce 3 jsou uvedeny odpovídající meze stanovitelnosti, kterých bylo dosaženo po asi 150 nástřicích reálných vzorků. Oproti původní hodnotě 0,730 mg NO₂⁻/l, se mez stanovitelnosti vlivem stárnutí kolony zvýšila na 1,15 mg NO₂⁻/l.

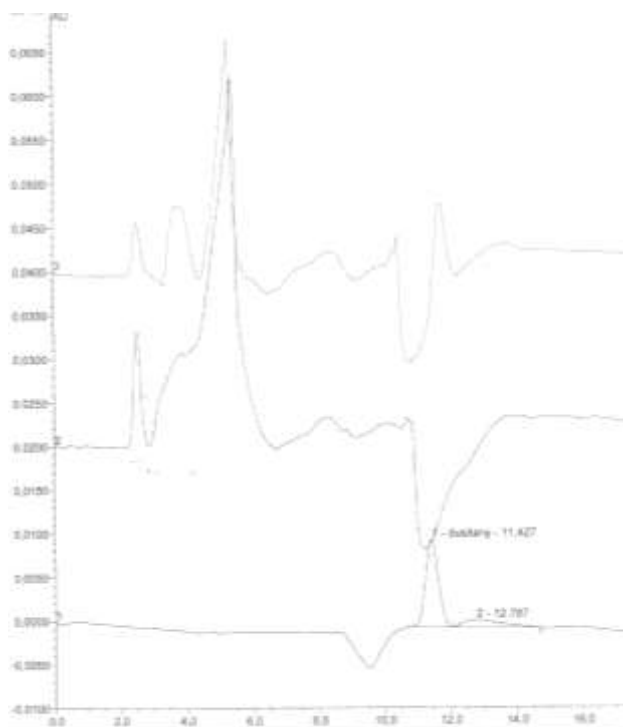


Obrázek 5. Kalibrační přímka.

Tabulka 3. Mez detekce a stanovitelnosti – vyhodnocení.

EffiChem your validation software	ANALYTICKÁ METODA: - krmivo - Stanovení obsahu dusitanů - 24.11.2		
	VALIDACE: Plná validace		
	PARAMETR: Meze, ze signálu slepého pokusu v chromatografii		
	VALIDOVANÁ VLASTNOST: -		
VYHODNOCENÍ:			
Měření na mezi detekce	Měření na mezi stanovitelnosti	Validovaná vlastnost na mezi detekce	Validovaná vlastnost na mezi stanovitelnosti
0,003	0,01	0,34483	1,14943
Závěr: Mez det./stanovit. je 0,003 resp. 0,01. Val.vlastnosti na mezi det./stanovit. je 0,34483 resp. 1,14943.			

Na obrázku 6 je chromatogram vzorku č. 371 – KKS pro prasata. Z obrázku je patrné, že už nebylo pro dusitany dosaženo žádoucího rozlišení ($R = 0,68$).



Obrázek 6. Chromatogram vz. č. 371 – KKS prasata.

Chromatogram 1- spike, chromatogram 2 - vzorek 371 , chromatogram 3- vzorek 371 spikovaný

Všechny výše zmiňované skutečnosti, zejména pak dosahovaná mez stanovitelnosti, vedly k ustoupení od IC metody. Pozornost byla dále věnována spektrofotometrické metodě.

3.2 Spektrofotometrická metoda

Výsledky získané spektrofotometrickou metodou byly statisticky zpracovány. Validační parametry – určení přesnosti, správnosti, nejistoty, meze detekce a meze stanovitelnosti byly vypočteny pomocí software Effivaldation od firmy Effichem.

Správnost

Nebyl k dispozici certifikovaný referenční materiál pro ověření správnosti metody. K vyhodnocení správnosti byla použita metoda pro velký koncentrační rozsah. Pro měření byl použit vzorek s minimálním obsahem dusitanů a za pomoci standardního přídatku dusitanu sodného byly obsahy změřeny na několika koncentračních úrovních.

Výsledky včetně vyhodnocení jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5.

Tabulka 4. Správnost – naměřená data.

EffiChem

your validation software

ANALYTICKÁ METODA:

- krmivo - Stanovení obsahu dusitanů - - 24.11.2

VALIDACE:

Plná validace

PARAMETR:

Správnost: velký koncentrační rozsah - slepý pokus není k dispozici: t-test

VALIDOVANÁ VLASTNOST:

List 1

Jednotky: mg/kg

DATA:

Úroveň	Popis	Přídavek	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6	Měření 7	Měření 8	Měření 9	Měření 10
1	NaNO2	0	0,86	0,75	0,7							
2		5	5,94	5,77	5,82							
3		10	10,51	10,67	10,21							
4		20	20,4	19,22	20							

Tabulka 5. Správnost – vyhodnocení.

EffiChem

your validation software

ANALYTICKÁ METODA:

- krmivo - Stanovení obsahu dusitanů - - 24.11.2

VALIDACE:

Plná validace

PARAMETR:

Správnost: velký koncentrační rozsah - slepý pokus není k dispozici: t-test

VALIDOVANÁ VLASTNOST:

List 1

VYHODNOCENÍ:

Úroveň	Popis	Přídavek	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
1	NaNO2	0	0	0	0,08185	-0,18553 - 0,18553	Přijata
2		5	5,0733	101,46667	0,08737	4,88145 - 5,26521	Přijata
3		10	9,6933	96,93333	0,23352	9,29673 - 10,08993	Přijata
4		20	19,1033	95,51667	0,60011	18,13262 - 20,07405	Přijata

Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Přesnost

Pro výpočet byla využita paralelní měření. Naměřená data a vyhodnocení jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7.

Tabulka 6. Opakovatelnost - naměřená data.

EffiChem

your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - krmivo - Stanovení obsahu dusitanů - - 24.11.2

VALIDACE: Plná validace

PARAMETR: Opakovatelnost: z paralelních měření

VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 1

Jednotky: mgNaNO2/kg

DATA:

Úroveň	Popis	Měření 1	Měření 2
1	432 rybí moučka	5,21	5,86
2	564 rybí moučka	22,14	21,7
3	856 rybí moučka	4,12	4
4	1054 rybímoučka	4,48	4,18
5	1209 rybí moučka	3,93	4,71
6	1226 rybí moučka	3,16	2,91
7	522 rybí moučka	12,45	13,35
8	523 rybí moučka	4,79	4,42
9	525 rybí moučka	16,16	16,78
10	529 rybí moučka	10,03	9,43
11	530 rybí moučka	3,75	3,87
12	1638 sladový květ	3,76	4,14
13	1640 sladový květ	5,51	5,68
14	1680 sladový květ	9,34	9,74
15	413 rybí moučka	3,99	4,29
16	414 rybí moučka	11,99	11,39
17	416 rybí moučka	7,16	6,49
18	447 rybímoučka	3,06	3,02
19	531 KKS králíci	2,91	3,07
20	347 KKS králíci med.	2,87	2,92

Tabulka 7. Opakovatelnost – vyhodnocení.

	ANALYTICKÁ METODA: - krmivo - Stanovení obsahu dusitanů - - 24.11.2		
	VALIDACE: Plná validace		
	PARAMETR: Opakovatelnost: z paralelních měření		
	VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 1		
VYHODNOCENÍ:			
Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
7,069	0,33011	4,66988	20
Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 0,33011 jednotek, tj. 4,67 %.			

Nejistota měření

Pro výpočet nejistoty měření laboratoře se použil výpočet z rozdílu paralelních stanovení. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8. Nejistota – vyhodnocení.

EffiChem

your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - krmivo - Stanovení obsahu dusitanů - - 24.11.2

VALIDACE: Nejistoty

PARAMETR: Nejistoty: z přesnosti - paralelní měření k dispozici

VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 1

VYHODNOCENÍ:

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	7,069
St. nejistota	0,33011
Rel. st. nejistota (%)	4,66988
Faktor pokrytí	1,96
Rozšířená st. nejistota	0,64702
Rel. rozšířená nejistota	9,15296

Závěr: Rozšířená st. nejistota je 0,64702. Relativní rozšířená nejistota je 9,15 %.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny z kalibrační přímky. Naměřená data a vyhodnocení uvádějí tabulky 9 a 10.

Tabulka 9. Mez detekce a stanovitelnosti – naměřená data.

EffiChem

your validation software

ANALYTICKÁ METODA:

- krmivo - Stanovení obsahu dusitanů - - 24.11.2

VALIDACE:

Plná validace

PARAMETR:

Meze: z kalibrační přímky

VALIDOVANÁ VLASTNOST:

List 1

Jednotky: mg/l

absorbance

DATA:

Úroveň	Popis	Val.vl.	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6	Měření 7	Měření 8	Měření 9	Měření 10
1	NaNO2	0,1	0,0484	0,0484	0,0499							
2		0,2	0,0971	0,0982	0,1013							
3		0,4	0,1932	0,201	0,2035							
4		0,6	0,2904	0,2969	0,3022							
5		1	0,4762	0,4906	0,5085							

Tabulka 10. Mez detekce a stanovitelnosti – vyhodnocení.

 your validation software	ANALYTICKÁ METODA: - krmivo - Stanovení obsahu dusitanů - - 24.11.2		
	VALIDACE: Plná validace		
	PARAMETR: Meze: z kalibrační přímky		
	VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 1		

VYHODNOCENÍ:			
Měření na mezi detekce	Měření na mezi stanovitelnosti	Validovaná vlastnost na mezi detekce	Validovaná vlastnost na mezi stanovitelnosti
0,00903	0,01371	0,01668	0,0262
Závěr: Mez det./stanovitel. je 0,00903 resp. 0,01371. Val.vlastnost na mezi det./stanovitel. je 0,01668 resp. 0,0262.			

Pro navážku vzorku 10 g do objemu 200 ml a následném pětinasobném ředění je mez stanovitelnosti 2,62 mg NaNO₂/kg.

4 Závěr

V rámci práce byla hledána vhodná metoda pro stanovení obsahu dusitanů v krmivech. Metoda iontové chromatografie se pro účely laboratoře ukázala jako nevhodná, protože získané meze stanovitelnosti přesahovaly povolené koncentrace dusitanů v krmivech.

Metoda spektrofotometrická byla zvalidována a zavedena do praxe. Od roku 2009 se touto metodou analyzuje několik desítek vzorků krmiv ročně.

5 Literatura

1. ČSN EN 12014-4 Potraviny – Stanovení obsahu dusičnanů a/nebo dusitanů – Část 4: IC metoda stanovení obsahu dusičnanů a dusitanů ve výrobcích z masa, 2005
2. Aplikační list č.112 od firmy Dionex: Determination of Nitrate a Nitrite in Meat Using High-Performance Anion –Exchange Chromatography,1998.
3. Sborník metod VD LUFA , kap 4.10.1.
4. ČSN EN 12014-3 Potraviny – Stanovení obsahu dusičnanů a/nebo dusitanů – Část 3: Spektrofotometrické stanovení obsahu dusičnanů a dusitanů ve výrodcích z masa po enzymatické redukci dusičnanů na dusitany, 2005.
5. Joachim Weiss,Handbook of Ion Chromatography, 2004.
6. Dionex Corporation, Produkt manual – On Quard II Cartridges, 2004.
7. Dionex Corporation, Produkt manual – IONPAC AS11-HC Analytical culumn, 2004.

Vývoj kalibrační rovnice na olej ve vzorcích máku metodou FT-NIRS

David Čížmár, Radvana Šulová

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

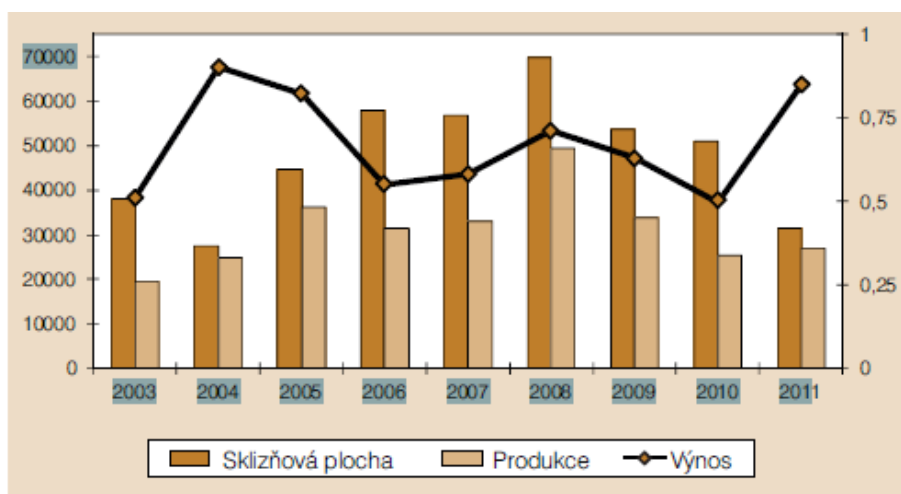
1 Souhrn

Metodou FT-NIR spektroskopie byl vytvořen a optimalizován kalibrační model pro stanovení obsahu oleje v máku setém. Všechny vzorky pocházely z laboratoře odrůdového zkušebnictví. Ve vzorcích byl znám koncentrační obsah oleje získaný pomocí laboratorní referenční metody (LRM). Vytvořený kalibrační model byl pak následně ověřen pomocí Studentova t testu na porovnání dvou analytických metod. Výsledky ukázaly, že metoda FT-NIR spektroskopie je vhodná pro stanovení obsahu oleje v máku setém.

2 Úvod

Na území dnešní České republiky se mák začal pěstovat ve větším rozsahu počátkem 19. století, a to převážně ve středních Čechách. V roce 2008 bylo touto plodinou oseto historické maximum osevní plochy, která činila celkem 70 tisíc ha. Pěstování máku však postupně nahradily výhradně plodiny regulované Evropskou unií jako je např. cukrová řepa.

Graf 1. Vývoj ploch produkce a výnosů máku setého v letech 2003-2011^[2].



* Údaj: český statistický úřad

Téměř všechna produkce máku je určena pro potravinářský průmysl, makovina (makovice) je využívána ve farmaceutickém průmyslu.

Mák se široce používá především při přípravě makového pečiva. Přes 4/5 produkce je exportováno, především do slovanských zemí, kde je mák tradiční pochoutkou. V západních zemích se makové produkty často pokládají za nevhodné, protože se částečně mylně předpokládá, že obsahují návykové alkaloidní látky. V potravinářském průmyslu je důležité mák setý kontrolovat na obsah morfinu a kodeinu. Hodnota těchto alkaloidů musí být co nejnižší, a pro to je důležité klást velký důraz na zralost semene během sklizně. Nedo zralé semeno máku zpravidla obsahuje vyšší koncentraci kodeinu, který má sedativní účinky.

V zemědělské praxi se využívá výhradně mák jednoletý (obrázek 1), jarní, i když jsou známy i odrůdy ozimé, přesívkové.



Obrázek 1. Mák setý.

Zemědělsky se mák setý člení na:

- **Mák opiový** – pěstuje se hlavně v Asii, Afgánistánu a v Latinské Americe. Mák opiový se využívá pro výrobu alkaloidů, jako jsou morfin, kodein a thebain, které se získávají z vytékajícího bílého latexu (opia) z makovic.
- **Mák semenný čili olejní** – pěstuje se hlavně v Evropě a Asii. Ten se dále dělí na mák potravinářský, pěstovaný především v ČR i SR a průmyslový, pěstovaný hlavně v Turecku, Maďarsku, SR, Francii, Španělsku a Ukrajině. Mimo Evropu pak hlavně v Tasmanii a Indii.

Mák potravinářský je v současné době hlavním předmětem šlechtění v ČR. Jsou známy odrůdy máků olejních s barvou semen bílou, okrovou, růžovou, červenou, hnědou stříbrošedou či šedou avšak nejčastěji modrou. **Barva semene** je rozhodujícím faktorem, který ovlivňuje další využití semene v pekárenských výrobcích a kuchyňské úpravě.

Modré semeno se používá na běžné pekárenské pečivo (rohlíky apod.) a na tradiční jídla a pochutiny v české kuchyni. Modrá barva máku nejvíce garantuje „makovou vůni a chuť“.

Bílé semeno se liší od modrého hlavně chuťovým projevem. Bílé semeno má příchut' po oříšcích, a proto se používá jako jejich náhrada v některých pekařských a cukrářských výrobcích.

V roce 2008 byla registrována první odrůda s okrovou barvou. Využití je obdobné jako u máku bílého.

Obsah oleje se uvádí jako doplňkové kritérium, protože mák se na olej zpracovává ve velmi malém měřítku. Makový olej je svým složením mastných kyselin podobný olejům slunečnicovým.

Obsah morfinu určuje kvalitu makoviny z hlediska farmaceutického zpracování.

3 Materiál a metody

3.1 Princip stanovení vlhkosti a oleje

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.

V následující části je velmi stručně popsána klasická laboratorní metoda mokré chemie, pomocí které byly získány referenční hodnoty použité pro kalibraci NIR spektrometru. Výsledek referenčních hodnot v kalibraci je uváděn jako průměr ze dvou paralelních stanovení.

Stanovení obsahu vlhkosti

Stanovení obsahu vlhkosti a obsahu těkavých látek vychází z normy ČSN EN ISO 665. Tato norma je platná pro stanovení vlhkosti v olejnatých semenech.^[3] Používaný postup, který vychází z uvedené normy, je sepsán v JPP TO postup 50010.1.^[5]

Obsah vlhkosti se stanoví vážkově jako úbytek po vysušení vzorku při 103 °C.

Stanovení obsahu oleje

Stanovení obsahu oleje vychází z normy ČSN EN ISO 659^[4]. Tato norma je platná pro stanovení obsahu oleje v olejnatých semenech. Používaný postup, který vychází z uvedené normy, je sepsán v JPP TO postup 50078.1.^[5]

Zkušební vzorek se extrahuje petroletherem za předepsaných podmínek. Obsah oleje se stanoví vážkově po následném oddestilování extrakčního činidla a vysušení získaného extraktu.

Definice výrazu obsah oleje je následující:

Jedná se o všechny látky vyextrahované za podmínek popsanych v této metodě a vyjádřené v hmotnostních procentech z produktu, tak jak byl obdržen, nebo z vyčištěných semen.

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 zcela ojedinělým pracovištěm zaměřeným na tento typ laboratorního testování. Požadavek na dostatečné množství vzorků pro vytvoření robustního kalibračního modelu byl spolehlivě splněn. V případě máku setého bylo proměřeno celkem asi 100 vzorků pro kalibraci parametru na obsah oleje. Vzorky použité na kalibraci NIR spektrometru pocházely ze všech regionálních pracovišť ÚKZÚZ a byly nashromážděny za období asi 2 let.

Všechny vzorky máku pro stanovení parametru olej nebyly před vlastním měřením upraveny mletím. NIR spektra byla nasnímána v křemenných kyvetách o průměru 12 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 rozsahu 4 000 – 10 000 cm^{-1} s rozlišením 2 cm^{-1} . 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 máku jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Složení vzorků máku setého použitých pro kalibraci přístroje Nicolet Antaris měřených v režimu reflektance.

	Olej (%/s)
N_K (počet vzorků)	100
Minimum	43,74
Maximum	51,72
Průměr	48,33

Důležitým předpokladem vytvoření úspěšného kalibračního modelu je dále skutečnost, že laboratorní referenční metoda používaná pro kalibraci NIR spektrometru musí být dostatečně přesná. Výsledky referenčních hodnot parametru oleje získané klasickou metodou 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 síťováním nebo pro vlastní měření NIR spektroskopii nebyly pomlety. 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.

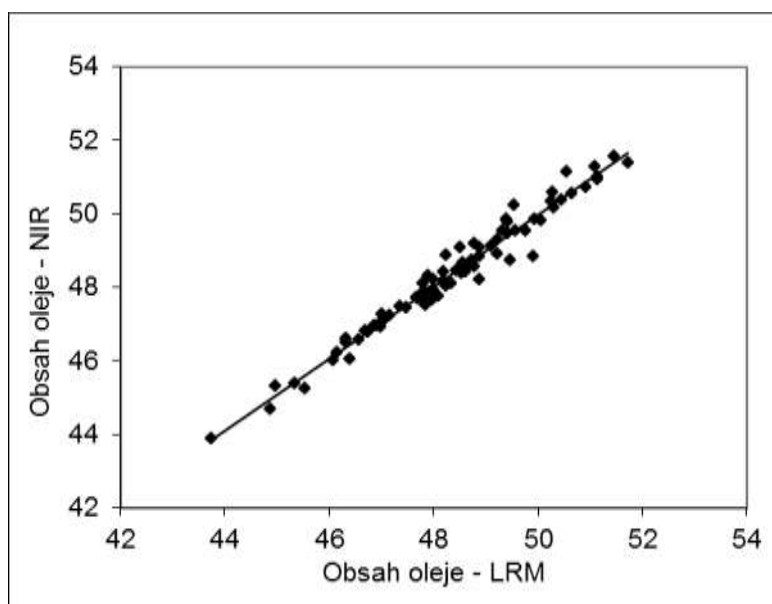
Tímto způsobem upravený kalibrační soubor pro stanovení obsahu oleje v máku setém po vyloučení odlehlých měření byla dále aplikována regresní metoda PLS. Následně byl kalibrační model optimalizován tak, aby poskytoval co nejvyšší hodnotu korelačního koeficientu R a zároveň co nejnížší střední kvadratickou chybu predikce RMSECV při optimálním počtu latentních proměnných (hlavních komponent) v modelu.

V průběhu tvorby kalibračního modelu byl rovněž proveden výběr vhodných vlnových délek a to takových, 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

Pro zjednodušení a zrychlení analýzy metodou NIR spektroskopie byla pro vývoj kalibrace na daný parametr navržena možnost vzorky před NIR měřením neupravovat mletím a provést analýzu celých semen nemletých vzorků. Všechna měření laboratorní referenční metodou jsou prováděna v laboratoři testování odrůd na pracovišti ÚKZÚZ RO Brno. Vzorky máku pro LRM jsou upraveny mletím na tříštivém laboratorním mlýnku Eta Mira. Kalibrační model vytvořený na celých semenech vzorků máku na parametr olej byl velmi spolehlivý, obsahoval vysokou hodnotu korelačního koeficientu R a velmi nízkou hodnotu střední kvadratické chyby predikce RMSECV. Hodnota korelačního koeficientu R byla (0,98), resp. střední kvadratické chyby predikce RMSECV (0,38).

Vytvořený kalibrační model pro parametr olej v máku, je graficky zobrazen na obrázku 2.



Obrázek 2. Kalibrační závislost pro parametr olej (%/s).

Koncentrace obsahu oleje je uvedena v % v sušině.

Přehled získaných kvalitativních parametrů kalibračního modelu stanovené regresní metodou PLS pro parametr olej v máku je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2. Kvalitativní parametry kalibračních modelů vzorků máku.

Parametr	RMSECV	R
olej (%/s)	0,38	0,98

Legenda: RMSECV – střední kvadratická chyba predikce (CV - příčné validace); R – korelační koeficient, výsledky RMSECV jsou uvedeny v % přepočtených na obsah sušiny

Predikční schopnost vytvořeného kalibračního modelu pro stanovení obsahu oleje ve vzorcích máku byla ověřována 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 použit Studentův test t ^[6]. Vypočtená hodnota t testu byla porovnána s kritickou (tabulkovanou) hodnotou t_{α} . Získané výsledky tohoto porovnání jsou prezentovány v tabulce 3.

Tabulka 3. Kvalitativní parametry porovnání 2 analytických metod.

Parametr	k	$\bar{x}_A$ (LRM)	$\bar{x}_B$ (NIR)	α	t	$t_{\alpha(0,05)}$
Olej (%/s)	15	49,31	49,45	0,05	1,66	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 3 je zřejmé, že vypočtené hodnoty t pro olej 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 parametru olej ve vzorcích máku setého.

5 Závěr

Na dostatečně obsáhlém souboru vzorků máku setého byl optimalizován kalibrační model pro stanovení parametru olej metodou FT-NIR spektroskopie. Z prezentovaného grafu kalibračních závislostí a hodnot kvalitativních parametrů (RMSECV, R) vytvořeného kalibračního modelu, je zřejmé, že hodnoty oleje stanovené laboratorní referenční metodou a predikované metodou NIR spektroskopie spolu vysoce korelují ($R = 0,98$).

Zároveň bylo provedeno ověření predikční schopnosti kalibračního modelu a tedy i porovnání 2 analytických metod na základě rozdílů výsledků získané oběma metodami. Prezentované výsledky potvrdily vhodnost metody NIR spektroskopie a lze ji tak doporučit pro predikování obsahu oleje v máku setém.

6 Literatura

1. Vašák, J. a kol.: Mák, Praha, 2010.
2. Zehnálek, P., Mezlík, T., Holubář, J.: Seznam doporučených odrůd (řepka olejka, sója) a přehled odrůd (hořčice bílá, mák setý, len olejný a kmín kořený), Odrůdy 2012, ÚKZÚZ, NOÚ Brno 2012.
3. ČSN EN ISO 665, Olejnatá semena – Stanovení vlhkosti a obsahu těkavých látek, 9/2001.
4. ČSN EN ISO 659, Olejnatá semena – Stanovení obsahu oleje (Referenční metoda), 1/2011.
5. Kabátová, N., Šulová, R., Ryšavý, P., JPP ÚKZÚZ-TO postup 50010.1, 50078.1 a 50050.1.
6. Eckschlager, K., Horsák, I., Kodejš, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. SNTL/ALFA Praha, 1980.

Bulletin Národní referenční laboratoře XVIII 2014/2

Ročník: XVIII, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2014

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 39

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196