

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2007

Ročník XI, číslo 3/2007

Brno 2007

Obsah

- 1. Ověření podmínek mikrovlnného tlakového rozkladu vzorků krmiv pro stanovení nežádoucích látek v krmivech** 1
- Dita Podraská
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Praha, Za opravnou 4,
150 06 Praha 5 – Motol
- 2. Ověření mikrovlnného rozkladu pro analýzu rostlinného materiálu** 18
- Eva Urbánková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
- 3. Stanovení vybraných pesticidů metodou HPLC-MS** 23
- Romana Kalusová, Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
- 4. Příprava pšeničné mouky pro Rapid Mix Test** 29
- Eva Morávková, Markéta Pospíchalová, Radvana Šulová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

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

Ověření podmínek mikrovlnného tlakového rozkladu vzorků krmiv pro stanovení nežádoucích látek v krmivech

Dita Podraská

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Praha, Za opravnou 4,
150 06 Praha 5 – Motol
dita.podraska@ukzuz.cz

1 Cíl práce

Pro rozklad vzorků krmiv ke stanovení nežádoucích látek (As, Cd, nízkého obsahu Cu a Pb) lze využívat klasické postupy rozkladu – suchý a mokřý rozklad. Každý způsob je vhodný pro určité typy matic. Mikrovlnný mokřý rozklad umožňuje provádět rozklad vzorků krmiv způsobem, který snižuje nebezpečí kontaminace vzorků i ztráty analyzovaných prvků.

Cílem práce bylo umožnit nalezení vhodného postupu mikrovlnného tlakového rozkladu krmiv pro následné stanovení As, Cd, Cu a Pb metodou elektrotermické atomizace s použitím Zeemanovy korekce pozadí.

2 Úvod

Analýzu vzorků krmiv můžeme v rámci analyticko-vzorkovacího systému rozdělit na několik samostatných částí, ke kterým patří odběr vzorku, příprava vzorku k měření, měření a interpretace výsledků. Velmi důležité je i další zpracování vzorku, jako je sušení a homogenizace pokusného materiálu. Každá z těchto částí má pro dosažení přesných a správných výsledků stejnou důležitost. Ve všech případech může dojít jak k sekundární kontaminaci, tak i ke ztrátám prvků.

Problematika rozkladů byla jak po teoretické, tak i po praktické stránce mnohokrát zpracována. Nejnovější přehled metod rozkladu počínaje jejich teoretickým základem a konče vybranými praktickými aplikacemi je popsán v literatuře (2).

Klasický suchý rozklad je charakterizován jako rozklad v otevřeném systému, na vzduchu a za atmosférického tlaku. Aby suchý rozklad probíhal plynule a bez exotermních reakcí, je nutno zvyšovat teplotu mineralizace velmi zvolna nebo zuhelnatovat vzorky nejprve mimo pec při teplotě (200 – 300) °C na horké desce s definovaným nárůstem teploty. Systematické chyby způsobené nedefinovatelným průběhem teploty zejména v první fázi rozkladu lze do značné míry redukovat zcela propracovaným teplotně časovým režimem rozkladu. Takové

pracovní postupy, obvykle upravené podle typu analyzovaného materiálu, vedou ke správným hodnotám obsahu sledovaných prvků a nedochází ke ztrátám analytů vytěkáním v místech okamžitého zvýšení teploty vzorku. Nejvýznamnějším problémem se při rozkladu jeví retence prvků na nerozpustný zbytek po rozkladu.

Velmi často se též používá tzv. pomocné činidlo, nejčastěji minerální kyselina, dusičnan nebo síran, které zvyšuje účinnost rozkladu, snižuje možnost ztrát analytu vytěkáním a omezuje jeho kontakt s povrchem reakční nádoby.

Při použití suchého rozkladu je také nutno zvolit optimální poměr navážky vzorku a roztoku použitého pro převedení mineralizátu do roztoku (zpravidla zředěná HNO_3 nebo HCl). Při použití příliš malého objemu roztoku nedochází k úplnému rozpuštění resp. vyloužení popela, což vede k nesprávným výsledkům.

Pro zvýšení účinnosti suchého rozkladu byla vyvinuta řada zařízení, v nichž mineralizace probíhá namísto na vzduchu v prostředí kyslíku či jiného oxidačního plynu (resp. směsi plynů), někdy i za zvýšeného tlaku. Tyto metody pak umožňují snížení maximální teploty rozkladu, což snižuje nebezpečí ztrát analytu vytěkáním či retencí (5).

Významnou nevýhodou klasického suchého rozkladu je poměrně dlouhá doba potřebná pro úplné rozložení vzorku. Jako minimální doba rozkladu se uvádí 3 hodiny, ale velmi často je zapotřebí doby mnohem delší. Dlouhodobá expozice analyzovaného materiálu vzduchu v otevřeném systému rovněž může vést k sekundární kontaminaci vzorku z prostředí laboratoře.

Pro rozklad vzorků krmiv na mokré cestě při atmosférickém tlaku v otevřeném či polouzavřeném systému se používají minerální kyseliny jako H_2SO_4 , HNO_3 , HClO_4 , HCl v nejrůznějších kombinacích, případně doplněné přísady dalších oxidačních činidel (H_2O_2) či katalyzátorů (Se, Hg, Cu).

Koncentrovaná HClO_4 je při teplotách používaných při rozkladu silným oxidačním a dehydratačním činidlem a z používaných kyselin je považována za nejučinnější. Její použití však vyžaduje dodržení řady bezpečnostních opatření, která potlačí případné riziko exploze reakční směsi. Kyselina dusičná se může používat samostatně, ale její účinnost je omezena nízkým bodem varu. Nejčastěji se HNO_3 používá jako součást reakčních směsí, z nichž je doporučována zejména směs $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ a směs $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$. Dále je navrhováno nahrazení kyseliny chloristé peroxidem vodíku, zejména z bezpečnostních důvodů, přičemž obě směsi jsou z hlediska účinnosti rozkladu plně srovnatelné (17).

Zvýšení účinnosti samotné HNO_3 umožňuje mokrý rozklad za zvýšeného tlaku, kdy je reakční směs umístěna do hermeticky uzavřeného prostoru a vystavena účinkům teplot vyšších než je

bod varu azeotropu HNO_3 (122,4 °C) při atmosférickém tlaku. Současně dojde k výraznému vzestupu tlaku v reakčním prostoru.

Mokrý rozklad v uzavřeném systému v prostředí koncentrované kyseliny dusičné má následující výhody ve srovnání s otevřeným systémem:

- nedochází ke ztrátám prvků vytěkáním,
- kratší doba rozkladu a jeho vyšší účinnost,
- může být použita samotná kyselina dusičná, kterou je možno relativně snadno připravit ve vysoké čistotě,
- používá se nižší objem reagensů, což vede ke snížení úrovně slepého pokusu,
- nepřichází v úvahu sekundární kontaminace vzorku během rozkladu z prostředí laboratoře.

Možnost zvýšení teploty rozkladu je v tomto případě omezena materiálem, ze kterého jsou vyrobeny reakční nádoby.

Hledání nových forem a podmínek rozkladných procesů je důležitým krokem analytického systému a rozhoduje významnou měrou o kvalitě analytických dat. V posledních několika letech jsou v analytických laboratořích velmi frekventována zařízení využívající mikrovlnné záření jako zdroje energie pro ohřev kapalně reakční směsi v uzavřené nádobě bez ohřevu nádoby a vnějšího prostoru. Teplotní gradient je opačný ve srovnání s tradičním postupem ohřevu, tzn. že ohřev se šíří z vnitřku rozkladné nádoby směrem ven, takže je zahříván obsah a ne povrch rozkladné nádoby. Podle požadované úpravy vzorku a z pohledu dalšího analytického postupu lze volit buď tlakový mikrovlnný rozklad nebo polootevřený (semi-open) mikrovlnný rozklad.

Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny o vysoké frekvenci, které působí na polární molekuly. Tento typ elektromagnetických vln je generován magnetronem, který vyžaduje magnetické a elektrické pole. Tímto procesem je dezorganizován pohyb polárních molekul vystavených mikrovlnnému záření a tento pohyb způsobuje vlastní tepelný efekt.

Výhody mikrovlnného záhřevu jsou:

- žádná prodleva při zahájení a ukončení procesu záhřevu,
- čistá, reprodukovatelná a snadno automatizovatelná energie,
- rychlost ohřevu,
- specifické působení na polární vazby a entropii zahřívajícího média.

Výše uvedené vlastnosti mikrovlnného ohřevu činí tuto techniku spolehlivou pro analytika, umožňují realizaci choulostivých chemických reakcí a postupů v relativně krátkém čase.

Při volbě postupu rozkladu je nutno přihlížet k následujícím aspektům:

- nízký a reprodukovatelný slepý pokus, který je tvořen příspěvkem z reagensů, aparatury a laboratorního prostředí, pro prvky jako jsou Pb a Cd,
- přijatelná výtěžnost prvků,
- dostačující rychlost při průchodu běžně zpracovávaných vzorků laboratoří,
- kompatibilita s použitou metodou stanovení a dále se všemi použitými separačními a koncentračními kroky použitými před vlastním krokem stanovení,
- bezpečnost práce v laboratoři.

3 Materiál a metody

3.1 Přístroje a zařízení

- 3.1.1 Laboratorní mlýn Fritch, typ pulverisette 1, 6, 14;
- 3.1.2 Třecí miska s tloučkem;
- 3.1.3 Analytické váhy Sartorius s přesností 220 g/0,0001 g;
- 3.1.4 Mikrovlnné zařízení MWS-3 speedwave (Berghof, Eningen, Germany);
- 3.1.5 Teflonové tlakové nádoby DAP-60S;
- 3.1.6 Podvarové destilační zařízení BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Germany);
- 3.1.7 Zařízení na přípravu ultračisté vody Milli-Q Gradient A10 (Millipore);
- 3.1.8 Muflová pec LM 212.11;
- 3.1.9 Topná deska JRT-350 (Altec);
- 3.1.10 Filtrační papír střední hustoty;
- 3.1.11 PE nádoby o objemu 100 ml;
- 3.1.12 Atomový absorpční spektrometr s elektrotermickou atomizací AAnalyst 600, vybavený příčně vyhřívanou kyvetou a Zeemanovou korekcí (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA);
- 3.1.13 Laboratorní sklo čištěné 5% HNO₃;
- 3.1.14 Běžné laboratorní vybavení.

3.2 Chemikálie

- 3.2.1 Koncentrovaná kyselina dusičná, přečištěná podvarovou destilací, $\rho = 1,4$ g/ml (Lachema)
- 3.2.2 Peroxid vodíku 30%, suprapur (Merck)
- 3.2.3 Základní standardní roztoky As, Cd, Cu a Pb, $c(\text{prvku}) = (1 \pm 0,002)$ g/l ve 2% HNO₃ (roztoky Astasol, Analytika)
- 3.2.4 Modifikátory matric
 - 3.2.4.1 Dihydrogenfosforečnan amonný, vodný roztok $c = 200$ g/l (Analytika)
 - 3.2.4.2 Dusičnan hořečnatý, roztok $c = 2$ g/l v 0,2% HNO₃ (Analytika)
 - 3.2.4.3 Paládium, roztok $c = 2$ g/l v 5% HNO₃ (Analytika)
- 3.2.5 Argon stlačený 5.0 (Messer Technogas)

3.3 Charakteristika analyzovaných vzorků

Pro ověření byly použity vzorky krmiv – certifikované referenční materiály BCR, vzorky z mezilaboratorních porovnávacích zkoušek (MPZ 1/2006 a MPZ 3/2006) a vybrané vzorky krmiv, jejichž parametry jsou shrnuty v tabulce č. 1 a č. 2.

Tabulka č. 1. Vybrané vzorky krmiv

Označení vzorku	Materiál
Fapas-1051	Krmná směs
BCR-32	Marokánský fosfát
IRM-1351	Krmná směs
Vzorek číslo 5/2006	Minerální krmivo
Vzorek číslo 1150/2006	Premix
Vzorek číslo 1151/2006	Kompletní krmné směsi pro hospodářská zvířata
Vzorek číslo 1152/2006	Kompletní krmné směsi pro hospodářská zvířata

Tabulka č. 2. Parametry vybraných vzorků krmiv

	Označení vzorku	Prvek			
		As	Cd	Cu	Pb
Deklarované hodnoty (mg/kg)	Fapas-1051	---	---	---	0,25 ± 0,10
	BCR-32	9,5 ± 0,5	20,8 ± 0,7	33,7 ± 1,4	5,0 ± 0,3
	IRM-1351	1,49 ± 0,50	0,30 ± 0,10	---	1,54 ± 0,65
	Vzorek č. 5 *	2,036 ± 0,410	0,220 ± 0,069	702 ± 83	3,029 ± 1,322
	Vzorek č. 1150 *	1,475 ± 0,106	0,089 ± 0,037	1473 ± 63	0,714 ± 0,259
	Vzorek č. 1151 *	0,218 ± 0,077	0,101 ± 0,021	15,4 ± 1,5	0,219 ± 0,018
	Vzorek č. 1152 *	0,196 ± 0,088	0,076 ± 0,020	25,8 ± 1,8	0,300 ± 0,144

* Deklarované hodnoty jsou uvedeny v přepočtu na sušinu (vzorek č. 5 – MPZ 1/2006, vzorek č. 1150, 1151 a 1152 – MPZ 3/2006)

3.4 Parametry měřicích metod

3.4.1 Parametry pro stanovení As

Vlnová délka 193,7 nm
 Šířka štěrbin 0,7L nm
 Teplota nástřiku 20 °C
 Modifikátor matrice 1 g/l Pd + 0,6 g/l Mg(NO₃)₂

Teplotní program				
	Temp (° C)	Ramp time (s)	Hold time (s)	Internal flow (ml/min)
Step 1	110	1	5	250
Step 2	130	15	50	250
Step 3	1200	10	20	250
Step 4	2400	0	4	0
Step 5	2600	1	3	250

3.4.2 Parametry pro stanovení Cd

Vlnová délka	228,8 nm
Šířka štěrby	0,7L nm
Teplota nástřiku	20 °C
Modifikátor matrice	1% NH ₄ H ₂ PO ₄ + 0,6 g/l Mg(NO ₃) ₂

Teplotní program				
	Temp (° C)	Ramp time (s)	Hold time (s)	Internal flow (ml/min)
Step 1	110	1	5	250
Step 2	130	15	50	250
Step 3	1200	10	20	250
Step 4	1800	0	3	0
Step 5	2450	1	3	250

3.4.3 Parametry pro stanovení Cu

Vlnová délka	324,8 nm
Šířka štěrby	0,7L nm
Teplota nástřiku	20 °C
Modifikátor matrice	---

Teplotní program				
	Temp (° C)	Ramp time (s)	Hold time (s)	Internal flow (ml/min)
Step 1	110	1	5	250
Step 2	130	15	50	250
Step 3	1000	10	20	250
Step 4	2100	0	5	0
Step 5	2450	1	3	250

3.4.4. Parametry pro stanovení Pb

Vlnová délka	283,3 nm
Šířka štěrby	0,7L nm
Teplota nástřiku	20 °C
Modifikátor matrice	1% NH ₄ H ₂ PO ₄ + 0,6 g/l Mg(NO ₃) ₂

Teplotní program				
	Temp (° C)	Ramp time (s)	Hold time (s)	Internal flow (ml/min)
Step 1	110	1	5	250
Step 2	130	15	50	250
Step 3	800	10	20	250
Step 4	1800	0	3	0
Step 5	2450	1	3	250

4 Experimentální část

4.1 Úprava vzorku

Vzorky č. 5; 1150; 1151 a 1152 byly před vlastní analýzou upravovány mletím pomocí laboratorního mlýnku s achátovou miskou (3.1.1) a konečnou homogenizací. Rozemletý vzorek byl prosit přes sítko s velikostí ok cca 0,5 mm. Vzorky Fapas-1051; BCR-32 a IRM-1351 nebyly upravovány.

4.2 Mineralizace vzorku

4.2.1 Středotlaká mikrovlnná mineralizace

Do teflonové tlakové nádoby (3.1.5) bylo diferenčně naváženo ($0,3 \pm 0,005$) g vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 5 ml koncentrované kyseliny dusičné (3.2.1) a po 30 minutách 1 ml peroxidu vodíku (3.2.2). Po dalších 30 minutách stání byly teflonové nádoby uzavřeny

a vloženy do mineralizačního zařízení (3.1.4). Parametry teplotního rozkladu jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Po skončení mineralizačního programu byly teflonové nádoby (3.1.5) vyjmuty a ponechány vyhladnout na laboratorní teplotu. Rozložené vzorky byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk 100 ml a doplněny ultračistou vodou. Takto upravené vzorky byly zfiltrány do PE nádoby (3.1.11).

Tabulka č. 3. Parametry teplotního rozkladu

Temp. (° C)	145	180	100	100
Ramp (min)	10	5	1	1
Time (min)	5	10	10	10

4.2.2 Mokrý rozklad

Do kádinek 250 ml bylo naváženo ($2 \pm 0,001$) g vzorku. Po stěnách kádinek bylo opatrně přidáno 20 ml 10M kyseliny dusičné (10M HNO₃ připravena z koncentrované HNO₃ (3.2.1)), kádinky byly přikryty hodinovým sklem a ponechány stát tak dlouho, dokud neustalo šumění. Poté byly kádinky umístěny na topnou desku (3.1.9) a obsah byl 1 minutu povařen. Po sejmutí z topné desky se kádinky se vzorky nechaly stát do druhého dne. Druhý den se obsah kádinek kvantitativně převedl do odměrných baněk 100 ml a doplnil ultračistou vodou. Takto upravené vzorky byly zfiltrány do PE nádobek (3.1.11).

4.2.3 Suchý rozklad

Do porcelánových kelímků bylo naváženo ($2 \pm 0,001$) g vzorku. Kelímky byly umístěny do studené pece (3.1.8). Postupně byla zvyšována teplota rychlostí 50 °C/hod. na teplotu 480 °C. Při této teplotě byly vzorky v peci ponechány do druhého dne. Druhý den bylo po stěnách kelímku opatrně přidáno 1 ml koncentrované kyseliny dusičné (3.2.1) a kelímky byly umístěny na topnou desku (3.1.9). Obsah kelímků se odpařil do sucha tak, aby vzorky v kelímku nevřely. Po vysušení se kelímky vložily zpět do pece (3.1.8) a ponechány 1 hodinu při teplotě 480 °C.

Po vyjmutí z pece a vyhladnutí bylo opatrně přidáno 20 ml 1M kyseliny dusičné (1M HNO₃ připravena z koncentrované HNO₃ (3.2.1)), kelímky byly přikryty hodinovým sklem a ponechány stát do druhého dne. Poté se obsah kelímků kvantitativně převedl do odměrných baněk 50 ml a doplnil ultračistou vodou. Takto upravené vzorky byly zfiltrány do PE nádobek (3.1.11).

4.3 Stanovení As, Cd, Cu a Pb

4.3.1 Příprava kalibračních křivek

Ze základních standardních roztoků (3.2.3) byly připraveny série kalibračních roztoků odpovídajících koncentrací (viz tabulka č. 4). Na ředění byla použita 5% kyselina dusičná (5% HNO₃ připravena z koncentrované HNO₃ (3.2.1)).

Tabulka č. 4. Série kalibračních roztoků a jejich koncentrace

Prvek	Koncentrace				
	(µg/l)				
As	1	5	10	25	50
Cd	0,25	1	2,5	5	10
Cu	1	5	10	25	50
Pb	1	5	10	25	50

4.3.2 Vlastní stanovení prvků

Stanovení se provádělo na atomovém absorpčním spektrometru AAnalyst 600 (3.1.12). Dávkovalo se 20 µl vzorku a 5 µl modifikátoru (3.2.4). Při stanovení Cu se modifikátor nepoužíval a nastříkovalo se pouze 20 µl vzorku. Při měření se používala korekce pozadí. Parametry měření byly uvedeny v bodě 3.4.

4.3.3 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah prvku vyjádřený hmotnostním zlomkem se vypočte dle vztahu

$$w_{Me} = \frac{(c_V - c_S) \times V}{m}$$

w_{Me} – hmotnostní zlomek prvku ($\mu\text{g/g} = \text{mg/kg}$)

c_V – koncentrace prvku v analyzovaném roztoku ($\mu\text{g/l}$)

c_S – koncentrace prvku v roztoku slepého pokusu ($\mu\text{g/l}$)

V – celkový objem výluhu (l)

m – navážka vzorku (g)

5 Výsledky

5.1 Výsledky stanovení As

Naměřené a vypočtené výsledky jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 5 společně s deklaroványi hodnotami.

Tabulka č. 5. Výsledky As

Označení vzorku	Deklarovaná hodnota (mg/kg)	Rozklad vzorku dle bodu *	Naměřená hodnota (mg/kg)
Fapas-1051	---	4.2.1	$0,1233 \pm 0,0009$
		4.2.2	$0,0823 \pm 0,0151$
		4.2.3	$0,1721 \pm 0,0108$
BCR-32	$9,5 \pm 0,5$	4.2.1	$9,1 \pm 0,6$
		4.2.2	$9,6 \pm 0,9$
		4.2.3	$9,7 \pm 0,0$
IRM-1351	$1,49 \pm 0,50$	4.2.1	$1,68 \pm 0,01$
		4.2.2	$1,30 \pm 0,16$
		4.2.3	$1,13 \pm 0,01$
Vzorek č. 5	$2,036 \pm 0,410$	4.2.1	$2,040 \pm 0,325$
		4.2.2	$1,712 \pm 0,283$
		4.2.3	$1,820 \pm 0,251$
Vzorek č. 1150	$1,475 \pm 0,106$	4.2.1	$1,414 \pm 0,211$
		4.2.2	$1,497 \pm 0,082$
		4.2.3	$0,926 \pm 0,045$
Vzorek č. 1151	$0,218 \pm 0,077$	4.2.1	$0,171 \pm 0,027$
		4.2.2	$0,184 \pm 0,010$
		4.2.3	$0,233 \pm 0,013$
Vzorek č. 1152	$0,196 \pm 0,088$	4.2.1	$0,161 \pm 0,034$
		4.2.2	$0,132 \pm 0,017$
		4.2.3	$0,231 \pm 0,021$

- * 4.2.1 středotlaká mikrovlnná mineralizace
- 4.2.2 mokrý rozklad
- 4.2.3 suchý rozklad

5.2 Výsledky stanovení Cd

Naměřené a vypočtené výsledky jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 6 společně s deklarovanými hodnotami.

Tabulka č. 6. Výsledky Cd

Označení vzorku	Deklarovaná hodnota (mg/kg)	Rozklad vzorku dle bodu *	Naměřená hodnota (mg/kg)
Fapas-1051	---	4.2.1	0,0413 ± 0,0035
		4.2.2	0,0408 ± 0,0039
		4.2.3	0,0537 ± 0,0029
BCR-32	20,8 ± 0,7	4.2.1	20,5 ± 0,3
		4.2.2	21,2 ± 0,7
		4.2.3	20,9 ± 0,8
IRM-1351	0,30 ± 0,10	4.2.1	0,24 ± 0,02
		4.2.2	0,23 ± 0,01
		4.2.3	0,21 ± 0,01
Vzorek č. 5	0,220 ± 0,069	4.2.1	0,244 ± 0,008
		4.2.2	0,267 ± 0,003
		4.2.3	0,228 ± 0,007
Vzorek č. 1150	0,089 ± 0,037	4.2.1	0,087 ± 0,011
		4.2.2	0,087 ± 0,002
		4.2.3	0,006 ± 0,004
Vzorek č. 1151	0,101 ± 0,021	4.2.1	0,089 ± 0,006
		4.2.2	0,085 ± 0,004
		4.2.3	0,085 ± 0,001
Vzorek č. 1152	0,076 ± 0,020	4.2.1	0,067 ± 0,016
		4.2.2	0,058 ± 0,005
		4.2.3	0,062 ± 0,001

- * 4.2.1 středotlaká mikrovlnná mineralizace
- 4.2.2 mokrý rozklad
- 4.2.3 suchý rozklad

5.3 Výsledky stanovení Cu

Naměřené a vypočtené výsledky jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 7 společně s deklarovanými hodnotami.

Tabulka č. 7. Výsledky Cu

Označení vzorku	Deklarovaná hodnota (mg/kg)	Rozklad vzorku dle bodu *	Naměřená hodnota (mg/kg)
Fapas-1051	---	4.2.1	35,7146 ± 0,4677
		4.2.2	27,6162 ± 1,1239
		4.2.3	37,1869 ± 1,0298
BCR-32	33,7 ± 1,4	4.2.1	33,1 ± 2,0
		4.2.2	33,5 ± 0,4
		4.2.3	33,3 ± 0,6
IRM-1351	---	4.2.1	26,9504 ± 3,2906
		4.2.2	21,2766 ± 1,5783
		4.2.3	17,7873 ± 2,8641
Vzorek č. 5	702 ± 83	4.2.1	737 ± 30
		4.2.2	719 ± 117
		4.2.3	712 ± 53
Vzorek č. 1150	1473 ± 63	4.2.1	1501 ± 57
		4.2.2	1525 ± 94
		4.2.3	1342 ± 189
Vzorek č. 1151	15,4 ± 1,5	4.2.1	15,0 ± 1,6
		4.2.2	15,3 ± 2,4
		4.2.3	14,5 ± 0,2
Vzorek č. 1152	25,8 ± 1,8	4.2.1	27,0 ± 1,6
		4.2.2	24,0 ± 1,2
		4.2.3	26,2 ± 1,6

- * 4.2.1 středotlaká mikrovlnná mineralizace
4.2.2 mokrý rozklad
4.2.3 suchý rozklad

5.4 Výsledky stanovení Pb

Naměřené a vypočtené výsledky jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 8 společně s deklarovanými hodnotami.

Tabulka č. 8. Výsledky Pb

Označení vzorku	Deklarovaná hodnota (mg/kg)	Rozklad vzorku dle bodu *	Naměřená hodnota (mg/kg)
Fapas-1051	0,25 ± 0,10	4.2.1	0,16 ± 0,04
		4.2.2	0,34 ± 0,03
		4.2.3	0,33 ± 0,01
BCR-32	5,0 ± 0,3	4.2.1	5,2 ± 0,9
		4.2.2	5,0 ± 0,3
		4.2.3	4,9 ± 1,0
IRM-1351	1,54 ± 0,65	4.2.1	1,46 ± 0,09
		4.2.2	1,50 ± 0,01
		4.2.3	1,25 ± 0,01
Vzorek č. 5	3,029 ± 1,322	4.2.1	3,987 ± 0,489
		4.2.2	4,109 ± 0,266
		4.2.3	3,448 ± 0,370
Vzorek č. 1150	0,714 ± 0,259	4.2.1	0,868 ± 0,209
		4.2.2	0,953 ± 0,096
		4.2.3	0,249 ± 0,085
Vzorek č. 1151	0,219 ± 0,018	4.2.1	0,222 ± 0,052
		4.2.2	0,229 ± 0,043
		4.2.3	0,212 ± 0,036
Vzorek č. 1152	0,300 ± 0,144	4.2.1	0,325 ± 0,130
		4.2.2	0,400 ± 0,065
		4.2.3	0,218 ± 0,114

- * 4.2.1. středotlaká mikrovlnná mineralizace
- 4.2.2. mokrý rozklad
- 4.2.3. suchý rozklad

6 Závěr

Je zcela zřejmé, že pro rozklad vzorků krmiv byla vyvinuta a ověřena nesmírně široká škála metod, kdy mezi jednotlivými metodickými postupy existují zdánlivě jen nepatrné rozdíly. Ve stejné míře se používají rozklady na suché i na mokré cestě, přestože k suchému rozkladu se vyskytují v literatuře vážné výhrady, zejména pro nízkou přesnost a riziko ztrát analytů během spalování, či možnost vzájemné kontaminace vzorků s různým obsahem analytů během rozkladu.

Z tabulek č. 5; 6; 7 a 8 je zřejmé, že ověřovaný postup mikrovlnného tlakového rozkladu krmiv dává správné výsledky. U všech stanovovaných prvků došlo ke shodě experimentálních hodnot s hodnotami certifikovanými. Značné odchylky se vyskytly pouze u vzorku označeného číslem 1150 (premix) mineralizovaného suchým rozkladem. U všech prvků došlo při stanovení nejspíše k vytěkání či retenci jednotlivých prvků. U všech ostatních vzorků krmiv nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi suchým, mokrým a mikrovlnným rozkladem.

Z výše uvedeného je patrné, že postup mikrovlnného tlakového rozkladu vzorků krmiv je možno použít pro následné stanovení As, Cd, Cu a Pb metodou elektrotermické atomizace s použitím Zeemanova korekce pozadí.

7 Literatura

- 1 Doležal J., Povondra P., Šulcek Z.: Rozklady základních anorganických surovin, Praha (1966)
- 2 Krakovská E., Kuss H. M.: Rozklady v analytickej chémii, Vienala, Košice (2001)
- 3 Vytřas K. a kol.: Laboratorní cvičení z analytické chemie, část I.: Chemická analýza, Pardubice (1995)
- 4 Pavelka J.: Rozklady potravin a biologických materiálů, Atomová absorpční spektrometrie II, Spektroskopická společnost Jana Marka Marci (2006)
- 5 Bock R.: A Handbook of Decomposition Methods in Analytical Chemistry, International Textbook Company, London (1979)
- 6 Mader P., Haber V., Zelinka J.: Analisis 25, 175 (1997)
- 7 De Boer J. L. M., Maessen F. J. M. J.: Spectrochim. Acta 38B, 739 (1983)
- 8 Nordic Committee on Food Analysis: Metals. Determination by Atomic Absorption Spectrophotometry in Foodstuffs, No. 139, Stockholm (1991)
- 9 Markert B.: Instrumentelle Multielementanalyse von Pflanzenproben, VCH. Verlagsges, Weinheim (1993)
- 10 Rosopulo A., Hahn M., Staerk J., Riedler J.: Landw. Forsch 32, 199 (1975)
- 11 Mader P., Száková J., Čurdová E.: Talanta 43, 521 (1996)
- 12 Society for Analytical Chemistry, Analytical Methods Committee: Analyst 84, 214, London (1959)
- 13 Horwitz W.: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13, 51.028, Association of Official Analytical Chemists, Arlington (1980)
- 14 Barbera R., Farre R., Lozano A.: Mocronutr. An. 6, 47 (1989)
- 15 Halvin J. L., Soltanpour P. N.: Commun. Soil Sci. Plant Anal. 11, 969 (1980)
- 16 Jiránek V., Tluchoř D.: Sborník z konference Mikroelementy, 84, Praha (1984)
- 17 Huang C. Y., Schulte E. E.: Commun. Soil Sci. Plant Anal. 16, 943 (1985)
- 18 Knapp G.: Mikrochim. Acta II, 445 (1991)
- 19 Stockwell P. B., Knapp G.: Internat. Labmate 14, 47 (1989)
- 20 Míka V.: Agrochémia 18, 333 (1978)
- 21 Fecher P., Ruhnke G.: Anal. Bioanal. Chem. 373, 787 (2002)

Ověření mikrovlnného rozkladu pro analýzu rostlinného materiálu

Eva Urbánková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
eva.urbankova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Certifikované referenční materiály (CRM) byly mineralizovány v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem. Takto připravené vzorky byly měřeny na atomovém absorpčním spektrometru s grafitovou kyvetou. Ve vzorcích byl stanoven obsah kadmia, mědi, olova, chromu, niklu, kobaltu a arsenu.

2 Úvod

Pro rozklad rostlin se používá mnoho mineralizačních metod. Používají se metody rozkladu na suché i mokré cestě (1 – 4). Mineralizace na suché cestě s sebou nese riziko ztráty některých prvků z rostlinného materiálu. Klasické mineralizace na suché a mokré cestě jsou poměrně zdoluhavé a v průběhu rozkladu nelze získat informace o změnách jednotlivých vzorků. Z tohoto hlediska má velkou výhodu mikrovlnný rozklad, a to jak pro úsporu chemikálií, tak pro úsporu času (5, 6). Rozklad vzorku v mikrovlnném zařízení trvá asi půl hodiny podle druhu vzorku a podle zvoleného teplotního programu. Vzorek před vlastním rozkladem nevyžaduje dlouhou přípravu. Čas přípravy vzorku pro mikrovlnný rozklad je mnohem kratší než čas, který je třeba k přípravě mineralizace vzorku klasickou cestou. Nevýhodou tohoto rozkladu je limitované množství vzorku, které lze mineralizovat. Pro mikrovlnný rozklad je nezbytné, aby byl vzorek dostatečně homogenní. Většina zařízení pro mikrovlnný rozklad dovolují použít množství vzorku do (0,5 – 1) g, což je postačující pro stanovení prvků, které se v daném materiálu vyskytují ve větších koncentracích. Pro stanovení prvků v takto zmineralizovaném materiálu je pak nutno použít taková zařízení, která umožňují stanovit velmi malé koncentrace prvků. Tato stanovení lze tedy provádět např. na atomovém absorpčním spektrometru s grafitovou kyvetou nebo na ICP-MS. Pro mikrovlnný rozklad bylo použito mikrovlnné zařízení MWS-3 speedwave s osmimístným rotorem. Uvnitř

přístroje je vestavěn infračervený teplotní senzor, který umožňuje přesné a rychlé sledování teplot uvnitř rozkladných nádob. Měření teploty je založeno na principu snímání intenzity tepelného záření vydávaného vzorkem v úzkém spektrálním rozmezí, kde je dostatečná propustnost stěnou nádoby. Při širokospektrálním sledování je toto záření odfiltrováno stěnami nádoby a proto jej není možné dále měřit. Tento způsob je významný tím, že dochází k zamezení kontaminace, protože při měření teploty nedochází ke styku s okolím a teplota je snímána přes stěny rozkladných nádob. Zaznamenávané hodnoty jsou přiváděny do řídicí jednotky, která zpětně reguluje výkon mikrovlnné pece.

Pro ověření mineralizace pro stanovení kadmia, mědi, olova, chromu, niklu, kobaltu a arsenu byly použity certifikované referenční materiály GBW07602, GBW07603 a GBW07604.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- 3.1.1 Kyselina dusičná, HNO_3 , koncentrovaná, p.a. $\rho = 1,4 \text{ g.ml}^{-1}$, (Lachema Neratovice) predestilována na podvarovém destilačním zařízení;
- 3.1.2 Peroxid vodíku, H_2O_2 , 30%, p.a. (Peroxides, Sokolov);
- 3.1.3 Demineralizovaná voda

3.2 Zařízení

- 3.2.1 Mikrovlnné zařízení MWS – 3 speedwave (Berghof, Eningen, Germany)
- 3.2.2 Podvarové destilační zařízení BSB-939-IR (Berghof, Eningen, Germany)
- 3.2.3 Atomový absorpční spektrometr s elektrotermickou atomizací Perkin Elmer Aanalyst 600 (Perkin Elmer, Shelton, Connecticut, USA)

3.3 Mineralizace

Do teflonových nádobek se naváží 0, 5 g vzorku a zalije se 8 ml kyseliny dusičné (3.1.1) a 2 ml peroxidu vodíku (3.1.2). Po 20 minutách se nádoby uzavřou a vloží se do mikrovlnného zařízení. Mineralizace probíhá následovně: za postupného nárůstu teplot jsou vzorky mineralizovány 4 minuty při 150 °C; 5 minut při 190 °C. Poté je teplota postupně snižována. Po vychladnutí se mineralizáty přelijí do 25 ml odměrné baňky a po vytemperování se doplní po značku demineralizovanou vodou. Následně se přelijí do PE lahvíček.

3.4 Měření

Vzorky získané mineralizací byly měřeny na atomovém absorpčním spektrometru s elektrotermickou atomizací (PerkinElmer Aanalyst 600). Pro konstrukci kalibračních křivek byly ze základních standardních roztoků (Analytika Praha) postupným ředěním připraveny standardní kalibrační roztoky. V tabulce 1 jsou uvedeny vlnové délky a kalibrační křivky pro jednotlivé prvky.

Tabulka 1. Vlnové délky a standardní kalibrační roztoky pro jednotlivé prvky

Prvek	Vlnová délka (nm)	Blank ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	St 1 ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	St 2 ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	St 3 ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	St 4 ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	St 5 ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
As	193,7	0	2	5	10	20	-
Cd	228,8	0	1	2	5	10	-
Co	242,5	0	2	5	10	20	-
Cr	357,9	0	5	10	20	50	-
Cu	324,8	0	5	10	20	50	-
Ni	232,0	0	5	10	20	50	-
Pb	283,3	0	2	5	10	20	50

4 Výsledky a diskuse

Vzorky CRM GBW07602, GBW07603 a GBW07604 byly mineralizovány v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem ve třech paralelních stanoveních. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Tlaková mineralizace CRM v uzavřeném systému ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Prvek	Vzorek					
	GBW07602a	GBW07602b	GBW07603a	GBW07603b	GBW07604a	GBW07604b
Cd	$0,230 \pm 0,039$	$0,140 \pm 0,010$	$0,818 \pm 0,140$	(0,380)	$0,417 \pm 0,069$	$0,320 \pm 0,050$
Cu	$5,383 \pm 0,592$	$5,200 \pm 0,300$	$6,844 \pm 0,753$	$6,600 \pm 0,400$	$8,150 \pm 0,820$	$9,300 \pm 0,500$
Pb	$7,552 \pm 0,982$	$7,100 \pm 0,700$	$47,948 \pm 6,233$	$47,000 \pm 2,000$	$1,553 \pm 0,202$	$1,500 \pm 0,200$
Cr	$1,923 \pm 0,480$	$2,300 \pm 0,200$	$2,054 \pm 0,513$	$2,600 \pm 0,100$	$0,561 \pm 0,140$	$0,550 \pm 0,050$
Ni	$1,788 \pm 0,357$	$1,700 \pm 0,300$	$1,652 \pm 0,330$	$1,700 \pm 0,200$	$2,330 \pm 0,466$	$1,900 \pm 0,200$
Co	$0,387 \pm 0,050$	$0,390 \pm 0,030$	$0,401 \pm 0,052$	$0,410 \pm 0,030$	$0,436 \pm 0,057$	$0,420 \pm 0,020$
As	$0,971 \pm 0,194$	$0,950 \pm 0,080$	$1,285 \pm 0,257$	$1,250 \pm 0,100$	$0,450 \pm 0,090$	$0,370 \pm 0,060$

Legenda: a - hodnota získaná mineralizací na mikrovlnném zařízení

b - certifikovaná hodnota.

Z tabulky 2 je zřejmé, že ověřovaný postup dává správné výsledky. U všech stanovovaných prvků došlo ke shodě experimentálních hodnot s hodnotami certifikovanými. Odchyly se vyskytly pouze u Cd, kde experimentální výsledky jsou vyšší než hodnoty certifikované. Ke shodě došlo pouze u CRM GBW 07604, kde se intervaly experimentální a certifikované hodnoty překrývají. U CRM GBW 07603 je certifikovaná hodnota uvedena dodavatelem v závorce a bez nejistot, takže tuto hodnotu též nelze brát za zcela přesnou. Možné příčiny vyšších hodnot při stanovení Cd mohou spočívat v nedokonalém odstranění interferencí. Stanovení Cd tedy nelze zatím považovat za zcela jednoznačně správné, zatímco stanovení ostatních prvků touto metodou lze považovat za vyřešené.

5 Literatura

- 1 Peter Christie, E. Leslie Dickson, David J. Kilpatrick, Comparison between Wet and Dry Oxidation Methods of Sample Preparation for Copper and Zinc Analysis of Grassland Herbage. *J. Sci. Food Agric.* **1989**, 48, 155 – 164.
- 2 G. Knapp, Mechanized Techniques for Sample Decomposition and Element Preconcentration. *Microchim. Acta (Wien)* **1991**, II, 445 – 455.
- 3 Pavel Mader, Eva Čurdová, Metody rozkladu biologických materiálů pro stanovení stopových prvků, *Chem. Listy* 91, **1997**, 227 – 236.
- 4 I. Lavilla, A.V.Filgueiras, C. Bendicho, Comparison of Digestion Methods for Determination of Trace and Minor Metals in Plant Samples, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 5072 – 5077.
- 5 R.A.Bowman, A rapid Plant Digestion Method for Analysis of P and Certain Cations by Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry. *Commun.in Soil Sci. Plant Anal.*, **1989**, 20 (5,6), 539 – 553.
- 6 Calvin R. Finch, H. Dale Pennington, Calvin G. Lyons, Sara E. Littau, Microwave Digestion of Plant Samples for Sulfur Analysis. *Commun. In Soil Sci. Plant Anal.*, **1990**, 21(7,8), 583 – 594.

Stanovení vybraných pesticidů metodou HPLC-MS

Romana Kalusová, Petra Kosubová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno

romana.kalusova@ukzuz.cz, petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Analýza pesticidních látek se v širokém rozsahu provádí pomocí GC-MS techniky. Při stanovení teplotně nestabilních, netěkavých látek, jakými jsou karbamáty nebo benzimidazoly, je vhodnější použít HPLC metodu, případně pro analýzu komplexních matric HPLC-MS. V rámci kontroly zakázaných látek v krmivech byl do roku 2005 sledován výskyt mořících přípravků ve zpracovávaných osivech. Tato skupina 30 fungicidů a insekticidů zahrnovala 10 látek obtížně stanovitelných pomocí GC-MS, které byly v minulých letech stanoveny pomocí HPLC s UV detekcí. S cílem odstranit možné interference při měření konvenčními detektory a zvýšit spolehlivost stanovení byla v roce 2005 a 2006 testována screeningová metoda s využitím HPLC-MS systému Bruker Esquire6000.

2 Úvod

Pesticidy jsou látky používané nejčastěji v zemědělství k ochraně rostlin, skladových zásob, technických produktů a hospodářských zvířat před rostlinnými a živočišnými škůdci. Jejich nadměrné a nesprávné používání však vede k narušování ekosystému a nepříznivým vlivům na zdraví člověka. S cílem ochrany lidského zdraví probíhá v různých zemích sledování pesticidů v potravinách a dalších člancích potravního řetězce člověka. Pro účely monitoringu pesticidů našly největší uplatnění multireziduální metody s koncovým stanovením založeným na chromatografické separaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS).

Postupy přípravy vzorku k finální analýze jsou různorodé. Nezbytnou podmínkou je použití takových extrakčních a separačních postupů, u kterých nedochází k výrazným ztrátám a degradaci sledovaných pesticidních látek. Extrakce se nejčastěji provádí třepáním (1, 2), extrakcí pevnou fází (SPE) (3) nebo také tlakovou extrakcí rozpouštědlem (4) pomocí polárnějšího rozpouštědla, jakou jsou aceton nebo jeho směsi (2), ethylacetát (1) nebo acetonitril (3). Získané extrakty se buď nečistí, upraví se pouze pH, případně se vzorek zfiltruje (1, 4) nebo se využívá SPE s různými sorbenty (2, 3).

Tabulka 1. Charakteristiky vybraných pesticidních látek (5)

Pesticidní látka	CAS No.	M (g/mol)	Klasifikace	Sumární vzorec	Použití	MLR pšenice (ppm)
Carbendazim	[10605-21-7]	191,2	benzimidazol	$C_9H_9N_3O_2$	fungicid	0,1
Difenoconazol	[119466-68-3]	406,3	triazol	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	fungicid	0,02
Imazalil	[35554-44-0]	297,2	imidazol	$C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$	fungicid	0,02
Imidacloprid	[138261-41-3]	255,7	neonikotinoid	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	insekticid	0,01
Iprodion	[36734-19-7]	330,2	dikarboximid	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	fungicid	0,5
Pirimicarb	[23103-98-2]	238,3	karbamát	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	insekticid	0,05
Prochloraz	[67747-09-5]	376,4	imidazol	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$	fungicid	0,5
Thiabendazol	[148-79-8]	201,3	benzimidazol	$C_{10}H_7N_3S$	fungicid	0,05
Tridemorph	[81412-43-3]	297,5	morfolin	$C_{19}H_{39}NO$	fungicid	0,05
Triazoxid	[72459-58-6]	247,7	benzotriazin	$C_{10}H_6ClN_5O$	fungicid	0,05

Koncové stanovení bylo původně založené na plynové chromatografii (GC) ve spojení s detekcí záchytem elektronu (ECD), plamenově fotometrickou detekcí pro dusík a fosfor (NPD) a MS. Hmotnostní spektrometry s iontovou pastí nebo s trojnásobným kvadrupólovým analyzátozem umožnily selektivní detekci pesticidů v komplikovaných materiálech pomocí tandemové MS (MS/MS). Termálně nestabilní a netěkavé pesticidní látky, jakými jsou karbamáty nebo benzimidazoly vyžadují kapalinovou chromatografickou (LC) separaci. Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s MS/MS detekcí patří v současnosti mezi rutinně používané metody pro účely monitoringu pesticidů v potravinách a jiných matricích. Metody stanovení pesticidů se v jednotlivých laboratořích odlišují podle vybavení a zkušeností, avšak všechny metody využívané k oficiální kontrole pesticidů musí splňovat požadavky stanovené v dokumentu SANCO/10232/2006 (6).

Cílem práce bylo sestavit a ověřit screeningovou metodu pro stanovení 10 pesticidních látek vhodných pro HPLC-MS/MS, která bude vyhovovat požadavkům dle SANCO/10232/2006 (6).

3 Materiál a metody

Všechny použité chemikálie byly minimálně p.a. kvality a vyšší. Příprava standardních roztoků pesticidů byly provedena navážením pevných látek o čistotě vyšší než 95 % a rozpuštěním v methanolu.

Tabulka 2. Příprava standardních pesticidních roztoků

Pesticid	Navážka (g)	Objem (ml)	Koncentrace (mg.ml⁻¹)
Carbendazim	0,0021	10	0,207
Difenoconazol	0,0104	10	1,040
Imazalil	0,0109	10	1,088
Imidacloprid	0,0050	10	0,500
Iprodion	0,0051	5	1,019
Pirimicarb	0,0107	10	1,066
Prochloraz	0,0050	5	0,992
Thiabendazol	0,0100	10	0,999
Tridemorph	0,0061	5	1,220
Triazoxid	0,0099	10	0,989

Pro MS/MS optimalizaci byly standardní roztoky (tabulka 2) 100krát zředěny methanolem. Pro stanovení vzájemných interferencí a pro přípravu matricových standardů byly připraveny směsné pesticidní roztoky o koncentraci 100 µg/ml a 10 µg/ml z výše uvedených standardních roztoků. Pro kvantifikaci reálných vzorků a vyhodnocení pracovních charakteristik metody byly připraveny matricové pesticidní standardy o koncentraci 100 ng/ml a 10 ng/ml z výše uvedených směsných pesticidních roztoků.

Příprava: Metoda vycházela z práce D. Ortelliho (1). 20 g vzorku bylo extrahováno ve 40 ml ethyl acetátu třepáním 15 minut při 150 kmitech/min. 5 ml podíl extraktu byl odpařen mírným proudem dusíku při 50 °C a rozpuštěn v 1 ml methanolu a zfiltrován přes 0,2 µm celulózový filtr do minivialky. Pro ověření výtěžnosti metody byly připraveny obohacené matrice s obsahem pesticidů 0,4 ppm.

HPLC-ESI-MS/MS screening: 50 µl vzorku bylo nastříknuto na kolonu Zorbax SB-C18 o délce 15 cm, průměru 4,6 mm a velikostí částic 5 µm. Gradientová eluce analytů byla provedena pomocí mobilní fáze obsahující vodu a methanol. Celkový čas analýzy byl 37 minut. Ionizace probíhala elektrosprejem v pozitivním módu. MS parametry Esquire 6000 (Bruker) – napětí na kapiláře, trap drive, skimmer, napětí na výstupu kapiláry – byly optimalizovány pro měření v MS/MS módu. Za daného tlaku He v pasti byly dále stanoveny kolizní energie pro největší výtěžek fragmentových iontů. Tabulka 3 shrnuje retenční a MS charakteristiky pro jednotlivé sledované pesticidy.

Tabulka 3. Retenční a hmotnostní charakteristiky sledovaných pesticidů

Pesticid	Retenční čas (min)	Mr (g/mol)	Prekursor (m/z)	Produktové ionty (m/z)
Carbendazim	13,9	191,1	192	159,9-160,9
Difenoconazol	24,6	405,1	406	251-291-337
Imazalil	19,8	296,0	297,299	259-201-159
Imidacloprid	16,3	255,0	256	128-174-175-209-210-212
Iprodion	27,9	329,0	330	245-288-188
Pirimicarb	19,0	238,1	239	182-195
Prochloraz	25,0	375,0	376	308-310
Thiabendazol	15,0	201,0	202	175-131-158
Tridemorph	22,0	297,0	298	116-130-240-256-280
Triazoxid	21,6	247,1	248	129-166-157-191-221-209

4 Výsledky a diskuse

Optimalizace MS/MS byla provedena pomocí jednosložkových pesticidních standardů s využitím přímého vstupu do MS. Všechny analyty poskytovaly při ESI intenzivní $[M+H]^+$ fragment, který byl použit jako prekursor při MS/MS experimentu. MS parametry byly podobné a bylo možné vytvořit společnou metodu pro 10 analytů bez výrazného poklesu citlivosti měření. MS/MS fragmentace carbendazimu, thiabendazolu, triazoxidu a imidaclopridu odpovídala postupnému odštěpování substituentů navázaných na řetězcích s dusíky a štěpení těchto řetězců. Při stanovení carbendazimu se využilo charakteristického fragmentu $[M+H]^+$ - m/z 32, který odpovídal ztrátě methanolu a při analýze thiabendazolu

[M+H]⁺- m/z 27, který odpovídal odštěpení kyanovodíku. Tridemorph a iprodion odštěpovaly alifatické řetězce, prochloraz imidazol, difenoconazol triazol. Pirimicarb ztrácel dimethyl- a trimethylamin a imazalil dichlorbenzen a imidazol.

Analýza QC vzorků. Výtěžnost na sledované hladině 0,4 ppm byla u 5 látek v rozsahu požadovaných (70 – 110) % a dalších pěti případech byla nižší (tabulka 4). RSD byly nevyhovující u thiabendazolu a imidaclopridu, tj. větší než 15 % (6). Kvantifikační limity (LOQ) byly vypočteny z S/N stanoveného v matricovém standardu MS2 o koncentraci 0,1 ug/ml. Vypočtené LOQ byly vyhovující vzhledem k maximálním limitům reziduí (MLR) pro sledované pesticidy v potravinách rostlinného původu, konkrétně pro pšenici nebo ječmen (7). Pro zlepšení stávající metodiky bude testována chromatografická separace na koloně Zorbax XDB-C18 s odlišnými separačními vlastnostmi, vliv okyselení složek mobilní fáze kyselinou mravenčí, výběr prekursoru a způsob kvantifikace.

Tabulka 4. Validační parametry použité metody

	Matricový efekt (%)	Výtěžnost pro 0,4 ppm (%)	Opakovatelnost (%)	LOQ (ppm)	MLR⁷ (ppm)
Carbendazim	111	98	12	0,005	0,1
Difenoconazol	78	79	6	0,0003	0,02
Imazalil	92	58	1	0,0005	0,02
Imidacloprid	112	97	16	0,01	0,01
Iprodion	70	61	10	0,02	0,5
Pirimicarb	96	53	3	0,0001	0,05
Prochloraz	81	69	4	0,0002	0,5
Thiabendazol	113	95	21	0,05	0,05
Tridemorph	73	57	3	0,001	0,2
Triazoxid	113	80	5	0,04	0,05

Analýza reálných vzorků krmiv. V roce 2005 byly analyzovány vzorky pšenice, žita, ječmene, koňského bobu a hrachu. U žádného vzorku nebyla zjištěna přítomnost sledovaných pesticidních látek. U některých vzorků byly nalezeny píky v retenčních časech charakteristických pro imidacloprid a tridemorph, avšak naměřená spektra neodpovídala standardům. Matricové interference byly zjištěny pro imidacloprid na m/z 212 a pro tridemorph na m/z 280, které byly vyřazeny z vyhodnocovacích parametrů pro tyto látky.

5 Závěr

Pro stanovení 10 pesticidních látek, carbendazimu, imidaclopridu, thiabendazolu, tridemorphu, triazoxidu, pirimicarb, prochlorazu, imazalilu, difenoconazolu a iprodionu byla sestavena HPLC-MS metoda, ověřena analýzou obohacených vzorků a využita k analýze 10 vzorků v rámci programu monitoringu krmiv. Přítomnost sledovaných pesticidů nebyla prokázána.

6 Literatura

- 1 D.Ortelli, et al., Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* **2004**, 520, p. 33-45.
- 2 G.-F. Pang, et al., Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants* **2006**, 23 (8), p. 777-810
- 3 M.Anastassiades, et al., Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and „Dispersive Solid-Phase Extraction“ for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *Journal of AOAC International* **2003**, 86 (2), p. 412-431.
- 4 C. Blasco, et al., Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-ion trap-triple stage mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1098, p. 37-43.
- 5 C.D.S. Tomlin, *The Pesticide Manual*, Twelfth Edition, British Crop Protection Council, **2000**.
- 6 Quality control procedures for pesticide residues analysis, Document N ° SANCO/10232/2006.
- 7 Vyhláška č.68/2005 Sb., kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 158/2004 Sb., kterou se stanoví maximálně přípustné množství reziduí jednotlivých druhů pesticidů v potravinách a potravinových surovinách.

Příprava pšeničné mouky pro Rapid Mix Test

Eva Morávková, Markéta Pospíchalová, Radvana Šulová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno

marketa.pospichalova@ukzuz.cz, radvana.sulova@ukzuz.cz

1 Souhrn

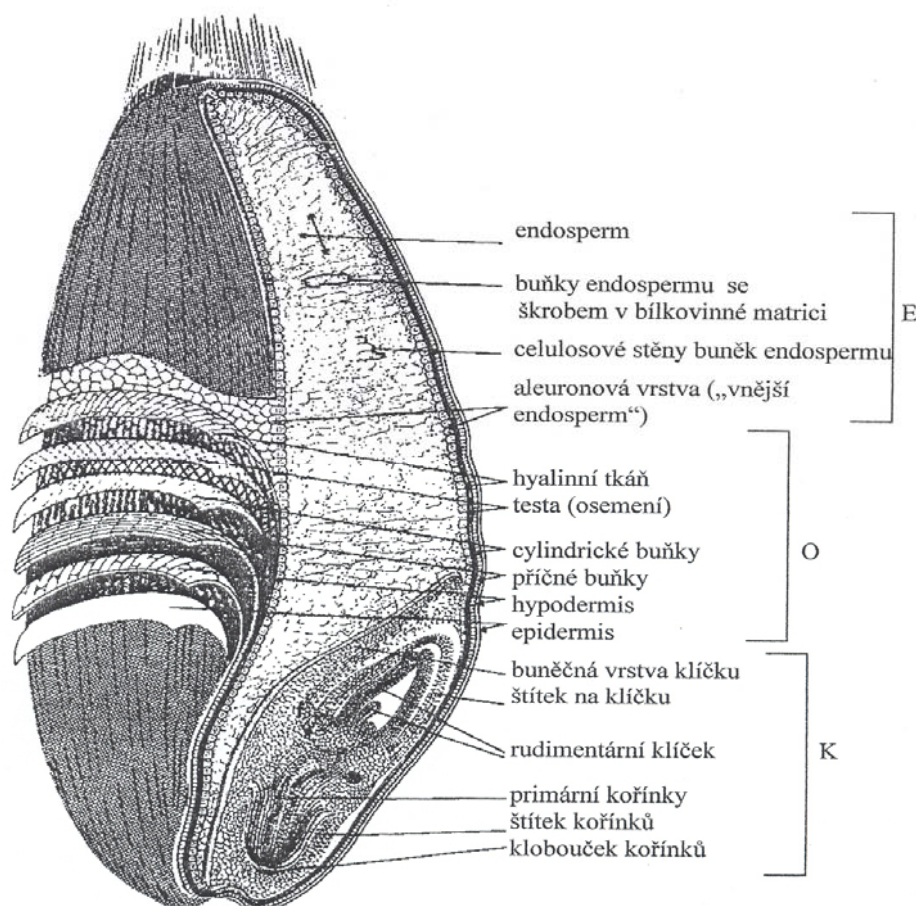
ÚKZÚZ je pověřen ze zákona registrací odrůd a prováděním zkoušek nutných pro tento účel. Technologické rozbory potravinářské pšenice se provádí v NRL- RO Brno. Součástí zkoušek užité hodnoty odrůd jsou chemické, fyzikálně chemické, technologické a mechanické rozbory sklizených produktů. Jakost odrůdy vychází z obecně akceptovaných ukazatelů, které jsou geneticky podmíněny. Jakost konkrétní odrůdy je ovlivňována ročníkem, lokalitou, úrovní hnojení, výskytem chorob apod. Pro hodnocení potravinářské kvality pšenice se v NRL RO Brno provádí řada laboratorních stanovení podle platných norem ISO a ČSN. Reologické a technologické testy se provádějí na mouce připravené z pšeničného zrna. K přípravě mouky se používá mlýn MLU 202 Bühler a její kvalita je závislá především na seřízení mlýna a na správné hydrotermické úpravě zrna před mletím. Cílem práce bylo navržení optimálních podmínek pro mletí mouky určené pro Rapid Mix Test RMT.

2 Úvod

Pro správné pochopení problematiky mlýnské technologie je potřeba objasnit si některé pojmy a procesy. V úvodu se proto zmíníme o hodnocení pšeničného zrna z morfologické stránky, o přípravě zrna k mletí, stručné charakteristice mouk, laboratorních mlýnech, mlecím procesu a laboratorní mlýnu MLU-202.

2.1 Charakteristika pšeničné mouky

Mouka je rozmělněná vnitřní část obilného zrna, tzv. endospermu (obr. 1), kdy mlýn vymílá středové části zrna a v konečných fázích zbytky endospermu ze zbytků otrub. Vlastnosti endospermu zrna ovlivňují technologický proces. Mlynářské a pekařské vlastnosti zrna pšenice jsou určovány anatomickými a morfologickými znaky, látkovým složením a vnitřní strukturou endospermu. Tvrdost zrna je dána genetickým základem odrůdy.



Obr. 1. Struktura zrna: O - vrstva zrna přicházející při mletí do otrub, E - část zrna přecházející do mouky, K - část zrna odstraňovaná i s klíčkem

Podíl mouk a krupic a množství odpadu jsou ovlivněny velikostí a tvarem zrna, velikostí a hloubkou jeho podélné rýhy. Struktura endospermu působí na tvrdost zrna, na jeho sklovitost, na velikost a tvar vymletých částic. Čím je zrno méně vymleto, tím je mouka bělejší, neboť klesá podíl bílkovin a je nižší obsah hrubé vlákniny. Při vyšším stupni vymletí roste obsah minerálů, tj. obsah popele. Z technologického hlediska jsou nejdůležitější zásobní

bílkoviny, které se řadí do skupiny prolaminů a glutelinů. Pšeničná mouka obsahuje (10 – 14) % bílkovin, obsah minerálních látek se podle stupně vymletí pohybuje v rozmezí (0,400 – 1,800) %, přičemž vyšší je u tmavých vysoko vymletých mouk.

V závislosti na vlastnostech odrůdy pšenice se mouky dělí na pečivářenské, určené na výrobu sušenek, oplatek a crackerů, a na pekárenské pro výrobu bílého kynutého pečiva. Další speciální mouky jsou vhodné na výrobu listových a plundrových těst, pizzy, hamburgerů a na těstářenské výrobky.

Mouky získané pomletím různých částí zrna se vyznačují různými vlastnostmi:

- Střed endospermu obsahuje kvalitní škrobová zrna a obsahuje mouky s pružným krátkým lepem, které jsou pekařsky nevhodné. Jsou vhodné pro vařené výrobky - těstoviny, knedlíky, šlehané, třené hmoty. Obsah popele je (0,200 – 0,400) %. Vyznačují se nulovou aktivitou enzymů.
- Směrem od středu k okraji endospermu jsou pekařské mouky, které jsou středně vymleté, jsou tažnější a mají pružný lepek. Škrobová zrna jsou již narušená, aktivita enzymů je velmi nízká, obsah popele se pohybuje v rozmezí (0,400 – 0,600) %.
- V části okraje endospermu a již aleuronové vrstvě je mouka s vyšším obsahem tažného lepku a s nízkou elasticitou, škrobová zrna jsou poškozená, aktivita enzymů vzrůstá, pružný lepek se ztrácí, obsah popele je (0,600 – 4) %. Jedná se o vysoce vymleté mouky.
- Vnitřní část obalových vrstev obsahuje popel v rozmezí (4 – 6) %. Obsah škrobu je nízký, zbytkový škrob je poškozen a aktivita enzymů je rovněž velmi nízká.
- Vnější obalové vrstvy jsou tvořeny neškrobovými polysacharidy (celuloza, hemiceluloza) a jsou zde zastoupeny lignin a minerální látky; aktivita enzymů je nulová, vrstvy jsou bez škrobu, obsah popele je kolem 7 %.

Při vymílání zrna ovšem nedochází k tak jednoznačnému vymletí mouk z jednotlivých částí zrna, jak je popsáno výše. Rozdělení jednotlivých frakcí na třídících strojích není dokonalé, proto jsou přední frakce kontaminovány obalovými vrstvami a obsah popele je tak o něco vyšší. Naopak zadní frakce jde až do středu zrna, a proto je obsah popele ve skutečnosti o něco nižší. Dokonalé oddělení vnitřních vrstev endospermu ani není žádoucí, protože bychom dostali frakce s nepoškozenými škrobovými zrny a s nevhodnou kvalitou proteinu a lepku. Taková mouka by byla pekařsky nepoužitelná.

Obsah popele ve skutečně vymletých jednotlivých frakcích je významným ukazatelem a naznačuje technologické vlastnosti, a tím zpracovatelskou vhodnost. Co se týče složení klíčku a aleuronové vrstvy, je toto složení natolik odlišné od endospermu, že jejich využití pro RMT je nevhodné. Jedná se však o velmi malý hmotnostní podíl v zru.

2.2 Tvrdość zrna a výtěžnost mouky

Tvrdość zrna a výtěžnost mouky patří mezi mlynářské znaky. Odrůdy s tvrdým zrnem se většinou vyznačují nižším podílem šrotových mouk. Nejvyšší výtěžnost při mletí je patrná u středně tvrdých odrůd. U měkkých pšenic je znatelně vyšší podíl šrotových mouk, nízký podíl vymílacích mouk a nižší výtěžnost mouky. Pro RMT se vymílá mouka na obsah popele kolem 0,550 % (T 550). V praxi však při mletí dochází k rozptylu hodnot obsahu popele. Proto se povolený obsah popele u mouky T 550 pohybuje v rozmezí (0,490 – 0,600) % v sušině. Tato mouka je řazena do skupiny mouk hladkých světlých až polohrubých světlých. Tvrdość zrna je určována metodou PSI (Particle Size Index) podle normy AACC 55-30 (The American Association of Cereal Chemists – Fyzikální test). Metoda je založena na uzančném drcení zrna na speciálním mlýnku (Pertem LM Mill 3303 s hlavou č. 2). Mírou tvrdosti zrna je podíl propadu meliva sítem 0,075 mm vyjádřený v jednotkách PSI %. Dělení odrůd podle relativní tvrdosti uvádí tabulka 1. Vyšší hodnoty mají odrůdy s měkkým zrnem, nižší jsou u tvrdých odrůd.

Tabulka 1. Dělení odrůd podle stupnice relativní tvrdosti (Norma AACC 55 – 30)

Tvrdość odrůdy	PSI (%)	Příklad odrůdy
Velmi tvrdé odrůdy	8 – 12	Alana, Sulamit
Tvrdé odrůdy	13 – 16	většina odrůd, např. Ebi, Alka, Brea, Estica
Středně tvrdé odrůdy	17 – 20	Niagara, Šárka, Saskia, Apache
Měkké odrůdy	21 – 25	Samanta, Nela, Contra

Rozdělení odrůd pšenice do skupin podle tvrdosti nesouvisí s rozdělením odrůd do jakostních skupin podle pekařské kvality (E, A, B, C).

2.3 Příjem obilí, jeho skladování a příprava k mletí

Technologická hodnota pšeničného zrna je do značné míry ovlivněna průběhem sklizně, posklizňovým ošetřením a skladováním. V období sklizně je nejčastějším problémem porůstání zrna v klase, které zhoršuje jeho skladovatelnost a pekařskou kvalitu. Rovněž poléhání porostu zhoršuje transport asimilátů do zrna. Tím se rovněž zhoršují fyzikální a fyzikálně chemické ukazatele kvality zrna se zhoršením mlynářské a pekařské kvality mouky.

Zrno, které se dostane do skladu, prochází procesem posklizňového dozrávání po dobu 3 týdnů až 6 týdnů. Zrno, které je neporušené, nenapadené škůdci a neporostlé vlivem vysoké vlhkosti, prochází dalšími technologickými procesy: tříděním, čištěním a hydrotermickou úpravou. Cílem hydrotermické úpravy je zlepšení mlynářských vlastností zrna - účinnější oddělení obalových vrstev od endospermu, a tím získání optimálních pekařských vlastností pšenice.

Důležité ukazatele hydrotermické úpravy jsou

- Intenzita nakropení, tj. množství použité vody
- Doba odležení
- Četnost opakování cyklu nakropení a odležení

Tvrdá pšenice potřebují delší dobu odležení, měkké pšenice kratší dobu. Zrno se kropí na (15,5 – 16) % vlhkosti. Měkké pšenice se kropí na 15 %, extrémně měkké na 14 %. Tvrdá pšenice a měkká pšenice s velkým zrnem se kropí na 16 %. Doba odležení se pohybuje v rozmezí (14 – 16) hod. Zvyšování míry nakropení poškozuje mlýnskou a pekárenskou kvalitu zrna a má rovněž negativní vliv na výtěžnost těsta a pečiva.

Režim přípravy vzorku před mletím je velmi důležitý, neboť ovlivňuje granulaci mouky, obsah a kvalitu bílkovin, aktivitu enzymů a stupeň poškození škrobu.

2.4 Teorie mlecího procesu

Mlecím procesem se rozumí postupné těžení endospermu od středu k obalům. Mlecí proces je drtícím procesem meliva mezi dvěma protiběžnými válci válcové stolice. Válce jsou opatřeny povrchovou úpravou, jsou rýhované nebo hladké a s rozdílnou obvodovou rychlostí a předstihem. Mezera mezi válci je mlecí spára. Ta se upravuje podle toho, jaké jsou požadavky na jednotlivé frakce, tzv. pasážní produkty. Je jedním z velmi důležitých parametrů drcení.

Princip mlýnského zpracování zrna

- Základní jednotkou je mlecí chod neboli pasáž, která se sestává z drcení meliva a následného třídění.
- Mlýnský proces se skládá z většího počtu pasáží, které na sebe navazují tak, že část frakcí z třídění v předchozí pasáži je melivem pro další chod.
- Směrem od středu k vnějším obalům zrna se mlecími chody a jejich tříděním získávají mouky přední a zadní.

Pasážní produkty odpovídají svým složením vlastnostem určité vrstvy obilky během mlecích chodů. Liší se navzájem obsahem popele. S obsahem popele se mění barva mouky - od bílé až krémově nažloutlé; od tzv. přední, k nahnědlé až našedlé, tzv. zadní.

Fáze mlecího procesu u pšenice

Šrotovací fáze – dochází k otevření zrna při zachování slupek ve větších kusech, je širší mlecí spára, vznikají přepady, krupice, krupičky, pasážní šrotové mouky.

- Luštění – vznikají jemnější částice, drtí se krupice, separují se klíčky.
- Vymílání mouky – drtí se krupice, vydírají se zbytky endospermu z obalových částí.

Pro dosažení optimální účinnosti mlecího procesu se používají doplňkové mlecí stroje jako např. vytloukačky, vytíračky otrub apod.

V mlýnském provozu se z hlediska optimalizace a požadavků obchodní sítě využívají různé vymílací klíče, popřípadě jejich střídání. Tím se dosahuje rozdílného stupně vymletí mouky, avšak při zachování technologické kvality mouky. Při mletí nejde pouze o vytěžení maxima endospermu, ale o jeho rozdělení do několika kvalitativně odlišných frakcí pro odlišné zpracovatelské využití.

Hlavní druhové mlýnské produkty a jejich vlastnosti

- Krupice, hrubé mouky, polohrubé mouky – obsahují převážně nepoškozený škrob, lepek s vysokou elasticitou a nízkou tažností, popel se pohybuje v rozmezí (0,350 – 0,550) %. Jsou to přední pasážní produkty, pekařsky nevhodné.
- Hladká mouka světlá – škrob je mírně poškozen, obsah popele je (0,500 – 0,600) %. Lepek je vyrovnaný, jeho obsah se pohybuje kolem 30 %. Mouka je získána z převážně předních pasáží a je vhodná na výrobu bílého kynutého pečiva.
- Hladká mouka polosvětlá – je podobná světlé mouce, obsahuje přední pasáže s přidavkem pasáží středních až zadních. Je to kvalitní pekařská mouka s vyšší

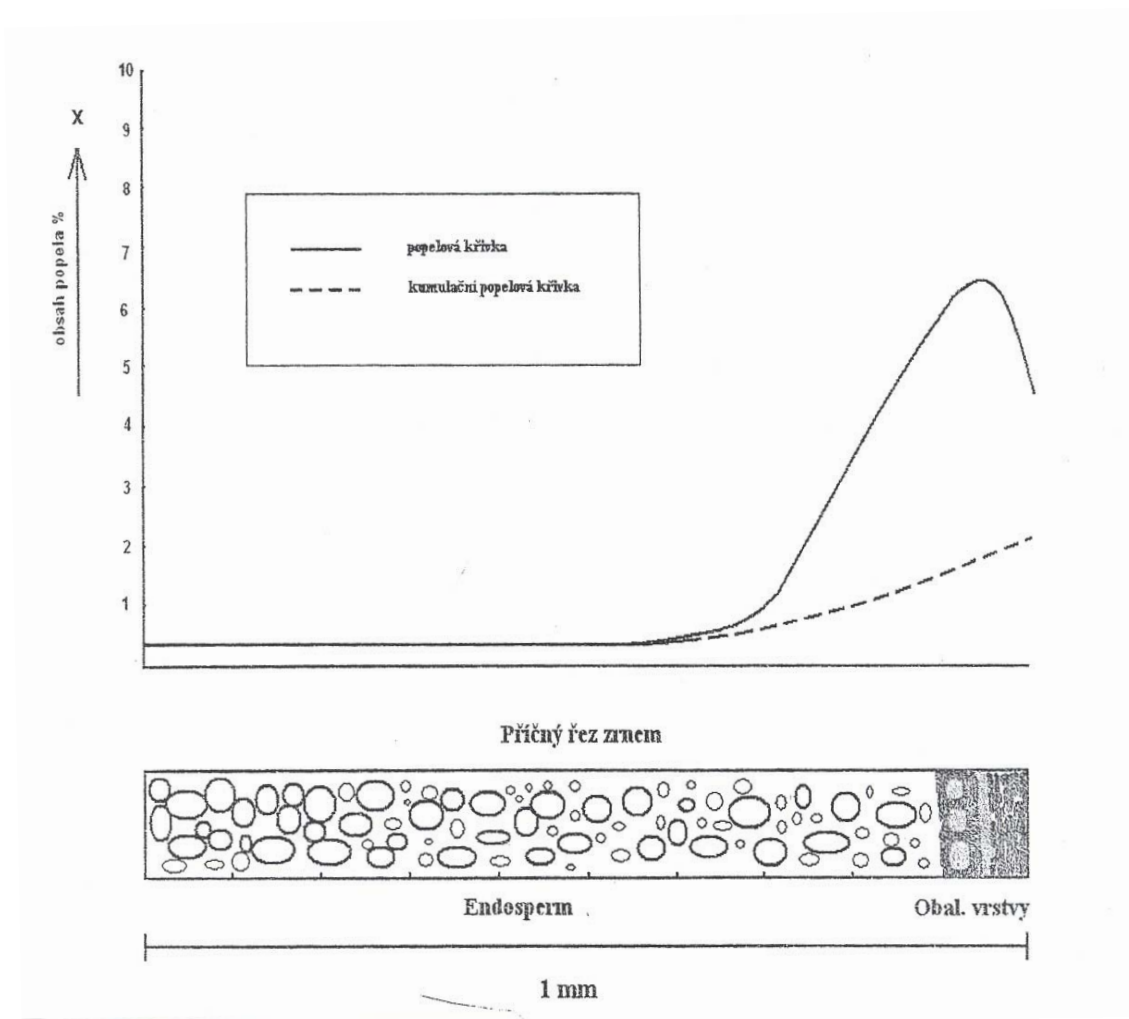
vazností a tažností. Obsah lepku je vyšší než 30 %, obsah popele (0,600 – 0,750) %. Mouka je vhodná na výrobu pečiva s výjimkou chlazených těst (šedivé těsto).

- Hladká mouka chlebová – škrob je vysoce poškozen, lepek nad 35 %, málo pružný až rozplývavý; jsou to mouky ze středních až zadních pasáží, u nichž je obsah popele (0,800 – 1,150) %. Mouka je určena na výrobu chleba.
- Krmné produkty – krmná mouka, která zahrnuje většinou otruby, obsah popele je (5 – 7) %.

2.5 Obsah popele

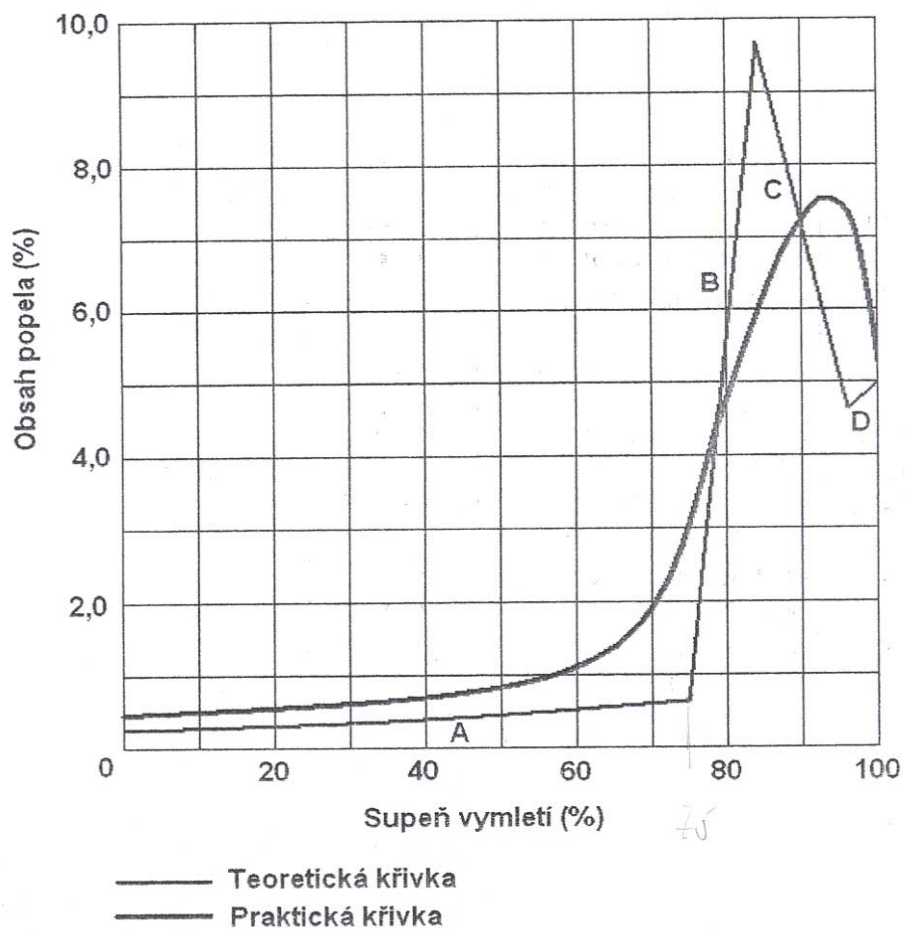
Stanovení obsahu popele v mouce je kontrolním znakem stupně vymletí zrna ve mlýně a znakem pro zařazení mouky dle druhu a typového označení. Popel je souhrnem minerálů po spálení organického materiálu. V celém zrně se jeho obsah pohybuje v rozmezí od 1,25 % do 2,5 %. Je tvořen převážně oxidem fosforečným, zastoupen je také hořčík, vápník, železo, ale i těžké kovy. Závislost obsahu popele na vzdálenosti od středu zrna k jeho povrchu vyjadřuje popelová křivka (obr. 2.). Je zřejmé, že obsah popele se směrem od středu zvyšuje nelineárně.

Na obrázku je znázorněna rovněž kumulační popelová křivka, která odpovídá obsahu popele v celé frakci.



Obr. 2. Popelová křivka. Obsah popele v anatomických částech pšeničného zrna.

Popelová křivka byla navržena technologem Mohsem. Na základě závislosti výtěžnosti mouky a obsahu popele je zpracována tabulka (obr. 3.), kde se odečítají kumulované obsahy popele vyjádřené v % v sušině nebo naopak dle obsahu popele se odečítá teoretická výtěžnost mouky. Bod 0 je střed zrna a 100 je jeho vnější okraj. Např. při teoretické výtěžnosti o hodnotě 70 % odpovídá obsah popele hodnotě 0,563 %. Skutečnou výtěžnost znázorňuje praktická křivka. Porovnáním získané výtěžnosti a obsahu popele s Mohsovou křivkou se zhodnotí úroveň mlecího procesu. Optimální výtěžnost mouky pro RMT by se měla pohybovat kolem 69,2 %.



Obr. 3. Průběh teoretické a praktické popelové křivky(diagram podle Mohse): A - mletí endospermu, B - mletí aleuronové vrstvy, C - mletí osemení a oplodí, D - oddělení klíčku

3 Laboratorní mlýny

Mouka se pro zhodnocení kvalitativních znaků odrůd připravuje na laboratorních mlýnech. Mouka připravená na těchto zařízeních se poněkud odlišuje od provozně připravených mlýnských výrobků. Označuje se jako typ T 550 a musí především splňovat požadavky pro zkoušení reologických a technologických vlastností potravinářské pšenice. Je připravena takovým vymílacím klíčem, že její výtěžnost se pohybuje v rozmezí (63 – 75) %, což je v provozní praxi nemyslitelné. V praxi totiž dochází k vymletí několika oddělených mlýnských produktů, které jsou technologicky různě zpracovatelné. Naopak mouka z laboratorních mlýnů svými vlastnostmi (obsahem N látek, lepku a jeho kvalitou, ČP, bobtnavostí lepku) charakterizuje kvalitu celého zrna pšenice, s výjimkou obalových částí (otruby) a klíčku (vnitřní obsah zrna). Tyto části zrna se při mletí odstraňují.

3.1 Mlýn Chopin CD 1

Mlýn (obr. 4) je určen pro přípravu pšeničné mouky pro alveografické hodnocení. Mouka získaná vymletím na tomto mlýnu je z hlediska složení a reologických vlastností blízká průmyslovým moukám.

Zrno je nutno před mletím vyčistit a zbavit všech příměsí a nečistot proséváním na síť (2,2 × 20) mm. Vlhkoměrem se stanoví vlhkost zrna a ta se pak následně upraví kropením na (15,5 – 16,5) %. Zrno se po přidavku vody několikrát důkladně promíchá v uzavřené nádobě tak, aby se přidaná voda stejnoměrně rozdělila mezi zrno. Zrno nesmí ulpívat na stěnách nádoby. Nechá se odležet 16 hod. až 18 hod. a před mletím se opět promíchá. Z množství vymletých produktů se stanovuje výtěžnost šrotových mouk a celková výtěžnost (efektivnost mletí).

Výtěžnost mouk by se podle návodu měla pohybovat v rozmezí (65 – 72) %, v praxi se však pohybuje kolem 63 % v závislosti na nastavení válců a na stupni přemletí. Nevhodné nastavení mlýna ovlivňuje výtěžnost mouky a její kvalitu. Na průběh mletí má vliv rovněž i rychlost podávání a doba prosevu produktů. Je potřeba dosáhnout optimálního množství podílu poškozeného škrobu, aby reologické vlastnosti mouky odpovídaly moukám z předních až středně vymletých pasáží o obsahu popela 0,550 %. Mouky vymleté laboratorním mlýnem Chopin CD 1 nejsou pro pekařský pokus RMT příliš vhodné, protože pro RMT je potřeba minimálně 2 kg pasážní mouky skupiny hladkých světlých mouk.



Obr. 4. - Laboratorní mlýn Chopin

3.2 Quadrumat Senior

Laboratorní mlýn Quadrumat Senior (obr. 5.) od firmy Brabender patří mezi universální mlýnky. Množství vzorku k mletí je 1 kg, výtěžnost se pohybuje mezi (65 – 75) %. Na tomto mlýnu je možno připravit mouku pro RMT i další reologická stanovení. Jedná se o osmi válcovou stolicí s dvěmi jednotkami sít. Výsledkem vymílání jsou 4 mlecí produkty. Nastavením válců je možno získat mouku o obsahu popele (0,450 – 0,650) %. Rychlost podávání je asi 55 g za 30 s pro měkkou pšenici a 60 g za 30 s pro tvrdou pšenici. Zrno se kropí na 14,5 %. Těsně před mletím se zrno nakropí ještě o 0,5 %.



Obr. 5. - Laboratorní mlýn Quadrumat Senior

3.3 Mlýn Bühler MLU-202

Mlýn Bühler MLU-202 (obr. 6.) připravuje mouku T 550 pro pekařský pokus RMT a pro další reologická a technologická stanovení. Jedná se o válcovou stolicí s vysévači. Na mlecím automatu Bühler MLU 202 se získávají 3 pasáže šrotové mouky a 3 pasáže vymílací mouky. Ve výsledcích se uvádí souhrn šrotové mouky a vymílací mouky a celková výtěžnost mouky.



Obr. 6. - Laboratorní mlýn Bühler MLU-202

3.3.1 Popis mlýna

Laboratorní mlecí automat Bühler MLU-202 s pneumatickým podáváním produktu je umístěn na pevné podlaze tak, aby nedocházelo ke chvění a posunu. Motor pohonu a ventilátor jsou namontovány na základové desce. Mlýn je zakrytý konstrukcí, mlecí válce jsou uloženy horizontálně, proto musí být mlýn horizontálně vyrovnaný. Chod mlýna je hlučný a prašný.

3.3.2 Nastavení mlýna Bühler MLU-202

Při mletí a práci s mlýnem je nutno dodržovat všechny pokyny dodané výrobcem, dodržovat všechny bezpečnostní předpisy a návod k použití mlýnu. S mlýnem může pracovat pouze zaškolená osoba. Mlýn i místnost se musí udržovat v čistotě, nikde nesmí ulpívat prach.

Nastavení a obsluha mlecích válců

Nastavení polohy mlecích válců může provádět pouze zodpovědný pracovník. Při neodborné manipulaci může dojít k nevratnému poškození mlýna a ke znehodnocení výsledku mletí.

Válce se po otevření krytů nastaví pomocí listové měrky na 0,1 mm. Uvolní se upevňovací matky a na škále se nastaví ukazatel na číslo 10, což odpovídá vůli válců 10/100. Upevňovací matky se dotáhnou. Kalibrovaná škála udává faktický rozestup válců. Otáčením vřeten je možno pomocí ukazatele upravovat a odečítat rozestup válců dle potřeby. Ve zkušebním provozu mlýna se mezery mezi válci upravovaly tak dlouho, až výtěžnost mouky dosáhla požadovaných (68 – 72) %. Při optimálním nakrápění pro pekařský pokus se obsah popele pohyboval kolem hodnoty 0,550 %. Válce byly nakonec nastaveny na tyto rozestupy:

B2 = 16/100,

B3 = 8/100,

C1 = 3/100,

C3 = 1/100 (zjednodušeně pro šrotovou část 16/8 a domílkovou část 3/1).

V případě nižší nebo vyšší výtěžnosti mouky a neodpovídající hodnotě popele se rozestupy znovu musejí na zkušebním zrna nastavit tak, aby mouka vykazovala tyto základní ukazatele v požadovaných mezích.

Vysévače

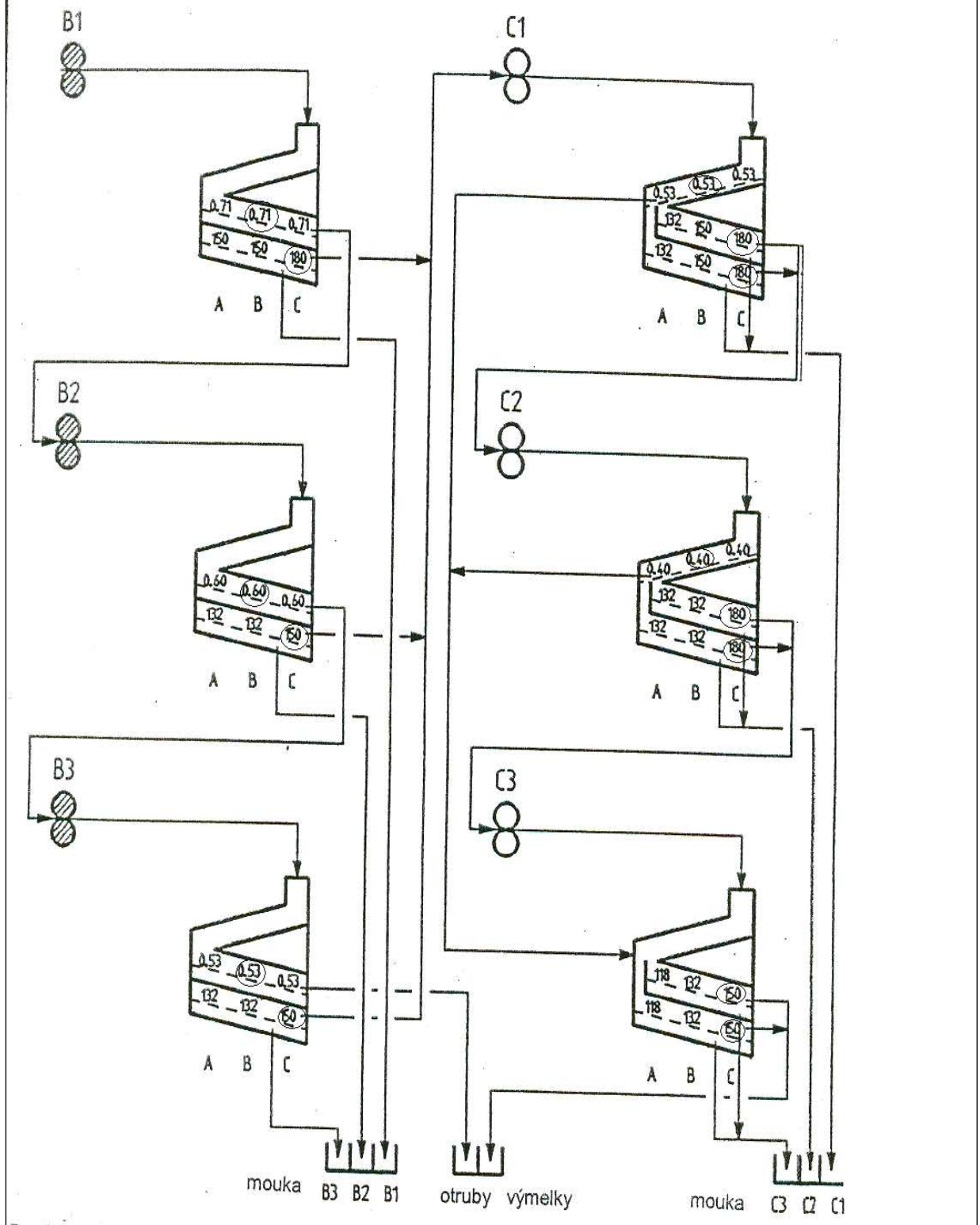
Mlýn má 12 vysévačů se síťovými zásuvkami. Zásuvky musejí být při mletí dobře uzavřeny a musejí být nastaveny tak, aby se namletý produkt rovnoměrně rozdělával. Hrubší částice slupek a klíčky jsou pomocí předsít od výmelků odděleny a do mouky se tudíž nedostanou. Část mletého produktu se přes síta dostane do připravených nádob, část jde k dalšímu mletí a znovu přes síta do sběrných nádob.

Doprava produktu

Polohováním vzduchových klapek se reguluje rychlost průchodu produktu mezi jednotlivými částmi obou pasáží. Nastavení je zleva doprava. Mouka se po projití šrotovou pasáží a domílacími válci dostává pneumaticky zpět do částí B a C k dalšímu vymílání. Každá strana má 3 větve s příslušnými cyklony. Obě části jsou napojeny na společnou aspiraci. Přes vysokotlaký ventilátor a hrdlo ventilátoru s filtrem se převádí produkt z jedné části mlýna do druhé části mlýna.

Pokud při průchodu dojde k ucpání cyklonu vytvořením klenby, musí se cyklon vyčistit falešným vzduchem. Před řetězovým kolem je zamontován střižný čep, který slouží jako pojistka proti nadměrnému přetížení. Zabráni tak případnému poškození mlýna v důsledku vniknutí cizího tělesa. V případě poškození se musí čep vyměnit.

DIAGRAM: LABORATORNÍ MLECÍ AUTOMAT MLU-202
MĚKKÁ PŠENICE



Obr. 7 Diagram mlýny Bühler MLU-202

4 Pracovní postup mletí

4.1 Příprava vzorku

- 1 Naváží se 3 kg vzorku pšenice.
- 2 Změří se vlhkost vzorku na vlhkoměru typu Dickey-John GAC 500 MT.
- 3 Vzorek se nakropí potřebným množstvím vody.
- 4 Nakropené zrno se důkladně promíchá v umělohmotných nádobách na míchačce BSP 06 (obr. 8.) po dobu 30 min. Nechá se odležet 14 hod. až 16 hod. (ideálně přes noc) a ráno se znovu dobře promíchá.
- 5 Znovu se změří vlhkost zrna na vlhkoměru, zapíše do deníku a naváží se přesně 3 kg navlhčeného zrna na mletí.



Obr. 8. - Laboratorní míchačka BS

4.2 Dávkování zrna

Rychlost dávkování zrna do prvního šrotu B1 se reguluje polohou hradítka u násypky na stupnici 0 až 8. Přesná poloha je dána objemovou hmotností pšenice, to znamená propadem zrna v otvoru. Pro nastavení mezery se z násypky sundá gumová hadice vedoucí do 1. šrotu a změří se čas vysypání. 3 kg zrna by mělo projít za čas delší než 15 minut. Průběh mletí musí být plynulý. Odzkoušením byla pro mouky pro RMT stanovena jako vhodná poloha hodnota 4. U měkkých a extrémně tvrdých odrůd a při neodpovídající výtěžnosti mouky je nutno dávkování změnit. U měkkých pšenic se nastaví na hodnotu 3, u tvrdých pšenic rychlost podávání pak nastavíme na polohu 4 až 5. V úvahu se musí brát i míra nakropení.

4.3 Mletí

Mlýn je nastaven podle postupu uvedeném v kapitole 3.3.2. Základní nastavení šrotových válců je 16/8, domílkových válců 3/1 a rychlost podávání je na hodnotě 4. Před uvedením mlýna do provozu se provede jeho kontrola podle postupu uvedeném v Poznámce 1. Zrno je připraveno podle postupu 4.1. Poté se může přistoupit k mletí. Mlýn je nutno během mletí kontrolovat tak, jak je uvedeno v poznámce 2.

Poznámky:

1. Před uvedením mlýna do provozu se zkontroluje

- *Není-li v prostoru pohyblivých částí (mlecí válce, válce podavače, síta vysévačů) cizorodé těleso, například uvolněná podávací klapka, zapomenutá štětka.*
- *Jsou-li všechny odnímatelné díly na svém místě (síta, dvířka obslužných okének a je-li hadice vedoucí k válci B1 napojena na násypku).*
- *Jsou-li správně umístěny nádoby na mouku a otruby.*
- *Souhlasí-li nastavení mlecích válců, vzduchových klapek a hradítka u násypky s běžně používaným postupem.*
- *Je-li polohovací páka válců na straně šrotu -B- zasunuta a na straně domílků -C- vysunuta. (Při stávajícím nastavení mohou být obě páky zasunuty celou dobu).*
- *Nezůstalo-li ve vnitřních prostorách mlýna (za obslužnými okénky, ve vysévačích) větší množství produktu z předchozího mletí.*
- *Pravidelně 1 × denně, častěji při mletí měkkých pšeníc, je nutno vyprášit filtr ventilátoru (látkový pytel v zadní části mlýna), neboť se v něm shromažďují nežádoucí nejjemnější frakce mouky a různé nečistoty.*
- *Pokud aspirační ztráta (3 kg – (hmotnost mouky + otrub)) výrazně přesáhne 100 g až 150 g, je nutno před dalším mletím vyprášit filtr.*
- *Domílkové válce se v průběhu mletí zahřívají třením o čisticí kartáčky. Proto je po každém mletí potřeba jejich teplotu zkontrolovat, s horkými válci by se nemělo mlet, je třeba nechat je vychladnout. Kartáčky se musí kontrolovat a minimálně 1 × týdně vyčistit.*

2. Kontrola mlýna během mletí

- *Mlýn se musí za chodu neustále kontrolovat. Musí mít pravidelný chod, stejnoměrné otáčky, žádné zvukové odlišnosti. Mlýn se musí udržovat v čistotě. V případě, že se pšenice nebo některý z produktů nedopatřením vysype, dá se tak beze ztrát vrátit, kam patří.*
- *Misky na mouku mají vlivem vibrací mlýna tendenci se pohybovat a může tak dojít k nežádoucímu promíchání čisté a popelové mouky. Je proto potřeba misky v průběhu mletí jednoho vzorku 1 × nebo 2 × posunout zpět na místo, případně jejich polohu zajistit závažím.*
- *Na mlýn se nesmí nic pokládat.*
- *Plátno v sítích vysévačů je náchylné na poškození, při jakékoliv činnosti v jeho blízkosti je potřeba zvýšené pozornosti.*
- *Při ucpání cyklonu za chodu se poklepe gumovou nebo dřevěnou paličkou. Při ucpání gumové hadice, když cyklony neprochází produkt, se vypne mlýn, odpojí se hadice a vyčistí se.*
- *V případě hromadění pšenice v 1. koloně je nutno zkontrolovat, zda se pohybují lopatky směšovače. Pokud ne, musí se vypnout mlýn a kontaktovat opravář.*
- *Při změně zvuku mlýna nebo jiném problému se musí mlýn okamžitě vypnout a kontaktovat opravář.*
- *Za chodu se nesmí mlýn čistit!*

4.4 Stanovení výtěžnosti, popele a vlhkosti

Stanovení výtěžnosti

Zváží se hmotnost čisté mouky (frakce B1 + B2 + C1 + C2), popelové mouky (frakce B3 + C3) a hmotnost otrub a výmelků (šrotu). Jednotlivé frakce jsou znázorněny v diagramu pro laboratorní mlýn Bühler MLU 202.

Ze získaných hodnot se vypočítá výtěžnost podle vztahu

$$\text{Výtěžnost (\%)} = \frac{\text{hmotnost veškeré mouky (kg)} \times 100}{\text{hmotnost veškeré mouky (kg)} + \text{hmotnost otrub a výmelků (kg)}}$$

Výtěžnost by se měla pohybovat v rozmezí (68 – 75) %.

Stanovení popele a vlhkosti

Kromě výtěžnosti se u čerstvě vymleté mouky stanoví ještě hodnoty vlhkosti a popele. Nejprve se však musí čerstvě namletá mouka dobře promíchat. Smíchají se frakce čisté mouky (1 + 2 + 4 + 5) s frakcemi popelové mouky (3 + 6), nasypou do umělohmotné míchací nádoby a míchají na automatické míchače po dobu 15 minut. Poté se v získané mouce stanoví obsah popele a vlhkosti, obojí metodou NIR. Vlhkost vymleté mouky by měla být (13 – 15) %, obsah popele by se měl pohybovat kolem hodnoty 0,550 %.

4.5 Zrání a skladování mouk

Po ukončení mletí prochází mouka procesem biochemických a fyzikálně chemických změn – dochází ke zrání mouky. Za optimální dobu zrání mouky se považují 2 týdny. V tomto období se výrazně mění reologické vlastnosti mouky. Např. jakost lepku se skladováním mouky zlepšuje, zvyšuje se jeho pružnost, naopak jeho obsah a bobtnavost klesá až o (1,5 – 3) %. Množství celkového dusíku se nemění, pouze bílkovinný dusík se mírně snižuje. Po delší době zrání se zvyšuje vaznost, vzrůstá síla mouky. Objem pečiva se v prvních měsících zvyšuje, později se zmenšuje v důsledku snížení schopnosti tvorby plynu. Velmi dlouhé skladování může proto vést ke znehodnocení mouky.

Více vymleté mouky zrají rychleji. Delší zrání musí prodělat mouky připravené z mladého zrní. Rychlost zrání mouky se zvyšuje se vzrůstající vlhkostí a teplotou skladování.

Pro hodnocení reologických vlastností mouky (farinograf, alveograf apod.) je nutné, aby během skladování, vlhkost mouky nepřekročila hodnotu 15 %.

5 Diskuse a výsledky

Byl odzkoušen postup přípravy zrna před mletím. Pro zajištění dostatečné homogenity vzorku se používá automatická laboratorní míchačka zrna. Vlhkost zrna je určována pomocí vlhkoměru. Byly vyvinuty kalibrační rovnice na stanovení obsahu popele a vlhkosti v mouce metodou NIR spektrometrie.

Dále byl odzkoušen proces mletí na mlýnu Bühler MLU-202. Válce dodaného mlýnu byly původně firmou Bühler nastaveny na vymílání mouk s obsahem popele kolem 0,450 % v sušině. Proto se nastavení spár mlecích válců a rychlost podávání zrna do šrotové části mlýna během 6 měsíčního uvádění mlýna do provozu měnily tak dlouho, dokud vymletá mouka neodpovídala požadavkům na kvalitu mouky pro laboratorní pekařský pokus RMT. Hodnotily se především parametry výtěžnost a obsah popele. Při nastavení šrotových válců na 16/8 se měnily spáry domílkových válců na hodnoty 10/5, 7/6, 5/4, 4/2, 3/1. Nyní jsou domílkové válce nastaveny na mezery 3/1 a podávání zrna na hodnotu 4.

Příklad výsledných vyhovujících hodnot zkušebních mouk s nastavením mlýna 16/8, 3/1 a dávkováním zrna 4 uvádí tabulka 2. Uvedené hodnoty byly získány umletím 3 kg zrna při vlhkosti zrna 15,5 %.

Tabulka 2. Parametry zkušebních mouk pro nastavení mlýnu 16/8, 3/1 a dávkování 4.

Číslo vzorku	Mouka (g)	Výmelky (g)	Otruby (g)	Celkem (g)	Výtěžnost (%)	Popel v sušině (%)
6821	2047	349	441	2837	72	0,536
6822	1964	418	452	2834	69	0,555
6823	1958	260	593	2811	69	0,554
6824	1958	406	444	2862	70	0,566

Z tabulky můžeme odvodit, jaký má být přibližný poměr mezi množstvím mouky, šrotu a otrub při dodržení kvalitativních ukazatelů procesu mletí, kterými jsou výtěžnost a obsah popele.

Je zřejmé, že při nedokonalém vymílání se sníží výtěžnost, sníží se množství mouky a zvýší se množství šrotu a otrub. Rovněž musíme mít na zřeteli fakt, že při vymílání měkkých pšenic se vymílá více otrub a při vymílání extrémně tvrdých pšenic se získá více šrotu.

Při mletí mouk mohou nastat případy, kdy se obsah popele nebo hodnota výtěžnosti liší od hodnot uvedených v tabulce. V těchto případech se snažíme upravit podmínky mletí podle níže uvedených pokynů

- **Zvýšení obsahu popele**

a) Pro měkké pšenice je typické, že mouka má nižší obsah popele. Abychom nemuseli měnit nastavení válců, což vždy přináší určitá rizika, snažíme se obsah popele zvýšit snížením kropení zrna o 0,5 % vlhkosti a zpomalením podávání zrna do šrotové části mlýna. Zrno se tím pádem více vymílá, a to znamená, že se zvyšuje obsah popele a výtěžnost. Např. u odrůdy Samanta, která se řadí mezi měkké pšenice, se musí kropení snížit o 0,5 % na hodnotu 15,0 %.

b) Některé odrůdy nedosahují mouky s popelem 0,550 % ani po zásazích do mlýna. Proto aby se zvýšil obsah popele, se získané otruby znovu přemelou a veškerá mouka se dobře smíchá. Mlýn se však musí kontrolovat, aby se neucpaly cyklony. Přemílání otrub může nahradit vytloukačka otrub. Tyto problémy nastávají u měkkých pšenic. Typickým příkladem je opět odrůda Samanta.

- **Zajištění optimální výtěžnosti**

Optimální výtěžnost mouky s popelem 0,550 % se má podle Mohsovy tabulky pohybovat v rozmezí (69 – 70) %. Pro mlýn Bühler MLU-202 se optimální výtěžnost dle dodané dokumentace pohybuje v rozmezí (68 – 71) %.

a) V případě, že výtěžnost mouky je vysoká, zvýší se rychlost podávání zrna a může se snížit množství vody při kropení.

b) V případě, že výtěžnost mouky je nízká, zpomalí se podávání zrna a může se zvýšit kropení. V obou případech je nutno zkontrolovat výši popele.

- **Kontrola vlhkosti získané mouky**

Vlhkost vymleté mouky je pro RMT velmi důležitá a její hodnotu musíme rovněž pečlivě kontrolovat. Optimální vlhkost mouky pro RMT je (12,8 – 13,2) %, kdy pečený výrobek vykazuje dobré ohodnocení. V případě, že získaná mouka má vlhkost pod 12 %, je nutno zvýšit kropení zrna minimálně o 0,5 %. V případě, že má mouka vlhkost nad 14,5 %, musí se snížit kropení zrna minimálně o 0,5 %.

6 Závěr

Cílem práce bylo navržení optimálních podmínek pro mletí pšeničné mouky určené pro Rapid Mix Test.

Pro přípravu mouky byl zvolen nově zakoupený mlýn Bühler MLU-202. Byly odzkoušeny různé varianty nastavení mlýna a zároveň byl optimalizován postup přípravy zrna před mletím. Na základě získaných výsledků výtěžnosti mouk a hodnot popele byl navržen postup mletí, který využívá základního nastavení mlýna na hodnoty spár šrotových válců 16/8, domílkových válců na 3/1 a hodnoty dávkování 4. Pro případy, kdy kvalitativní parametry mletí (výtěžnost a obsah popele) nevyhovují daným limitům, byly navrženy postupy, jak tyto situace řešit.

Optimalizovaný postup mletí byl odzkoušen na zru ze sklizně 2006. Výsledky odpovídaly potřebě RMT.

Před přípravou mouky z nové sklizně se musí provést zkušební mletí a musí se ověřit kvalita mouky. V případě rozdílů se musí upravit podávání, popř. množství vody pro hydrotermickou úpravu. Nastavení spár mezi válci by se pokud možno měnit nemělo. Měnit se může pouze v krajních případech, kdy kvalita mouky neodpovídá požadavkům RMT i po popsáních úpravách. Každá změna, ať už v přípravě vzorků, v úpravě podávání, či v nastavení mlýna, se musí ověřit odzkoušením kvality mouky v RMT.

7 Literatura

- 1 Bühler; Provozní návod pro mlecí automat MLU-202
- 2 Faměra O., Hrušková M.: Vliv tvrdosti zrna na charakteristiku mletí odrůd pšenice, Sborník Qualima **2003**, Hradec Králové
- 3 Hampl J., Křivan P., Hrušková M.: Cereální chemie a technologie, Praha **2003**
- 4 Hampl J.: Cereální chemie a technologie, Praha **1970**
- 5 Příhoda, Humplíková, Novotná: Základy pekárenské technologie, Praha **2003**

Bulletin Národní referenční laboratoře XI 2007/3

Ročník: XI, č. 3
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2007
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce: Ing. Iva Strížová
Náklad: 150 výtisků
Počet stran: 48
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

PISSN 1801-9196