

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2013

Ročník XVII, číslo 3/2013

Brno 2013

Obsah

1. **Stanovení namořenosti obilovin**
Pavla Tieffová, Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 1

2. **Stanovení glycerol-triheptanoátu (GTH) ve zpracovaných odpadních surovinách živočišného původu metodou GC-MS**
Pavla Tieffová, *Michaela Růžková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno
*Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Praha,
Za Opravnou 4, 150 06 Praha 6

3. **Úprava mineralizačního postupu rostlinného materiálu na suché cestě pro rozklad lesních vegetativních orgánů**
Václav Rypl, Iveta Dvořáková, Libuše Tůmová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Plzeň,
Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň 18

4. **Převedení metod stanovení doplňkových látek na přístroj UHPLC (Dionex UltiMate 3000)**
Marta Mádlová, Radmila Varmužová, Eva Egersdorfová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Praha,
Za Opravnou 4, 150 06 Praha 25

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení namořenosti obilovin

Pavla Tieffová, Petra Kosubová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
pavla.tieffova@ukzuz.cz, petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Úvod

Cílem práce bylo vypracovat postup pro posouzení kvality namořenosti osiva na základě analytického rozboru a stanovit obsah účinných látek z použitého pesticidního přípravku ve vzorcích mořeného osiva.

Mořicí přípravky k ochraně osiva proti škůdcům a houbovým chorobám obsahují velké množství různorodých složek, vedle vlastní účinné látky i výstražné barvivo, rozpouštědla a emulgátory. Přípravky schválené k aplikaci na určitou plodinu mají předepsané složení a postup pro jejich správné použití. Aby bylo možné ověřit dodržení těchto předpisů a kontrolovat identitu a správné použití přípravků, je nutné vypracovat metodu vhodnou pro identifikaci a kvantitativní stanovení různých účinných látek v namořeném osivu.

Od roku 2011 ÚKZÚZ, Oddělení osiva a sadby Praha, opět požaduje u vybraných vzorků namořeného osiva kontrolu deklarovaného použití mořících přípravků chemickou analýzou. Postupy stanovení byly v NRL-RO Brno zkoušeny a ověřovány v roce 2007. V současné době laboratoř disponuje novým přístrojovým vybavením, a proto je nutné aktualizovat a rozšířit metodu pro stanovení namořenosti.

Normovaný postup kvantitativní analytické metody pro stanovení namořenosti není k dispozici.

2 Princip stanovení

Účinné látky se z celých namořených zrn extrahují do acetonu pomocí sonifikace vzorku v ultrazvukové lázni. Zfiltrovaný extrakt se použije pro přípravu zředěných roztoků pro koncové LC-MS a GC-MS stanovení.

3 Materiál a metody

Podrobný postup přípravy vzorku, seznam použitých chemikálií i přístrojového vybavení je uveden v příslušných kapitolách Jednotných pracovních postupů ÚKZÚZ (1, 2).

Pro koncové stanovení a kvantifikaci obsahu stanovovaných látek v připraveném extraktu byly použity chromatografické přístroje s hmotnostně selektivním detektorem. Pro GC-MS stanovení sestava Trace GC Ultra/ITQ 1100 (Thermo), pro LC-MS stanovení sestava UPLC-MS/MS XEVO TQ (Waters).

4 Vyhodnocení naměřených dat

4.1 Výpočet a vyjádření výsledků

Podrobný postup měření a zpracování dat je uveden v Jednotných pracovních postupech, Testování odrůd (1, 2).

Po proměření upraveného extraktu vzorku se z vyhodnocovacího programu měřicího přístroje získá hodnota b (ng/ml) koncentrace stanovovaného analytu v proměřovaném extraktu. Po přepočtu na navážku vzorku a ředění extraktu se získá hodnota x (mg/kg) obsahu účinné látky mořicího přípravku v namořeném vzorku.

$$x = \frac{b \cdot V_1 \cdot F}{m} \qquad F = \frac{V_3}{V_2}$$

- kde x je obsah účinné pesticidní látky v namořeném vzorku (mg/kg),
 b koncentrace analytu v proměřovaném roztoku (ng/ml), odečtená z kalibrace,
 F zředovací faktor,
 V_1 objem zásobního extraktu (ml); $V_1 = 5$ ml,
 V_2 objem aliqutního podílu ze zásobního extraktu (μ l); např. $V_2 = 10$ μ l,
 V_3 objem proměřovaného extraktu ve 2ml vialce (μ l); $V_3 = 1000$ μ l,
 m navážka vzorku v mg.

Je-li to požadováno, vypočte se i hodnota namořenosti N , která udává množství účinné látky na výsevní jednotku (VJ). Není-uváděno jinak, tak 1 VJ = 100 000 zrn.

$$N = x \cdot HVJ \cdot 10^{-3}$$

kde N je namořenost vzorku (g/VJ),

x obsah účinné pesticidní látky v namořeném vzorku (mg/kg),

HVJ hmotnost výsevní jednotky (kg).

4.2 Mez stanovitelnosti

Detekční limit (LOD) pro stanovení koncentrace b zjišťovaných analytů je dán nejnižším bodem kalibrační přímky. Zásobní extrakt V_I po vyextrahování namořených zrn je nutné mnohonásobně zředit, a proto se podle použitého zředovacího faktoru F významně zvyšuje mez stanovitelnosti (LOQ). Pro LC-MS metodu je dosažitelná LOQ = 0,1 mg/kg, pro GC-MS metodu LOQ = 0,5 mg/kg osiva.

4.3 Odhad očekávaného obsahu účinných látek v namořeném osivu

Pro odhad očekávaného obsahu stanovovaných účinných látek je potřeba znát deklarované složení mořicího přípravku a použité dávkování mořidla. Obě informace lze zjistit z etikety mořicího přípravku. Příklady pro mořidla testovaná v obilovinách (vzorky 2011-2012) jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Očekávaný obsah účinných látek ve vybraných mořicích přípravcích.

Mořicí přípravek	Účinná látka	Deklarovaný obsah (g/l)	Dávka (l/t osiva)	Očekávaný obsah (mg/kg osiva)
Celest Extra	Fludioxonil	25	1,5	37,5
	Difenoconazole	25		37,5
Dividend 030FS	Difenoconazole	30	2	60
Kinto Duo	Prochloraz-CuCl ₂	60	1,5	90
	Triticonazole	20		30
Lamardor 400FS	Prothioconazole	250	0,2	50
	Tebuconazole	150		30
Maxim Star 025	Cyproconazole	6,25	2	12,5
	Fludioxonil	18,75		37,5
Orius 6	Tebuconazole	60	0,5	30
Premis Universal	Iprodione	250	1,5	375
	Triticonazole	25		37,5
Raxil 060FS	Tebuconazole	60	0,5	30
Raxil Extra 515FS	Tebuconazole	15	2	30
	Thiram	500		1000
Raxil TNT	Tebuconazole	20	1	20
	Triazoxide	20		20
Scenic 080FS	Fluoxastrobin	37,5	1	37,5
	Prothioconazole	37,5		37,5
	Tebuconazole	5		5
Vitavax 2000	Carboxin	200	2,5	500
	Thiram	200		500

4.4 Posouzení namořenosti osiva

Metoda pro stanovení namořenosti osiva je vhodná k ověření použití deklarovaného mořidla a ke zjištění případné přítomnosti dalších účinných látek, vzniklé záměnou přípravků nebo kontaminací v mořicím zařízení. Analýzou namořeného osiva lze kvalitativně i kvantitativně stanovit obsažené účinné látky, ale nelze zpětně zjistit přesnou koncentraci těchto látek v aplikovaném přípravku ani použitou aplikační dávku.

Nejistota výsledku je dána kombinací více faktorů, může kolísat homogenita namořenosti zrn, jednotlivé složky přípravku nemusejí být vázány na povrch zrna stejně silně a navíc proces rozkladu účinných látek při skladování, přípravě vzorku i vlastní analýze může být rozdílný. Na nejistotu výsledků má vliv i velikost navážky vzorku (pouhých 10 zrn) osiva k analýze a následný přepočtení výsledku na výsevní jednotku (10^5 zrn).

4.5 Analýza reálných vzorků

V roce 2011 byla série 20 vzorků proměřena oběma postupy s koncovým stanovením LC-MS a GC-MS. Při porovnání výsledků byla zjištěna dobrá shoda při použití obou technik, průměrná směrodatná odchylka porovnávaných výsledků byla 3,6 %. Nevýhodou GC-MS stanovení je jeho omezený rozsah, některé analyty (např. thiram, triazoxid, fluoxastrobin) jsou stanovitelné jen LC-MS technikou.

V roce 2012 byla celá série vzorků analyzována jenom metodou LC-MS.

Z celkového počtu analyzovaných vzorků mořeného osiva 89 % obsahovalo účinné látky deklarovaného přípravku, v průměru stanovené obsahy odpovídaly 74% namořenosti. 4 vzorky z této skupiny obsahovaly ještě další účinné látky (nález nad 1 mg/kg), 4 vzorky byly označeny jako nevyhovující, protože neobsahovaly účinné látky odpovídající příslušné deklaraci.

5 Závěr

Byl ověřen postup extrakce účinných látek z namořeného osiva, optimalizovaný již v předchozí etapě vývojového úkolu a byla zavedena LC-MS a GC-MS měřicí a vyhodnocovací metoda pro stanovení namořenosti pro aktuální přístrojové vybavení laboratoře. Byly sepsány a publikovány dvě kapitoly do Jednotných pracovních postupů ÚKZÚZ (1, 2) s podrobným postupem přípravy vzorku, proměření, zpracování a vyhodnocení naměřených dat.

Postupy pro stanovení namořenosti bylo v roce 2011 a 2012 analyzováno 43 vzorků mořených obilovin.

6 Literatura

1. JPP ÚKZÚZ – Testování odrůd, postup 50330.1 – Stanovení namořenosti osiva metodou GC-MS, **2012**.
2. JPP ÚKZÚZ – Testování odrůd, postup 50340.1 – Stanovení namořenosti osiva metodou LC-MS, **2012**.

Stanovení glycerol-triheptanoátu (GTH) ve zpracovaných odpadních surovinách živočišného původu metodou GC-MS

*Pavla Tieffová, *Michaela Růžková*

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

*Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Praha, Za Opravnou 4, 150 06 Praha

pavla.tieffova@ukzuz.cz, petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Souhrn

V roce 2011 EURL-AP in feedingstuffs požádala všechny příslušné NRL členských zemí EU, aby si zajistily možnost kvantitativní analýzy značkovací látky GTH v odpadních produktech živočišného původu. Postup pro označování rizikových surovin látkou GTH (glycerol-triheptanoát) a její stanovení metodou GC-MS je uveden v prováděcí studii (1) laboratoří IRMM, Geel, Belgie (2006). Na základě postupu uvedeného v této studii byla v laboratoři pro reziduální analýzy RO Brno zavedena metoda stanovení glycerol-triheptanoátu (GTH) metodou GC-MS v živočišném tuku a krmných surovinách živočišného původu. Metoda byla validována, akreditována a bude ověřena účastí v mezinárodním porovnávacím testu EUPT-AP.

2 Úvod

Vedlejší produkty živočišného původu vznikají zejména při porážení zvířat k lidské spotřebě, při výrobě produktů živočišného původu, při neškodném odstraňování mrtvých zvířat a během opatření pro tlumení nálezů. Bez ohledu na původ znamenají tyto produkty potenciální zdravotní riziko pro lidi a zvířata i pro životní prostředí. Tyto produkty, přestože nejsou určeny k lidské spotřebě, jsou potenciálním zdrojem rizik, která se v posledních letech projevíla formou epidemií přenosných chorob (BSE, slintavka, kulhavka) a také výskytem

toxické kontaminace krmiv i potravin (zamoření dioxiny). Neškodné odstraňování všech vedlejších produktů živočišného původu je ekonomicky neudržitelné, a proto bezpečné a vhodné využívání těchto produktů je v zájmu společnosti i ochrany životního prostředí.

Nové technologie rozšířily možné využití vedlejších produktů živočišného původu na velké množství odvětví, od krmivářského, farmaceutického a kožedělného průmyslu až po výrobu energie. Hygienická a veterinární pravidla pro sběr, přepravu, manipulaci, ošetření, zpracování, skladování a uvádění na trh jsou podrobně uvedena v Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č.1069/2009 (2) a v příslušném prováděcím dokumentu, v nařízení č. 142 z roku 2011 (3). Podle legislativy je zavedena klasifikace těchto produktů do tří kategorií podle míry rizika spojeného s těmito produkty. Ve zpracovatelských zařízeních, která produkují a dále zpracovávají rizikový materiál 1. a 2. kategorie, musejí být tyto produkty trvale označeny glycerol-triheptanoátem (GTH) způsobem popsáným v prováděcím nařízení (3). GTH se do rizikového materiálu přidává v průběhu tepelného zpracování při teplotě alespoň 80 °C v minimální koncentraci 250 mg GTH na kg tuku. Zpracovatelé i kontrolní orgány musí být schopné ověřit dodržování předepsaného označení rizikových produktů.

Vývojem vhodného postupu označování těchto surovin a optimalizací analytické metody pro kvantifikaci značkovací látky bylo pověřeno výzkumné středisko Komise JRC v laboratořích IRMM v belgickém Geelu. V říjnu 2006 byla zveřejněna závěrečná studie (1) s validovanou analytickou metodou pro GC-MS stanovení GTH v odpadních surovinách živočišného původu. V roce 2012 měly být referenčním laboratořím pro stanovení živočišných proteinů EURL-AP rozeslány vzorky na první porovnávací test EUPT-AP-GTH 01 na stanovení této značkovací látky.

3 Pracovní postup

3.1 Účel

Postup je určen pro chromatografické stanovení s hmotnostně selektivní detekcí (GC-MS) glycerol-triheptanoátu (GTH) v masokostní moučce a v odpadním kafilerním tuku.

Glycerol-triheptanoát je syntetický triglycerid kyseliny n-heptanové, který se podle nařízení (ES) č.142/2011 přidává do odpadního živočišného materiálu při zpracování rizikových surovin (1. a 2. kategorie) v koncentraci 250 mg/kg tuku.

3.2 Princip

GTH se ze vzorku extrahuje do n-hexanu a extrakt se přečistí přes komerčně dostupné čisticí (SPE) kolonky s aminosorbentem. K extraktu se přidá vnitřní standard, rozpouštědlo se odpaří, odparek se převede do isooktanu a obsah GTH se stanoví plynovou chromatografií s hmotnostně selektivní detekcí (GC-MS).

Výsledek se vyjádří v mg GTH/kg tuku, stanoveného postupem pro stanovení tuku v krmivech, uvedeným v nařízení (ES) 152/2009 (4).

3.3 Chemikálie

Použitá rozpouštědla jsou čistoty minimálně p.a., jejich dostačující kvalita se ověřuje proměřením slepého vzorku.

1 n-Hexan.

2 Isooktan.

3 Dietyléter.

3.1 Eluční činidlo, 15% diethyléter v n-hexanu.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 150 ml dietyléteru (3) a doplní se n-hexanem (1) po značku.

3.2 Promývací činidlo, 50% diethyléter v n-hexanu.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se odměří 500 ml dietyléteru (3) a doplní se n-hexanem (1) po značku.

4 Glycerol-triheptanoát, GTH, (1,2,3-trienanthoylglycerol), CAS 620-67-7, $C_{24}H_{44}O_6$, $M_v = 428,6$ g/mol; např. Aldrich 92855.

4.1 Zásobní roztok GTH, $c = 1$ mg/ml.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se naváží ($50 \pm 0,1$) mg GTH (4) a doplní se isooktanem (2) po značku.

4.2 Pracovní roztok (A) GTH, $c = 10$ μ g/ml.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se odměří 0,5 ml zásobního roztoku GTH (4.1) a doplní se isooktanem (3.3.2) po značku.

4.3 Pracovní roztok (B) GTH, $c = 1$ μ g/ml.

Příprava: Do 10ml odměrné baňky se odměří 1 ml pracovního roztoku (A) GTH (4.2) a doplní se isooktanem (2) po značku.

- 5 5α Cholestan, CAS 481-21-0, $C_{27}H_{48}$, $M_v = 372,7$ g/mol, např. Acros 16560 nebo Fluka C8003.
- 5.1 Zásobní roztok cholestanu, $c = 1$ mg/ml.
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se naváží ($50 \pm 0,1$) mg cholestanu (5) a doplní se isooktanem (2) po značku.
- 5.2 Pracovní roztok (A) cholestanu, $c = 10$ μ g/ml.
Příprava: Do 50ml odměrné baňky se odměří 0,5 ml zásobního roztoku cholestanu (5.1) a doplní se isooktanem (2) po značku.
- 5.3 Pracovní roztok (B) cholestanu, $c = 1$ μ g/ml.
Příprava: Do 10ml odměrné baňky se odměří 1 ml pracovního roztoku cholestanu (5.2) a doplní se isooktanem (2) po značku.

3.4 Přístroje a laboratorní vybavení

- 1 Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem (GC-MS/MS), např.: Trace Ultra/ITQ 1100; software Xcalibur (Thermo).
- 2 Kapilární analytická kolona s nepolární stacionární fází; stabilní do 350 °C, např.: DB XLB 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m (J&W Scientific), DB5 MS 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m (J&W Scientific), VF5 MS 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m (Varian).
- 3 Centrifuga s rozsahem otáček nad 4500 ot/min, pro objemy do 100 ml, např. 2-16K (Sigma), centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem, PP, 50 ml.
- 4 SPE manifold.
- 5 SPE kolonky s amino sorbentem, 500mg, 3ml, např.: Bond Elut NH2 (Agilent Technologies) nebo Cleanert NH2 (Bonna-Agela Technologies).
- 6 Zařízení pro odpařování proudem inertního plynu, např. Termovap (Ecom), reakční vialky pro Termovap, sklo, 5 ml.
- 7 Laboratorní třepačka.
- 8 Vialky skleněné, 2 ml a 20 ml, šroubovací víčko, septum s teflonovým povrchem.

3.5 Příprava a čištění extraktu

Pomletá surovina masokostní moučka (MKM) se nemusí dále upravovat. Obsahuje-li vzorek velké částice, pomele se v mlýnku se sítím o velikosti ok 3 mm.

Vzorky tuku a oleje není nutné dále upravovat, tuhé vzorky lze před navažováním rozpustit při 70 °C.

Do centrifugační zkumavky se naváží (10,00 ± 0,01) g vzorku MKM nebo (1,00 ± 0,001) g vzorku tuku. Přidá se 20 ml hexanu, dobře se promíchá a nechá se třepat v laboratorní třepačce 20 min s rychlostí 200 kyvů/min. Po třepání se zkumavka odstředí 10 min při 6000 ot/min, (resp. při maximálně dosažitelné rychlosti).

Do 5ml reakční vialky se napipetuje 1 ml pracovního roztoku vnitřního standardu (1 µg cholestanu). Do SPE manifoldu se upevní čistící kolonky a kondicionují se 6 ml hexanu, promývací hexan se nesbírá. Na připravenou kolonku se nanese 200 µl odstředěného extraktu a GTH se z kolonky vymyje 3 ml elučního činidla do připravené 5ml vialky s vnitřním standardem. Eluát se odpaří k suchu pod mírným proudem dusíku a odparek se rekonstituuje do 2 ml isooktanu. Důkladně se rozpustí pomocí ultrazvuku nebo míchadla Vortex a 1,5 ml se převede do 2ml vialky ke koncové analýze.

3.6 GC-MS analýza vzorku

3.6.1 Chromatografické podmínky

Nosný plyn	Helium; 2 ml/min
Teplota injektoru	250 °C
Teplota MS (TL/IZ)	280/220 °C
Teplotní program	120 °C (1 min)-45 °C/min-260 °C(10 min)-45 °C/min-300 °C(2 min)
Objem nástřiku	2 µl
SSL time	0,75 min
Retenční čas	GTH = 7,9 min, 5 α -cholestan = 11,2 min

3.6.2 Podmínky pro hmotnostní spektrometrii

Elektronová ionizace (EI) při 70 eV, měření v plném skenu (FS) nebo v režimu snímání vybraných iontů (SIM). Pro stanovované látky se sledují nejméně tři fragmenty m/z, Q1 pro kvantifikaci, Q2 a Q3 pro konfirmaci.

Tabulka 1. Vybrané ionty pro kvantifikaci a identifikaci stanovovaných látek

	GTH		ISTD (5 α -cholestan)	
	m/z	Poměr iontů (%)	m/z	Poměr iontů (%)
Q1	299	100	217	100
Q2	228	36,7	357	65,4
Q3	185	30,3	372	44,2

3.6.3 Kalibrace a měření

Před analýzou se zkontroluje aktuální stav MS (typické odezvy pozadí, těsnost systému na hmotách pro vodu a vzduch, odezva na kalibrační plyn). Citlivost systému se ověří analýzou nejnižšího kalibračního bodu. Do měřicí sekvence se zařadí alespoň tři hladiny kalibračních roztoků, promývací rozpouštědlo, série reálných vzorků a na závěr opět kalibrační roztoky.

Tabulka 2. Rozpis pro přípravu kalibrační řady.

Kalibrační úroveň	c (ng/ml)	V (μ l)			
		ISTD (5.2) c = 10 μ g/ml	GTH (4.2) c = 10 μ g/ml	GTH (4.3) c = 1 μ g/ml	Isooktan (2) (μ l)
1	5	50	0	5	945
2	50	50	0	50	900
3	100	50	0	100	850
4	1 000	50	100	0	850
5	1 250	50	125	0	825
6	1 500	50	150	0	800

Linearita ($R^2 \geq 0,995$) byla ověřena v koncentračním rozsahu 5 ng až 7500 ng GTH/ml isooktanu, s vnitřním standardem o koncentraci 500 ng/ml. Postačující kalibrační rozsah pro kvantifikaci vzorků je 5 ng až 1500 ng GTH/ml, to za podmínek daných postupem odpovídá 1 až 300 mg GTH/kg tuku ve vzorku.

3.6.4 Výpočet a vyjadřování výsledků

Z poměru ploch kvantifikačních iontů Q1 pro GTH a vnitřní standard se vypočte relativní odezva GTH a sestrojí se kalibrační přímka, proložená osovým počátkem (vyhodnocovací program příslušné MS metody).

Obsah GTH v proměřovaném extraktu se vypočte ze směrnice kalibrační přímky, sestrojené ze všech naměřených kalibračních bodů pro danou sérii vzorků.

Výsledek se vyjádří v mg GTH/kg tuku a vypočte se podle vztahu

$$C = \frac{b \cdot F}{m \cdot w} \cdot 10^2 \qquad F = \frac{V_1 \cdot V_2}{V_3} \cdot 10^{-3}$$

kde	C	je	obsah GTH ve vzorku v mg/kg tuku,
	b		obsah GTH odečtený z kalibrační přímky v ng/ml,
	m		navážka vzorku v g,
	w		obsah tuku ve vzorku v %,
	F		zředovací faktor,
	V_1		objem extračního hexanu v ml; $V_1 = 20$ ml,
	V_2		objem isooktanu v ml; $V_2 = 2$ ml,
	V_3		aliquot nanesený na SPE kolonku v ml; $V_3 = 0,2$ ml.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace postupu

Postup ÚKZÚZ je založen na metodě JRC (1). Základní pokyny pro přípravu extraktu, jeho čištění a proměření byly dodrženy. Byly optimalizovány především chromatografické podmínky, přidavek vnitřního standardu a ředění extraktu vzorku.

Chromatografické podmínky

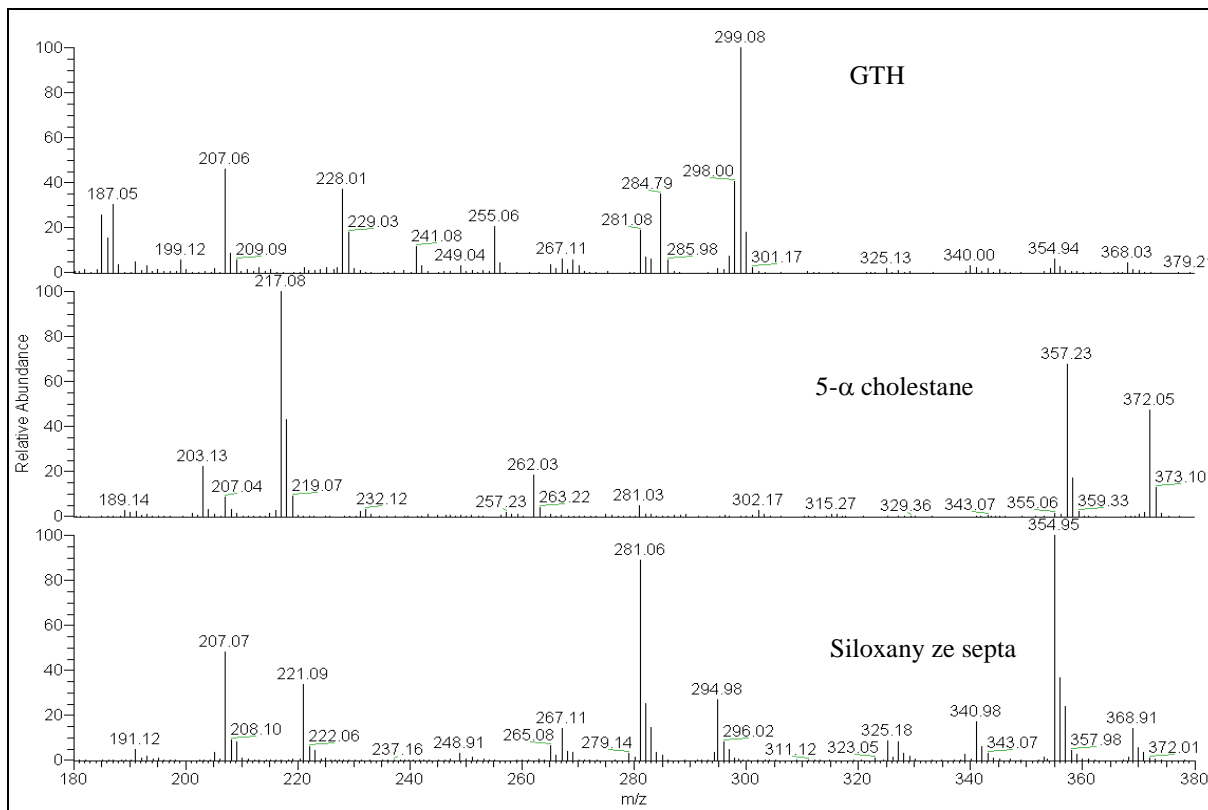
Analýza byla odzkoušena na GC-MS přístroji s MS analyzátozem typu iontová past (ITQ 1100) s 30m analytickou kolonou DB XLB. Teplotní program byl upraven tak, aby zůstal

dostatečně rychlý, šetrný k analytické koloně a umožnil separaci zájmových složek (GTH a cholestanu) od hlavních rušivých píků (siloxany ze septa a kolony).

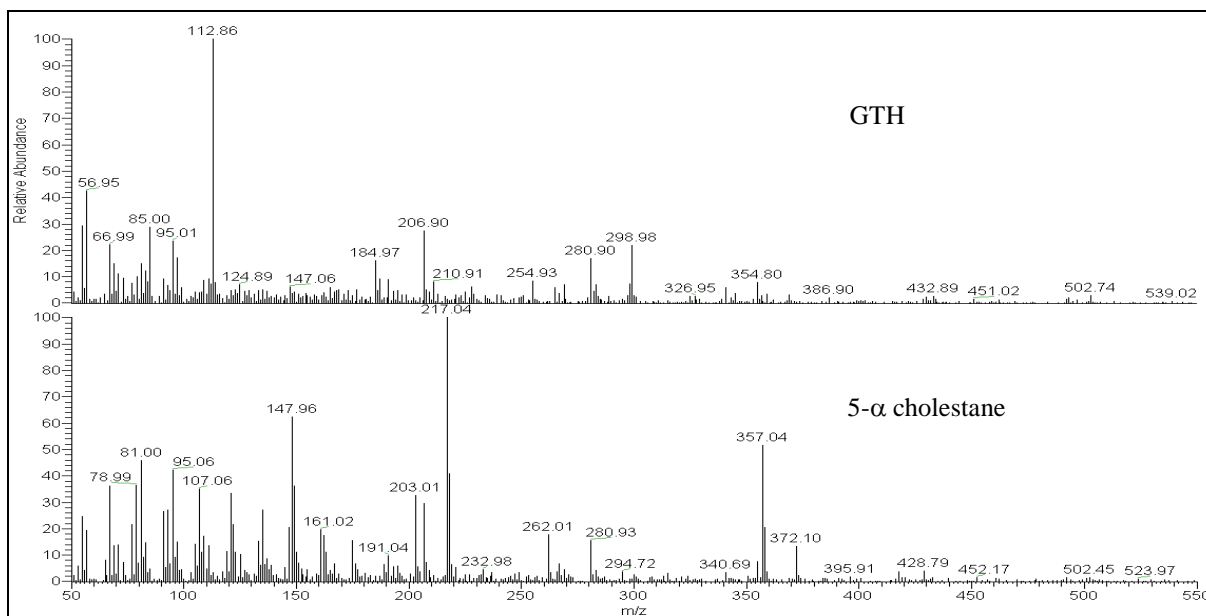
Podmínky pro hmotnostní spektrometrii

Pro obě látky bylo změřeno MS spektrum v širokém rozsahu m/z a byly vybrány nejvhodnější hmotnostní fragmenty pro kvantifikaci i konfirmaci stanovované látky v optimálním rozsahu m/z od 180 do 380.

Obrázek 1. Porovnání MS spekter v rozdílném skenovacím rozsahu m/z .



1. rozsah m/z = 180-380



2. rozsah m/z = 50-550

Při měření v rozsahu 50-550 stanovovaná látka GTH poskytovala nejvyšší fragment $m/z = 112,9$. Tato nízká hmota ale není dostatečně selektivní a šum pozadí je vysoký. Zúžením rozsahu na 180-380 se výrazně snížil šum a hmota nejintenzivnějšího fragmentu $m/z = 299,1$ je dostatečně selektivní a umožní s potřebným odstupem signál/šum stanovit GTH v roztoku o koncentraci 5 ng/ml.

Při výběru vhodných konfirmačních fragmentů (pro GTH byly hodnoceny m/z 185, 228, 255, 285 a pro 5- α cholestane m/z 357, 372; FS 180-380) byla zohledněna intenzita i stabilita fragmentu (směrnice kalibrační přímky a korelační koeficient pro ověřovaný fragment). Jako nejlepší byly pro GTH vybrány fragmenty 228 a 285, ale rozdíly mezi hodnocenými fragmenty nebyly výrazné.

Ověřena byla rovněž možnost snímání spekter v MS/MS režimu po sekundární fragmentaci z rodičovských iontů m/z 299 a 217, ale dceřiné spektrum neposkytovalo významné ionty.

Příprava extraktu a jeho čištění na SPE

Původní postup JRC (1) byl optimalizován pro stanovení GTH v rozsahu 10 mg a 100 mg GTH/kg vzorku, ale podle stávající platné legislativy se GTH přidává ke vzorku v koncentraci 250 mg/kg tuku. Proto byly navážky i další ředění extraktu vzorku v nově navrženém postupu pozměněny. Navážka vzorku byla upravena tak, aby extrakt obsahoval přibližně 50 mg tuku/ml extrakčního hexanu, tedy navážka 1 g tuku a 10 g MKM (10% tuk) do 20 ml hexanu. Potom alikvot 0,2 ml čištěný přes SPE obsahuje maximálně 10 mg tuku (JRC postup 15 mg).

Optimální přídavek vnitřního standardu (ISTD) byl 500 ng/ml proměřovaných roztoků (JRC 600 ng/ml).

Nebyla testována maximální kapacita SPE kolonky, pouze byla ověřena výtěžnost čisticího kroku pro alikvot 0,2 ml (spike na hladině 25 a 250 ppm do MKM a tuku) a dostatečnost eluce. Výtěžnost tohoto kroku byla v průměru 98 % a při dalším promytí kolonky už GTH nalezeno nebylo. Rovněž byla ověřena možnost opakovaného použití SPE náplně. Použitá kolonka byla promyta 10 ml promývacího činidla (3.2), kondicionována 6 ml hexanu a vysušena proudem vzduchu. Při opakovaném použití byly výtěžnosti shodné s daty získanými z nových kolonek.

Další změna byla provedena při ředění vyčištěného extraktu. Podle JRC postupu se extrakt s přídavkem ISTD po SPE ředil do 5 ml isooktanu a část se převedla do 2ml vialky pro GC-MS stanovení. Vhodnější je přidat jen 1 µg ISTD a 2 ml isooktanu, po rozpuštění převést 1,5 ml do vialky pro koncové stanovení.

V případě potřeby dosáhnout nižší meze stanovitelnosti (stanovení stop GTH v krmné směsi) lze snížit zředovací faktor zvýšením alikvotu pro SPE čištění a snížením objemu isooktanu pro rekonstituci odparku po SPE.

Koncentrační rozsah

Linearita byla ověřována v širokém rozsahu koncentrace od 5 ng do 10000 ng GTH/ml, do 7500 ng/ml byla závislost relativní odezvy lineární, $R^2 \leq 0,995$. Praktický rozsah kalibrace byl zvolen od 5 ng do 1500 ng/ml, což při zředovacím faktoru $F = 200$ odpovídá rozsahu 1 mg až 300 mg GTH/kg tuku ve vzorku. Matricový efekt nebyl významný a kvantifikace obsahu mohla být provedena na solventovou kalibraci.

4.2 Validace postupu

Postup byl ověřen analýzou 3 různých vzorků ve dvou opakováních, obohacených přídavkem standardu GTH na hladině 25 ppm a 250 ppm, vztaženo na obsah tuku ve vzorku. Z extraktu takto připravených vzorků byly odebrány 4 alikvotní podíly pro SPE čištění, podíly A, B byly čištěny přes nové kolonky, podíly C, D přes kolonky použité a čištěné. Vnitřní standard byl přidán do vialky po SPE v množství 500 ng/ml isooktanu. Výtěžnost všech vzorků (A, B, C, D) byla srovnatelná.

Tabulka 3. Přídavky standardů k matici testovaných vzorků.

Matrice	LS č.	Tuk (%)	Navážka (g)	25 ppm	250 ppm
				GTH (μg)	GTH (μg)
Tuk	1276/K 06	100	1	25	250
MKM 1	445/K 10	14,9	10	37	371
MKM 2	806/K 10	7,3	10	18	182

Dále byly proměřeny slepé vzorky testovaných matic, byla ověřena stabilita retenčních časů a vliv maticového efektu. Byla sepsána a doložena podrobná validační zpráva.

5 Závěr

Navržená metoda byla ověřena opakovanou analýzou vzorků masokostní moučky a živočišného tuku, obohacených přídavkem standardu GTH na dvou koncentračních hladinách 250 ppm a 25 ppm, tj. na úrovni očekávané koncentrace a na desetíně této hodnoty. Detekční limity byly stanoveny proměřením nejnižší úrovně kalibrační přímky na hladině 5 ng GTH/ml. Za podmínek daných postupem lze dosáhnout meze stanovitelnosti LOQ = 1 mg GTH/kg tuku.

Relativní opakovatelnost metody byla 5,40 % (6,34 % na hladině 25 mg/kg a 4,27 % na hladině 250 mg/kg). Výtěžnost postupu byla v povoleném rozmezí (80 – 110) %.

Postup byl zpracován jako metoda 660 JPP-ZK ÚKZÚZ (5), validován a akreditován podle ISO 17025 v RO Brno jako zkouška č. 356.

6 Literatura

1. A. Boix, F. Serano, S. Bellorini, Ch. Holst, Implementation study to evaluate glyceroltriheptanoate (GTH) as a marker for animal by-products in rendering systems, DG JRC IRMM, Geel, Belgium, 2006.
2. Nařízení EP a Rady (ES) č.1069/2009 ze dne 21.10.2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě, a o zrušení nařízení (ES) č.1774/2002 (nařízení o vedlejších produktech živočišného původu).
3. Nařízení Komise (ES) č.142/2011 ze dne 25.2.2011, kterým se provádí nařízení EP a Rady (ES) č.1069/2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě a provádí směrnice Rady 97/78/ES, pokud jde o určité vzorky a předměty osvobozené od veterinárních kontrol na hranici podle uvedené směrnice.
4. Nařízení Komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv.
5. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – Zkoušení krmiv; 2012, postup 10660.1 – Stanovení obsahu GTH metodou GC-MS.

Úprava mineralizačního postupu rostlinného materiálu na suché cestě pro rozklad lesních vegetativních orgánů

Václav Rypl, Iveta Dvořáková, Libuše Tůmová

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

1 Úvod

Při analýze asimilačních orgánů lesních dřevin pomocí rozkladu na suché cestě je výtěžnost při stanovení manganu nízká. Je předpoklad, že příčinou je nedostatečné rozpouštění popela v kyselině dusičné. Cílem práce je ověřit možnost zlepšení převodu manganu do roztoku pomocí kyseliny chlorovodíkové a poté metodu verifikovat.

2 Materiál a metody

2.1 Princip

Navážka vzorku se spaluje v muflové peci postupným zvyšováním teploty tak, aby nedošlo ke ztrátám analytů, tj. je odstraněna organická matrice vzorku a vzniklý popel je následně rozpuštěn ve zředěné kyselině dusičné. Výhodou tohoto postupu je možnost použití vysokých navážek vzorku tj. dosažení nízkých detekčních limitů a také stanovení mnoha prvků, což činí daný postup značně univerzálním. Vzniklý mineralizát je přiveden do Ar/Ar plazmatu (ICP-OES), kde na základě emise charakteristických kvant energie je určeno složení vzorku.

2.2 Chemikálie

- 1 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná.
- 2 Kyselina dusičná, HNO₃, koncentrovaná.
- 3 Voda, destilovaná.
- 4 Kyselina chlorovodíková, zředěná, 1 : 1, (V : V).

Příprava: 100 ml koncentrované HCl (1) se zředí vodou na celkový objem 200 ml.

- 5 Kyselina dusičná, HNO_3 , $c(\text{HNO}_3) = 10 \text{ mol/l}$.
Příprava: 692 ml koncentrované kyseliny dusičné (2) se zředí na celkový objem 1000 ml.
- 6 Kyselina dusičná, HNO_3 , $c(\text{HNO}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$.
Příprava: 6,9 ml koncentrované kyseliny dusičné (2) se zředí na celkový objem 1000 ml.
- 7 Peroxid vodíku, H_2O_2 , 30%.
- 8 Kyselina dusičná, HNO_3 , $c(\text{HNO}_3) = 2 \text{ mol/l}$.
Příprava: 138 ml koncentrované kyseliny dusičné (2) se zředí na celkový objem 1000 ml.
- 9 Směsný standardní roztok $c(\text{Me}) = 100 \text{ mg/l}$ (např. od firmy Analytica Praha).
(Me = Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn).

2.3 Přístoje a pomůcky

- 1 Muflová pec, LM 112.10, VEB ELEKTRO.
- 2 Topná deska, 44A, CERAN 500[®], HARRY GESTIGKEIT GMBH.
- 3 ICP-OES Spectro Arcos, Spectro, Kleve, Německo.
- 4 Laboratorní nádobí – keramické spalovací kelímky.
- 5 Laboratorní váhy, A200 S, Sartorius.

2.4 Mineralizace

Byly použity tři typy mineralizací:

Původní mineralizace na suché cestě (2.4.1),

Upravená mineralizace suché cestě (2.4.2),

Mineralizace na mokré cestě (2.4.3).

Původní mineralizace na suché cestě je postup popsán v Jednotných pracovních postupech – Analýza rostlinného materiálu, kapitola 2.2.3 Mineralizace na suché cestě. Náplní této práce je úprava tohoto postupu tak, aby se pomocí kyseliny chlorovodíkové zvýšila výtěžnost manganu. Třetí typ mineralizace je popsán v Jednotných pracovních postupech – Analýza rostlinného materiálu, kapitola 2.2.1 Mineralizace kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku.

Tento postup nízkou výtěžností manganu netrpí, a proto s výsledky získanými tímto postupem byly porovnány výsledky získané prvními dvěma metodami.

2.4.1 Původní mineralizace na suché cestě s HNO₃ (zkráceně HNO₃ výluh)

5 g vzorku se zpopelní během 6 h při 500 °C. K popelu se přidá 10 ml HNO₃ (5) a směs se asi 1 min povaří při 220 °C. Mineralizát se dále převede do 50ml odměrné banky a doplní po značku HNO₃ (6). Obsah baňky se druhý den přefiltruje do uzavíratelné plastové lahvičky.

2.4.2 Upravená mineralizace na suché cestě s HCl a následně s HNO₃ (zkráceně HCl výluh)

5 g vzorku se zpopelní během 6 h při 500 °C. K popelu se přidá 2 ml HCl (4) a při 120 °C se kyselina odpaří. Poté se k popelu přidá 10 ml HNO₃ (5) a směs se asi 1 min povaří při 220 °C. Mineralizát se dále převede do 50ml odměrné banky a doplní po značku HNO₃ (6). Obsah baňky se druhý den přefiltruje do uzavíratelné plastové lahvičky.

2.4.3 Mineralizace na mokré cestě s H₂O₂ a HNO₃ (zkráceně S výluh)

K 1 g vzorku se přidá 8 ml HNO₃ (2) a nechá se stát přes noc. Poté se vzorek vaří při 120 °C a postupně se přidá 15 ml H₂O₂ (7) do vyčeření roztoku. Mineralizát se převede do 50ml odměrné baňky a doplní po značku HNO₃ (6). Obsah baňky se druhý den přefiltruje do uzavíratelné plastové lahvičky.

2.5 Podmínky měření

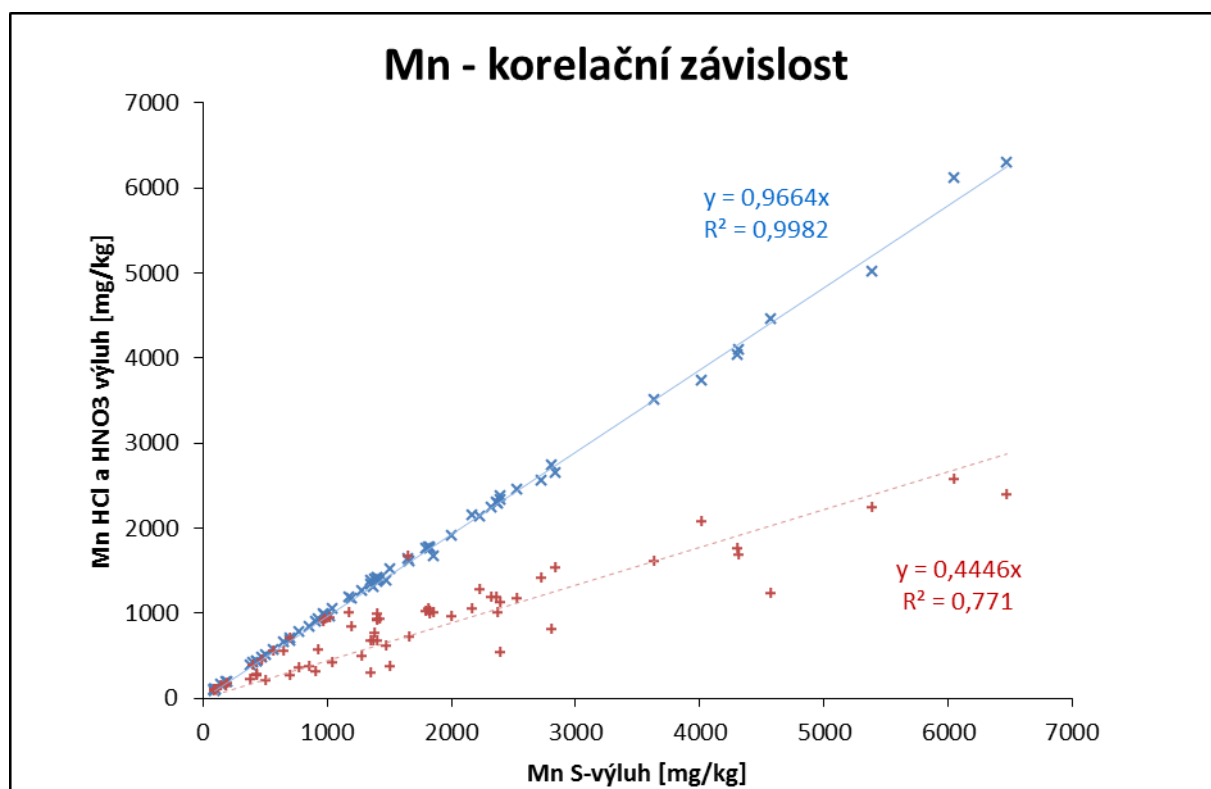
Mangan byl měřen na čáře Mn (II) 257,611 nm. Vzorky byly měřeny pomocí externí kalibrace a kalibrační křivka byla sestavena z bodů (0; 1; 4; 10; 20; 40) mg/l Mn tak, že ze směsného standardního roztoku (9) c(Me) = 100 mg/l se pipetuje (0; 1; 4; 10; 20; 40) ml do 100ml baňky a doplní se 2M HNO₃.

Měřicí parametry ICP-OES: příkon 1350 W, cooling gas 13,5 l/min, auxiliary gas 1 l/min, nebulizer gas 0,8 l/min, add gas 0,3 l/min, přívod vzorku 2 ml/min.

3 Výsledky a diskuze

Při mineralizaci na suché cestě za normálního tlaku v muflové peci se vzorek oxidací zbavuje organické matrice. V případě vzorků vegetativních orgánů lesních dřevin s vysokým obsahem manganu v řádu až tisíců mg/kg dochází při spalování také ke vzniku oxidu manganičitého, který je ovšem nerozpustný v kyselině dusičné. V důsledku toho nepřechází veškerý mangan do roztoku. Po spálení je proto nutné ke vzorku přidat asi 2 ml kyseliny chlorovodíkové a odpařit, čímž se zredukuje oxid manganičitý na chlorid manganatý. Dále se již postupuje rozpuštěním upraveného popela v kyselině dusičné podle původního postupu (2.4.1).


Upravený postup mineralizace na suché cestě (2.4.2) byl ověřován porovnáním s výsledky z mineralizace na mokré cestě v kyselině dusičné s peroxidem vodíku (2.4.3), který nízkou výtěžností manganu netrpí. Porovnání bylo provedeno na asi 60 reálných vzorcích jehličí a listí a 4 interních referenčních materiálech 9102 – jehličí, 9107 – malina, 9041 – javor a 9116 – čaj. Pomocí těchto vzorků byla provedena verifikace metody.



Obr. 1. Mn – korelační závislost. × HCl-výluh vs S-výluh, + HNO₃-výluh vs S-výluh.

Byla vypočítána výtěžnost a jako referenční byly použity hodnoty získané postupem 2.4.3 (S výluh) a porovnávány byly hodnoty získané postupy 2.4.2 (HCl výluh) a 2.4.1 (HNO₃ výluh). Výtěžnosti se pohybovaly pro upravený postup 2.4.2 (HCl výluh) v intervalu 89,9 % až 103,6% a pro původní postup 2.4.1 (HNO₃ výluh) v intervalu 22,1 % až 101,6 %.


Upravený postup byl verifikován pomocí aplikace EffiValidation. Krokem omezený koncentrační rozsah - referenční materiál k dispozici, byly porovnány střední hodnoty interních referenčních materiálů irm9102, irm9107, irm9116, irm9041 získané v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách s hodnotami získanými upraveným postupem (2.4.2) a byla potvrzena shoda těchto dat.

	ANALYTICKÁ METODA: 10/2012 - Rostliny: asimilační orgány lesních dřev
	VALIDACE: Plná validace
	PARAMETR: Správnost: Omezený koncentrační rozsah - referenční materiál k dispozici
	VALIDOVANÁ VLASTNOST Mn - HCl+HNO ₃ výluh

VYHODNOCENÍ:

Úroveň	Popis	Referenční hodnota	Naměřeno	Výtěžnost	Referenční přesnost	Přesnost	n	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
1	irm9116 čaj	1300	1408,075	108,31346	138,71	7,71163	4	Přijata	Přijata


Závěr: Analytická metoda poskytuje pro všechny referenční materiály statisticky správné výsledky.

	ANALYTICKÁ METODA: 10/2012 - Rostliny: asimilační orgány lesních dřev
	VALIDACE: Plná validace
	PARAMETR: Správnost: Omezený koncentrační rozsah - referenční materiál k dispozici
	VALIDOVANÁ VLASTNOST Mn - HCl+HNO ₃ výluh

VYHODNOCENÍ:

Úroveň	Popis	Referenční hodnota	Naměřeno	Výtěžnost	Referenční přesnost	Přesnost	n	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
1	irm9107 malina	997,77	977,475	97,96596	42,23	14,14387	4	Přijata	Přijata


Závěr: Analytická metoda poskytuje pro všechny referenční materiály statisticky správné výsledky.

	ANALYTICKÁ METODA: 10/2012 - Rostliny: asimilační orgány lesních dřev
	VALIDACE: Plná validace
	PARAMETR: Správnost: Omezený koncentrační rozsah - referenční materiál k dispozici
	VALIDOVANÁ VLASTNOST Mn - HCl+HNO ₃ výluh

VYHODNOCENÍ:

Úroveň	Popis	Referenční hodnota	Naměřeno	Výtěžnost	Referenční přesnost	Přesnost	n	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
1	irm9102 jehličí	1687,27	1765,25	104,62167	84,27	12,44655	4	Přijata	Přijata

Závěr: Analytická metoda poskytuje pro všechny referenční materiály statisticky správné výsledky.

	ANALYTICKÁ METODA: 10/2012 - Rostliny: asimilační orgány lesních dřev
	VALIDACE: Plná validace
	PARAMETR: Správnost: Omezený koncentrační rozsah - referenční materiál k dispozici
	VALIDOVANÁ VLASTNOST Mn - HCl+HNO ₃ výluh

VYHODNOCENÍ:

Úroveň	Popis	Referenční hodnota	Naměřeno	Výtěžnost	Referenční přesnost	Přesnost	n	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
1	irm9041 javor	89,86	96,615	107,51725	3,86	2,13419	4	Přijata	Přijata

Závěr: Analytická metoda poskytuje pro všechny referenční materiály statisticky správné výsledky.

Obr. 2. Vyhodnocení správnosti pomocí aplikace EffiValidation.

Dále byla vyhodnocena opakovatelnost, nejistota a mez stanovitelnosti.

Tab. 1. Validační parametry.

Koncentrační hladina (mg/kg)	Opakovatelnost (%)	Nejistota (%)
< 50	7,5	15
50 – 1500	7	13
> 1500	5	10

Mez stanovitelnosti je 0,5 mg/kg.

4 Závěr

Byla vypracována upravená metoda pro rozklad asimilačních orgánů lesních dřevin. Touto metodou je možné zlepšit převod manganu do roztoku a získat tak správné a přesné výsledky. Metoda byla verifikována a je možné ji doporučit laboratořím, které analyzují tyto materiály.

5 Literatura

1. Analýza rostlinného materiálu – jednotné pracovní postupy, 2005, 25 – 26, 29 – 30.
2. P. Mader, J. Száková, D. Miholová, Classical dry ashing of biological and agricultural materials. Part II. Losses of analytes due to their retention in an insoluble residue, *Analisis*, 1998, 26, 121 – 129.

Převedení metod stanovení doplňkových látek na přístroj UHPLC (Dionex UltiMate 3000)

Marta Mádlová Pnioková, Radmila Varmužová, Eva Egersdorfová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Praha, Za Opravnou 4, 150 06 Praha
marta.pniokova@ukzuz.cz

1 Úvod

Na regionální oddělení Praha byl zakoupen kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000, firmy Thermo Scientific. Toto zařízení se liší od dosud používaného přístroje (Agilent 1100, firmy HPST) výkonnějším fluorescenčním detektorem a ovládacím softwarem. Úkolem bylo oba přístroje porovnat při stanovení doplňkových látek v krmivech, zjistit možnosti přenosu metod, podle získaných zkušeností optimalizovat využití obou přístrojů a zároveň verifikovat metody na novém přístroji.

2 Pracovní postup

Byly aplikovány níže uvedené JPP ÚKZÚZ používané pro stanovení doplňkových látek v krmivech. Analyty byly měřeny na novém zařízení. Výsledky byly statisticky zpracovány, byly vyhodnoceny pracovní charakteristiky, přístroj byl verifikován a byl porovnán s pracovními charakteristikami dosud používaného přístroje.

10023.1 Stanovení obsahu tryptofanu,

10330.1 Stanovení obsahu hydroxyanalogu D,L-methioninu (alimetu) metodou HPLC,

10335.1 Stanovení obsahu kyseliny benzoové metodou HPLC,

10360.1 Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC,

10380.1 Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC,

10389.1 Stanovení obsahu robenidinu,

10401.1 Stanovení obsahu lasalocidu,

10635.1 Stanovení obsahu nifursolu metodou HPLC

2.1 Přístroje a laboratorní vybavení

- 1 Kapalinový chromatograf s DAD a FLD detekcí (Dionex UltiMate 3000).
- 2 Kapalinový chromatograf s DAD a FLD detekcí (Agilent 1100).
- 3 Další vybavení viz příslušné JPP ÚKZÚZ.

2.2 Postup příprava a čištění extraktu

Pro jednotlivé analyty podle příslušného JPP ÚKZÚZ.

2.3 HPLC analýza vzorku

Pro jednotlivé analyty podle příslušného JPP ÚKZÚZ.

2.4 Zkratky

DAD	Diode array detector
DL	Doplňkové látky
EURL FA	European Union Reference Laboratory for feed additives
FLD	Fluorescenční detektor
HMTBa	Hydroxyanalog D,L-methioninu
JPP	Jednotné pracovní postupy
MPZ	Mezilaboratorní porovnávací zkoušky
PT	Testy způsobilosti (Proficiency testing)
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography

3 Výsledky a diskuse

3.1 Porovnání technických parametrů přístrojů

Tabulka 1. Technické parametry přístrojů Agilent a Dionex.

	Agilent 1100	Dionex UltiMate 3000
DAD rozsah	(190 – 950) nm	(190 – 800) nm
FLD rozsah	(200 – 700/200 – 700) nm	(200 – 800/220 – 900) nm
Rychlost sběru dat	36 Hz (28 ms)	DAD až 100 Hz, FLD 200 Hz
Tlaky	max. tlak až 400 barů až do průtoků 5 ml/min	max. tlak až 620 barů až do průtoků 10 ml/min
	max. tlak až 200 barů až do průtoků 10 ml/min	
Nástřik	(0,1 – 100) µl	
Termostat kolon	(15 – 80) °C	(5 – 80) °C
Pumpy	Kvartérní gradientové	
+		přepínací ventil na kolony
+		RS (Rapid separation)
Ovládací program	ChemStation	Chromeleon 7.0

Technické parametry přístrojů jsou srovnatelné, s výjimkou fluorescenčního detektoru, který má větší rozsah vlnových délek a vyšší rychlost sběru dat. Další výhodou přístroje Dionex je možnost práce při vyšších tlacích, tedy zkrácení doby analýzy a nižší spotřeby rozpouštědel. Přístroj Dionex UltiMate 3000 má ovládací program Chromeleon 7.0, který je odlišný od programu ChemStation k přístroji Agilent 1100. Plynulý přechod na nový systém byl zvládnut bez větších potíží díky dobré přehlednosti programu. Ten se ukázal jako uživatelsky velmi příjemný.

3.2 Porovnání validačních parametrů jednotlivých analytů

3.2.1 Relativní opakovatelnost

Tabulka 2. Porovnání relativní opakovatelnosti (%).

	Agilent 1100	DIONEX UltiMate 3000
Nikarbazin	3,36	2,02
Robenidin	9,10	8,82
Lasalocid	7,40	7,48
Vitamín A	5,88	2,41
Vitamín E	4,80	1,21
Kyselina benzoová	2,30	2,10
HMTBa	2,96	1,87

Pro analyty nikarbazin, robenidin, vitamín A, vitamín E a HMTBa jsou naměřené hodnoty opakovatelnosti lepší pro přístroj Dionex. Pro vitamín A a vitamín E je rozdíl v opakovatelnosti významný. Kyselina benzoová a lasalocid mají hodnoty opakovatelnosti srovnatelné pro oba přístroje.

3.2.2 Mez detekce

Tabulka 3. Porovnání meze detekce.

Parametr	Agilent 1100		DIONEX UltiMate 3000	
	mg/l	mg/kg	mg/l	mg/kg
Nikarbazin	0,027	0,11	0,040	0,16
Robenidin	0,820	5,47	0,688	4,59
Lasalocid	0,546	10,92	0,386	7,72
Vitamín A	0,043 (mj./ml)	943 (mj./kg)	0,042 (mj./ml)	937 (mj./kg)
Vitamín E	0,16	3,55	0,28	6,22
			0,06 *	1,39 *
Kyselina benzoová	45,48	4548	16,64	1664
HMTBa	2,81	28,07	0,668	6,68
Nifursol	0,24	1,19	0,42	2,10

* snížená kalibrační křivka

3.2.3 Mez stanovitelnosti

Tabulka 4. Porovnání meze stanovitelnosti.

Parametr	Agilent 1100		DIONEX UltiMate 3000	
	mg/l	mg/kg	mg/l	mg/kg
Nikarbazin	0,031	0,13	0,047	0,19
Robenidin	0,953	6,35	0,800	5,33
Lasalocid	0,634	12,96	0,448	8,97
Vitamín A	0,049 (mj./ml)	1095 (mj./kg)	0,049 (mj./ml)	1087 (mj./kg)
Vitamín E	0,186	4,13	0,33	7,33
			0,07 *	1,61 *
Kyselina benzoová	52,85	5285	26,14	2614
HMTBa	3,261	32,61	0,776	7,76
Nifursol	0,28	1,38	0,49	2,44

* snížená kalibrační křivka

Mez detekce a stanovitelnosti byly získány z kalibračních křivek složených ze stejných koncentračních hladin pro oba přístroje. Protože se jednalo o porovnání dvou přístrojů, byly použity hladiny běžně používané v analýzách, tedy většinou určené k zjištění dávkovaného obsahu analytu.

Pro robenidin, lasalocid, kyselinu benzoovou a HMTBa byla mez detekce i mez stanovitelnosti nižší u Dionexu. Pro nikarbazin, vitamín E a nifursol jsou meze u Dionexu vyšší a vitamín A má meze srovnatelné.

Nevýhoda vyšších hodnot mezi detekce a stanovitelnosti u vitamínu E byla odstraněna změnou rozsahu kalibrační křivky. Po zařazení kalibračních bodů s nižší koncentrací se meze výrazně snížily při zachování linearitu kalibrační křivky, viz údaje s hvězdičkou.

3.2.4 Citlivost

Tabulka 5. Porovnání citlivosti.

	Agilent 1100	DIONEX UltiMate 3000
Nikarbazin	58,49	0,59
Robenidin	74,67	0,94
Lasalocid	19,21	261473
Vitamín A	74,00	1,08
Vitamín E	16,33	658759
Kyselina benzoová	2,66	0,033
HMTBa	12,84	0,165
Nifursol	27,73	0,28

Údaje o citlivosti u jednotlivých přístrojů nejsou porovnatelné, protože plocha píků je udávána v rozdílných jednotkách (u Dionexu se liší jednotky i u DAD a FLD).

3.2.5 Potvrzení správnosti pro přístroj Dionex analýzou vzorků z mezilaboratorních porovnávání.

Tabulka 6. Porovnání z-score z MPZ a ALVA.

Parametr	MPZ 2011		MPZ 2012		MPZ 2013		ALVA 2013	
	z-score							
	Agilent	Dionex	Agilent	Dionex	Agilent	Dionex	Agilent	Dionex
Lasalocid-KS			0,43	0,32				
Lasalocid-PX			-0,74	-0,80				
Robenidin-KS			1,31	1,15	0,78	0,26		
Robenidin-PX			-0,75	-1,48	-0,79	-1,83		
Nikarbazin-KS					-0,28	-0,40		
Nikarbazin-PX					-0,75	-0,63		
Vitamín A-KS	0,35	-0,89	1,95	1,46			1,27	1,29
Vitamín A-PX			1,15	1,12			1,75	1,55
Vitamín E-KS	0,02	1,05	0,04	0,23			-1,13	-1,27
Vitamín E-PX			0,16	-0,21			-0,48	-0,64
Tryptofan							-1,28	-1,12

Správnost výsledků uvedených postupů pro oba přístroje byla potvrzena analýzou vzorků z mezilaboratorních porovnávacích zkoušek. Dosažené hodnoty z-score jsou v dobré shodě pro oba přístroje.

4 Závěr

Přístroje Agilent 1100 a Dionex UltiMate 3000 byly porovnány jak po technické, tak po analytické stránce. Všechny uvedené postupy, verifikované na přístroji Agilent 1100, bylo možné přímo použít pro přístroj Dionex UltiMate 3000. Úprava postupu byla provedena pouze u stanovení vitamínu E, kde se využila kalibrační křivka s nižšími koncentračními body.

Při verifikaci postupů na přístroji Dionex UltiMate 3000 byly získány vyhovující pracovní charakteristiky. Z tabulky 7 je patrné, že validační parametry jsou lepší pro přístroj Dionex UltiMate 3000.

Tabulka 7. Hodnocení validačních parametrů pro přístroj Dionex UltiMate 3000.

DIONEX UltiMate 3000	Opakovatelnost	Mez stanovitelnosti (detekce)
Nikarbazin	+	-
Robenidin	+	+
Lasalocid	=	+
Vitamín A	++	=
Vitamín E	++	-/+
Kyselina benzoová	=	+
HMTBa	+	+
+ lepší hodnota ++ výrazně lepší hodnota = shoda hodnot - horší hodnota		

Oba přístroje jsou plně zastupitelné a to je umožňuje využívat podle aktuální potřeby. Jediným omezením využití přístroje Dionex UltiMate 3000 je, že není připojen k derivatizační jednotce, a není tedy možnost stanovení ionoforů.

5 Literatura

1. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ; 2013, postupy č. 10023.1 Stanovení obsahu tryptofanu metodou HPLC; č. 10330.1 Stanovení obsahu hydroxyanalogu D,L-methioninu metodou HPLC; č. 10335.1 Stanovení obsahu kyseliny benzoové metodou HPLC; č. 10360.1 Stanovení obsahu nikarbazinu metodou HPLC; č. 10380.1 Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC; č. 10389.1 Stanovení obsahu robenidinu; č. 10401.1 Stanovení obsahu lasalocidu; č. 10635.1 Stanovení obsahu nifursolu metodou HPLC.
2. Centner V. Uživatelská příručka EffiValidation 3.0, EffiChem, 1999–2005.
3. Interní dokumentace ÚKZÚZ; ID č. 7 – Validace metod v Národní referenční laboratoři ÚKZÚZ (2011).
4. Referenční manuál Agilent 1100, 2004.
5. Uživatelská příručka Dionex UltiMate 3000, 2011.

Bulletin Národní referenční laboratoře XVII 2013/3

Ročník: XVII, č. 3

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2013

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 34

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196