

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2005

Ročník IX, číslo 1/ 2005

Brno 2005

Obsah

1.	Spektrofotometrické stanovení monensinu a salinomycinu v premixech	1
	(Michal Douša, Ecochem a.s., Praha Romana Hosmanová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Plzeň)	
2.	Problémy přenosu HPLC metod	7
	(Michal Douša, Ecochem a.s., Praha)	
3.	Ověřování mlýnku GRINDOMIX	15
	(Pavel Šíma, Jaroslava Petrová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Praha)	
4.	Hmotnost zkušebního vzorku a zrnitost materiálu jako významný zdroj chyby analytického stanovení	41
	(Michal Douša, Ecochem a.s., Praha Romana Hosmanová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Plzeň)	

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Bulletin Národní referenční laboratoře IX 2005/ 1

Ročník: IX, č. 1
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2005
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce: Ing. Iva Strížová
Náklad: 130 výtisků
Počet stran: 49
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou

ISSN 1212- 5466

Spektrofotometrické stanovení monensinu a salinomycinu v premixech

Michal Douša

Ecochem a.s., Dolejškova 30, 182 00 Praha 8; michal.dousa@ecochem.cz

Romana Hosmanová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň; romana.hosmanova@ukzuz.cz

1. Úvod

Polyetherová antibiotika (PA) reprezentují významnou skupinu ionoforních sloučenin, produkovaných kmeny *Streptomyces*. Jejich antimikrobiální vlastnosti se využívají ve veterinární praxi při léčbě a prevenci kokcidiózy u drůbeže a také působí jako stimulatory růstu u prasat a skotu. Polyetherová antibiotika se aplikují ve většině případech jako prevence ve formě krmiva (do krmných směsí jsou přidávány ve formě sodných solí v obsazích 15- 100 mg/ kg). Určitým omezením jejich klinického používání jsou jejich toxické vlastnosti a dále vznik bakteriálně rezistentních kmenů, ale i environmentální znečištění v podobě jejich reziduí v živočišných produktech při jejich nesprávném používání. Některá antibiotika jsou již pro některá hospodářská zvířata natolik toxická (např. pro koně v dávce již 0,6 mg salinomycinu na 1 kg hmotnosti zvířete) nebo negativně ovlivňují jejich růst (zejména u drůbeže), že z tohoto hlediska je přirozená potřeba jejich identifikace a kvantitativní stanovení v medikovaných krmivech, ale i ve zvířecích tkáních, tekutinách, mase a ostatních produktech (vejce, mléko).

2. Metody stanovení

Metody stanovení těchto antibiotik jsou zejména mikrobiologické metody, které však nejsou dostatečně selektivní a specifické. Biologická účinnost antibiotika se stanovuje porovnáním inhibice růstu citlivých mikroorganismů způsobené známými koncentracemi testovaného antibiotika v analyzovaném vzorku. Stanovení se může provádět difúzní nebo turbidimetrickou metodou. Kline a spol. popsali metodu stanovení monensinu v premixech a krmných směsích ⁽¹⁾, ale tato metoda se nejevila jako příliš vhodná pro svou nízkou selektivitu, přesto se dnes dosud používá jako oficiální metoda stanovení ⁽²⁾. Při stanovení polyetherových antibiotik difúzní plotnovou metodou se používá kmen *Bacillus subtilis* a

v tomto případě se účinnost antibiotika vyhodnocuje na základě průměru inhibičních zón na destičce s naočkovanou živnou půdou. Principem turbidimetrické metody je sledování zákalu naočkované živné půdy po určitém čase inkubace. Při stanovení polyetherových antibiotik se používá kmen *Streptococcus faecalis* ⁽³⁾.

Jsou rovněž popsány metody tenkovrstevné chromatografie stanovení polyetherových antibiotik v krmivech. Na jejich detekci se využívá především bioautografie nebo chemická reakce s vanilinem, která poskytuje barevný derivát. TLC semikvantitativní metoda stanovení monensinu v krmivech ⁽⁴⁾ byla popsána v roce 1983. Monensin je extrahován 80 % vodným methanolem, extrakt je přečištěn na koloně s oxidem hlinitým a následně neextrahován do dichlormethanu a opět přečištěn na koloně se Sephadexem LH-20. Takto připravený extrakt je analyzován na tenké vrstvě silikagelu s mobilní fází dichlormethan-methanol (9:1). Později byla popsána simultánní detekce přítomnosti monensinu, narasinu, salinomycinu a lasalocidu na TLC desce s oxidem hlinitým ve vzorcích krmiv a premixů ⁽⁵⁾. Bioautografická detekce (*Bacillus subtilis*) umožnila snížit detekční limit až na hodnotu 0,5 až 3 mg/ kg ⁽⁶⁾. Za zmínku ještě stojí metoda stanovení TLC metoda stanovení monensinu v krmivech pro koně ⁽⁷⁾.

V roce 1973 Golab a spolupracovníci publikovali spektrofotometrickou metodu stanovení monensinu ⁽⁸⁾ a tato metoda byla navržena jako alternativa k mikrobiologickým metodám. Autoři po extrakci monensinu methanolem využívají k jeho stanovení barevné reakce monensinu s 3 % vanilinem (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) v kyselém prostředí 0,5 % kyseliny sírové za vzniku intenzivně zbarveného produktu ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$). Barevná reakce vanilinu s vyššími alkoholy je obecně známa jako Komarowského reakce ⁽⁹⁾, jejíž reakční mechanismus byl popsán později ⁽¹⁰⁾. Spektrofotometrická metoda byla porovnávána s turbidimetrickou metodou ⁽³⁾ a obě metody byly v korelaci, nebyly nalezeny žádné interferující analyty a dané stanovení nerušily amprolium, clopidol, chlortetracyklin, furazolidon, methylbenzochát, ethopabát, nikarbazin, nitrofurazon, robenidin a zoalen. Komarowského reakce byla využita v HPLC při postkolonové derivatizaci na normální i reverzní fázi.

3. Experimentální část

Pokusili jsme se vyvinout rychlou, spolehlivou a jednoduchou analytickou metodu stanovení výše uvedených polyetherových antibiotik v triturátech a v premixech tak, aby tato

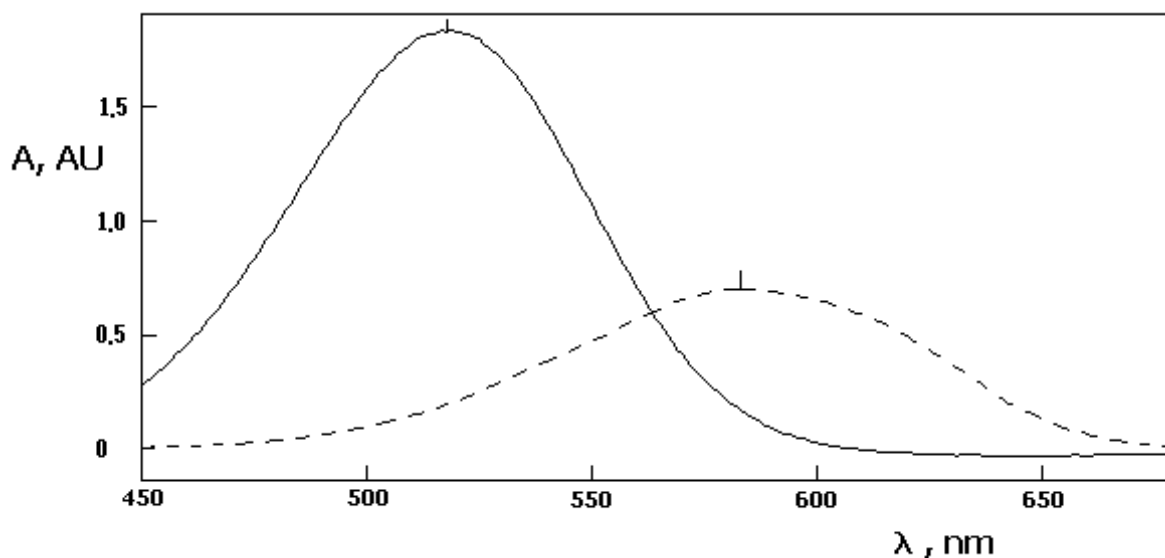
metoda byla použitelná pro kontrolu jakosti. Jako derivatizační činidlo jsme použili 3 % roztok *N,N'*-p-dimethylaminobenzaldehydu v ethanolu a 5,5 % kyselině sírové. Toto činidlo je ve srovnání s vanilinem stabilní v chladničce nejméně 60 dnů. Po extrakci PA 90 % ethanolom a filtraci se derivatizace provádí při teplotě 75 °C pod dobu 30 minut. Vzhledem ke složité matici vzorku a možným interferencím jsme použili k vyhodnocení metodu dvou standardních přídavek namísto kalibrační přímky. Obsah PA (c_x) vyjádřený v mg/l se vypočítá podle vzorce:

$$c_x = \left(\frac{a}{b}\right) \left(\frac{V_s c_s}{V_T}\right)$$

kde b je směrnice přímkové závislosti naměřených hodnot na objemových jednotkách N , a je posunutí na ose y , V_s je objem přídávku standardu, V_T je objem odměrné baňky a c_s je koncentrace standardu v mg/l.

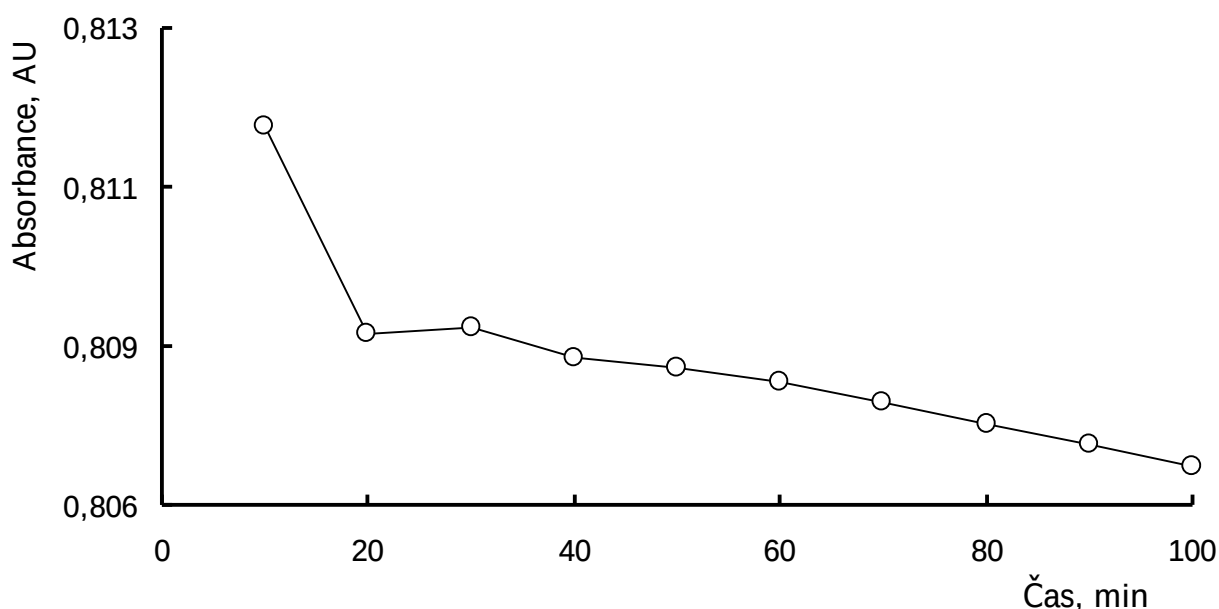
4. Diskuse

Absorbční maximum derivátu monensinu s vanilinem je posunuto k nižším vlnovým délkám ($\lambda_{\max} = 519$ nm), absorbční maximum derivátu monensinu s *N,N'*-p-dimethylaminobenzaldehydem je 583 nm (obr. č. 1). Obdobně i u salinomycinu je absorbční maximum derivátu salinomycinu a vanilinu 521 nm proti 600 nm derivátu salinomycin-*N,N'*-p-dimethylaminobenzaldehyd.



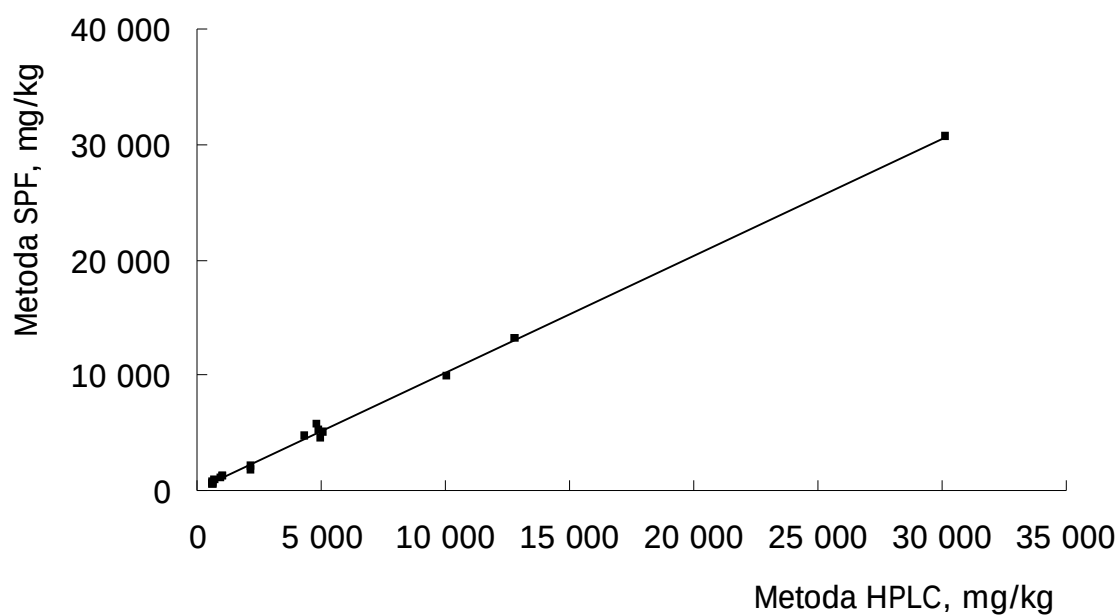
Obr. č. 1 Absorbční maximum derivátu monensin-vanilin ($\frac{3}{4}$; 519 nm) a monensin-p-dimethylaminobenzaldehyd (- -; 583 nm)

Kalibrační závislost je lineární v oblasti od 4 do 40 mg/ l pro salinomycin (korelační koeficient $r = 0,9991$, $a = 0,0922$, $b = 0,0557$), monensin i narasin. Reprodukovatelnost derivatizační reakce byla zkoušena na derivatizaci standardu salinomycinu v 6 opakováních na koncentrační úrovni 8 mg/ l a relativní směrodatná odchylka byla vypočtena na 1,55 %. Derivát je stabilní nejméně 100 minut, doba měření je nejvhodnější po 20 minutách od ukončení derivatizační reakce (obr. č.2).

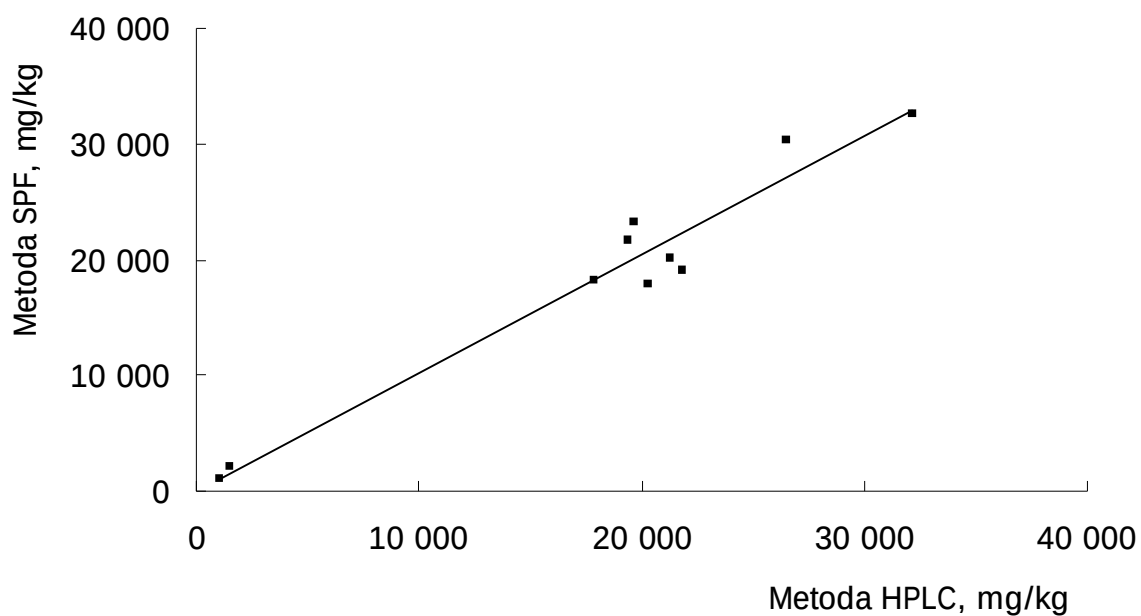


Obr. č. 2 Stabilita derivátu salinomycinu s časem

Na průběh derivatizační reakce má vliv teplota reakčního média, koncentrace derivatizačního činidla a koncentrace kyseliny sírové. Se stoupající teplotou je výtěžek reakce vyšší. Se stoupající koncentrací kyseliny sírové i samotného činidla je vyšší odezva analytického signálu, tyto poznatky však již byly popsány ⁽¹¹⁾. Výsledky spektrofotometrické metody byly porovnány s výsledky získané metodou HPLC ⁽¹²⁾ metodou lineárních nejmenších čtverců. Pro stanovení salinomycinu byl vypočten koeficient $b = 1,015$ ($R^2 = 0,998$), pro monensin $b = 1,023$ ($R^2 = 0,953$).



Obr. č. 3 Korelace výsledků metody stanovení salinomycinu



Obr. č. 4 Korelace výsledků metody stanovení monensinu

5. Závěr

Byla vyvinuta spektrofotometrická metoda stanovení monensinu a salinomycinu v triturátech a v premixech. Metoda je rychlá a celková doba analýzy je asi 90 minut. Metoda stanovení je vzhledem k derivatizační reakci dostatečně selektivní a robustní. Ve srovnání s HPLC metodou poskytuje správné výsledky.

Literatura

1. Kline R.M., Striker R.E., Coffman J.D., Bikin H., Rathmacher R.P.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. 53, 49 (1970)
2. Official Method of Analysis (1990) 15th Ed., AOAC, Arlington, VA
3. Kavanagh F.W., Willis M.: J. Assoc. Off. Anal. Chem 55, 114 (1972)
4. Martinez E.E., Shimoda W.: J. AOAC Int. 66, 1506 (1983)
5. Owles P.J.: Analyst 109, 1331 (1984)
6. Richard J., Joubert M: Annales des Falsifications de l'Expertise Chimique et Toxicologique 93, 83 (2000)
7. Landgraf W.W., Ross P.F.: J. AOAC Int. 81, 844 (1998)
8. Golab T., Burton S.J., Scroggs R.E.: J. Assoc. Off. Anal. Chem 56, 171 (1973)
9. Komarowski A.: Chem. Ztg. 27, 807, 1086 (1903)
10. Duke F.R.: Anal. Chem. 19, 661 (1947)
11. Lapointe M.R., Cohen H.: J. Assoc. Off. Anal. Chem 71, 480 (1988)
12. Vyhláška č. 222/ 1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se stanoví metody odběru vzorků, metody laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků podléhajících zkáze, ve znění pozdějších předpisů

Problémy přenosu HPLC metod

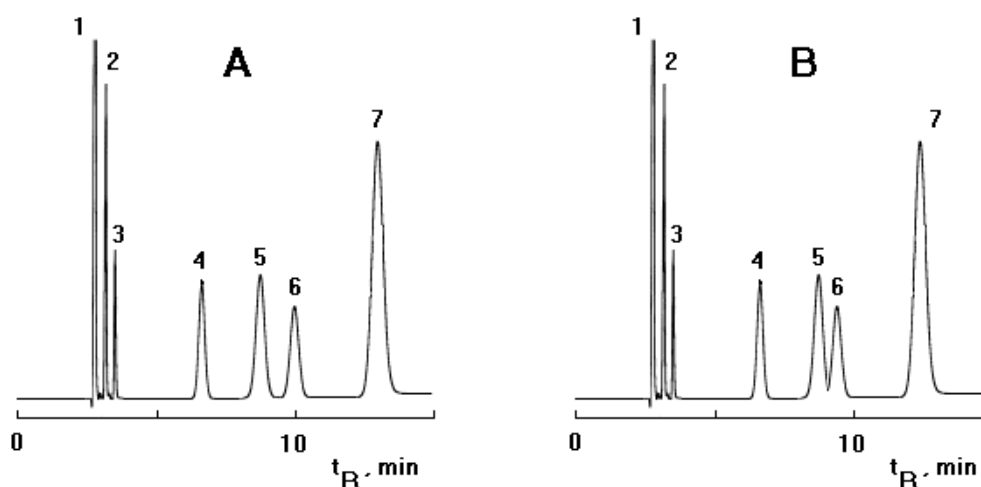
Michal Douša

Ecochem a.s., Dolejškova 3, 182 00 Praha

E-mail: michal.dousa@ecochem.cz

1. Úvod

Při přenosu publikované HPLC metody z jednoho stroje na druhý nebo na jiné analytické pracoviště, nastávají mnohdy problémy s interpretací separace sledovaných analytů a nastává problém vůbec reprodukovat publikovanou nebo i zcela validovanou metodu. Typický příklad přenosu HPLC metody je ukázán na separaci analytů obrázku č.1.



Obrázek č. 1 Přenos HPLC metody z jedné laboratoře do druhé. A – původní laboratoř, B – další laboratoř

Chromatogram A na obr. č.1 znázorňuje původní separaci analytů publikované metody, chromatogram B na obr č.1 je chromatogramem po přenosu metody do jiné laboratoře nebo na jiný chromatografický systém. Je zřejmé, že nedochází k separaci analytů 5,6 a rozlišení je menší než většinou požadujeme při kvantitativním stanovení ($R_s < 1,5$). Existuje několik příčin, proč nedochází k dokonalé separaci:

- a) celý HPLC systém není dostatečně ekvilibrovaný
- b) došlo ke změně chromatografické kolony
- c) byl použit zcela jiný HPLC systém
- d) došlo ke změně HPLC podmínek

Nedostatečnou ekvilibraci chromatografické kolony, jako začátečnickou chybu uživatele vyloučíme, a dále budeme rozebírat pouze poslední tři možné příčiny.

2. Diskuse

2. 1. Změna kolony

Změnou kolony (jiný výrobce, jiná šarže) zpravidla dojde ke změně:

- a) účinnosti kolony (počet teoretických pater, n)
- b) selektivity (retenční poměr, r 1,2)

Proto je vhodné při validaci metody určit chromatografické parametry kolony, které vyhovují pro danou chromatografickou separaci:

- a) účinnost kolony
- b) selektivitu
- c) silanolovou aktivitu

Jako výhodné se jeví testy chromatografických charakteristik stacionární fáze. K testům silanolové aktivity stacionární fáze se používají *p*-ethylanilin v modifikovaném Jugheim-Engelhardtově testu ^(1,2), kdy se sleduje závislost kapacitního faktoru na koncentraci *p*-ethylanilinu za použití mobilní fáze methanol - voda (50:50; v/ v) při průtoku 1 ml/ min. Výsledkem jsou konstantní hodnoty kapacitního faktoru *p*-ethylanilinu. Tanaka ⁽³⁾ používá k testování silanolové aktivity benzylamin, ale zde dostáváme nelineární korelace a interpretace dat je složitější. Jako další látky k testování silanolové aktivity byly použity pyridin nebo isomery aminopyridinu ⁽⁴⁾, (4-aminopyridin, 3- aminopyridin a 2-aminopyridin za použití mobilní fáze methanol - 20 mM fosfátový pufr pH 7,6; 10:90; v/ v). Při porovnání Engelhardtova a Tanakova testu se jako výhodnější ukazuje test Engelhardtův, protože *p*-ethylanilin oproti benzylaminu vykazuje za použití mobilní fáze methanol - voda (50:50; v/ v) lineární adsorpční isotermu, kapacitní faktor benzylaminu je závislý na pH mobilní fáze a na množství dávkovaného benzylaminu. K testování chromatografických charakteristik stacionární fáze se v současné době nejvíce využívá Tanakův test. Ten zahrnuje měření kapacity, hydrofobicity, stérické selektivity, silanolové aktivity, iontově-výměnné kapacity

při pH 7,6 a iontově- výměnné kapacity při pH 2,7. K posouzení kapacity se používá měření kapacitního faktoru pentylbenzenu, k posouzení hydrofobicity (methylenové selektivity a_{CH_2})

$a_{CH_2} = k_{pentylbenzen} / k_{butylbenzen}$, k posouzení stérické aktivity $a_s = k_{trifenylen} / k_{o-terfenyl}$, k posouzení

silanolové aktivity $a_A = k_{kofein} / k_{fenol}$ a k posouzení iontově-výměnné kapacity

$a_{HB} = k_{benzylamin} / k_{fenol}$.

Po zvolení vhodného testu je vhodné optimalizovat chromatografickou separaci nejen na zvolené chromatografické koloně, ale i určit vhodnou alternativní chromatografickou variantu. Používá se k tomuto tzv. metoda maximální chromatografické variability, která spočívá v:

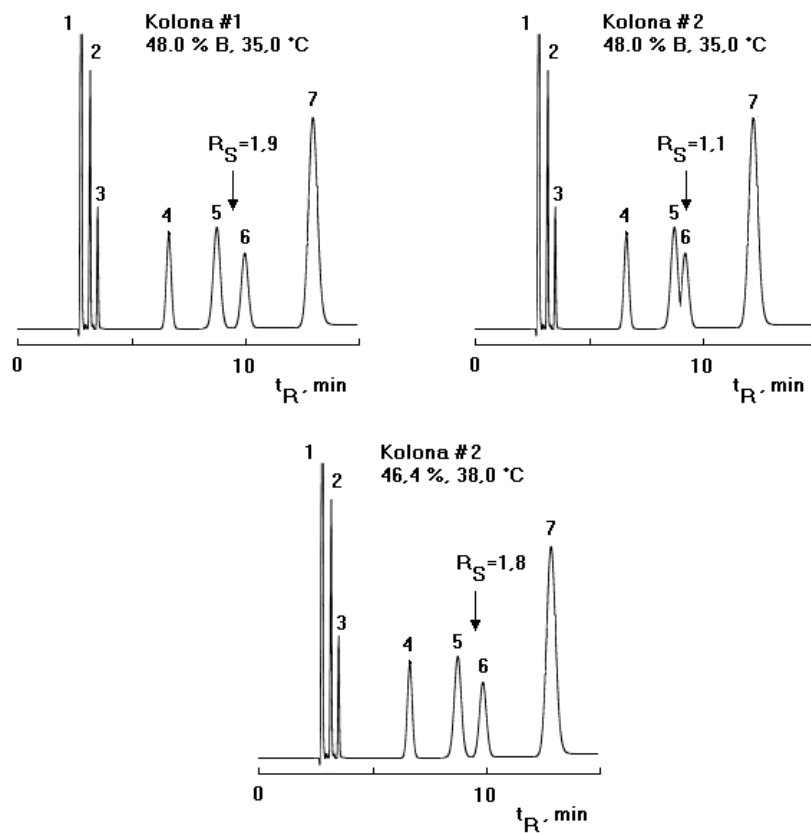
- optimalizaci chromatografických podmínek
- předvídání variability chromatografických kolon
- výběru podobných kolon

2.1.1. Optimalizace chromatografických podmínek

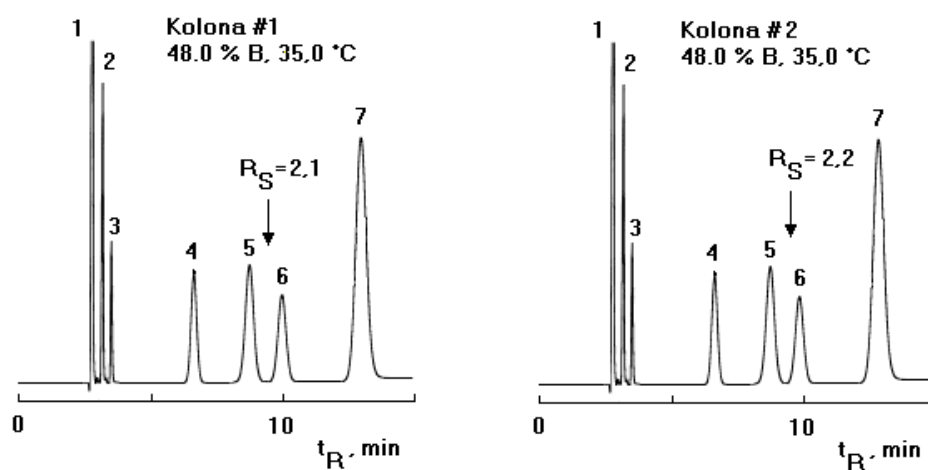
Chromatografické podmínky se optimalizují tak, že se sleduje vliv teploty a složení mobilní fáze (objemové frakce organické fáze nebo strmost gradientu) na R_S nebo $r_{1,2}$ a vícenásobnou regresí se získá R_S mapa akceptovatelných rozlišení při daných chromatografických podmínkách. Pak při změně rozlišení R_S můžeme velmi jednoduše určit chromatografické podmínky, které budou vyhovovat požadovanému rozlišení. Praktický příklad je patrný z obrázku č.2.

2.1.2. Variabilita chromatografických kolon

Obdobně jako u optimalizace chromatografických podmínek se optimalizují chromatografické kolony pro alternativní kolony a pak dostáváme nejen chromatografické podmínky pro používanou kolonu, ale i pro alternativní chromatografickou kolonu. Určením tzv. R_S map a jejich překryvem pro dvě různé kolony získáme ihned přehled, jak bude vypadat separace na alternativní koloně. Praktický příklad je patrný z obrázku č.3.



Obrázek č. 2 Optimalizace chromatografických podmínek a aplikace na dvě stejné kolony různé šarže



Obrázek č. 3 Variabilita chromatografických kolon a určení R_S map

2. 1. 3. Výběr podobných kolon

K celkové selektivitě stacionární fáze přispívají jednak kapacitní faktor k a dále hydrofobicita (H), stérická selektivita (shape selectivity; S), silanolová aktivita (non- ionized silanol acidity nebo také silanol group capacity, A), kolonová basicita (column basicity; B) a iontově-výměnná kapacita (cation- exchange capacity; C). Pro logaritmus kapacitního faktoru pak platí:

$$\log k = \log k_{ref} + n'H + s'S + b'A + a'B + k'C \quad (1)$$

kde k , a , b , s a v jsou příspěvky solutu a H , S , A , B a C jsou příspěvky stacionární fáze a k_{ref} je kapacitní faktor daný distribuční konstantou a fázovým poměrem. Příspěvek hydrofobicity H souvisí s nespecifickými interakcemi solutu se stacionární fází (methylenová selektivita α_{CH_2}), příspěvky silanolové aktivity A a kolonové basicity B souvisí s možností tvorby vodíkových vazeb mezi solutem a zbytkovými silanolovými skupinami silikagelu. Určením selektivity různých chromatografických kolon (Tanakovy a Engelhardtovy testy), ^(1,2,5) tak můžeme získat přehled o podobných kolonách, které je možné použít pak jako alternativní kolony ke koloně používané (validované).

2.2. Změna HPLC systému

Změna HPLC systému vede ve většině případech ke změnám:

- a) mrtvého objemu systému
- b) mimokolonových příspěvků k rozšíření chromatografické zóny

2.2.1. Mrtvý objem systému

Změna mrtvého objemu systému (konstrukce pumpy, změna vnitřního průměru kapilár) vede ke změně mrtvého objemu systému, která může mít vliv na strmost gradientu (zpoždění gradientu, které má vliv na separaci kritických analytů). Na separaci má vliv i tvorba gradientu – změna tvorby gradientu z nízkotlakého gradientu na vysokotlaký vede ke zpoždění gradientu a to má pak vliv na separaci kritických analytů. Na určení mrtvého objemu existuje několik způsobů, ale hodnověrnost získaných výsledků je neustále

diskutabilní ⁽⁶⁾. K určení objemu systému se nejlépe postupuje tak, že se ze systému vyřadí chromatografická kolona a nastříkne se do systému dobře detekovatelná látka (např. aceton, dusičnan sodný) při průtoku mobilní fáze (např. acetonitrilu) 1 ml/ min. Sleduje se retenční objem nastříknuté látky, ze kterého se pak určí objem systému.

2.2.2. Mimokolonové příspěvky

Mimokolonové příspěvky k rozšíření chromatografické zóny mají vliv na účinnost systému. Změna objemu nástřiku, objemu cely detektoru, vnitřního průměru kapilár nebo jejich délky může mít vliv na účinnost kolony a to vede ke snížení rozlišení kritických analytů. Tento příspěvek je úměrný celkovému objemu těchto částí. Rozptyl v šířce chromatografické zóny je tedy roven součtu rozptylů v koloně a ve všech ostatních objemových částech chromatografického systému a matematicky můžeme psát

$$S_{celkem}^2 = S_k^2 + S_{inject}^2 + S_{spoj}^2 + S_{detektor}^2 \quad (2)$$

Objemy všech částí aparatury mají být tedy co nejmenší, aby se zamezilo mimokolonovému rozmývání chromatografické zóny a tím snížení účinnosti kolony. Toto je zejména markantní u použití mikrokolon (krátké a extrémně úzké, plněné malými částčkami), kdy klesá volný objem kolony jejím zkrácením a zmenší se i výškový ekvivalent teoretického patra.

2. 3. Změna metody HPLC

Při změně postupu HPLC metody může dojít:

- a) ke změně složení mobilní fáze (složení, pH, koncentrace aditiv)
- b) ke změně teploty na chromatografické koloně
- c) ke změně gradientu (použití jiné tvorby gradientu např. namísto nízkotlaké tvorby gradientu se použije vysokotlaká tvorba gradientu)

Při aplikaci publikované HPLC metody v jiné laboratoři dochází ať už k nevědomé změně v postupu publikované metody např. použitím nízkotlakého gradientu namísto vysokotlakého, změnou mrtvého objemu systému. Může také docházet k záměrné změně

HPLC postupu např. použitím jiných pufrů mobilní fáze (v případě, že tyto nejsou dostupné) nebo změně teploty separace, není-li dostupný termostat kolon. Proto by při aplikaci HPLC metody v jiné laboratoři mělo být dodrženo přesné složení mobilní fáze a podmínky separace. Naopak při validaci metody by měly být validovány parametry jako složení mobilní fáze (koncentrace pufrů, pH mobilní fáze, koncentrace protiiontu, vliv objemové frakce organického rozpouštědla na retenci resp. selektivitu) a vliv teploty na separaci analytů.

3. Závěr

Aplikace publikované HPLC metody v jiné laboratoři přináší s sebou mnohé problémy. Ty nastávají zejména v případě aplikace HPLC metod, které nejsou dostatečně validované a robustní. Téměř vždy se používá jiný chromatografický systém, což může přinést další nepříjemnosti zejména v případě nutnosti použití gradientu mobilní fáze při separaci analytů. V případě literárních údajů staršího data pak nastává problém s použitím analytické kolony, která už nemusí být na trhu dostupná. Mnohé problémy však můžeme přičíst na vrub analytikovi, který metodu přetváří k obrazu svému. Použití zcela jiných pufrů, složení a koncentrace pufrů, změna složení solventu analytu, záměna chromatografické kolony, to vše pak vede k nepředvídatelnému nebo překvapivému chování chromatografického systému. Je nutné si uvědomit, že i malá změna pH mobilní fáze může vést ke změně retence analytů nebo dokonce ke změně pořadí jejich separace. To samé je možné prohlásit o chromatografické koloně. Na druhé straně, abychom ušetřili podobných problémů jiné analytiky, kteří budou aplikovat naši publikovanou metodu, je nutné provést důkladnou optimalizaci HPLC metody. Velký důraz je kladen na optimalizaci metody zejména při použití gradientu mobilní fáze nebo isokratické separace více analytů. Optimalizace koncentrace pufrů a všech dalších aditiv, pH, objemové frakce organického rozpouštědla, teploty separace, navržení alternativních chromatografických kolon je nezbytností. Publikace výsledků všech validovaných parametrů HPLC metody, optimalizace metody do hloubky a navržení alternativních řešení pak dává metodě vyšší vědeckou věrohodnost.

4. Literatura

1. Engelhardt H., Arangio M., Lobert T.: LC- GC Int., 12 (1997)
2. Engelhardt H.: Chromatographia 29, 59 (1990)
3. Kimata K., Iwaguchi K., Onishi S., Jinno K., Eksteen R., Hosoya M., Araki M., Tanaka N.: J. Chromatogr. Sci. 27, 721 (1989)
4. Barret D.A.: J. Chromatogr. Sci. 34, 139 (1996)
5. Ohtsu Y., Shioshima Y., Okumura T., Koyama J.- I., Nakamura O., Kimata K., Tanaka N.: J. Chromatogr. 481, 147 (1989)
6. Taylor G.: Proc. Roy. Soc. A 219, 186 (1953)

Ověřování mlýnku GRINDOMIX

Pavel Šíma, Jaroslava Petrová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Praha, Za opravnou 4, 150 06 Praha 5 – Motol;

pavel.sima@ukzuz.cz, jaroslava.petrova@ukzuz.cz

1. Úvod

Při stanovení doplňkových látek v krmivech je metodikou odboru krmiv při ověřování výroben krmiv, ověřování homogenity a kontaminace, předepsáno provádět mletí vzorku o hmotnosti až jeden kilogram. Vzhledem k tomu, že laboratoře NRL jsou vybaveny mlýnky Minirasant, je splnění tohoto požadavku omezeně splnitelné pro nadměrné přehřívání vzorku, doba mletí neúměrně prodlužuje dobu analýzy a dochází k nadměrnému opotřebování součástí mlýnku a problémům s následující opravou (zastaralý typ).

Pro naplnění požadavku odboru krmiv na způsob mletí vzorů krmiv a současně dovybavení laboratoří ústavu moderním mlýnkem splňujícím požadavky jako rychlost, omezení kontaminace, omezení přehřívání vzorku apod., byl zakoupen mlýnek GRINDOMIX GM 200 firmy Retsch. Vlastnímu mletí předchází rozdělení vzorku na rotačním děliči s poměrem 1 : 8, kdy je vydělen zhruba stogramový vzorek a ten je potom pomlet mlýnkem GRINDOMIX GM 200.

Cílem práce bylo odzkoušet a ověřit :

- 1.1. stanovení optimální doby mletí
- 1.2. stanovení optimálního počtu otáček mlýnku
- 1.3. vliv mletí na výsledky stanovení obsahu vlákniny
- 1.4. vliv mletí na výsledky stanovení vitamínu A a E
- 1.5. vliv mletí na výsledky stanovení obsahu doplňkových látek – stimulatorů

- 1.6. zjistit homogenitu mletí vzorků krmiv – provedení síťové zkoušky - a porovnání výsledků zkoušek s dosud používaným mlýnkem Minirasant
- 1.7. zjistit vliv mletí na stanovení obsahu sušiny, N – látek, tuku a vlákniny metodou NIRS

2. Technické parametry mlýnu¹⁾

Mlýnek GRINDOMIX GM 200 je laboratorní nožový mlýn určený k homogenizaci a mletí suchého vláknitého materiálu s případným vyšším obsahem tuku. Slouží jako laboratorní zařízení pro jednu osmihodinovou pracovní směnu a při nepřetržitém provozu může pracovat do 30 % pracovní směny, tj 160 minut.

Homogenizace a mletí se provádí pomocí řezných nožů. Ostří nože je rovné a svírá se směrem otáčení pravý úhel. Nože jsou tenké, řezná hrana je skloněna pod úhlem 15° a plocha nože je zbroušena po úhlem 30°. V tomto geometrickém uspořádání je zdrojem řezné síly rozdíl v rychlosti materiálu a řezných nožů.

Rychlost otáčení je 2000 až 10000 ot./ min. a lze ji nastavovat v krocích 500 ot./ min. Dobu mletí lze nastavovat v rozmezí 3 minut. Mlýnek může být vybaven třemi typy mlecích nádob – plastovou, kovovou a skleněnou. Pro vzorky krmiv a podobných materiálů se nejlépe osvědčila nádoba kovová.

3. Výsledky měření a diskuse

Práce na vývojovém úkolu byla zahájena v RO Praha, kde byly ověřeny různé parametry pracovního režimu mlýnku, nastavení parametrů mlýnku za účelem optimalizace mletí a vliv mletí na výsledky zkoušek.

Ostatní regionální oddělení v rámci NRL byla požádána o provedení:

- vybrat minimálně osm původních vzorků krmiv, u kterých je deklarován obsah vlákniny a nějaké doplňkové látky - vitamin A, E, popřípadě další doplňkové látky ze skupiny stimulantů růstu či antikokcidik. Pro ověření vlivu mletí na mlýnku GRINDOMIX na výsledky zkoušení krmiv metodou NIRS je vhodné vybrat vzorky se zjištěným obsahem sušiny, N- látek, tuku a vlákniny
- vybrané vzorky krmiv upravit mletím na mlýnku GRINDOMIX za těchto parametrů: 9000 otáček za minutu po dobu 20 sekund. V některých případech

(např. tvrdá semena) pokud bude pouhým okem patrně větší procentické zastoupení neumletých částic (velikost nad 1 mm), je nutno prodloužit dobu mletí na celkem 40 sekund

- u takto upraveného vzorku provést síťovou analýzu (zrnitostní) složení: Zjistit procentické zastoupení frakce nad drátěným sítem o velikosti oka 1 mm; 0,5 mm; 0,2 mm a pod sítem o velikosti oka 0,2 mm. Parametry prosévacího přístroje: 120 ± 10 cyklů za minutu po dobu 180 sekund
- dokonale promíchat všechny frakce a provést stanovení vlákniny, popřípadě vitaminu A a E, stimulatorů růstu či antikokcidik a sušiny. Výsledky dvou paralelních zkoušek přepočtených na 100 % sušinu uvést do předepsané tabulky. Zde současně uvést původní hodnoty (také přepočtené na 100 % sušinu) zjištěné analýzou vzorku upraveného mlýnkem Minirasant
- zaslat takto upravený vzorek a současně i původní vzorek upravený mlýnkem Minirasant do RO Brno spolu s původním protokolem – ověření vlivu mletí na výsledky obsahu sušiny, N-látek, tuku a vlákniny metodou NIRS.

V tabulce č. 1, 3, 5, 7 a 9 je uvedeno porovnání výsledků stanovení obsahu vlákniny u vzorků krmiv pomletých mlýnkem GRINDOMIX a Minirasant. K ověření shodnosti výsledků byla použita statistická metoda uvedená v EffiValidation²⁾ - „Správnost“, která charakterizuje shodnost získaných výsledků obsahu vlákniny u vzorků krmiv pomletých na různých typech mlýnku.

Celkem bylo analyzováno 36 vzorků krmiv, pouze u dvou výsledků zkoušky – vzorek „CDP – 40“ (H. Brod) a vzorek „Řepkové expelery“ (Brno) nevyhovuje hypotéze o shodnosti obou výsledků. Vzhledem k tomu, že 95 % všech vzorků krmiv vyhovělo podmínkám statistického hodnocení shodnosti obou výsledků, je možno používat mlýnku GRINDOMIX k mletí vzorků určených k stanovení obsahu vlákniny.

V tabulce č. 2, 4, 6, 8 a 10 je uvedeno porovnání výsledků stanovení obsahu doplňkové látky – vitamin A a E a antikokcidika u vzorků krmiv pomletých mlýnkem GRINDOMIX a Minirasant.

Celkem bylo analyzováno 65 vzorků krmiv, všechny výsledky zkoušek vyhověly hypotéze o shodnosti obou výsledků. Vzhledem k tomu, že 100 % všech vzorků krmiv

vyhovělo podmínkám statistického hodnocení shodnosti obou výsledků, je možno používat mlýnku GRINDOMIX k mletí vzorků určených k stanovení obsahu doplňkových látek.

V tabulce č. 11 až 15 jsou uvedeny výsledky síťové analýzy – zjištění procentického zastoupení frakce nad drátěným sítem o velikosti oka 1 mm; 0,5 mm; 0,2 mm a pod sítem o velikosti oka 0,2 mm. Parametry prosévacího přístroje: 120 ± 10 cyklů za minutu, doba činnosti prosévacího přístroje 180 sekund. Celkem byly ověřeny podmínky mletí u 33 vzorků různých krmiv, z toho u 32 vzorků krmiv (celkem 97 % všech vzorků) byl zjištěn optimální průběh zastoupení frakce pod drátěným sítem o velikosti oka 1 mm, neboť metody zkoušení krmiv uvedené ve vyhlášce ministerstva zemědělství ČR³⁾ předepisují úpravu vzorku mletím tak, aby prošla drátěným sítem o velikosti oka 1 mm. Pouze jeden vzorek – Kompletní krmení pro psy (Brno) vykázal vyšší podíl frakce nad drátěným sítem o velikosti oka 1 mm. Výsledky opavské laboratoře (vysoký podíl frakce nad drátěným sítem o velikosti oka 1 mm) byly způsobeny nedostatečným ostřím pracovních nožů – je nezbytné věnovat mimořádnou pozornost stavu ostří.

Síťová analýza prokázala vhodnost použití laboratorního nožového mlýnku GRINDOMIX GM 200 k homogenizaci a mletí vzorků krmiv a ostatního suchého vláknitého materiálu. Vzorky krmiv se upravují mletím na mlýnku GRINDOMIX za těchto podmínek: 9000 otáček za minutu po dobu 20 sekund.

Ověření vlivu mletí vzorků krmiv mlýnkem GRINDOMIX a Minirasant na stanovení obsahu sušiny, N – látek, tuku a vlákniny metodou NIRS je uvedeno v tabulce č. 16.

Celkem bylo analyzováno 17 vzorků krmiv – stanovení obsahu N – látek, tuku a vlákniny metodou NIRS a nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi výsledky analýzy při mletí vzorku krmiv na mlýnku GRINDOMIX a Minirasant. Mlýnku GRINDOMIX je možno používat pro mletí vzorků krmiv a následnou analýzu pomletých vzorků metodou NIRS.

4. Literatura

1. Firemní materiál firmy Retsch k mlýnku GRINDOMIX GM 200
2. Uživatelská příručka EffiValidation 3.0, autor Ing. Vladimír Centner, PhD.
3. Příloha č. 9 a 10 vyhlášky 124/2001 Sb., kterou se stanoví požadavky na odběr vzorků a principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků

Plzeň

Tabulka č. 1 : Stanovení obsahu vlákniny (100 % sušina)

Označení krmiva	Minirazant				GRINDOMIX			
	vláknina	vláknina	rozdíl	průměr	vláknina	vláknina	rozdíl	průměr
	(g/ kg)	(g/ kg)	(rel.%)	(g/ kg)	(g/ kg)	(g/ kg)	(rel.%)	(g/ kg)
243 - DKS pro produkční dojnice	47,4	45,2	4,75	46,3	43,6	42,6	2,32	43,1
264 - KKS pro výkrm prasat	39,3	37,6	4,42	38,45	37,5	41,1	9,16	39,3
297 - KKS pro výkrm prasat	38,5	34,0	12,41	36,25	32,4	30,8	5,06	31,6
317 - KKS pro výkrm kuřat	33,8	32,3	4,54	33,05	39,8	41,1	3,21	40,45
335 - Chovná králíci	162,0	162,0	0,00	162	161,6	162,4	0,49	162
342 - DKS pro dojnice	42,3	41,0	3,12	41,65	39,5	38,2	3,35	38,85
345 - Ovesná mouka krmná *	30,3	33,2	9,13	31,75	31,4	33,4	6,17	32,4
370 - A2 - KKS pro výkrm prasat	41,5	39,6	4,69	40,55	40,7	39,0	4,27	39,85

Směrodatná odchylka

3,78

2,62

Plzeň

Tabulka č. 2 : Stanovení obsahu dopl. látky (100 % sušina)

Označení krmiva	Minirazant				GRINDOMIX			
	dopl. látka	dopl. látka	rozdíl	průměr	dopl. látka	dopl. látka	rozdíl	průměr
			(rel.%)				(rel.%)	
317 - salinomycin mg/ kg	96,9	90,4	6,94	93,65	94,1	95,1	1,06	94,60
370 - salinomycin mg/ kg	39,4	36,9	6,55	38,15	38,9	40,8	4,77	39,85
335 - robenidin mg/ kg	62,0	62,4	0,64	62,20	60,6	61,8	1,96	61,20
243 - vitamin A m.j./ kg	51 294	47 027	8,68	49160	39 851	45 124	12,41	42488
243 - vitamin E m.j./ kg	80,4	77,0	4,32	78,70	70,2	70,2	0,00	70,20
264 - vitamin A m.j./ kg	6 026,5	7 397,6	20,43	6712	6 648,2	6 420,1	3,49	6534
264 - vitamin E m.j./ kg	28,5	29,7	4,12	29,10	26,0	26,0	0,00	26,00
297 - vitamin A m.j./ kg	14 370	18 086	22,90	16228	18 298	20 962	13,57	19630
297 - vitamin E m.j./ kg	138,8	138,8	0,00	138,80	137,0	135,9	0,81	136,45
342 - vitamin A m.j./ kg	45 021	51 075	12,60	48048	49 423	48 471	1,95	48947
342 - vitamin E m.j./ kg	64,9	66,1	1,83	65,50	65,6	64,5	1,69	65,05
376 - vitamin A m.j./ kg	2 343 052	2 281 007	2,68	2312029	2 285 063	2 239 987	1,99	2262525
376 - vitamin E m.j./ kg	4 398	4 443	1,01	4420,20	4 432	4 405	0,61	4418,55

Směrodatná odchylka

7,38

4,46

Havlíčkův Brod

Tabulka č. 3 : Stanovení obsahu vlákniny (100 % sušina)

Označení krmiva	Minirazant				GRINDOMIX			
	vláknina	vláknina	rozdíl	průměr	vláknina	vláknina	rozdíl	průměr
	(g/ kg)	(g/ kg)	(rel.%)	(g/ kg)	(g/ kg)	(g/ kg)	(rel.%)	(g/ kg)
124/ 03-DOPS 2 - 20 s	51,80	52,95	2,20	52,375	51,01	52,91	3,66	51,96
126/ 03-PCH 2 – 40 s	53,23	53,92	1,29	53,575	48,86	47,19	3,48	48,025
127/ 03-DOK - 20 s	68,90	67,33	2,30	68,115	63,73	60,79	4,72	62,26
150/ 03-CDP - 40 s	34,55	34,76	0,61	34,655	29,63	30,86	4,07	30,245
152/ 03-CDP - 40 s*	42,25	42,46	0,50	42,355	36,61	37,05	1,19	36,83
155/ 03-KKS pro prasata - 40 s	38,14	38,19	0,13	38,165	38,06	35,24	7,69	36,65
157/ 03-DOSCH gr. - 20 s	50,23	50,36	0,26	50,295	51,12	48,77	4,71	49,945
181/ 03-CDP - 40 s	46,93	49,19	4,70	48,06	45,16	44,70	1,02	44,93

Směrodatná odchylka

1,54

2,12

* výsledek testování neprokázal hypotézu o shodě

Havlíčkův Brod

Tabulka č. 4 : Stanovení obsahu DL (100 % sušina)

Označení krmiva	Minirazant				GRINDOMIX			
	dopl. látka	dopl. látka	rozdíl	průměr	dopl. látka	dopl. látka	rozdíl	průměr
			(rel.%)	(g/ kg)			(rel.%)	(g/ kg)
124/ 03-DOPS 2- vit A (m.j./ kg)	58560	50330	15,12	54445	62300	63620	2,10	62960,00
126/ 03-PCH 2- vit A (m.j./ kg)	14170	16630	15,97	15400	12300	12530	1,85	12415,00
127/ 03-DOK- vit A (m.j./ kg)	32650	35270	7,71	33960	26670	31370	16,20	29020,00
150/ 03-CDP- vit A (m.j./ kg)	6450	6840	5,87	6645	5530	6470	15,67	6000
152/ 03-CDP- vit A (m.j./ kg)	6550	6920	5,49	6735	6640	6810	2,53	6725,00
157/ 03-DOSCH gr.- vit A (m.j./ kg)	26880	26210	2,52	26545	22410	21360	4,80	21885
181/ 03-CDP- vit A (m.j./ kg)	4920	5880	17,78	5400	4590	4900	6,53	4745,00
124/ 03-DOPS 2- vit E (mg/ kg)	78,6	74,5	5,36	76,6	75,4	74,1	1,74	75
126/ 03-PCH 2- vit E (mg/ kg)	75,6	83,4	9,81	79,5	74,9	75,8	1,19	75,35
127/ 03-DOK- vit E (mg/ kg)	71,8	77,6	7,76	74,7	73,9	71,8	2,88	73
150/ 03-CDP- vit E (mg/ kg)	16,1	17,1	6,02	16,6	18,1	17,1	5,68	17,60
152/ 03-CDP- vit E (mg/ kg)	21,1	19,1	9,95	20,1	18,1	19,1	5,38	19
157/ 03-DOSCH gr. - vit E (mg/ kg)	75,5	73,0	3,37	74,3	72,1	74,3	3,01	73,20
181/ 03-CDP - vit E (mg/ kg)	42,2	43,2	2,34	42,7	38,7	39,7	2,55	39,20

Směrodatná odchylka

4,97

4,96

Praha

Tabulka č. 5 : Stanovení obsahu vlákniny (100 % sušina)

Označení krmiva	Minirazant				GRINDOMIX			
	vláknina	vláknina	rozdíl	průměr	vláknina	vláknina	rozdíl	průměr
	(g/ kg)	(g/ kg)	(rel.%)	(g/ kg)	(g/ kg)	(g/ kg)	(rel.%)	(g/ kg)
276 BR1 KKS pro výkrm kuřat brojlerů	31,13	27,33	12,99	29,23	26,2	25,6	2,19	25,88
302 KS pro kojící prasnice	37,84	33,30	12,77	35,57	32,2	32,5	1,04	32,34
312 KS výkrm brojlerových králíků s antikokcidikem	213,33	189,65	11,75	201,49	187,3	187,2	0,06	187,26
500 KS selata do 8 kg živé hmotnosti ČOS	38,10	33,41	13,11	35,75	36,1	35,4	2,13	35,75
313 Nutra Nuggets-ADULT MAINTENANCE KKS pro psy	20,02	17,68	12,43	18,85	22,9	23,3	1,96	23,10
328 CDP KS výkrm prasat nad 65 kg živé hmotnosti	44,57	45,60	2,28	45,09	42,0	40,6	3,30	41,32

Směrodatná odchylka

4,24

1,11

Praha

Tabulka č. 6 : Stanovení obsahu doplňkové látky (100 % sušina)

Označení krmiva	Minirazant				GRINDOMIX			
	dopl. látka	dopl. látka	rozdíl (rel.%)	průměr	dopl. látka	dopl. látka	rozdíl (rel.%)	průměr
124 AMINOVIN P3 PLUS Premix pro prasata- vit A (m.j./ kg)	2090813	2084688	0,29	2087751	2016703	2048168	1,55	2032435
276 BR1 KKS pro výkrm kuřat brojlerů- vit A (m.j./ kg)	11923	11872	0,42	11897	10189	9968	2,19	10078
302 KS pro kojící prasnice- vit A (m.j./ kg)	15457	15298	1,03	15377	15549	16150	3,79	15849
312 KS výkrm brojlerových králíků cidikem- vit A (m.j./ kg)	10699	10421	2,63	10560	14856	14879	0,15	14867
500 KS selata do 8 kg živé hmotnosti ČOS- vit A (m.j./ kg)	22637	21927	3,19	22282	20759	24153	15,11	22455
502AMINOVITAN KZK-PLUS Premix pro kuřice- vit A (m.j./ kg)	2180088	2153173	1,24	2166630	2106311	2231774	5,78	2169042
313 Nutra Nuggets-Adult Maintenance KK pro psy- vit A (m.j./ kg)	16259	15182	6,85	15720	14084	14447	2,55	14265
328 CDP KS výkrm prasat nad 65 kg živé hmotnosti- vit A (m.j./ kg)	5935	6101	2,75	6018	4310	4339	0,68	4324
AMINOVITAN P3 PLUS Premix pro chov. prasata- vit E (mg/ kg)	9925	9833	0,93	9879	10751	10385	3,46	10567
BR1 KKS pro výkrm kuřat brojlerů - vit E (mg/ kg)	37,92	36,71	3,24	37,31	48,14	47,12	2,14	47,63
KS pro kojící prasnice - vit E (mg/ kg)	86,88	90,13	3,67	88,50	94,96	96,93	2,05	95,94
KS výkrm brojlerových králíků s kokcidikem - vit E (mg/ kg)	51,56	62,95	19,88	57,26	90,92	90,89	0,04	90,90
AMINOVITAN KZK-PLUS Premix pro kuřice- vit E (mg/ kg)	4283	4286	0,07	4285	4283,7	4335,8	1,21	4309
313 Nutra Nuggets-ADULT NCE KK pro psy- vit E (mg/ kg)	123,56	115,12	7,07	119,3	121,63	128,88	5,79	125,25
CDP KS výkrm prasat nad 65 kg živé hmotnosti- vit E (mg/ kg)	17,02	16,59	2,52	16,81	23,61	23,72	0,48	23,67
312 KS výkrm brojlerových králíků - salinomycin (mg/ kg)	23,26	22,91	1,51	23,09	23,33	23,97	2,70	23,65

Směrodatná odchylka

4,79

3,65

Brno

Tabulka č. 7 : Stanovení obsahu vlákniny (100 % sušina)

	Minirazant				GRINDOMIX			
Označení krmiva	vláknina	vláknina	rozdíl	průměr	vláknina	vlánina	rozdíl	průměr
	(g/ kg)	(g/ kg)	(rel.%)	(g/ kg)	(g/ kg)	(g/ kg)	(rel.%)	(g/ kg)
Kompletní krmivo pro psy	15	14,6	2,70	14,80	19,9	18	10,03	18,95
KKS pro kuřata - 1.fáze	44,2	42,1	4,87	43,15	48,1	45,7	5,12	46,9
KKS pro prasata - nad 35 kg	37,4	36,2	3,26	36,80	40,8	38,7	5,28	39,75
KKS pro kuřata	30	31,3	4,24	30,65	32,6	30,6	6,33	31,6
Řepkové expelery*	116,3	113,8	2,17	115,05	129,5	121,2	6,62	125,35
KKS pro králíky	138	138,9	0,65	138,45	145,3	143,1	1,53	144,2
CALMIX P								
AMINOKRAFT ZM								

Směrodatná odchylka

1,51

2,75

* výsledek testování neprokázal hypotézu o shodě

Brno

Tabulka č. 8 : Stanovení obsahu DL (100 % sušina)

Označení krmiva	Minirazant				GRINDOMIX			
	vitamin A	vitamin A	rozdíl	průměr	vitamin A	vitamin A	rozdíl	průměr
	(m.j./ kg)	(m.j./ kg)	(rel.%)	(m.j./ kg)	(m.j./ kg)	(m.j./ kg)	(rel.%)	(g/ kg)
Kompletní krmivo pro psy	16304	15194	7,05	15749	13363	15150	12,53	14256
KKS pro kuřata - 1.fáze	14064	15311	8,49	14688	12450	17279	32,49	14864
KKS pro prasata - nad 35 kg	9054	8559	5,62	8807	9329	8923	4,45	9126
KKS pro kuřata	12926	12107	6,54	12517	13348	13544	1,46	13446
Řepkové expelery								
KKS pro králíky	7859	8521	8,08	8190	7442	8103	8,50	7772
CALMIX P	520413	499506	4,10	509960	493753	473236	4,24	483494
AMINOKRAFT ZM	408060	400262	1,93	404161	418750	413401	1,29	416075

Směrodatná odchylka

2,32

10,98

Opava

Tabulka č. 9 : Stanovení obsahu vlákniny (100 % sušina)

Označení krmiva	Minirazant				GRINDOMIX			
	vláknina	vláknina	rozdíl	průměr	vláknina	vláknina	rozdíl	průměr
	(g/ kg)	(g/ kg)	(rel.%)	(g/ kg)	(g/ kg)	(g/ kg)	(rel.%)	(g/ kg)
262 M/ 265G - doplňková KS pro dojnice	61,15	58,84	3,85	60,00	61,48	62,64	1,87	62,06
285 M/ 266G - doplňková KS pro dojnice	61,22	58,62	4,34	59,92	57,84	57,05	1,38	57,44
293 M/ 267G - KS pro brojlerů	25,8	28,96	11,54	27,38	23,15	25,75	10,63	24,45
294 M/ 268G - KS pro telata	30,7	34,2	10,79	32,45	34,76	35,44	1,94	35,10
305 M/ 269G - KS pro kuřice	39,59	35,73	10,25	37,66	36,89	37,8	2,44	37,34
310 M/ 270G - KS pro kuřice	41,69	42,15	1,10	41,92	42,04	40,31	4,20	41,17
329 M/ 271G - KS pro nosnice-granule	37,02	35,11	5,30	36,07	33,98	37,09	8,75	35,53
337 M/ 272G - KS pro prasnice-granule	58,07	55,9	3,81	56,99	57,91	55,74	3,82	56,82

Směrodatná odchylka

3,91

3,46

Opava

Tabulka č. 10 : Stanovení obsahu doplňkové látky (100 % sušina)

	Minirazant				GRINDOMIX			
Označení krmiva	dopl. látka	dopl. látka	rozdíl (rel.%)	průměr	dopl. látka	dopl. látka	rozdíl (rel.%)	průměr
262 M/ 265G - doplňková KS pro dojnice- vit A (m.j./ kg)	25832	28194	8,74	27013	30696	29142	5,19	29919
262 M/ 265G - doplňková KS pro dojnice- vit E (mg/ kg)	109,42	110,2	0,71	110	116,59	115,39	1,03	115,99
285 M/ 266G - doplňková KS pro dojnice- vit A (m.j./ kg)	23421	21805	7,15	22613	25069	26522	5,63	25795
285 M/ 266G - doplňková KS pro dojnice- vit E (mg/ kg)	94,31	95,55	1,31	95	92,04	94,3	2,43	93,17
293 M/ 267G - KS pro brojler- vit A (m.j./ kg)	15274	15256	0,12	15265	15608	15786	1,13	15697
293 M/ 267G - KS pro brojler- vit E (mg/ kg)	58,03	56,9	1,97	57	56,92	56,47	0,79	56,70
294 M/ 268G - KS pro telata- vit A (m.j./ kg)	26761	28710	7,03	27736	28430	25202	12,04	26816
294 M/ 268G - KS pro telata- vit E (mg/ kg)	106,66	103,5	3,01	105	105,87	102,14	3,59	104,01
305 M/ 269G - KS pro kuřice- vit A (m.j./ kg)	13217	11859	10,83	12538	10910	11070	1,46	10990
305 M/ 269G - KS pro kuřice- vit E (mg/ kg)	35,51	35,73	0,62	36	36,32	36,32	0,00	36,32
310 M/ 270G - KS pro kuřice- vit A (m.j./ kg)	11344	12652	10,90	11998	11315	10793	4,72	11054
310 M/ 270G - KS pro kuřice- vit E (mg/ kg)	40,11	42,26	5,22	41	38,36	38,7	0,88	38,53
329 M/ 271G - KS pro nosnice-granule- vit A (m.j./ kg)	7009	6784	3,26	6897	6806	6727	1,17	6766
329 M/ 271G - KS pro nosnice-granule- vit E (mg/ kg)	32,28	32,62	1,05	32	33,4	33,17	0,69	33,29
337 M/ 272G - KS pro prasnice-granule- vit E (mg/ kg)	91,15	92,97	1,98	92	92,4	92,18	0,24	92,29

Směrodatná odchylka

3,70

4,09

Plzeň

Parametry mletí : 9000 ot./min., doba mletí 20 s. Sítová zkouška byla provedena na sítích 1,0; 0,5 a 0,2 mm

Tabulka č. 11 : Zrnitostní složení

Označení krmiva	velikost ok (mm)/ frakce (%)			
	0	0,2	0,5	1,0
243 - DKS pro produkční dojnice	37,5	47,6	14,5	0,4
264 - KKS pro výkrm prasat	38,8	46,5	13,8	0,9
297 - KKS pro výkrm prasat	48,9	38,7	11,7	0,7
317 - KKS pro výkrm kuřat	35,5	52,4	11,9	0,2
335 - Chovný králíci	33,1	46,3	20,1	0,5
342 - DKS pro dojnice	39,8	33,3	26,1	0,8
345 - Ovesná mouka krmná *	45,2	49,2	5,2	0,4
370 - A2 - KKS pro výkrm prasat	43,8	35,2	20,5	0,5
376 - AMINOVITAN SK-C1-PLUS	62,1	35,1	2,5	0,3

Havlíčkův Brod

Parametry mletí : 9000 ot./ min., doba mletí 20 s. Sítová zkouška byla provedena na sítích 1,0; 0,5 a 0,2 mm

Tabulka č. 12 : Zrnitostní složení

	velikost ok (mm)/ frakce (%)			
Označení krmiva	0	0,2	0,5	1,0
124/ 03-DOPS 2 - 20 s	32,47	35,69	27,91	3,34
126/ 03-PCH 2 - 40 s	30,08	38,24	27,15	3,00
127/ 03-DOK - 20 s	34,68	33,3	26,63	3,73
150/ 03-CDP - 40 s	37,48	33,34	26,88	1,68
152/ 03-CDP - 40 s	32,72	34,57	28,37	3,45
155/ 03-KKS pro prasata - 40 s	27,19	31,01	38,17	4,70
157/ 03-DOSCH gr. - 20 s	35,01	39,59	23,6	1,53
181/ 03-CDP - 40 s	28,28	38,55	32,22	1,06

Praha

Tabulka č. 13: Zrnitostní složení

Parametry mletí : 9000 ot./ min., doba mletí 20 s. Sítová zkouška byla provedena na sítích 1,0; 0,5 a 0,2 mm

Označení krmiva	velikost ok (mm)/ frakce (%)			
	0	0,2	0,5	1,0
124 AMINOVITAN P3 PLUS Premix pro chov. prasata se zvýš.	53	41	6	0
276 BR1 KKS pro výkrm kuřat brojlerů	2	47	46	4
302 KS pro kojící prasnice	2	28	68	2
312 KS výkrm brojlerových králíků s antikokcidikem	20	41	37	1
500 KS selata do 8 kg živé hmotnosti ČOS				
502 AMINOVITAN KZK-PLUS Premix pro kuřice nosného typu v				
313 Nutra Nuggets-ADULT MAINTENANCE Kompl. krm. pro psy	0	24	74	2
328 CDP KS výkrm prasat nad 65 kg živé hmotnosti	2	21	70	6

Brno

Tabulka č. 14 : Zrnitostní složení

Parametry mletí : 9000 ot./ min., doba mletí 20 s. Sítová zkouška byla provedena na sítích 1,0; 0,5 a 0,2mm

	velikost ok (mm)/ frakce (%)			
Označení krmiva	0	0,2	0,5	1,0
Kompletní krmivo pro psy	0	0	21	79
KKS pro kuřata - 1.fáze	25	31	31	13
KKS pro prasata - nad 35 kg	24	36	34	6
KKS pro kuřata	10	26	59	5
Řepkové expelery	6	31	61	2
KKS pro králíky	27	44	28	1
CALMIX P	37	29	28	6
AMINOKRAFT ZM	47	40	12	1

Opava

Parametry mletí : 9000 ot./ min., doba mletí 20 s. Sítová zkouška byla provedena na sítích 1,0; 0,5 a 0,2mm

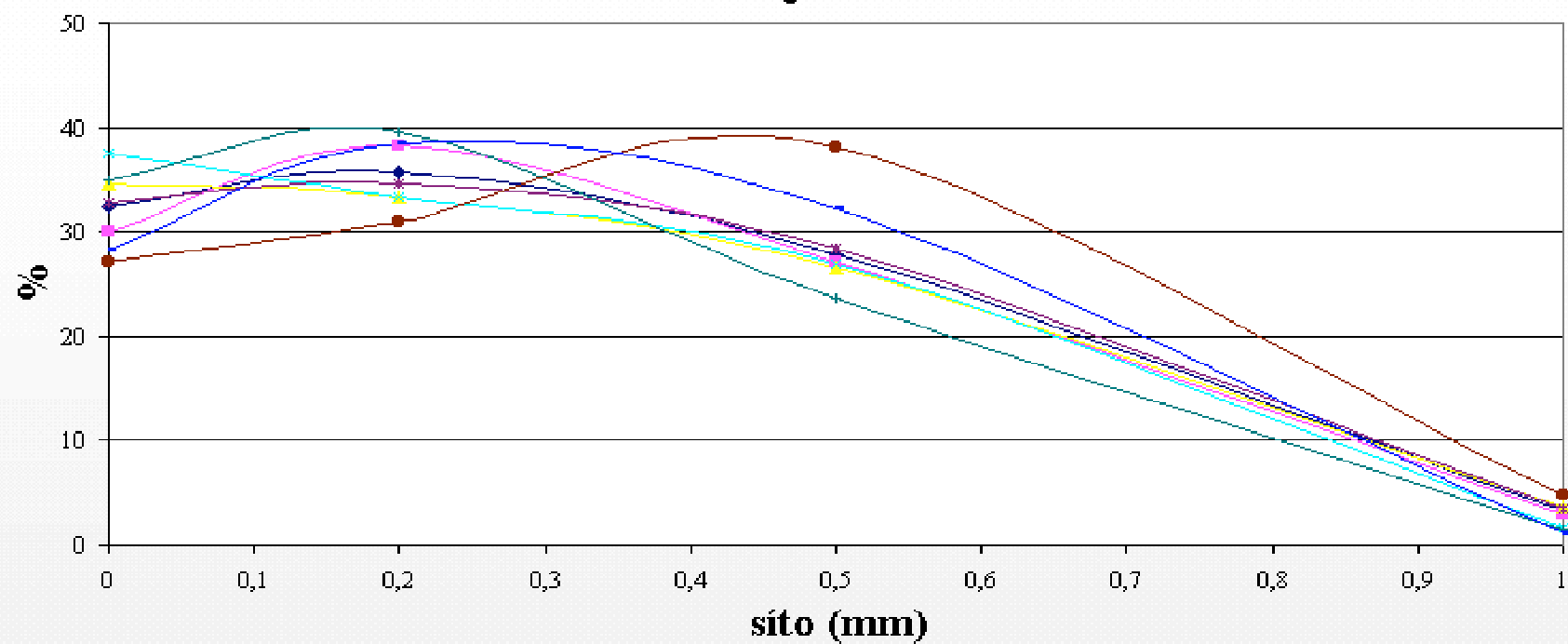
Tabulka č. 15 : Zrnitostní složení

Krmivo	velikost ok (mm)/ frakce (%)			
	0	0,2	0,5	1,0
265G - doplňková KS pro	17,6	36,3	27	19,1
266G - doplňková KS pro	17,5	28,9	28,6	25
267G - KS pro brojlerů	15,3	31,3	35,6	17,8
268G - KS pro telata	14,6	25,8	32,7	26,9
269G - KS pro kuřice	17,8	20,6	29,7	31,9
270G - KS pro kuřice	9,9	30,8	31,9	27,4
271G - KS pro nosnice-granule	17,5	24,5	33,2	24,8
272G - KS pro prasnice-granule	14,4	27,9	35,5	22,2

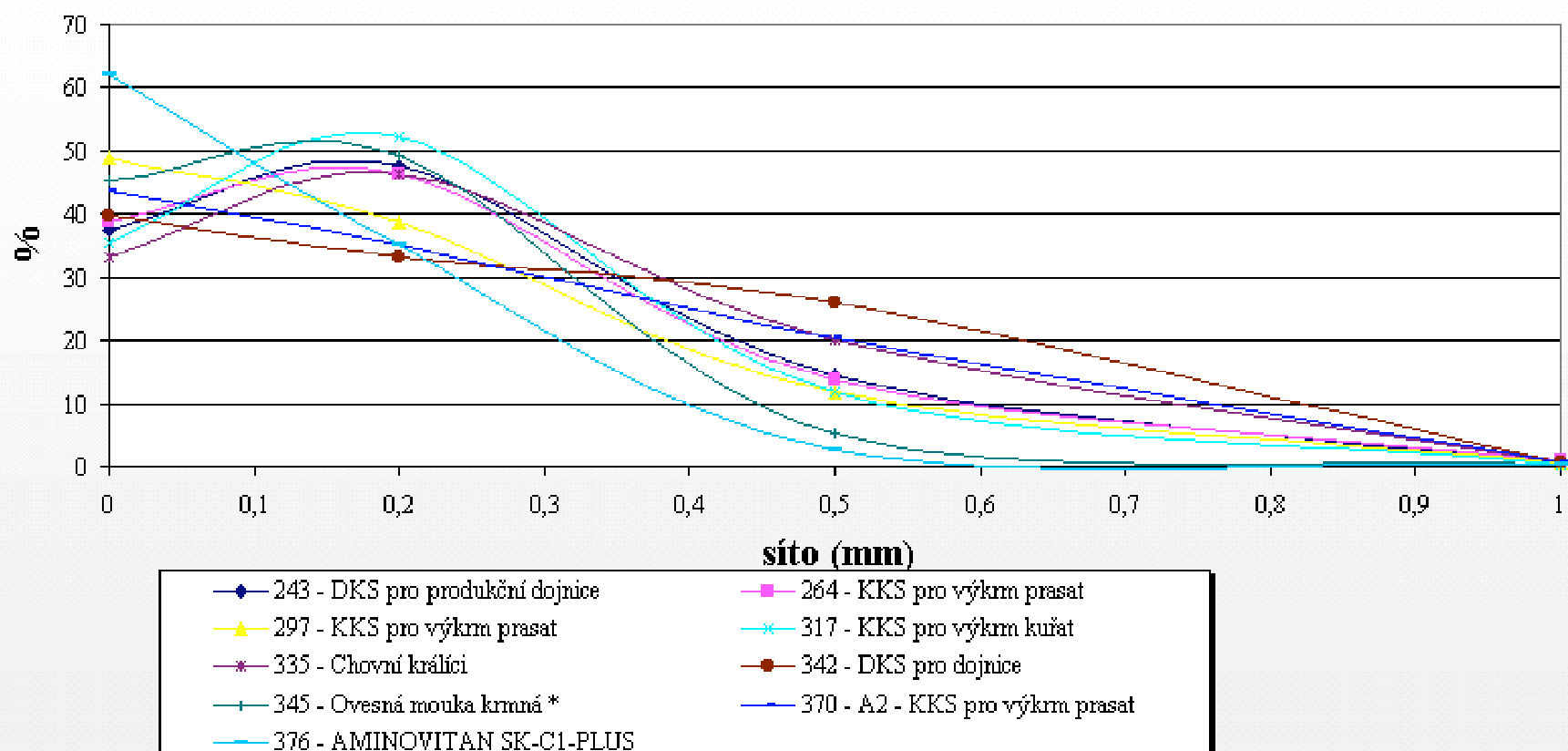
Tabulka č. 16 : Stanovení obsahu N- látek, tuku a vlákniny ve vzorku krmiva upraveného mlýnkem GRINDOMIX a Minirasant

Označení krmiva	N- látky (g/ kg)			Tuk (g/ kg)			Vláknina (g/ kg)		
	GRINDOMIX	Minirasant	Rozdíl (rel.%)	GRINDOMIX	Minirasant	Rozdíl (rel.%)	GRINDOMIX	Minirasant	Rozdíl (rel.%)
243	246,9	242,5	1,8	40,4	43	- 6,3	42	40,5	3,6
264	163	161,4	1,0	15,4	16,9	- 9,7	35,1	34,4	2,0
267	225,5	215,4	4,5	43,8	37,1	15,3	24,9	26	- 4,4
7268	190,2	181,8	4,4	36,6	31,2	14,8	34,9	32,7	6,3
269	142	133,4	6,0	21,7	22,3	- 2,8	26,5	25,4	4,2
271	165,3	164,9	0,2	18,8	15	20,2	31,8	26,5	16,7
276	226,5	232	- 2,4	41,1	42,4	- 3,2	23,5	24,5	- 4,2
297	112,3	111,5	0,7	13,6	12,8	5,9	33,2	33,7	-1,5
302	172	171,7	0,2	48,9	51,4	- 5,1	29,1	30,4	- 4,5
317	210,1	216,7	- 3,1	71,8	74,5	- 3,8	25,5	27,3	- 7,0
328	139,5	140,7	- 0,8	17,4	19,5	- 12,1	36,1	35,5	1,7
345	188,8	184,9	2,1	23,4	23,3	0,4	41,9	36,7	12,4
346	146,8	147,8	- 0,7	73,2	76,8	- 4,9	36,4	43	-18,1
370	158,9	164,6	- 3,6	19,8	18,9	4,5	34,9	35,2	- 0,9
442	159,8	155,1	2,9	28,7	28,1	2,1	36,8	36,2	1,6
461	208,5	206,3	1,1	47	44,3	5,7	23	22,9	0,4
500	190,7	184,1	3,5	34,7	31,6	8,9	33,6	29,6	11,9

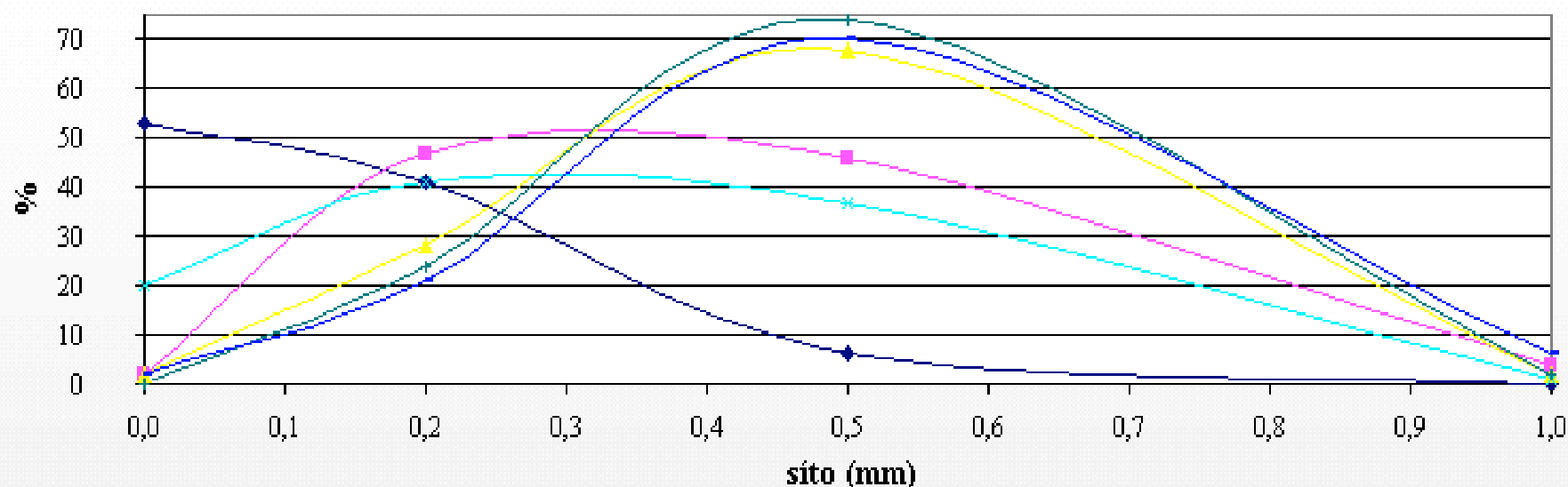
Sítová analýza - H.Brod



Sítová analýza - Plzeň

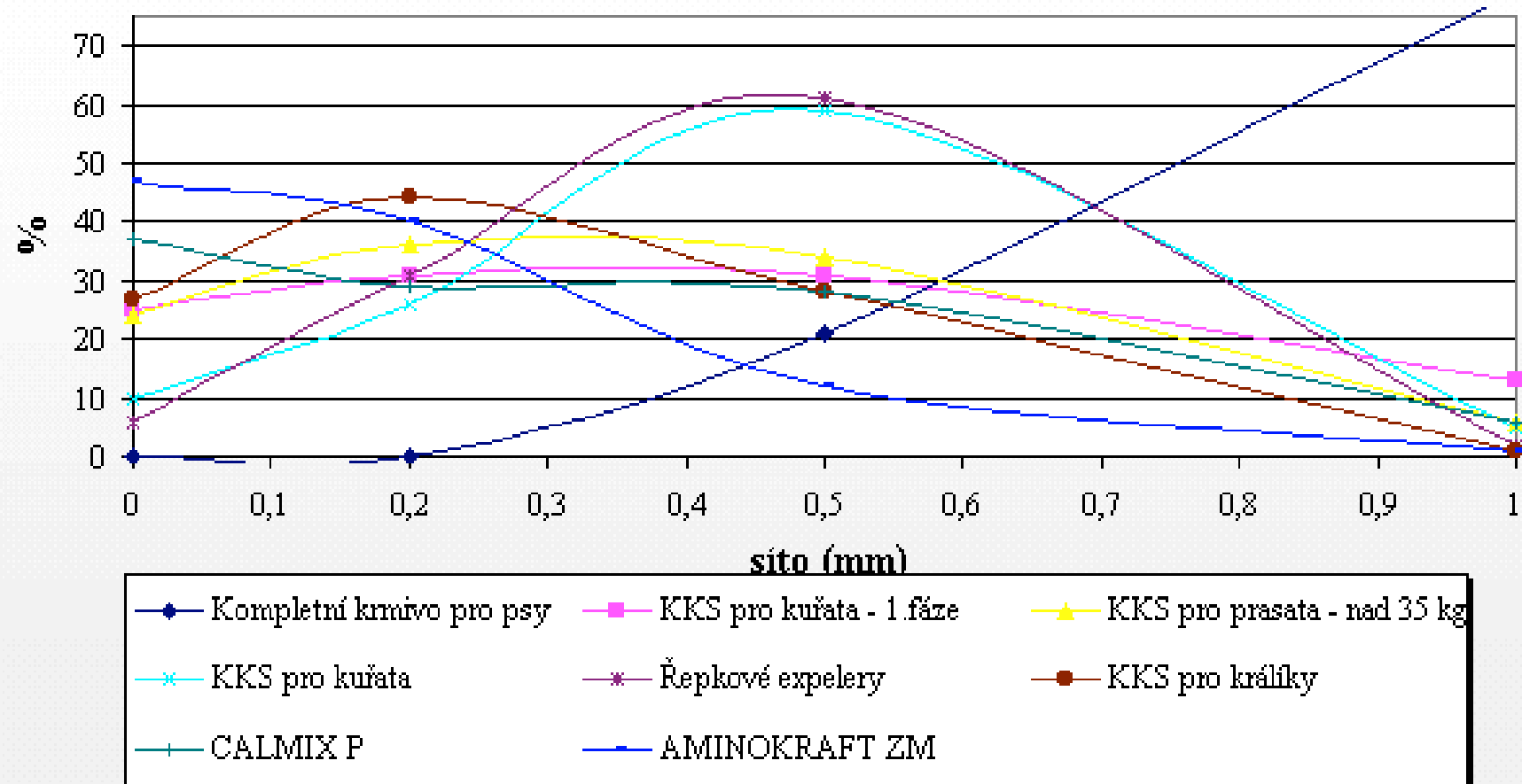


Sítová analýza - Praha

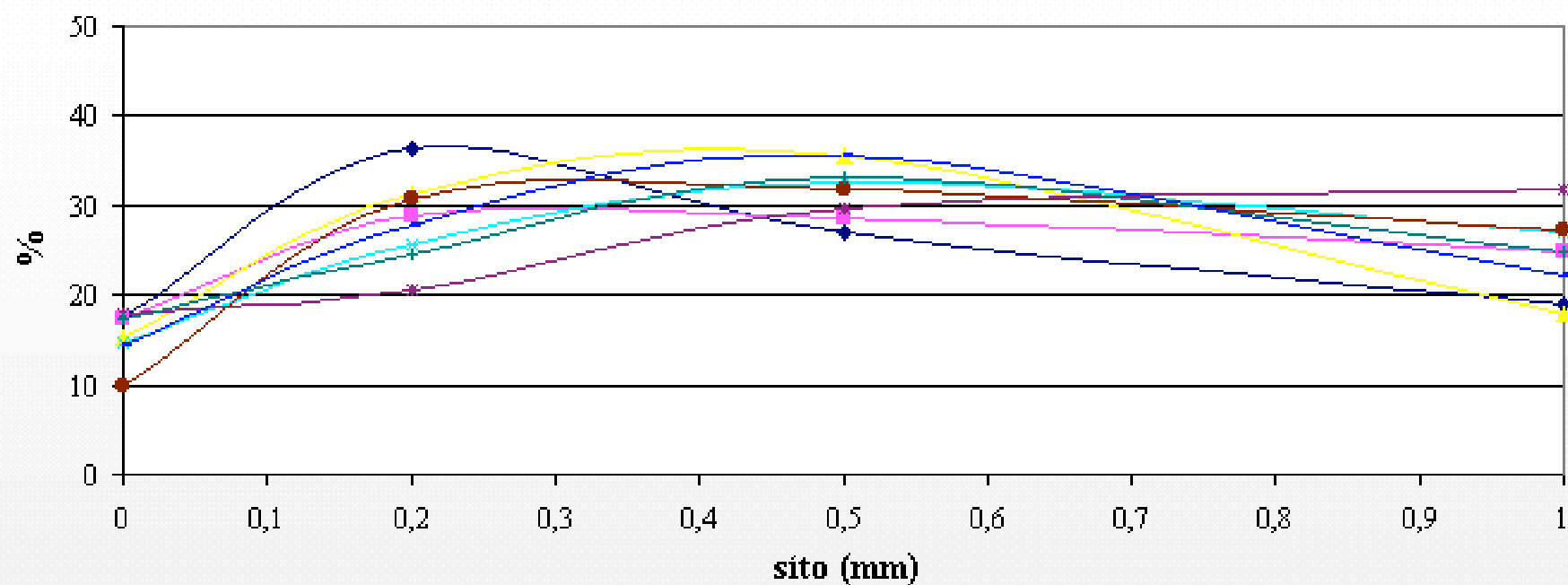


- ◆ 124 AMINOVITAN P3 PLUS Premix pro chov prasata se zvýš. obs. vitamínů
- 276 BR1 KKS pro výkm kuřat brojlerů
- ▲ 302 KS pro kojící prasnice
- ✱ 312 KS výkm brojlerových králíků s antikokcidikem
- ✱ 500 KS selata do 8 kg živé hmotnosti COS
- 502 AMINOVITAN KZK-PLUS Premix pro kuřice nosného typu v užit chovech
- + 313 Nutra Nuggets-ADULT MAINTENANCE Komplet. km. pro psy v běžné zátěži
- 328 CDP KS výkm prasat nad 65 kg živé hmotnosti

Sítová analýza - Brno



Sítová analýza - Opava



—◆— 265G - doplňková KS pro dojnice

—■— 266G - doplňková KS pro dojnice

—▲— 267G - KS pro brojery

—×— 268G - KS pro telata

—*— 269G - KS pro kuřice

—●— 270G - KS pro kuřice

—+— 271G - KS pro nosnice-granule

—■— 272G - KS pro prasnice-granule

Hmotnost zkušebního vzorku a zrnitost materiálu jako významný zdroj chyby analytického stanovení

Michal Douša

Ecochem a.s., Dolejškova 30, 182 00 Praha 8; michal.dousa@ecochem.cz

Romana Hosmanová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,

Regionální oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 317 60 Plzeň; romana.hosmanova@ukzuz.cz

Klíčová slova: krmivo, příprava vzorku, chyba metody

1. Úvod

Vzorek, který odebíráme pro stanovení průměrného složení určitého materiálu, musí být reprezentativní ⁽¹⁾, tj. musí mít kvalitativní a kvantitativní složení odpovídající průměrnému složení materiálu, ze kterého byl odebrán.

Vzorkování, příprava vzorku pro zkoušení a vlastní zkoušení vzájemně úzce souvisí a můžeme pro náhodnou chybu odběru vzorku s_s , chybu přípravy vzorku s_p a chybu analýzy s_A teoreticky napsat:

$$s_s \leq s_p \leq s_A \quad (1)$$

Při závislosti dvou nebo více proměnných x , y a z , jejichž hodnoty jsou zatíženy náhodnými chybami měření, hromadí se jejich chyby v chybě konečné veličiny, kterou z těchto proměnných vypočteme. Podle zákona hromadění chyb pro hodnoty veličin x , y a z , které mají rozptyly s_x^2 , s_y^2 a s_z^2 , pak pro rozptyl konečné veličiny z platí:

$$s_z^2 = s_x^2 + s_y^2 + 2rs_x s_y \quad (2)$$

kde r je korelační koeficient $-1 \leq r \leq +1$. V případě, že jsou veličiny vzájemně nezávislé pak $r = 0$, pro $r = 1$ jsou veličiny úplně závislé.

Vyjádříme-li celkový rozptyl stanovení s_L^2 , musíme mít na zřetel, že do rozptylu s_L^2 se může promítnout i nerepresentativní odběr vzorku ⁽²⁾. Pak má vedle složek s_s^2 a s_A^2

na celkový rozptyl stanovení vliv i počet odebraných vzorků m a počet paralelních stanovení n , provedených na každém vzorku. Rozptyl průměru z m vzorků a n paralelních stanovení je

$$s_L^2 = \frac{s_s^2}{m} + \frac{s_A^2}{mn} . \quad (3)$$

Celková chyba stanovení se tedy více zmenší odběrem většího počtu dílčích vzorků m než zvětšením počtu paralelních stanovení n . Známe-li chybu způsobenou vzorkováním a chybu způsobenou analýzou, můžeme vhodnou volbou počtu odebraných dílčích vzorků a počtu paralelních stanovení ušetřit mnoho nákladů při požadavku na celkovou chybu stanovení ⁽³⁾ .

Vyjádříme-li chybu způsobenou odběrem vzorku $(s_s/X)^2$ v závislosti na průměrné hodnotě sledovaného znaku x , hmotnosti odebraného vzorku m_s a zrnitosti materiálu m , pak může psát ⁽⁴⁾ :

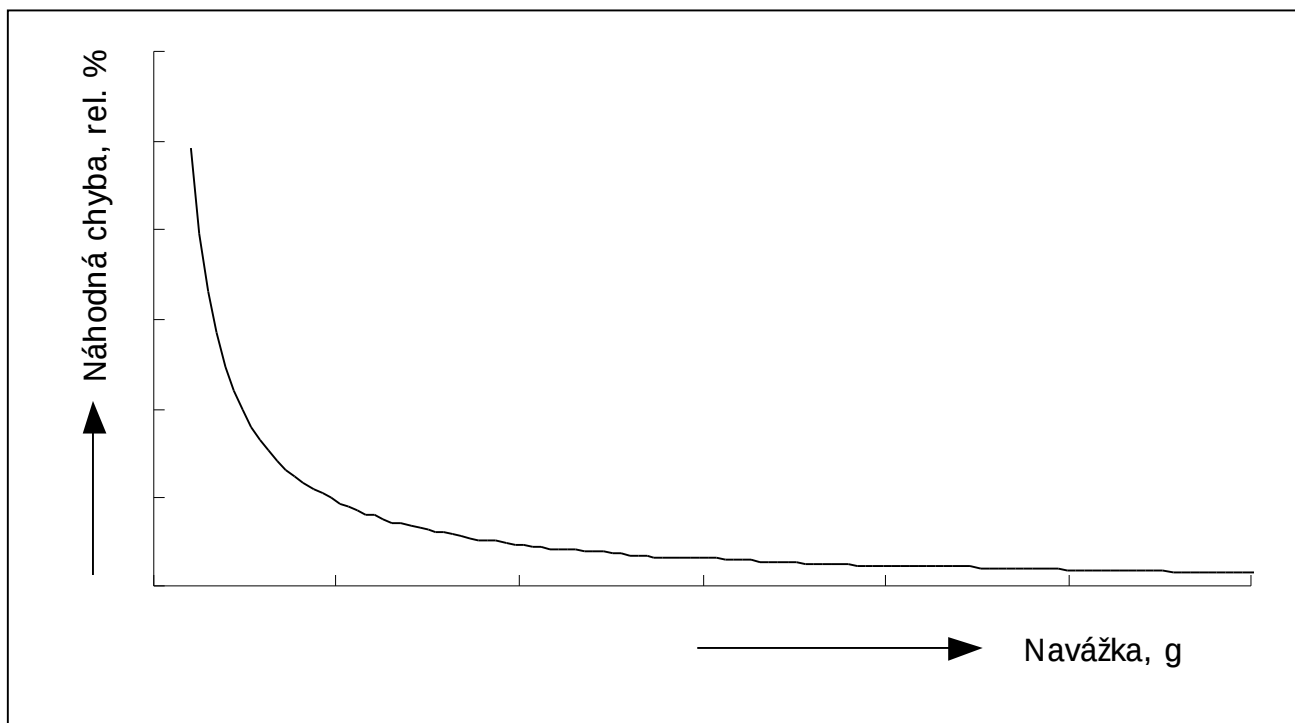
$$\left(\frac{s_s}{x} \right)^2 = \frac{(1-x)}{x} \cdot \frac{\bar{m}}{m_s} \quad (4)$$

Tento vztah můžeme aplikovat i na náhodnou chybu přípravu vzorku s_p v závislosti na hmotnosti zkušební vzorku m_A , zrnitosti materiálu m (vliv mletí vzorku) a průměrné hodnotě sledovaného znaku x . Ze vztahu (4) je zřejmé, že chyba přípravy vzorku klesá s klesající zrností m , zvyšující se hodnotou sledovaného znaku x a zvyšující se hmotností zkušební vzorku m_A .

Z výše uvedených faktorů plyne, že na celkovou chybu určení průměrné hodnoty x má vliv:

- a) počet dílčích vzorků odebraných ze vzorkované partie, ze kterých se tvoří konečný vzorek
- b) hmotnost odebraného vzorku
- c) zrnitost materiálu
- d) hmotnost zkušební vzorku a velikost částic (zrnitost)
- e) chyba analytického postupu

Teoretická závislost náhodné chyby na hmotnosti zkušební vzorku pro konstantní hodnotu sledovaného ($x < 1$) znaku a konstantní zrnitost materiálu je ukázána na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1 Vliv hmotnosti zkušební vzorku na náhodnou chybu stanovení pro konstantní hodnotu obsahu a zrnitost materiálu.

Vliv hmotnosti zkušební vzorku na velikost směrodatné odchylky pro stanovení vitamínu A byl už publikován ⁽⁵⁾. Vliv hmotnosti zkušební vzorku na velikost mezilaboratorní směrodatné odchylky stanovení vitamínu A byl sledován v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách ⁽⁶⁾.

2. Experimentální část

K ověření teoretických závěrů byl připraven laboratorní modelový vzorek lasalocidu v krmné mouce o koncentrační úrovni 20 mg/ kg. Vzorek byl upraven na velikost částic menší než 0,5 mm a zhomogenizován. Na tomto vzorku byl proveden test homogenity testem

ANOVA. Výsledky testu jsou sestaveny do tabulky č. 1. Dále byla použita krmná směs KS BR2 a KS BV-1-SAL. Obsah lasalocidu a salinomycinu byl stanoven metodou HPLC ⁽⁷⁾ .

3. Výsledky a diskuse

3.1. Vliv velikosti navážky

Vliv velikosti navážky byl studován na modelovém vzorku lasalocidu pro velikost navážky 5, 10, 20 a 40 g přičemž poměr navážky a objemu extrakčního činidla byl vždy zachován v poměru 1:5 tj. na 1 g vzorku byl použit objem extrakčního činidla 5 ml. Počet opakování pro každou hmotnost zkušební vzorku je $n = 8$.

Výsledky stanovení lasalocidu a vypočtené statistické parametry pro každou hmotnost zkušební vzorku jsou sestaveny do tabulky č. 2.

Z výsledků testu ANOVA (viz Tabulka č.1) vyplývá, že připravený modelový vzorek je homogenní. Z experimentálně získaných výsledků byla potvrzena platnost rovnice (4), se zvyšující se hmotností zkušební vzorku m_A klesá relativní směrodatná odchylka a klesá z 23,9 na 7,4 %. Z výsledků je dále možné vypočítat, že se zvyšující se hmotností zkušební vzorku se průměrná hodnota blíží k hodnotě očekávané. Na obrázku č. 2 je ukázána grafická závislost hmotnosti zkušební vzorku na relativní směrodatné odchylce. Je zřejmé, že získané výsledky se liší od teorie a blíží se spíše k závislosti lineární než exponenciální. Toto je dáno tím, že není splněna podmínka nulové chyby analytické koncovky (projevují se další náhodné chyby metody).

3.2. Vliv zrnitosti

Vliv velikosti navážky byl studován na reálných vzorcích pro homogenitu krmných směsí - KS BR2 s lasalocidem (deklarovaný obsah lasalocidu 110 mg/ kg) a KS-BV1-SAL se salinomycinem (deklarovaný obsah salinomycinu 95 mg/ kg). Vzorky byly upraveny mletím na částice 1,0 mm. Tyto vzorky byly analyzovány na obsah lasalocidu resp. salinomycinu. Poté byly vzorky opět upraveny mletím na částice 0,5 mm a menší a opět analyzovány. Výsledky měření jsou sestaveny do tabulek č. 3 a č. 4. Byla získána výborná shoda mezi hodnotami vypočtenými z experimentálních dat a hodnotami plynoucími z teoretických vztahů (4). V obou případech, při úpravě vzorku na menší zrnitost, klesla hodnota směrodatné odchylky téměř desetkrát.

Tabulka č. 1 Test homogenity ANOVA modelového vzorku lasalocidu v krmné mouce

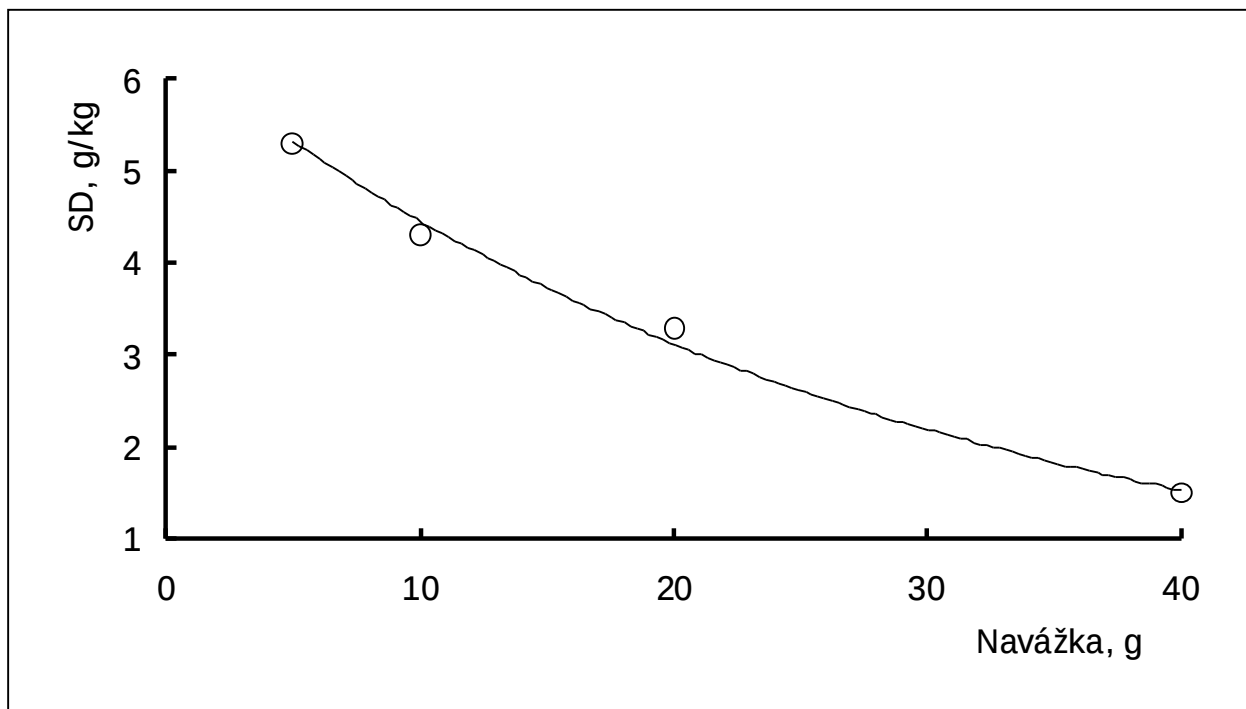
Číslo vzorku	X_1	X_2	Průměr
1	21,6	19,1	20,4
2	21	19,7	20,4
3	20,9	19,8	20,4
4	21,4	20,0	20,7
5	22,6	20,7	21,7
6	20,4	19,6	20,0
7	21,8	20,5	21,2
8	20,9	20,3	20,6
9	22,9	22,4	22,7
10	20,8	20,2	20,5
Průměr:			20,8
Meziúrovňový rozptyl:			1,30
Reziduální rozptyl:			0,90
$F_{\text{vyp}}:$			1,393
$F_{\text{tab}} (P= 0,05):$			3,02

Tabulka č. 2 Výsledky stanovení lasalocidu pro různou hmotnost zkušebního vzorku

Vzorek	Hmotnost zkušebního vzorku/ Objem činidla (g/ ml)			
	5/25	10/50	20/100	40/200
1	24,6	23,1	27,5	20,0
2	22,1	24,2	19,3	21,4
3	17,1	20,1	22,6	21,1
4	30,1	21,9	19,7	20,6
5	24,2	19,7	27,2	19,7
6	16,5	20,5	20,3	16,8
7	27,1	32,9	22,6	21,6
8	15,6	24,0	25,3	20,7
Průměr	22,2	23,3	23,1	20,2

SD	5,30	4,30	3,30	1,50
% RSD	23,9	18,5	14,3	7,4

Vysvětlivky: SD - směrodatná odchylka, % RSD - relativní směrodatná odchylka



Obrázek č. 2 Vliv hmotnosti zkušební vzorku na náhodnou chybu stanovení - výsledky stanovení lasalocidu. Bližší vysvětlení v textu.

Tabulka č. 3 Výsledky stanovení lasalocidu pro různou zrnitost vzorku

Vzorek	Obsah lasalocidu (mg/ kg) ^{*)}	
	1,0 mm	0,5 mm
1	84,4	111,5
2	101,9	111,7
3	99,6	112,5
4	118,2	111,4
5	109,0	112,5
6	98,3	111,5
7	102,6	112,2
8	102,6	110,0
9	103,3	109,1
10	117,3	111,2
11	119,4	111,6
12	118,1	109,9
13	103,4	110,5
Průměr (mg/ kg)	106,0	111,2
SD (mg/ kg)	10,1	1,0
RSD (%)	9,6	0,9

^{*)} Průměrný obsah dvou paralelních stanovení

Tabulka č. 4 Výsledky stanovení salinomycinu pro různou zrnitost vzorku

Vzorek	Obsah salinomycinu (mg/ kg) ^{*)}	
	1,0 mm	0,5 mm
1	109,8	100,2
2	119,7	97,0
3	77,1	94,3
4	113,3	95,3
5	125,3	93,2
6	82,6	90,9
7	55,9	89,5
Průměr (mg/ kg)	97,7	94,3
SD (mg/ kg)	25,9	3,6
RSD (%)	26,6	3,8%

^{*)} Průměrný obsah dvou paralelních stanovení

4. Závěr

Z výsledků experimentů můžeme formulovat tři závěry, které již však vyplývají z teoretických závislostí (rovnice 3, 4):

- se zvyšující se hmotností zkušebního vzorku klesá směrodatná odchylka stanovení
- se zvyšující se hmotností zkušebního vzorku se průměrná hodnota blíží ke správné hodnotě
- se zvyšujícím se počtem paralelních stanovení klesá směrodatná odchylka stanovení a průměrná hodnota se blíží ke správné hodnotě

Experiment byl zjednodušen v tom, že nebyl zkoumán vliv koncentrační úrovně sledovaného znaku (koncentrační úroveň byla konstantní). Výše uvedené závěry však mají obecnou platnost.

5. Literatura

1. Kratochvil B. and Taylor J.K.: Anal. Chem., 53, 984 (1981)
2. Kratochvil B., Wallace D., Taylor J.K.: Anal. Chem., 56, 113 (1984)
3. Doerffel K.: Statistik in der analytischen Chemie. VEB DVG, Leipzig 1966
4. Wilson D.: Analyst 89, 18 (1964)
5. Douša M.: Problematika přípravy laboratorních vzorků krmiv, Bulletin 2002 Laboratorního odboru roč. VI, č. 2, str. 13, LO ÚKZÚZ Brno, 2002 (ISSN 1212-5466).
6. Douša M.: Problematika stanovení vitamínu A v krmivech a potravinách metodou HPLC, Mezilaboratorní porovnávací zkoušky, Bulletin 2002 Laboratorního odboru roč. VI, č. 2, str. 39, LO ÚKZÚZ Brno, 2002 (ISSN 1212- 5466).
7. Vyhláška č. 222/ 1996 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se stanoví metody odběru vzorků, metody laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků podléhajících zkáze, ve znění pozdějších předpisů

POZNÁMKY