Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř

Bulletin 2011

Ročník XV, číslo 1/2011

Brno 2011

Obsah

1. **Stanovení jodu v krmivech a mléce** 1

Eva Fojtlová, Eva Niedobová, Karel Fritsch
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

2. **Stanovení selenu ve vzorcích půd** 12

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

3. **Zavedení metody stanovení β-karotenu ve vybraných odrůdách pšenice** 22

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

4. **Plán obecného validačního postupu pro analytické metody používané v laboratořích ÚKZÚZ** 37

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

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

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

Stanovení jodu v krmivech a mléce

Eva Fojtlová, Eva Niedobová, Karel Fritsch

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

1 Souhrn

Pro účely kontroly obsahu jodu v krmivech a mléce byla zavedena metoda stanovení jodu s využitím ICP-MS. Byla optimalizována předúprava vzorků, zejména u kompletních krmných dávek, dále samotný rozklad vzorku v tetramethylamonium hydroxidu a následné změření obsahu jodu metodou ICP-MS. Metoda byla validována a aplikována na soubor reálných vzorků různých typů krmiv a mléka odebraných v rámci monitoringu v období 2008 až 2009.

2 Úvod

Jod jako esenciální prvek je součástí thyroidních hormonů a jeho nedostatek způsobuje dysfunkce organismu, zejména pak fyzické a mentální poruchy u dětí a u dospělých osob zvětšení štítné žlázy (1).

Pro přípravu vzorků pro stanovení jodu je v literatuře popsáno několik různých postupů, a to jak v kyselém, tak v alkalickém prostředí (2, 3, 4, 5). Rozklady v kyselém prostředí nejsou zcela vhodné pro přípravu vzorků pro stanovení jodu, protože jodid, který je nejčastěji přidávanou doplňkovou látkou, je v kyselém prostředí velmi nestabilní a může docházet ke ztrátám analytu (6). Naproti tomu totální rozklady v alkalickém prostředí jsou časově náročné a vzhledem k množství dalších chemikálií, které jsou k rozkladu potřeba a zvyšují tak riziko kontaminace vzorku analytem, jsou pro přípravu vzorku pro stanovení jodu také méně vhodné. Jako optimální způsob přípravy vzorku se proto jeví alkalická extrakce, kdy je vzorek za vyšší teploty podroben extrakci/solubilizaci v silně alkalické prostředí (4, 7). Nejedná se o totální rozklad, nicméně pro extrakci veškerých forem jodu ze vzorku je tento postup dostačující a je zajištěna stabilita analytu v extraktu.

Pro stanovení jodu jsou nejpoužívanější tyto metody: hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES), neutronová aktivační analýza (NAA) a dále pak některé elektrochemické metody a titrační metody (2, 4, 5, 6). ICP-MS dominuje v analýzách jodu zejména pro svou citlivost, rychlost analýzy a relativně nízkou náročnost přípravy vzorků. Z tohoto důvodu byla tato metoda vybrána i v Národní referenční laboratoři ÚKZÚZ pro stanovení jodu v krmivech a mléce. ICP-MS spektrometr Agilent 7500ce má dostatečnou citlivost pro měření nízkých koncentrací jodu v TMAH extraktech kompletních krmných dávek, kde obsahy bývají v jednotkách µg/l. Analýza iontů vzniklých v plazmatu je prováděna na základě poměru hmotnosti a náboje iontu (M/z).

Cílem práce byl vývoj metody stanovení jodu metodou ICP-MS v krmivech a mléce, validace metody včetně ověření na certifikovaných referenčních materiálech a analýza reálných vzorků z monitoringu krmiv a mléka.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, voda čistá (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná), pokud není uvedeno jinak.

1 Kyselina dusičná, HNO_3, koncentrovaná, ρ = 1,4 g/ml, předestilována na podvarovém destilačním zařízení.

2 Tetramethylammonium hydroxid, TMAH, 25%, (např. Sigma Aldrich, Německo).

3 Demineralizovaná voda, ultračistá.

4 Jodid draselný, KI.

5 Základní komerční certifikovaný standardní roztok Te, c = 1 g/l.

4 Přístroje a pomůcky

1 Ultraodstředivý mlýn, např. ZM 200, síto o velikosti ok 3 mm, (Retsch, Německo).

2 Laboratorní mlýn, např. GM 200, (Retsch, Německo).

3 Sušárna.

4 Centrifuga.

5 Analytické váhy.

6 Plastové centrifugační zkumavky.

7 Plastové uzavíratelné nádobky.

8 Podvarové destilační zařízení, např. BSB-939-IR (Berghof, Germany).

9 ICP-MS spektrometr, např. Agilent 7500ce (Agilent, Japan).

10 Zařízení na přípravu ultračisté vody, např. MilliQ (Milipore, Francie).

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

Při přípravě vzorků pro stanovení jódu v krmivech je nevyhnutelné zabránit případným změnám obsahu jodu ve vzorcích, a proto je nutno vzorek uchovávat ve vzduchotěsném obalu a při manipulaci s ním zabránit nadměrnému kontaktu se vzduchem a světlem. Vzorky podléhající zkáze je nutno uchovávat při teplotě minus 18 ºC. Dále je nutno klást velký důraz na homogenitu vzorku, a to zejména u kompletních krmných dávek. Homogenizace musí probíhat ve vhodném zařízení tak, aby nedocházelo k nadměrnému zahřívání vzorku. Suché vzorky se homogenizují na ultraodstředivém mlýnku (1), vlhké vzorky pomocí laboratorního mlýnku (2).

Vzorky krmiv (0,5 g nebo 1 g) se extrahují v uzavíratelné centrifugační zkumavce 1 ml TMAH (2) a 5 ml vody (3). Extrakce probíhá v sušárně při 90 ºC po dobu 3 h. Po ukončení extrakce se extrakty zchladí na laboratorní teplotu a kvantitativně převedou do 25ml nebo 50ml odměrných baněk. Před měřením se extrakty odstředí 20 min při 2000 ot/min.

Vzorky mléka (5 g) se extrahují v uzavíratelné centrifugační zkumavce 1 ml TMAH (2). Extrakce probíhá v sušárně při 90 ºC po dobu 3 h. Po ukončení extrakce se extrakty zchladí na laboratorní teplotu a kvantitativně převedou do 25ml odměrných baněk. Před měřením se extrakty odstředí 20 min při 2000 ot/min.

U CRM BCR 151 (Skim milk powder) byla navážka snížena na 0,2 g, protože se jednalo o sušené mléko. Extrakce probíhala obdobně jako u vzorků krmiv. Z důvodu rozdílného obsahu tuku ve vzorcích neupraveného mléka a sušeného mléka (CRM) byly také extrahovány vzorky komerčně dostupných mléčných výrobků s rozdílným obsahem tuků, tj. mléka (1,5%) a smetany (33%), ke kterým byl přidán jodid draselný (koncentrace jodu 1 µg/ml) a zjišťovala se výtěžnost extrakčního postupu.

5.2 Měření

Vzorky získané extrakcí se do 24 h po extrakci měří na ICP-MS spektrometru. Jod jako monoizotopický prvek se měří na hmotě 127 v normálním módu bez využití kolizní/reakční cely.

Kalibrační roztoky v rozsahu (0 – 5000) µg/l se připraví postupným ředěním ze zásobního roztoku jodidu draselného 1 g/l. Do kalibračních roztoků se přidává 1 ml TMAH (2) stejně jako ke vzorkům při extrakci. Jako vnitřní porovnávací prvek se použije tellur (500 µg/l), který se připraví postupným ředěním základního certifikovaného roztoku Te (5). Tellur byl vybrán z důvodu podobných měřených hmot vnitřního porovnávacího prvku (125) a analytu (127) a také z důvodu blízkých hodnot ionizačních energií (9,01 eV pro Te a 10,459 eV pro I). Pro vyhodnocení měření se používá externí kalibrace s použitím vnitřního porovnávacího prvku. V tabulce 1 jsou uvedeny pracovní podmínky ICP-MS spektrometru.

Následující podmínky stanovení jsou doporučené, mohou být použity jiné podmínky za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

Tabulka 1. Pracovní podmínky ICP-MS spektrometru.

Parametr	Ladění	Normální mód
RF power	ne	1500 W
Sampl. Depth	ano	6 mm
Torch-H	ano	mm
Torch-V	ano	mm
Carrier Gas	ano	0,8 L/min
Makeup Gas	ano	0,2 L/min
Nebulizer pump	ne	0,1 rps
S/C Temp	ne	11 °C
Extract 1	ano	1 V až 5 V
Extract 2	Ano	– 150 V až – 120 V
Omega Bias-ce	ano	V
Omega Lens-ce	ano	V
Cell Entrance	Ne	– 22 V
QP Focus	ne	3 V
Cell Exit	Ne	– 22 V
OctP RF	ne	V
OctP Bias	Ne	– 6 V
QP Bias	Ne	– 3 V

6 Výsledky a diskuse

6.1 Krmiva

Výsledky získané měřením extraktů vzorků krmiv byly použity pro validaci metody a byly spočítány validační parametry (EffiValidation 3.0), které jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2. Meze detekce, stanovení, vnitrolaboratorní opakovatelnost a nejistota stanovení.

Prvek	MD (mg/kg)	MS (mg/kg)	VO (%)	N (%)
I (ICP-MS)	0,06	0,2	6	12

Pro ověření správnosti metody včetně extrakce bylo potřeba analyzovat vhodný certifikovaný referenční materiál. Vzhledem k tomu, že analyzované vzorky byly přednostně kompletní krmné dávky, byl vybrán rostlinný certifikovaný referenční materiál BCR 129 Hay Powder s certifikovaným obsahem jodu (0,167 ± 0,024) mg/kg. Naměřené hodnoty v laboratoři (0,17 ± 0,02) mg/kg byly shodné s certifikovanou hodnotou.

Monitoring krmiv probíhal v období 2008 až 2009 paralelně s vývojovým úkolem. Hodnoty naměřené ve vzorcích odebraných v roce 2009, které byly v rámci monitoringu odebírány současně se vzorky mléka, jsou uvedeny v tabulkách č. 3, 4 a 5.

Tabulka 3. Obsahy jodu ve vzorcích kompletních krmných dávek.

Vzorek	I (mg/kg)	Vzorek	I (mg/kg)	Vzorek	I (mg/kg)
777	1,040	**877**	0,6696	**1222**	0,8507
781	0,6752	**872**	0,4968	**1555**	0,5790
785	0,9077	**1093**	0,5457	**1559**	1,081
815	0,4284	**1098**	2,166	**1563**	1,272
819	0,4392	**1102**	0,3918	**1684**	0,7360
823	1,940	**1127**	0,5373	**1688**	0,3774
858	1,054	**1134**	1,199	**1648**	0,6737
859	3,501	**1138**	0,5523	**1653**	1,661
860	0,9296	**1142**	< 0,2000	**1692**	0,3037
861	1,788	**1146**	0,5709	**1804**	2,368
866	1,519	**1189**	0,3428	**1805**	0,4039
911	0,8091	**1193**	0,8872	**1854**	2,458
915	1,727	**1197**	0,5524	**1859**	0,4084
916	0,6882	**1212**	0,7977	**1864**	0,4247
1004	1,040	**1216**	0,8654	**1836**	0,3174

Z výsledků vyplývá, že žádný ze vzorků nepřekročil povolený limit 5 mg/kg jodu v kompletní krmné dávce pro dojnice dle směrnice EU (9).

Tabulka 4. Obsahy jodu ve vzorcích minerálních krmiv.

Vzorek	I (mg/kg)
862	115,5
1094	1459
1221	24,45
1855	287,6
1103	1986

Tabulka 5. Obsahy jodu ve vzorcích pícnin.

Vzorek	I (mg/kg)
1220	< 0,2000
1554	< 0,2000
1564	0,8476

6.2 Mléko

Metoda byla validována v software Effivalidation 3.0 a validační parametry jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka 6. Meze detekce, stanovení, vnitrolaboratorní opakovatelnost a nejistota stanovení.

Prvek	MD (mg/kg)	MS (mg/kg)	VO (%)	N (%)
I (ICP-MS)	0,03	0,2	5	10

Správnost metody byla ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu BCR 151 Skim Milk Powder s certifikovaným obsahem (5,35 ± 0,14) mg/kg. Metodou ICP-MS byl stanoven obsah v certifikovaném referenčním materiálu (5,34 ± 0,12) mg/kg, z čehož vyplývá, že výsledky jsou shodné. Pro vyloučení vlivu obsahu tuku ve vzorku byly

analyzoványi také vzorky mléka (1,5 % tuku) a smetany (33 % tuku) s přídavkem jodu. Průměrná návratnost extrakce byla (101 ± 6) %, čímž bylo prokázáno, že rozdílný obsah tuku ve vzorku nemá vliv na množství vyextrahovaného jodu ze vzorku.

Výsledky monitoringu mléka (r. 2009) jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Tabulka 7. Obsahy jodu ve vzorcích mléka.

Vzorek	I (mg/kg)	Vzorek	I (mg/kg)	Vzorek	I (mg/kg)
778	0,5525	**917**	0,3238	**1223**	0,7994
782	0,7255	**918**	0,2521	**1224**	0,7275
786	< 0,2000	**919**	0,2220	**1225**	0,5816
779	0,5163	**1005**	0,4656	**1551**	0,2177
780	0,3779	**1006**	0,7709	**1552**	< 0,2000
783	0,9277	**1007**	0,3944	**1553**	< 0,2000
784	0,6836	**1095**	0,9610	**1556**	0,4138
787	< 0,2000	**1096**	1,625	**1557**	0,3603
788	< 0,2000	**1097**	1,085	**1558**	0,3585
816	0,2578	**1099**	0,2996	**1560**	0,3196
817	0,2557	**1100**	0,4861	**1561**	0,5705
818	0,2464	**1101**	0,4522	**1562**	0,2928
820	< 0,2000	**1104**	0,3938	**1685**	0,2974
821	< 0,2000	**1105**	0,3922	**1686**	0,2546
822	< 0,2000	**1106**	0,3138	**1687**	0,4115
824	< 0,2000	**1128**	0,6464	**1689**	0,6694
825	< 0,2000	**1129**	0,2332	**1690**	0,6601
826	0,2867	**1130**	0,2275	**1691**	0,2965
863	0,2366	**1131**	0,3058	**1693**	0,4574
864	< 0,2000	**1132**	0,2542	**1694**	0,5412
865	0,2061	**1133**	0,3204	**1695**	0,3313
867	0,7357	**1135**	< 0,2000	**1801**	0,6705
868	0,9173	**1136**	< 0,2000	**1802**	0,5606
869	1,046	**1137**	< 0,2000	**1803**	0,9564
895	0,4932	**1143**	< 0,2000	**1806**	0,3496
896	0,3588	**1144**	< 0,2000	**1807**	0,3255
897	0,5121	**1145**	< 0,2000	**1808**	< 0,2000
898	1,950	**1147**	< 0,2000	**1856**	0,2459
899	1,563	**1148**	< 0,2000	**1857**	0,7182
900	1,603	**1149**	< 0,2000	**1858**	0,7326
901	0,5225	**1190**	0,5265	**1861**	0,3313
902	0,5230	**1191**	0,5699	**1862**	0,2919
873	0,3054	**1192**	0,5520	**1863**	0,2503
874	0,2747	**1194**	0,2737	**1866**	< 0,2000
875	0,2452	**1195**	0,2695	**1867**	< 0,2000
878	0,3389	**1196**	0,2568	**1868**	< 0,2000
879	0,3830	**1198**	0,2367	**1837**	0,4315
880	0,3718	**1199**	0,2302	**1838**	< 0,2000
903	0,4202	**1200**	0,2807	**1839**	0,2020
908	0,5520	**1213**	0,3500	**1649**	< 0,2000
909	0,5943	**1214**	0,3431	**1650**	< 0,2000
910	0,5440	**1215**	0,5349	**1651**	0,2324
912	0,9345	**1217**	0,4916	**1654**	0,7232
913	1,465	**1218**	0,6398	**1655**	0,7335
914	0,9635	**1219**	0,3772	**1656**	0,7354

7 Závěr

Vyvinutá metoda stanovení jodu pomocí ICP-MS má dostačující mez stanovení (0,2 mg/kg) pro kontrolu jodu v kompletních krmných dávkách (max. přípustný limit 5 mg/kg). Nejistota stanovení je 12 %. Pro analýzu mléka je nejistota stanovení 10 %. Správnost metody byla ověřena analýzou certifikovaných referenčních materiálů (seno, sušené mléko) se shodnými výsledky. Analýzou mléčných výrobků s odlišným obsahem tuku s přídavkem jodu byla zjištěna návratnost extrakce (101 ± 6) %. Při monitoringu krmiv v roce 2009 nebyly zjištěny žádné vzorky kompletních krmných dávek, které by vykazovaly nadlimitní obsahy jodu.

V roce 2008 byla metoda akreditována ČIA se stupněm flexibility typu 2 a je rutinně používanou metodou v NRL RO Brno.

8 Literatura

1 E. J. Underwood, Trace elements in human and animal nutrition. 1971, Third edition, 281-322.

2 Y. Gélinas, A. Krushevska, R. M. Barnes, Determination of total iodine in nutritional and biological samples by ICP-MS following their combustion within an oxygen stream. Anal. Chem. 70, 1998, 1021-1025.

3 J. Rudolfová, L. Čurda, R. Koplík, Optimalizace fotometrické metody stanovení jodu v potravinách, Chem. Listy 95, 2001, 642-644.

4 E. Niedobová, J. Machát, V. Otruba, V. Kanický, Vapour generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry in determination of total iodine in milk, J. Anal. At. Spectrom. 20, 2005, 945-949.

5 D. Andrey, A routine quality control method for the determination of iodine in human and pet food by ICP-MS. Atomic Spectroscopy 22(3), 2001, 299-305.

6 X. Hou, X. Feng, Q. Qian, Ch. Chai, A study of iodine loss during the preparation and analysis of samples using ^{131}I tracer and neutron activation analysis. Analyst 123, 1998, 2209-2213.

7 ČSN EN 15111 potraviny – Stanovení stopových prvků – Stanovení jodu metodou ICP-MS.

8 Uživatelská příručka EffiValidation verze 3.0.

9 Comission regulation (EC) No 1459/2005.

Stanovení selenu ve vzorcích půd

Eva Urbánková, Eva Niedobová

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

1 Souhrn

Vzorky z bazálního monitoringu půd byly rozloženy v lučavce královské. V mineralizátech byl stanoven obsah selenu metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).

2 Úvod

Na živý organismus má negativní vliv nejen nadbytek selenu, ale i jeho nedostatek. Hranice mezi toxicitou a esencialitou je velmi úzká. Vysoké obsahy selenu v píci vyvolávají chronickou otravu známou jako alkalická nemoc skotu, která se projevuje zánětem nohou, ztrátou kopyt, rohů a srsti. Jiná chronická otrava je závrativost, která má za následek slábnutí zraku zvířat a nakonec smrt vyvolanou snížením dýchacích funkcí.

K pozitivním účinkům selenu v organismu patří jeho interakce s řadou toxických kovů, v jejímž účinku se snižuje jejich nežádoucí působení na živý organismus. Proto je někdy do potravy záměrně přidáván. Deficience selenu v metabolismu zvířat a lidí vyvolává rovněž vznik některých onemocnění. Typickými znaky nedostatku selenu u člověka, ryb, malých živočichů a dobytka jsou omezení růstu, snížení chuti k jídlu, anémie, pokles plodnosti. Specifickou poruchou z nedostatku selenu je např. vysoká úmrtnost embryí u ptáků. Úspěšná léčba podáváním preparátů obsahující sloučeniny selenu nezvratně prokazuje, že selen je ve výživě nezbytný (1). Selen je esenciální součástí antioxidačního enzymu glutathionin peroxidázy (GSH-Px). V součinnosti s vitamínem E a několika dalšími antioxidačními činidly snižuje GSH-Px destrukční účinky peroxidačních reakcí na živé buňky (2). Donedávna byl hlavním zdrojem selenu, kterým byly doplňovány krmné dávky, seleničitan sodný. I když větší část problémů s deficiencí tohoto prvku byla použitím seleničitanu sodného odstraněna,

nebyla vyřešena úplně. Proto se k obohacování krmných dávek začaly používat kvasinky obohacené selenem, které mají vysokou koncentraci organicky vázaného selenu. Porovnání účinku selenových kvasinek s působením anorganického seleničitanu sodného u různých druhů hospodářských zvířat ukázalo, že odezva na podání organické formy tohoto prvku je mnohem výraznější. Před rokem 1960 byla většina diet pro lidi i zvířata dotována pouze organickým selenem, který pocházel ze zdrojů rostlinných a živočišných bílkovin. Vyhodnocení kvasinek obohacených selenem ukázalo, že chemické složení použitých selenových aminokyselin je stejné jako u obilnin, což znamená, že tato forma vykazuje podobné účinky jako vysoký obsah selenu v obilninách (3, 4).

Vzhledem k tomu, že selen není v půdě rovnoměrně rozdělen, je jeho koncentrace v rostlinách odrazem jednak jeho relativního množství a jednak jeho dostupnosti pro rostlinu. Pro rostoucí rostliny je dostupnost půdního selenu ovlivněna pH půdy, typem půdní struktury a rozsahem provzdušnění. Oxidovaná forma tohoto prvku (selenan nebo seleničitan) je pro rostliny dostupnější, zatímco forma redukovaná zůstává v půdě nerozpuštěna. Všeobecně platí, že oblasti s nízkým obsahem selenu (< 0,1 ppm), nepokrývající požadavky na dostatečný obsah selenu v krmivech a potravinách, jsou rozšířenější než oblasti s toxickými obsahy v rostlinách (> 2 ppm).

Protože selen se vyskytuje ve většině materiálů ve velmi malém množství, je nutno pro stanovení selenu použít takovou techniku, která umožňuje tato množství detekovat. V minulosti nejčastěji používanou technikou byla metoda generování hydridu ve spojení s atomovou absorpční spektrometrií (HG-AAS) nebo s optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (HG-ICP-OES). Princip generování hydridu je relativně jednoduchý, založený na redukci selenu kyselinou chlorovodíkovou a následné reakci s tetrahydridoboritanem sodným v aparatuře pro generování hydridů. Vzniklý hydrid selenu se odvádí proudem inertního plynu, a to buď do vyhřívané rozkladné trubice (AAS) nebo přímo do plazmatu (ICP-OES). Nicméně v přítomnosti dalších prvků jako jsou měď, nikl, železo nebo olovo apod. může docházet k významnému rušení (poklesu signálu) v závislosti na koncentraci daného prvku ve vzorku, protože tyto prvky mohou být také redukovány. V těchto případech je nutné maskovat interferenty vhodným činidlem, např. 1,10-fenantrolinem apod.

Z důvodu vysoké citlivosti ICP-MS technika generování hydridů odpadá. Principem metody je vytvoření iontů vhodným ionizačním zdrojem tak, aby docházelo ke vzniku iontů z atomů. Vznik molekulových iontů je nežádoucí. Ionty vzniklé v plazmatu se analyzují

v kvadrupólovém analyzátoru na základě poměru hmotnosti a náboje iontu (M/z) a následně se vyhodnotí detektorem (násobičem iontů). Selen je možno stanovit měřením na hmotách odpovídajících následujícím izotopům: 74 (0,89 %), 76 (9,37 %), 78 (23,77%), 80 (49,61%), 82 (8,73%). Izotopy 78 a 80 jsou nejvíce procentuálně zastoupeny, mají nejvyšší intenzitu signálu během měření, a proto se využívají nejčastěji. V případě stanovení selenu na již zmíněných izotopech je potřeba eliminovat rušení molekulových iontů, které vznikají v plazmatu. Jedná se o molekulové ionty argonu, které odpovídají následujícím hmotám: $ArAr^+$ (78) a $ArAr^+$ (80). Odstraňování takovýchto molekulových iontů je nejvhodnější s použitím tzv. kolizní/reakční cely s použitím vodíku nebo helia. Vhodným nastavením potenciálové bariery pro molekulové ionty a srážkami s vodíkem nebo s heliem jsou molekulové ionty odstraněny. Další možnosti jsou pak matematické korekční rovnice, které ovšem zavádějí do měření další chyby a zvyšují tak výslednou nejistotu stanovení (5).

Hlavním cílem práce je zjištění hladiny obsahu selenu v zemědělských půdách a ověření analytické metody vhodné k jeho stanovení. Získané výsledky povedou k rozdělení oblastí do kategorií podle obsahu selenu v půdách a k vytipování oblastí vhodných k dalšímu šetření.

3 Experimentální část

Pro stanovení selenu byly použity vzorky z bazálního monitoringu půd. Vzorky byly rozloženy v lučavce královské (JPP AP II) (6) a obsah selenu byl následně stanoven na ICP-MS spektrometru.

3.1 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Kyselina dusičná, HNO_3, koncentrovaná.

2 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná.

3 Kyselina dusičná HNO_3, zředěná, $c(HNO_3) = 1$ mol/l.

Příprava: 70 ml koncentrované kyseliny dusičné (1) se zředí vodou na výsledný objem 1000 ml

4 Kyselina dusičná, HNO_3, podvarově destilovaná.

5 Voda, ultračistá.

6 Certifikovaný standardní roztok selenu, c(Se) = 1 g/l.

7 Certifikovaný standardní roztok telluru, c(Te) = 1 g/l.

3.2 Zařízení

1 ICP-MS spektrometr 7500ce (Agilent, Japonsko).

2 Podvarové destilační zařízení BSB-939-IR (Berghof, Germany).

3 Zařízení na přípravu ultračisté vody MilliQ (Milipore, Francie).

4 Mineralizační blok 16-místný (Mezos, Hradec Králové).

3.3 Mineralizace

5 g upraveného vzorku se umístí do zábrusových trubic, zalije se 7 ml kyseliny dusičné (1) a nechá se stát přes noc. Druhý den se přidá 21 ml kyseliny chlorovodíkové (2), nasadí se chladiče a směs se zahřívá pozvolna k varu. Mírný var se udržuje 2 h. Po ochlazení se obsah trubic filtruje do 100ml odměrných baněk. Trubice i filtrát se promyjí asi 10 ml kyseliny dusičné (3) a baňky se po vytemperování doplní po značku kyselinou dusičnou (3).

3.4 Měření

Před měřením byly extrakty v lučavce královské z důvodu vysokých koncentrací rozpuštěných solí a vysokých obsahů kyselin ředěny 25 × vodou (5) do plastových zkumavek.

Obsah selenu (9,75 eV) v extraktech byl měřen na hmotě 78. Z důvodu korekce „matrix“ efektů byl jako vnitřní porovnávací prvek vybrán tellur (ionizační potenciál 9,01 eV). Tellur jako monoizotopický prvek byl měřen na hmotě 125. Pro odstranění rušící molekuly $ArAr^+$ na hmotě 78 se měřilo ve vodíkovém módu s využitím kolizní/reakční cely.

Kalibrační roztoky byly připraveny v rozsahu (0 – 100) µg/l. V tabulce č. 1 jsou uvedeny pracovní podmínky ICP-MS spektrometru.

Tabulka 1: Pracovní podmínky ICP-MS spektrometru.

Parametr	Ladění	Vodíkový mód
RF power	ne	1500 W
Sampl. Depth	ano	6 mm
Carrier Gas	ano	0,8 l/min
Makeup Gas	ano	0,2 l/min
Nebulizer pump	ne	0,1 rps
S/C Temp	ne	2 °C
Extract 1	ano	1 V až 5 V
Extract 2	Ano	– 150 V až – 120 V
Omega Bias-ce	Ano	– 18 V
Omega Lens-ce	ano	2 V
Cell Entrance	Ne	– 22 V
Plyn (H_2)	ano	3 ml/min
QP Focus	Ne	– 8 V
Cell Exit	Ne	– 46 V
OctP RF	ne	160 V
OctP Bias	Ne	– 19 V
QP Bias	Ne	– 15 V

4 Výsledky a diskuse

Pro validaci metody a ověření správnosti metody byl použit soubor paralelních vzorků, slepých pokusů, interních referenčních materiálů a certifikovaného referenčního materiálu. V tabulce č. 2 jsou uvedeny výsledky získané analýzou certifikovaného referenčního

materiálu WT-M (kal z čistírny městských odpadních vod), kde obsah selenu je uveden jako informativní hodnota s rozšířenou nejistotou.

Tabulka 2. Výluh v lučavce královské WT-M (mg/kg).

Prvek	Certifikováno	Nejistota	Naměřeno	Nejistota
Se	2,70	0,95	3,22	0,44

Z analýz slepých pokusů byly vypočítány meze detekce (MD) a meze stanovení (MS) pro selen a dále z paralelních stanovení byly vypočítány hodnoty vnitrolaboratorní opakovatelnosti (VO) a rozšířené kombinované nejistoty (N), vše v programu EffiValidation 3.0 (viz. Tabulka 3).

Tabulka 3. Meze detekce, stanovení, vnitrolaboratorní opakovatelnost a nejistoty stanovení.

Prvek	MD (mg/kg)	MS (mg/kg)	VO (%)	N (%)
Se	0,03	0,09	5	10

Zvalidovaná metoda pak byla použita pro stanovení selenu v půdách. Jednalo se o vzorky odebrané v rámci šestiletého cyklu bazálního monitoringu půd, který provádí ÚKZÚZ. Pro Odbor bezpečnosti krmiv a půdy bylo celkem analyzováno 469 vzorků půd. Výsledky analýz jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka 4. Obsahy selenu ve vzorcích půd (mg/kg).

Vzorek	Se	Vzorek	Se	Vzorek	Se	Vzorek	Se	Vzorek	Se
1989	0,37	**2083**	0,48	**2219**	0,24	**2607**	0,32	**3068**	0,46
1990	0,29	**2084**	0,48	**2220**	0,24	**2608**	0,30	**3069**	0,42
1991	0,32	**2085**	0,20	**2221**	0,46	**2609**	0,29	**3070**	0,22
1992	0,29	**2086**	0,15	**2222**	0,44	**2610**	0,36	**3071**	0,19
1993	0,34	**2087**	0,38	**2223**	0,89	**2611**	0,38	**3072**	0,28
1994	0,36	**2088**	0,32	**2224**	0,77	**2975**	0,36	**3073**	0,23
1995	0,36	**2089**	0,56	**2225**	0,31	**2976**	0,37	**3074**	0,28
1996	0,25	**2090**	0,52	**2226**	0,27	**2977**	0,44	**3075**	0,25

1997	0,38	**2091**	0,40	**2227**	0,96	**2978**	0,41	**3076**	0,28
1998	0,34	**2092**	0,37	**2228**	1,00	**2979**	0,35	**3077**	0,26
1999	0,31	**2093**	0,44	**2229**	0,99	**2980**	0,34	**3078**	0,58
2000	0,33	**2094**	0,40	**2230**	0,32	**2981**	0,42	**3079**	0,50
2001	0,34	**2095**	0,28	**2231**	0,32	**2982**	0,38	**3080**	0,43
2002	0,39	**2096**	0,29	**2232**	0,42	**2983**	0,50	**3081**	0,35
2003	0,28	**2097**	0,29	**2233**	0,72	**2984**	0,45	**3082**	0,33
2004	0,48	**2098**	0,22	**2234**	0,42	**2985**	0,38	**3083**	0,29
2005	0,49	**2099**	0,38	**2235**	0,36	**2986**	0,34	**3084**	0,64
2006	0,35	**2100**	0,38	**2236**	0,38	**2987**	0,28	**3085**	0,51
2007	0,29	**2101**	0,38	**2237**	0,38	**2988**	0,28	**3086**	0,35
2008	0,70	**2102**	0,34	**2238**	0,49	**2989**	0,43	**3087**	0,29
2009	0,65	**2103**	0,31	**2239**	0,45	**2990**	0,44	**3088**	0,37
2010	0,68	**2104**	0,32	**2240**	0,26	**2991**	0,25	**3089**	0,32
2011	0,37	**2105**	0,54	**2241**	0,23	**2992**	0,24	**3090**	0,25
2012	0,34	**2106**	0,49	**2242**	0,20	**2993**	0,66	**3091**	0,47
2013	0,35	**2107**	0,52	**2243**	0,21	**2994**	0,38	**3092**	0,44
2014	0,32	**2108**	0,47	**2244**	0,22	**2995**	0,38	**3093**	0,40
2015	0,33	**2109**	0,31	**2245**	0,18	**2996**	0,37	**3094**	0,29
2016	0,31	**2110**	0,32	**2246**	0,29	**2997**	0,36	**3095**	0,22
2017	0,31	**2111**	0,46	**2247**	0,29	**2998**	0,33	**3096**	0,56
2018	0,31	**2112**	0,48	**2248**	0,27	**2999**	0,33	**3097**	0,53
2019	0,77	**2113**	0,40	**2249**	0,24	**3000**	0,39	**3098**	0,43
2020	0,86	**2114**	0,39	**2250**	0,52	**3001**	0,43	**3099**	0,52
2021	0,36	**2115**	0,45	**2251**	0,45	**3002**	0,32	**3100**	0,46
2022	0,33	**2116**	0,42	**2252**	0,49	**3003**	0,29	**3101**	0,66
2023	0,27	**2117**	0,31	**2253**	0,45	**3004**	0,39	**3102**	0,56
2024	0,25	**2118**	0,37	**2254**	0,43	**3005**	0,34	**3103**	0,27
2025	0,21	**2119**	0,44	**2255**	0,34	**3006**	0,33	**3104**	0,28
2026	0,20	**2120**	0,47	**2256**	0,35	**3007**	0,34	**3105**	0,28
2027	0,34	**2121**	0,48	**2257**	0,39	**3008**	0,35	**3116**	0,23
2028	0,30	**2122**	0,32	**2258**	0,36	**3009**	0,38	**3117**	0,25
2029	0,32	**2123**	0,33	**2259**	0,41	**3010**	0,24	**3118**	0,33
2030	0,37	**2124**	0,30	**2260**	0,49	**3011**	0,24	**3119**	0,28
2031	0,28	**2125**	0,26	**2555**	0,33	**3012**	0,23	**3120**	0,25

2032	0,32	**2126**	0,25	**2556**	0,35	**3013**	1,65	**3121**	0,26
2033	0,29	**2127**	0,54	**2557**	0,46	**3014**	1,61	**3122**	0,25
2034	0,26	**2128**	0,48	**2558**	0,46	**3015**	0,17	**3123**	0,31
2035	0,35	**2129**	0,43	**2559**	0,38	**3016**	0,45	**3124**	0,32
2036	0,32	**2130**	0,43	**2560**	0,38	**3017**	0,41	**3125**	0,33
2037	0,34	**2131**	0,81	**2561**	0,39	**3018**	0,20	**3126**	0,30
2038	0,87	**2132**	0,74	**2562**	0,34	**3019**	0,19	**3127**	0,30
2039	0,89	**2133**	0,39	**2563**	0,32	**3020**	0,31	**3128**	0,31
2040	0,85	**2134**	0,30	**2564**	0,81	**3021**	0,31	**3129**	0,16
2041	0,47	**2135**	0,30	**2565**	0,83	**3022**	0,33	**3130**	0,16
2042	0,33	**2136**	0,28	**2566**	0,84	**3023**	0,34	**3131**	0,17
2043	0,36	**2137**	0,23	**2567**	0,20	**3024**	0,39	**3132**	1,13
2044	0,30	**2138**	0,20	**2568**	0,40	**3025**	0,39	**3133**	1,21
2045	0,24	**2139**	0,34	**2569**	0,23	**3026**	0,41	**3134**	0,44
2046	0,23	**2140**	0,32	**2570**	0,24	**3027**	0,21	**3135**	0,43
2047	0,36	**2141**	0,31	**2571**	0,17	**3028**	0,21	**3136**	0,46
2048	0,34	**2142**	0,28	**2572**	0,15	**3029**	0,46	**3137**	0,36
2049	0,43	**2143**	0,28	**2573**	0,69	**3030**	0,52	**3138**	0,51
2050	0,41	**2144**	0,32	**2574**	0,65	**3031**	0,51	**3139**	0,30
2051	0,40	**2145**	0,34	**2575**	0,47	**3032**	0,48	**3140**	0,27
2052	0,48	**2146**	0,46	**2576**	0,14	**3033**	0,44	**3141**	0,24
2053	0,47	**2147**	0,41	**2577**	0,24	**3034**	0,19	**3142**	0,28
2054	0,46	**2148**	0,35	**2578**	0,30	**3035**	0,19	**3143**	0,33
2055	0,51	**2149**	0,37	**2579**	0,33	**3036**	0,31	**3144**	0,28
2056	0,37	**2150**	0,33	**2580**	0,38	**3037**	0,29	**3145**	0,38
2057	0,39	**2151**	0,32	**2581**	0,37	**3038**	0,32	**3146**	0,25
2058	0,40	**2152**	0,29	**2582**	0,41	**3039**	0,38	**3147**	0,36
2059	0,35	**2153**	0,30	**2583**	0,23	**3040**	0,47	**3148**	0,34
2060	0,36	**2196**	0,36	**2584**	0,25	**3041**	0,44	**3149**	0,30
2061	0,28	**2197**	0,39	**2585**	0,27	**3042**	0,52	**3150**	0,31
2062	0,28	**2198**	0,23	**2586**	0,25	**3043**	0,54	**3151**	0,22
2063	0,27	**2199**	0,19	**2587**	0,19	**3044**	0,22	**3152**	0,30
2064	0,49	**2200**	0,19	**2588**	0,20	**3045**	0,22	**3153**	0,30
2065	0,49	**2201**	0,22	**2589**	0,20	**3050**	0,47	**3154**	0,35
2066	0,34	**2202**	0,28	**2590**	0,16	**3051**	0,16	**3155**	0,27

2067	0,35	**2203**	0,26	**2591**	0,22	**3052**	0,38	**3156**	0,29
2068	0,32	**2204**	0,32	**2592**	0,24	**3053**	0,28	**3157**	1,12
2069	0,29	**2205**	0,31	**2593**	0,31	**3054**	0,51	**3158**	1,21
2070	0,35	**2206**	0,32	**2594**	0,27	**3055**	0,40	**3159**	0,45
2071	0,31	**2207**	0,32	**2595**	0,44	**3056**	0,39	**3160**	0,43
2072	0,38	**2208**	0,26	**2596**	0,40	**3057**	0,36	**3161**	0,30
2073	0,37	**2209**	0,28	**2597**	0,35	**3058**	0,59	**3162**	0,29
2074	0,25	**2210**	0,24	**2598**	0,51	**3059**	0,52	**3163**	0,28
2075	0,23	**2211**	0,47	**2599**	0,45	**3060**	0,43	**3164**	0,70
2076	0,23	**2212**	0,48	**2600**	0,51	**3061**	0,42	**3165**	0,69
2077	0,24	**2213**	0,19	**2601**	0,40	**3062**	0,40	**3166**	0,68
2078	0,20	**2214**	0,21	**2602**	0,48	**3063**	0,36	**3167**	0,52
2079	0,45	**2215**	0,37	**2603**	0,33	**3064**	0,33	**3168**	0,45
2080	0,50	**2216**	0,39	**2604**	0,34	**3065**	0,25	**3169**	0,34
2081	0,16	**2217**	0,29	**2605**	0,32	**3066**	0,25	**3170**	0,30
2082	0,17	**2218**	0,30	**2606**	0,33	**3067**	0,22		

5 Závěr

Prokázalo se, že metoda ICP-MS v kombinaci s extrakcí v lučavce královské je vhodná pro stanovení „celkového“ (kyselinami extrahovatelného) selenu v půdách. Je velmi rychlá a citlivá, s velmi dobrými parametry stanovení jako jsou meze detekce (0,03 mg/kg) a nejistota stanovení (10 %). Obsahy selenu se ve vzorcích půd pohybovaly v rozmezí (0,14 – 1,65) mg/kg. Naměřené obsahy korespondují s uváděnými průměrnými přirozenými hodnotami obsahů selenu v půdách (0,01 – 2) mg/kg, přičemž průměrný obsah v hnojených zemědělských půdách se uvádí kolem 0,4 mg/kg. Výsledky analýz byly předány Odboru bezpečnosti krmiv a půdy k dalšímu hodnocení.

Pro hodnocení dostupnosti selenu z půd rostlinám by bylo zřejmě vhodné doplnit stanovení o méně razantní metody extrakce, jako jsou např. vodné výluhy, výluhy v 1M dusičnanu amonném apod.

6 Literatura

1 Dočekalová H., Modifikátory pro přímé stanovení selenu v tělních tekutinách AAS s elektrotermickou atomizací, Kandidátská disertační práce, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 1990.

2 Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G., Hoekstra W.G., Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase, Science, 1973, 179, 588.

3 Keskinen R., Ekholm P., Yli-Halla M., Hartikainen H., Efficiency of different methods in extracting selenium from agricultural soils of Finland. Geoderma, 2009, 153, 87-93.

4 Navarro-Alarcon M., Cabrera-Vique C., Selenium in food and the human body: A review, Sci. Total Environ., 2008, 400 (1-3), 115-141.

5 Aplikační literatura Agilent.

6 Zbíral J. a kol.: JPP Analýza půd II, 3.2.1. (2003) 81-83.

7 Uživatelská příručka EffiValidation verze 3.0.

Zavedení metody stanovení β-karotenu ve vybraných odrůdách pšenice

Radvana Šulová

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

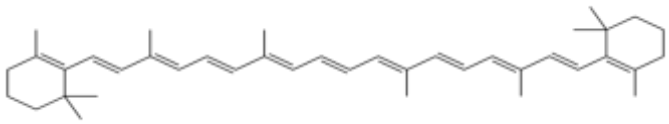
1 Cíl práce

Tato práce navazuje na předchozí úkol, který se zabýval stanovením ß-karotenu, ale i dalších vybraných karotenoidů v ovoci, zelenině a krmivech. Cílem práce je ověření metody na stanovení obsahu ß-karotenu a dalších karotenoidů metodou HPLC (ČSN EN 12 823-2) ve vybraných vzorcích pšenice. Tato stanovení byla provedena na žádost firmy Hanácká osiva a slouží jako podklad k registračnímu řízení dvou žlutomoučných odrůd pšenice ozimé a jarní pro Národní odrůdový úřad.

2 Úvod

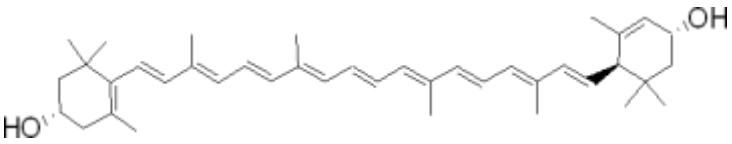
Karotenoidy jsou značně rozšířené žluté, oranžové, žluto-zelené a červené, převážně lipofilní pigmenty rostlin, hub, řas, mikroorganismů a také živočichů a jako zásobní látky se ukládají v tukových tkáních. Je známo téměř 700 přirozeně se vyskytujících karotenoidních pigmentů. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb, který se vyskytuje v několika základních strukturách a jejich kombinacích.

Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny: karoteny a xantofyly (kyslíkaté sloučeniny karotenů). Nejjednodušším zástupcem karotenů je acyklický polynenasycený uhlovodík lykopen. Nejznámější a nejrozšířenější je ß-karoten.



Obrázek č. 1. Strukturní vzorec ß-karotenu.

Společně s lykopenem a se zástupcem xantofylů luteinem (obrázek č. 2) mají významné antioxidační účinky, tzn. že zamezují v organismu řetězovým oxidačním pochodům, které vedou ke vzniku různých chorob, stárnutí, atd.



Obrázek č. 2. Strukturní vzorec luteinu.

Kvalitativní a kvantitativní složení karotenoidů v analyzované zemědělské plodině závisí na mnoha faktorech, jako je druh a odrůda rostliny, sezóna, stupeň zralosti, způsob zpracování apod. Vzhledem k tomu, že roste zájem o žlutou pšeničnou mouku nejen pro výrobu těstovin, ale i pečiva a daří se vyšlechtit žluté odrůdy s dobrými technologickými vlastnostmi a dobrými výnosy, práce byla zaměřena na zjištění, které karotenoidy toto zbarvení způsobují. K analýzám byly vybrány nově vyšlechtěné odrůdy Citrus (pšenice ozimá) a Luteus (pšenice jarní). Spotřebitelé často požadují nažloutlou barvu výrobků z mouky, čehož lze dosáhnout použitím mouky s výrazněji žlutou barvou. Vysoký obsah žlutých pigmentů (karotenoidů) byl obsažen v původních odrůdách obilovin (kolem 1000 µg karotenoidů/100 g), z nichž byly vyšlechtěny ty současné. Pšenice Triticum aestivum obvykle obsahuje jen asi 200 µg karotenoidů/100 g, což znamená snížení obsahu pigmentů proti původním odrůdám na pětinu. Genotypy s vyšším podílem žlutých pigmentů už téměř vymizely, protože typy bez pigmentů mají podstatně vyšší výnosy. Výrazně žlutá je dodnes používaná diploidní „jednozrnka“ – Triticum monococcum, která má však nízké výnosy a v dnešní době už nevyhovující pekařské vlastnosti. Její pěstování se vyplatí jen v místech, v nichž jsou tak jako tak výnosy nízké anebo v případě, že je zákazník ochoten zaplatit vyšší cenu.

Výrazně žluté varianty se vyskytují u tetraploidní pšenice durum – Triticum turgidum durum, u níž v poslední době šlechtitelé z hlediska výnosů dosáhli značných pokroků. Pšenice durum

je základní součástí těstovin italského typu, avšak vzhledem k ceně bývá často i v těstovinách nahrazována nebo míchána s měkkou pšenicí. Na druhé straně se rozšiřuje využívání pšenice durum i pro výrobu pečiva, a to především kvůli žluté barvě, ale i dalším senzorickým, výživovým a technologickým vlastnostem.

V současnosti je však pšenice používaná k výrobě potravin tvořena z 90 % hexaploidní Triticum aestivum, přičemž původní druh pšenice špalda Triticum spelta L. tvoří jen nepatrný podíl. Nyní je špalda považována za zdravější alternativu šlechtěné pšenice, proto je často využívanou plodinou v ekologickém zemědělství. I v případě Triticum aestivum se v poslední době podařilo vyšlechtit odrůdy s vysokým obsahem žlutých pigmentů a zároveň dobrými technologickými vlastnostmi pro výrobu pečiva i těstovin a dobrými výnosy i v místech, kde není pěstování pšenice durum možné. V současnosti jsou k dispozici následující žlutomoučné odrůdy pšenice ozimé - Caroti, Citrus, Yellow; a jarní - Luteus, Safrania. Odrůda Luteus se dobře osvědčila i při pozdnějším podzimním výsevu, odrůda Safrania je velmi vhodná i pro použití do sušenek a oplatek.

Hlavní podíl karotenoidů tvoří lutein, který je významným antioxidantem a slouží jako doplňkový pigment při přenosu světelné energie na chlorofyl. Ačkoli je obsah pigmentů v zrnu, krupici i mouce z určité odrůdy pšenice stejný, vizuálně/optickým měřením se mouka jeví jako nejméně žlutá vlivem rozdílné reflexe světla. Na barvě těstovin se však rozdíl mezi pozorovanou barvou krupice a mouky neprojeví. Při použití do pečiva způsobí přirozené pigmenty mouky mnohonásobně výraznější žlutou barvu, než jakou lze dosáhnout přídavkem 10 % vaječných žloutků. Dalším prostředkem používaným k dosažení žluté barvy pečiva je kurkuma (9).

3 Materiál a metody

Pro ověření a optimalizaci postupu byly použity vzorky dvou žlutomoučných odrůd pšenice Citrus (pšenice ozimá) a Luteus (pšenice jarní). Pro srovnání byla vybrána pozdní odrůda elitní – Akteur. Tyto vzorky byly vypěstovány ve třech různých zemědělských výrobních oblastech ČR.

Všechny vzorky byly před analýzou upraveny mletím. Jako metoda stanovení byl zvolen postup, který doporučuje norma ČSN EN 12823-2. Metoda byla částečně validována. Pro potvrzení správnosti byl analyzován certifikovaný referenční materiál BCR 485.

3.1 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Acetonitril, pro HPLC.

2 Metanol, pro HPLC.

3 Dichlormetan.

4 Butylhydroxytoluene (BHT).

5 Triethylamin.

6 Octan amonný, CH_3COONH_4.

7 Octan amonný, metanolický roztok: $c(CH_3COONH_4) = 0{,}05$ mol/l.

Příprava: Do 500ml baňky se naváží 1,972g octanu amonného (6), rozpustí se v metanolu (2) a doplní metanolem po značku.

8 Mobilní fáze.

Příprava: Smíchá se 750 ml acetonitrilu (1), 200 ml metanolického roztoku octanu amonného (7), 50 ml dichlormetanu (3) a přidá se 1g butylhydroxytoluenu (4) a 0,5 ml trietylaminu (5). Roztok se promíchá a odplyní v ultrazvukové lázni a nechá se stát v uzavřené nádobě do druhého dne.

9 Hexan pro HPLC.

10 Hexan.

11 Etanol, $c(C_2H_5OH) \approx 96$ %, denaturovaný benzínem.

12 Etanol, roztok, $c(C_2H_5OH) \approx 35$ %.

Příprava: Smíchá se 365 ml etanolu (11) a 635 ml vody (26).

13 Hydroxid draselný, KOH, etanolický roztok, c(KOH) = 200 g/l.

Příprava: 200 g hydroxidu draselného se rozpustí v etanolu (12), převede se do 1000ml odměrné baňky a doplní po značku.

14 Kyselina askorbová.

15 Křemelina.

16 Hydrochinon.

17 Chelaton III.

18 Chlorid sodný, NaCl, nasycený roztok v etanolu.

Příprava: K 50 g chloridu sodného se přidá 100 ml etanolu (12).

19 Fenolftalein (indikátor), etanolický roztok.

Příprava: Naváží se 1 g fenolftaleinu, rozpustí se v 80 ml etanolu (11). Roztok se převede do 100ml odměrné baňky a doplní vodou (26) po značku. Připravený roztok se 10 × zředí vodou (26).

20 Síran sodný bezvodý, Na_2SO_4.

21 Standardy s čistotou nad 97,0 %: β-karoten, lutein, α-karoten, lykopen, zeaxantin.

22 β-karoten, zásobní roztok**.**

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se naváží (3 ± 0,1) mg β-karotenu (21) a rozpustí se ve 20 ml dichlormetanu (3). Odměrná baňka se umístí do ultrazvukové lázně přibližně na 30 s a poté se doplní hexanem (9) po značku. Do 100ml odměrné baňky se napipetuje 10 ml tohoto roztoku a doplní se po značku hexanem (9). 1 ml tohoto roztoku obsahuje 3 μg β-karotenu v hexanu/dichlormetanu (98 : 2) = (V: V). Zásobní roztok se skladuje chráněn před světlem při teplotě pod 4 °C.

Poznámka

1 *Test pro určení koncentrace a čistoty standardu: Na spektrofotometru se změří absorbance zásobního roztoku β-karotenu při vlnové délce λ = 453 nm a zároveň absorbance při vlnové délce 340 nm, 483 nm. Poté se vypočítá hmotnostní koncentrace ρ v μg/ml pomocí vztahu*

$$\rho = \frac{A_{453} \times 10^4}{2592}$$

kde

A_{453} *je absorbance zásobního roztoku při λ = 453 nm,*

2592 je hodnota $E_{1cm}^{1\%}$ *pro β-karoten v hexanu,*

Poměr A_{453}/A_{340} *musí být vyšší než 15, poměr* A_{453}/A_{483} *se musí pro čistý β-karoten pohybovat v rozmezí (1,14 - 1,18).*

23 β-karoten, standardní roztok.

Příprava: 25 ml zásobního roztoku β-karotenu (22) se odpaří do sucha na vakuové rotační odparce při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 25 ml metanolu (2). Skladuje se v chladničce při teplotě pod 4 °C, chráněn před světlem nejdéle po dobu 1 týdne. Kalibrační standardní roztoky se připraví tak,

že do sady 10ml baněk se pipetuje (1; 2; 3; 4; 6; 8) ml standardního roztoku β-karotenu a doplní se metanolem (2) po značku.

24 Lutein, zásobní roztok**.**

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se naváží (1 ± 0,1) mg luteinu (21) a rozpustí se ve 20 ml dichlormetanu (3). Odměrná baňka se umístí do ultrazvukové lázně přibližně na 30 s a poté se doplní hexanem (9) po značku. Do 100ml odměrné baňky se napipetuje 10 ml tohoto roztoku a doplní se po značku hexanem (9). 1 ml tohoto roztoku obsahuje 2 μg luteinu v hexanu/dichlormetanu (98 : 2) = (V : V). Zásobní roztok se skladuje chráněn před světlem při teplotě pod 4 °C.

25 Lutein, standardní roztok.

Příprava: 50 ml zásobního roztoku luteinu se odpaří do sucha na vakuové rotační odparce při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí ve 25 ml methanolu (2). Skladuje se v chladničce při teplotě pod 4 °C, chráněn před světlem nejdéle po dobu 1 týdne.

Kalibrační standardní roztoky se připraví tak, že do sady 10ml baněk se pipetuje (0,5; 1; 2; 3; 4; 8) ml standardního roztoku luteinu a doplní se metanolem (2) po značku.

26 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

27 Referenční materiál BCR 485 - lyofilizovaná zeleninová směs.

3.2 Přístroje a pomůcky

1 Kapalinový chromatograf Agilent 1100 s DAD.

2 Chromatografická kolona Spherisorb ODS-2 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) nebo obdobná ve spojení s chromatografickou kolonou Grace Vydac 201 TP 54 (250 mm × 4,6 mm, 10 μm) nebo obdobnou.

3 Rotační vakuová odparka.

4 Termovap.

5 Spektorofotometr (UV-VIS).

6 Kladivový šrotovník.

7 Analytické váhys přesností 0,01 mg.

8 Ultrazvuková lázeň.

9 Vodní lázeň s možností regulace teploty.

10 Papírové filtry střední hustoty.

3.3 Pracovní postup

Obsah vybraných karotenoidů se stanoví po alkalické hydrolýze vzorků hydroxidem draselným a následné extrakci hexanem metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se spektrofotometrickou detekcí ve viditelné oblasti při 450 nm.

3.3.1 Úprava vzorku

Vzorek pšenice se mele na kladivovém šrotovníku např. MILL 3100 s velikostí ok síta 0,8 mm. Při mletí nesmí docházet k jeho zahřátí. Poté se vzorek řádně promíchá.

Vzorek se upravuje těsně před zmýdelněním. Vzorky se chrání před světlem a UV zářením.

3.3.2 Zmýdelnění

Do 250ml kulaté baňky se zábrusem se naváží 15 g vzorku s přesností na 1 mg a zalije se 30 ml etanolu (11). Postupně se přidá 1 g kyseliny askorbové (14), 1 g hydrochinonu (16), 1 g chelatonu 3 (17) a 70 ml etanolického roztoku hydroxidu draselného (13). Na baňku se nasadí zpětný chladič a umístí se do vodní lázně. Zmýdelnění probíhá 45 min při 80 °C pod proudem dusíku. Po ukončení zmýdelnění se chladič opláchne 30 ml etanolu (12) a 30 ml vody (26) a obsah baňky se ochladí na laboratorní teplotu.

Poznámky

2 Antioxidanty (kyselina askorbová a hydrochinon) je nutné přidat do vzorku před přídavkem roztoku hydroxidu draselného. Aby se zabránilo nebezpečí oxidativního katalytického působení stopových množství kovů, je možné přidat chelaton III nebo sulfid sodný.

3 Příklady dalších vhodných způsobů zmýdelnění vzorku uvádí ČSN EN 12823-2.

3.3.3 Extrakce

Do dělicí nálevky na 500 ml se v uvedeném pořadí přidá 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (18), zmýdelněný roztok (3.3.2), který se převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl zůstal v baňce a přidá se ještě 60 ml hexanu (10). Dělicí nálevka se uzavře a třepe se manuálně 3 min. Poté se obsah nálevky nechá rozdělit. Pevný podíl v baňce po zmýdelnění (3.3.2) se mezitím kvantitativně převede do plastové kyvety a odstřeďuje se při 2500 ot/min po dobu 10 min. Po rozdělení fází v první dělicí nálevce se spodní vodno-etanolická fáze

převede do druhé dělicí nálevky a horní organická fáze se převede do sběrné dělicí nálevky na 500 ml. K vodno-etanolické fázi se přidá 15 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (18), supernatant po odstředění pevného zbytku a 50 ml hexanu (10). Druhá dělicí nálevka se třepe po dobu 3 min. Po rozdělení fází se převede organická fáze do sběrné dělicí nálevky a vodno-etanolická fáze se třepe opět s 50 ml hexanu po dobu 5 min. Po rozdělení fází se spodní vodno-etanolická fáze odstraní a organická fáze se přidá do sběrné dělicí nálevky. K oplachování zátky dělicí nálevky se používá roztok ethanolu (12). Spojené extrakty se propláchnou nejméně 2 × až 3 × 200 ml vody (26), přičemž dělicí nálevkou se otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Promývá se tak dlouho, až promývací voda vykazuje neutrální reakci na fenolftalein (19). Organická fáze se převede do Erlenmeyerovy baňky s křemelinou (15) a síranem sodným (20), zamíchá se a nechá stát do vyčeření. Poté se filtruje do 200ml odměrné baňky a doplní hexanem (10) po značku.

3.3.4 Odpaření

Alikvotní část extraktu se odpaří na vakuové rotační odparce za sníženého tlaku a při teplotě nepřevyšující 40 °C. Zbytek po odpaření se rozpustí v metanolu (2) tak, aby bylo dosaženo koncentrace do 3 μg β-karotenu a 4 μg luteinu v 1 ml roztoku.

3.3.5 Chromatografické stanovení

Příklad vhodných chromatografických podmínek pro stanovení karotenoidů metodou HPLC uvádí tabulka 1.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky pro stanovení karotenoidů.

Chromatografická kolona	Spojení kolony Spherisorb ODS 2 (150 mm × 4,6 mm, 5μm) a kolony Vydac 201 TP 54 (250 mm × 4,6 mm, 5μm)
Mobilní fáze	(8)
Teplota kolony	30 °C
Průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
Injektovaný objem	50 μl
Detekce	450 nm

β-karoten, lutein, případně další karotenoidy (α-karotenu, lykopenu, zeaxantinu) se identifikují porovnáním retenčních časů píků roztoku vzorku s retenčními časy píků roztoků standardů (21).

Píky mohou být identifikovány přídavkem malého množství roztoku jednotlivých standardů (21) k roztoku vzorku.

Pro kvantitativní stanovení se použije metoda vnějšího standardu. Připraví se šestibodová kalibrační přímka v rozsahu 0,2 μg/ml až 3,2 μg/ml pro lutein a 0,3 μg/ml až 2,4 μg/ml pro β-karoten v extrakčním roztoku. Kontrolují se linearity kalibračních přímek.

3.3.5 Výpočet

Obsah vybraného karotenoidu (mg/100 g vzorku) se vypočítá z kalibrační závislosti. Sestrojí se graf závislosti plochy píku vybraného karotenoidu na koncentraci v požadovaném rozsahu. Obsah vybraného karotenoidu ve vzorku se vypočte ze směrnice kalibrační přímky.
Obsah jednotlivých karotenoidů lze zjednodušeně vypočítat i podle vztahu

$$\rho = \frac{A_S \times c \times V_S \times V_{St}}{A_{St} \times m \times V_{iS} \times 1000} \times 100$$

ρ	obsah vybraného karotenoidu (mg/100 g),
A_S	plocha píku vybraného karotenoidu získané z roztoku vzorku,
A_{St}	plocha píku vybraného karotenoidu získané ze standardního roztoku,
c	koncentrace vybraného karotenoidu ve standardním roztoku po korekci na čistotu (μg/100 g),
m	navážka vzorku (g),
V_S	celkový objem pracovního roztoku vzorku (ml),
V_{St}	nastřikovaný objem pracovního roztoku standardu (μl),
V_{iS}	nastřikovaný objem pracovního roztoku vzorku (μl),
1000	konverzní faktor z μg na mg,
100	faktor pro výpočet hmotnostní koncentrace na 100 g.

3.4 Výsledky a diskuse

Pro ověření a částečnou validaci metody byly použity vzorky, které dodal Národní odrůdový úřad (NOÚ). Vzorky pšenice byly upraveny výše popsaným způsobem (kap. 3.3.1). Jako optimální se potvrdil postup stanovení, který doporučuje norma ČSN EN 12823-2.

Byla použita metoda zmýdelnění. Měření bylo provedeno na HPLC s DAD detektorem. Vzorky pšenice, které vybral NOÚ pro stanovení karotenoidů, obsahovaly pouze lutein a stopy β-karotenu.

Obsah luteinu byl stanoven u certifikovaného referenčního materiálu (27) a u dalších vybraných vzorků. Velmi dobře stanovitelný je obsah luteinu mimo vzorků pšenice např. v ovsu pluchatém i nahém, tritikale jarním i ozimém a kukuřici (viz chromatogramy v příloze 1).

Správnost výsledků byla potvrzena analýzou certifikovaného referenčního materiálu BCR 485. U uvedeného certifikovaného referenčního materiálu byla provedena jak přímá extrakce, která byla doporučená v dodaném materiálu, tak extrakce se saponifikačním krokem. Stanovený obsah luteinu vyhovoval deklarované hodnotě certifikovaného referenčního materiálu.

3.4.1 Stanovení validačních parametrů

Pomocí programu EffiValidation 3.0 byly stanoveny vybrané validační parametry.

Opakovatelnost

Ke stanovení hodnot opakovatelnosti byly použity výsledky paralelních měření 9 reálných vzorků pšenice. Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3. Opakovatelnost stanovení sumy izomerů luteinu.

Analyt	Opakovatelnost (s)	Rel. opakovatelnost (s_R) %	Diference R (s × 2,77)
Suma izomerů luteinu	0,018	6,35	0,05

Opakovatelnost je ČSN EN 12 823-2 určená normou pouze pro sumu β-karotenů, ale je srovnatelná i pro námi vypočtenou hodnotu opakovatelnosti pro sumu izomerů luteinu

Správnost

Pro ověření správnosti metody byl použit certifikovaný referenční materiál BCR 485. Jedná se o lyofilizovanou zeleninovou směs s deklarovanými hodnotami pro jednotlivé karotenoidy.

Tabulka č. 4. Správnost metody stanovení sumy izomerů luteinu.

Analyt	Ref. hodnota (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Hypotéza
Lutein + zeaxantin	22,3 ± 1,3	22.5 ± 0,2	100,8	Přijata

Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Ze směrnice kalibrační přímky a hodnot kolísání základní linie byly vypočítány meze detekce a stanovitelnosti.

Tabulka č. 5. Mez detekce a mez stanovitelnosti pro sumu izomerů luteinu.

Analyt	Korelační koeficient	Mez detekce (μg/ml)	Mez stanovitelnosti (μg/ml)
Suma izomerů luteinu	0,999	0,006	0,02

Nejistota stanovení

Relativní standardní nejistota a relativní rozšířená nejistota byly stanoveny z hodnot paralelních měření jednotlivých vzorků. Hodnoty nejistoty stanovení obsahu sumy izomerů luteinu jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6. Nejistota stanovení pro sumu izomerů luteinu.

Analyt	Rozšířená standardní nejistota	Rel. rozšířená nejistota (%)
Suma izomerů luteinu	0,03	11,41

3.4.2 Stanovení obsahu karotenoidů ve vybraných vzorcích pšenice

U vybraných vzorků pšenice ozimé Akteur - pozdní odrůda elitní a dvou žlutomoučných odrůd pšenice ozimé Citrus a jarní Luteus byl stanoven obsah karotenoidů podle postupu normy ČSN EN 12823-2. Vzorky obsahovaly lutein a stopy β-karotenu. Tabulka č. 7 názorně ukazuje srovnání obsahu sumy izomerů luteinu klasické odrůdy Akteur a dvou žlutomoučných odrůd ve třech vybraných zemědělských výrobních oblastech určených pro polní odrůdové zkoušky ÚKZÚZ.

Tabulka č. 7. Obsah sumy izomerů luteinu ve vybraných vzorcích pšenice.

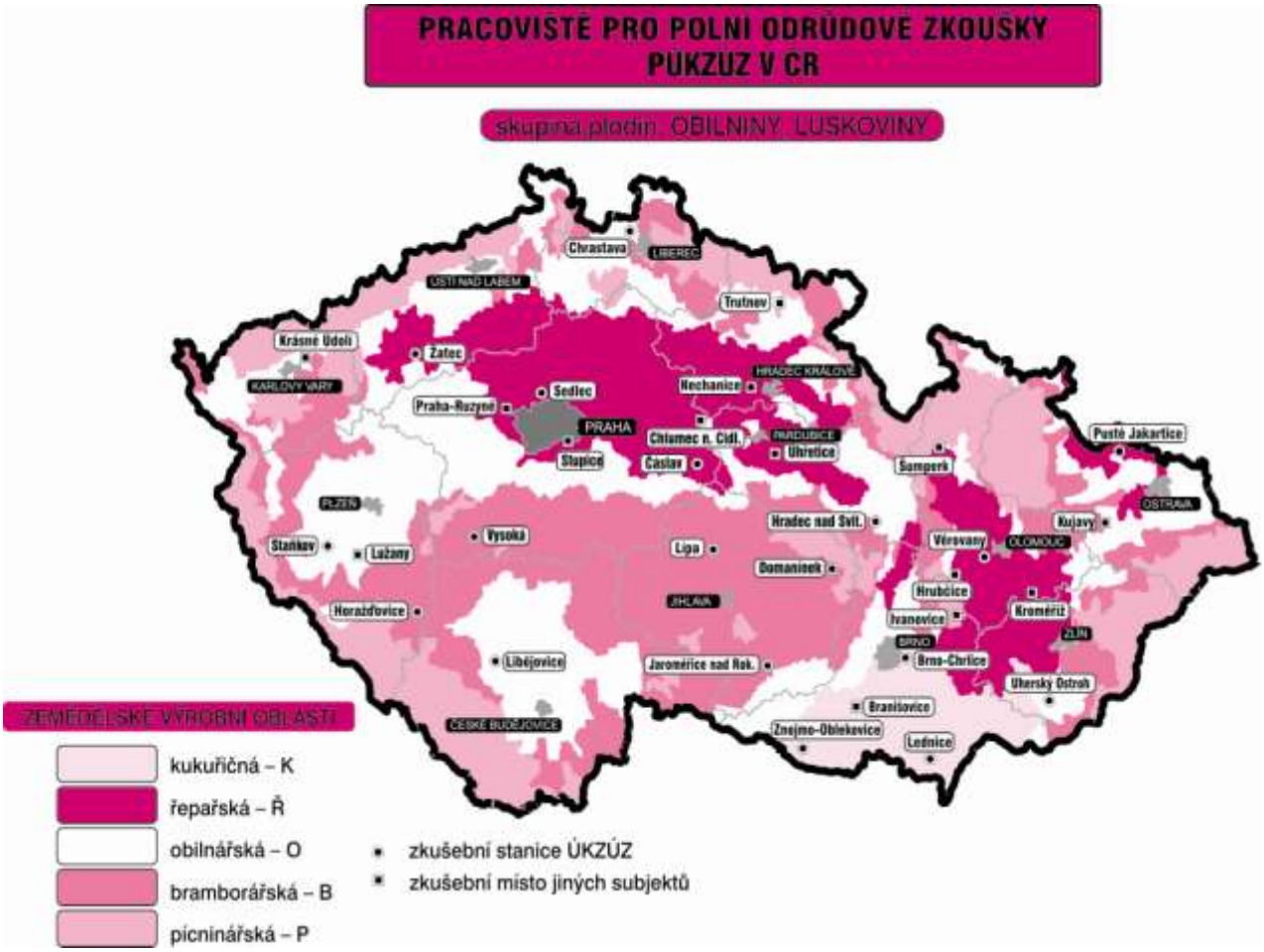
Odrůda	Obsah luteinu (mg/100g)			Průměrný obsah
	Čáslav	Staňkov	Jaroměřice	
Akteur	0,15	0,14	0,18	**0,16**
Citrus	0,28	0,36	0,37	**0,34**
Luteus	0,37	0,33	0,23	**0,31**

Čáslav zkušební stanice v řepařské zemědělské výrobní oblasti,

Staňkov zkušební stanice v obilnářské zemědělské výrobní oblasti,

Jaroměřice nad Rokytnou zkušební stanice v bramborářské zemědělské výrobní oblasti.

Dále byly analyzovány i vzorky ovsa pluchatého, nahého, tritikale jarního, ozimého a kukuřice zrnové. (viz příloha 1)



4 Závěr

Byla ověřena metoda stanovení karotenoidů v různých druzích obilovin podle ČSN EN 12823-2 a provedena její částečná validace. Správnost metody stanovení byla potvrzena analýzou certifikovaného referenčního materiálu BCR 485.

Na základě podrobného proměření vzorků obilovin bylo zjištěno, že hlavní podíl karotenoidů tvoří suma izomerů luteinu a dále se zde nachází i stopy β-karotenu.

Z tabulky č. 7 je zřejmé, že vzorky žlutomoučných odrůd pšenice ozimé Citrus a jarní Luteus obsahují 2 × více luteinu než pozdní odrůda elitní Akteur.

Literatura

1 ČSN EN 12823-2: Potraviny - Stanovení vitamínu A metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – Část 2: Stanovení β-karotenu, ČNI, říjen 2002.

2 Velíšek, J.: Karotenoidy, Chemie potravin 3, 1. vydání, OSSIS, 1999.

3 Muhle + Mischfutter, 146, 2009, č. 3, s. 82-84.

4 Příloha č.10 vyhlášky č. 124/2001 Sb: Stanovení vitamínu A a vitamínu E, Postupy laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů, JPP Brno 2001.

5 Europan Commission BCR information reference materials: BCR 485, Common extraction protokol, Report EUR 18320 EN, 1998.

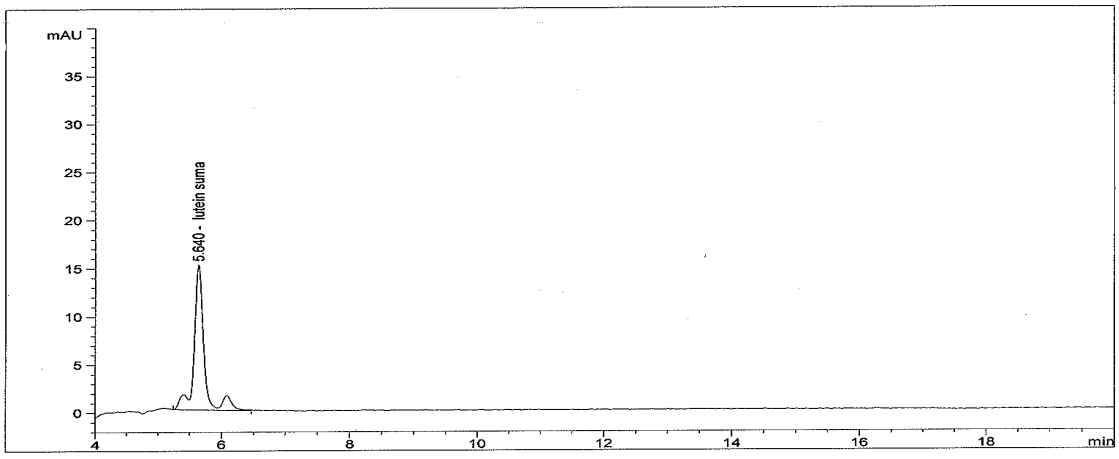
6 Eckschlager, K., Horsák, I.: Dovolená diference výsledků paralelních stanovení. Vyhodnocování analytických výsledků a metod, 1. vydání, SNTL Praha, 1980.

7 Vilamová, V,: zabezpečení jakosti výsledků zkoušek, Bulletin LO 2004/2, ÚKZÚZ Brno,2004, str. 1-19.

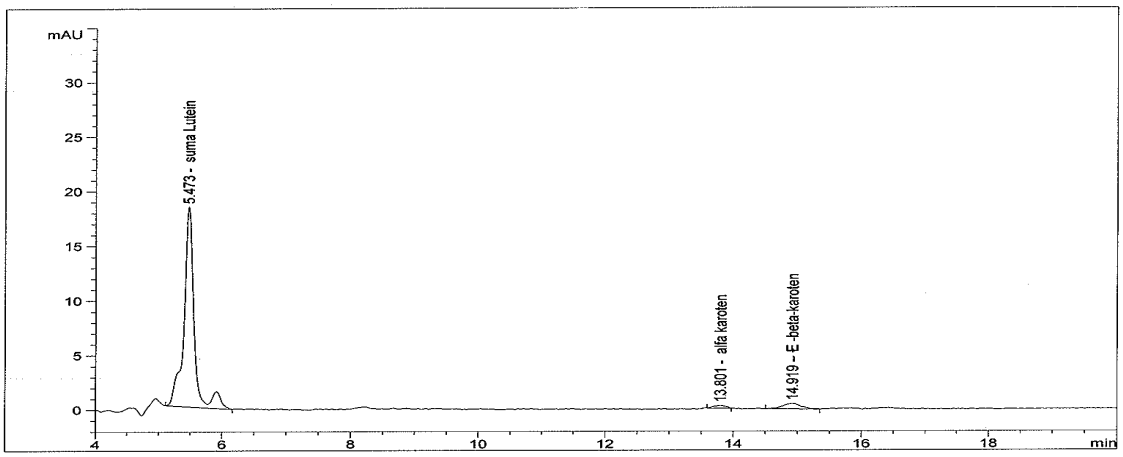
8 Centner, V.: Uživatelská příručka Effi Validation 3.0.

Příloha 1

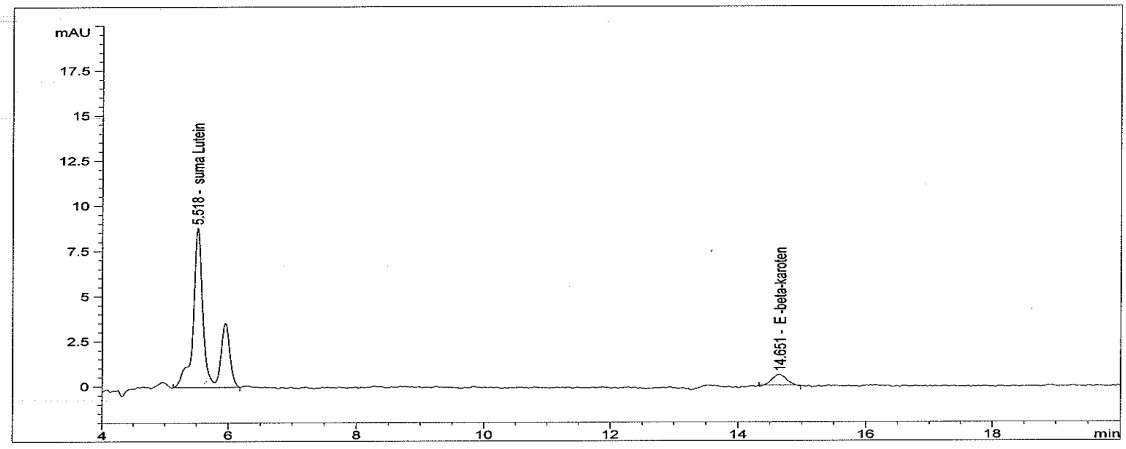
Chromatogram č. 1. Stanovení vybraných karotenoidů v pšenici.



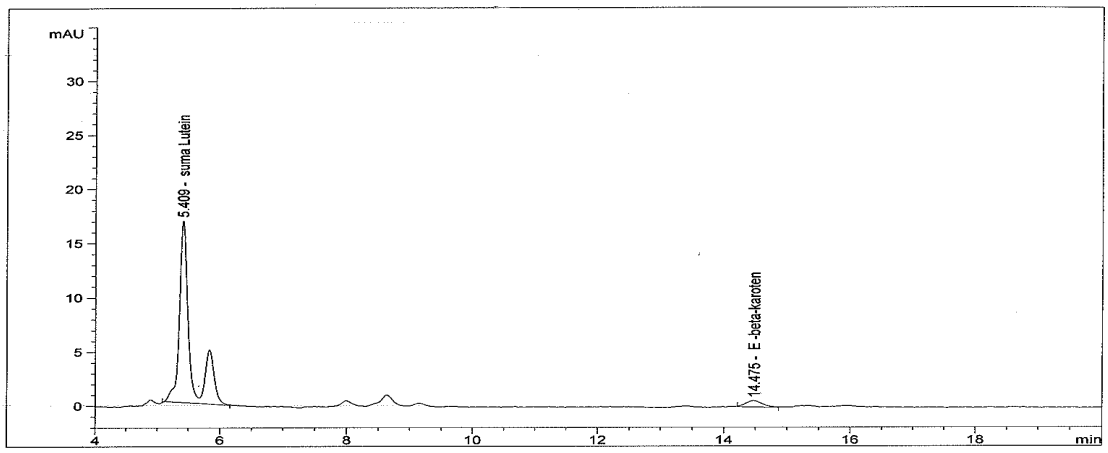
Chromatogram č. 2. Stanovení vybraných karotenoidů ve vzorku tritikale jarního.



Chromatogram č. 3. Stanovení vybraných karotenoidů ve vzorku ovsa pluchatého.



Chromatogram č. 4. Stanovení vybraných karotenoidů v kukuřice zrnové.



Plán obecného validačního postupu pro analytické metody používané v laboratořích ÚKZÚZ

Karel Fritsch

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

Autor touto cestou děkuje Ing. Vítězslavu Centnerovi, Ph.D. za poskytnutí podkladů a za další cenné náměty v oblasti validace metod.

1 Úvod

Validace je potvrzení získané prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci byly splněny. Validace potvrzuje, že analytický postup je schopen plnit požadavky na něj kladené. Jinak řečeno, že metoda poskytuje dostatečně přesné a správné výsledky.

Verifikaci lze chápat jako potvrzení získané prostřednictvím objektivních důkazů, že údaje o analytických znacích poskytnutá výrobcem, jinou laboratoří, nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři s použitím konkrétního měřicího systému dosažena. Nebo srozumitelněji – Verifikace je ověření toho, že již validovaná metoda (převzatá např. z normy) poskytuje výsledky s požadovanou přesností a správností v podmínkách vaší laboratoře.

Kdy je potřeba validovat – když je nutné zjistit, zda jsou výkonnostní parametry metody dostačující k řešení daného analytického problému. Například při

- zavedení normované metody (metoda se pouze verifikuje),
- zavedení metody nově vyvinuté laboratoří,
- porovnání dvou metod (nahrazení stávající metody novou metodou),
- převzetí metody z jiné laboratoře nebo aplikačního listu dodavatele zařízení,
- zásadní revizi stávající metody,

- kontrole způsobilosti metody v případě, že systém jakosti indikuje nestabilitu metody v čase.

Proč validovat – pokud má být analytický výsledek považován za tak spolehlivý, aby na jeho základě bylo možné přijímat následná rozhodnutí a opatření včetně finančního nebo trestního postihu, je třeba validovat (ověřit) výkonnost analytické metody a odhadnout na dané hladině spolehlivosti nejistotu výsledku. Akreditace, neboli úřední potvrzení kompetence laboratoře, vyžaduje používání řádně validovaných metod včetně odhadu nejistoty.

Měřit s dostatečnou kvalitou je profesionální povinností analytika.

2 Druhy validací

2.1 Interní (vnitřní) validace

Validace metody v rámci jedné laboratoře. Podle účelu validace – verifikace (validace při převodu validované metody do jiné laboratoře), validace průzkumová, validace plná, kontrola způsobilosti metody nebo retrospektivní validace.

2.2 Externí (vnější) validace

Validace metody srovnáním výsledků z více laboratoří (kruhové testy). Vyhodnocení reprodukovatelnosti metody.

2.3 Verifikace (validace při převodu metody)

Interní validace používaná při zavedení metody vycházející z národní (mezinárodní) normy nebo byla validována v laboratoři, která ji vyvinula. Metoda prošla validací při schvalování normy nebo ve vývojové laboratoři, a proto stačí ověřit pouze základní validační parametry (přesnost, správnost, nejistotu a meze detekce a stanovitelnosti).

2.4 Průzkumová validace

Interní validace, jejímž cílem je na omezeném počtu vzorků stanovit, zda zvolená analytická metoda je vhodným kandidátem pro plnou validaci.

2.5 Plná validace

Interní validace, jejímž cílem je demonstrovat vhodnost metody k zamýšlenému použití vyhodnocením všech požadovaných validačních parametrů.

2.6 Kontrola způsobilosti metody

Interní validace, která má potvrdit, že dříve plně zvalidovaná metoda nadále věrohodně funguje. Obvykle zahrnuje kontrolu kalibrační přímky, tj. linearity a citlivosti, kontrolu slepého pokusu a kontrolu rozlišení (u separačních metod).

2.7 Retrospektivní validace

Interní validace, jež je založena na vyhodnocení dříve naměřených dat. Ta obvykle umožňují pouze vyhodnocení přesnosti, tj. opakovatelnosti, střední přesnosti a reprodukovatelnosti.

3 Definice použitých pojmů

Analytický postup

Dokument, popisující schválený postup pro aplikaci analytické metody.

Validace analytické metody

Procedura, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kriterií jako je přesnost, správnost, mez detekce apod., a měřením hodnot těchto kriterií. Validace metody má potvrdit způsobilost metody k zamýšlenému použití.

Validovaná vlastnost

Vlastnost, která je předmětem validace: koncentrace hlavní látky, koncentrace nečistoty, fyzikálně chemický parametr.

Validační plánování

Plánování validace s ohledem na požadovaný typ validace, dobu předpokládaného použití metody, rozsah validované vlastnosti, dostupnost referenčních materiálů, možnost měření odezvy slepého pokusu, složení matrice, počet potenciálních interferentů, počet potenciálně vlivných faktorů pro vyhodnocení robustnosti metody apod.

Validační plán

Dokument shrnující plán validace.

Validační protokol

Souhrn primárních dat získaných při validaci metody.

Validační zpráva

Dokument shrnující validaci jedné analytické metody.

4 Validační parametry

Přesnost

Charakterizuje rozptýlení výsledků kolem průměru vzniklé v důsledku působení náhodných chyb, a to bez ohledu na to, zda průměr je správným odhadem skutečné hodnoty měřené veličiny. V závislosti na experimentálních podmínkách při měření existují tři typy přesnosti: opakovatelnost, střední přesnost a reprodukovatelnost.

Opakovatelnost

Druh přesnosti stanovený za podmínek měření opakovatelnosti, tj. při opakování měření stejným analytikem na stejném přístroji v co nejkratším čase.

Reprodukovatelnost

Druh přesnosti stanovený za podmínek měření reprodukovatelnosti, tj. při měření různými analytiky, na různých přístrojích, v různých laboratořích a v dlouhém časovém intervalu.

Střední přesnost

Druh přesnosti popisující výsledky měření dosažené za podmínek mezi podmínkami pro měření opakovatelnosti a reprodukovatelnosti.

Správnost

Správnost metody charakterizuje shodnost naměřených výsledků s akceptovanou nebo deklarovanou referenční hodnotou. Pokud je rozdíl mezi výsledky měření a referenční hodnotou statisticky významný, pak má validovaná metoda sklon a není správná.

Selektivita a interferenty

Selektivita je schopnost metody selektivně měřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. Pokud je vliv interferentů významný, metoda není selektivní.

Citlivost

Změna signálu vyvolaná jednotkovou změnou validované vlastnosti (definice IUPAC), resp. minimální rozdíl ve validované vlastnosti, který lze s analytickým stanovením věrohodně odlišit.

Linearita

Popisuje míru lineární závislosti mezi validovanou vlastností a měřením (např. absorbancí).

Robustnost

Charakterizuje odolnost metody vůči malým změnám v nastavení experimentálních podmínek.

Mez detekce

Minimální hodnota, nad kterou lze odezvu vzorku věrohodně odlišit od odezvy slepého pokusu, tzn., že nad ní lze provést kvalitativní stanovení.

Mez stanovitelnosti

Minimální hodnota, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení.

Rozsah

Rozmezí hodnot validované vlastnosti, v němž platí vyhodnocené validační charakteristiky.

Rozlišení

Charakteristika stupně rozlišení píků u separačních metod.

Slepý pokus

Materiál (vzorek), jehož koncentrace analytu je pod mezí detekce použité analytické metody. Používá se jako analytický vzorek s jmenovitě nulovým obsahem (množství, koncentraci) měřeného analytu či složky. Slouží ke kompenzaci vlivu reagencií na výsledek měření a též ke kompenzaci vlivu matrice analytického vzorku.

RM

Referenční materiál - Materiál nebo látka, jejíž jedna nebo více hodnot vlastností je dostatečně homogenní a dobře stanovená, aby mohla být použita pro kalibraci systému či přístroje, posouzení metody nebo k přiřazení hodnot materiálům. Primární funkcí referenčního materiálu je "být nositelem hodnoty".

CRM

Certifikovaný referenční materiál - Referenční materiál doprovázený certifikátem, jehož jedna nebo více hodnot vlastností jsou certifikovány postupem, který vytváří návaznost na správnou realizaci jednotky, v níž jsou hodnoty vlastností vyjádřeny a pro kterou je každá certifikovaná hodnota doprovázena nejistotou při uvedené hladině spolehlivosti. Certifikované referenční materiály jsou nejdůležitějšími nástroji realizace návaznosti a zajištění pravdivosti měření ve zkušební laboratoři.

IRM

Interní referenční materiál - dostatečně homogenní materiál připravený v laboratoři pro interní řízení jakosti. Od ostatních RM se liší tím, že se u něj vyžaduje jen homogenita a stabilita.

MPZ

Mezilaboratorní porovnávání zkoušek - organizace, provedení a vyhodnocení zkoušek týchž nebo podobných předmětů nebo materiálů dvěma nebo více laboratořemi podle předem stanovených podmínek.

5 Nejistota měření

Je k výsledku měření přidružený parametr charakterizující rozptýlení hodnot, které lze odůvodněně pokládat za hodnotu veličiny, která je objektem měření. Tímto parametrem může být směrodatná (standardní) odchylka nebo její daný násobek. Nejistota měření obecně obsahuje řadu složek. Některé z těchto složek mohou být vyhodnoceny ze statistického rozložení výsledků měření a mohou být charakterizovány experimentální standardní odchylkou (čili experimentálně určeným odhadem této standardní odchylky). Základní kvantitativní charakteristikou nejistoty měření je **standardní nejistota.** Je to standardní (směrodatná) odchylka veličiny, pro niž je nejistota udávána. Označuje se symbolem **u** (z anglického výrazu *uncertainity*). Standardní nejistoty se podle způsobu svého vyhodnocení dělí na:

- **standardní nejistoty typu A** (označení $\mathbf{u}_A$), které jsou stanoveny z výsledků opakovaných měření statistickou analýzou série naměřených hodnot. Jejich příčiny se považují za neznámé a jejich hodnota klesá s počtem měření;
- **standardní nejistoty typu B** (označení $\mathbf{u}_B$), které jsou získané jinak než statistickým zpracováním výsledků opakovaných měření. Jsou vyhodnoceny pro jednotlivé zdroje nejistoty identifikované pro konkrétní měření a jejich hodnoty nezávisí na počtu

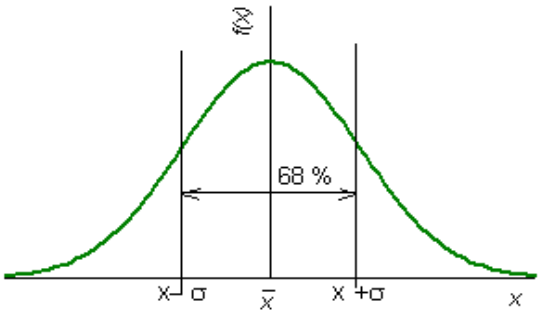
opakování měření. Pocházejí od různých zdrojů a jejich společné působení vyjadřuje výsledná standardní nejistota typu B.

V praxi se většinou nevystačí s jedním nebo druhým typem nejistoty samostatně. Pak je zapotřebí stanovit výsledný efekt kombinace nejistot měření obou typů, A i B, vyjádřený kombinovanou standardní nejistotou.

- **kombinovaná standardní nejistota $\mathbf{u}_C$** se získá sloučením standardní nejistoty typu A s výslednou standardní nejistotou typu B.

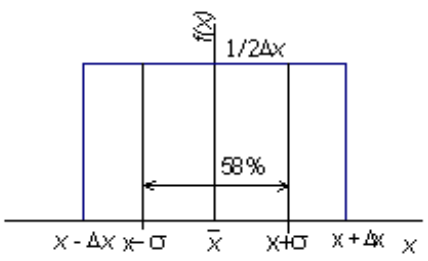
Pro standardní nejistotu typu A rovnou $\mathbf{u}_A$ a výslednou standardní nejistotu typu B rovnou u_B je pak **kombinovaná standardní nejistota $\mathbf{u}_c$** rovna:

$$u_C(x) = \sqrt{u_A^2(x) + u_B^2(x)} \quad (1)$$



Obr. 1. Hustota pravděpodobnosti normálního (Gaussova) rozložení pravděpodobnosti.

Směrodatná odchylka (a tedy i standardní nejistota) veličiny x představuje u veličiny rozdělené podle normálního rozdělení pravděpodobností polovinu šířky intervalu, v jehož středu leží střední hodnota veličiny x a ve kterém s pravděpodobností přibližně 68 % leží každá hodnota veličiny x. Tuto situaci znázorňuje obr. 1.



Obr. 2. Hustota pravděpodobnosti rovnoměrného rozložení pravděpodobnosti.

Pokud je veličina x rozložena podle rovnoměrného rozdělení pravděpodobností a víme, že tato veličina nepřekročí interval o šířce $2\Delta_X$, budou všechny hodnoty této veličiny ležet v intervalu $\pm\Delta_X$ okolo střední hodnoty.

V takovém případě je standardní odchylka této veličiny (čili příslušná složka standardní nejistoty typu B) rovna $\Delta_X/\sqrt{3}$, jak plyne z vlastností rovnoměrného rozdělení pravděpodobností. Graf rovnoměrného rozdělení pravděpodobností uvádí obr. 2.

Abychom zajistili, že v pásmu, jehož šířka je určená nejistotou, leží větší procento hodnot než např. 68 %, použije se interval o šířce větší než 2u, jehož středem je naměřená hodnota měřené veličiny. Standardní nejistota se v takovém případě vynásobí číslem, které se nazývá koeficient rozšíření k. Pro normální rozdělení k = 2 odpovídá situaci, že v pásmu 2 k u leží 95 % měřených hodnot, k = 3 odpovídá situaci, že v pásmu 3 k u leží 99,7 % měřených hodnot. **Rozšířená nejistota** (označená U) je definována jako součin kombinované standardní nejistoty (1) u_C a koeficientu rozšíření k, tedy vztahem

$$U = k \times u_C(y) \quad (2)$$

kde U je rozšířená nejistota, k je koeficient rozšíření, u_c je kombinovaná standardní nejistota a y je měřená veličina. S rozšířenou nejistotou je nutno vždy uvést číselnou hodnotu použitého činitele rozšíření k. Hodnota koeficientu rozšíření bývá nejčastěji 2, v praxi leží v intervalu < 2, 3 >.

V laboratořích je často užívána relativní rozšířená nejistota udávaná v %.

Nejistotu měření laboratoře lze jednoduše vypočítat z rozdílu výsledků paralelních stanovení.

Standardní nejistota je

$$u = \sqrt{\frac{\sum (x_{i1} - x_{i2})^2}{2k}}$$

kde

x_{i1} je výsledek prvního paralelního stanovení vzorku *i*,

x_{i2} výsledek druhého paralelního stanovení vzorku *i*,

k celkový počet vzorků.

Relativní nejistota je

$$ur = 100 \times u/\bar{x} \qquad (\%)$$

kde

$\bar{x}$ je průměr všech stanovení.

Relativní rozšířená nejistota je

$U_r = k \times u_r$

Pokud je k dispozici dostatečný počet paralelních stanovení shromážděný za dostatečně dlouhý časový úsek, je tato metoda výpočtu nejpřesnější, protože jejím výsledkem je skutečně dosažená reálná nejistota zahrnující i složky, které nelze matematicky vyjádřit (lidský faktor). V případě, že není k dispozici dostatečný počet paralelních stanovení, je možné nejistotu vypočítat z opakovaného měření vzorků na několika koncentračních hladinách. Obvykle se používá 6 opakování vzorku na 3 koncentračních hladinách pokrývajících rovnoměrně celý rozsah stanovovaného parametru.

Protože je velikost nejistoty závislá na koncentraci analytu, je nutné ji vy počítat minimálně pro 2 koncentrační hladiny. První hladina je od meze stanovitelnosti metody do jejího trojnásobku. Druhá hladina je pro koncentrace vyšší než trojnásobek meze stanovitelnosti. Pokud se vypočtené nejistoty v obou hladinách neliší o více než 5 %, je možné použít větší z nich pro vyjádření nejistoty pro celý koncentrační rozsah metody. V některých případech je nutné rozdělit koncentrační rozsah metody na více intervalů. Toto závisí na úvaze a zkušenostech analytika, který metodu validuje. Z důvodu přehlednosti by počet intervalů neměl být větší než 5.

6 Obecný validační plán

Postup při validaci analytické metody závisí na řadě faktorů, jako jsou

- existence mezinárodní (národní) normy. Pokud existuje platná norma, metoda se pouze verifikuje,
- existence specifických legislativních nebo jiných požadavků na metodu,
- typ a cíle validace (vnitřní – vnější validace, stanovení všech validačních kritérií, minimální validace,

- oblast použití metody (kvalitativní /kvantitativní analýza)

- zamýšlená doba použitelnosti (rutinní/jednorázová metoda).

Dále je třeba zohlednit

- jaké validované vlastnosti se sledují (koncentrace hlavní látky, koncentrace nečistot, fyzikálně chemické parametry),
- dostupnost referenčních materiálů a kruhových testů,
- složení matrice, počet a druh potenciálních interferentů (mají se detekovat – kvantifikovat ?),
- možnost měření odezvy slepého pokusu,
- jaké zařízení se má použít (validace na jeden nebo více přístrojů),
- zda se jedná o validaci v jedné nebo ve více laboratořích,
- požadovaný rozsah validované vlastnosti,
- počet potenciálně vlivných faktorů pro vyhodnocení robustnosti metody.

Obecný postup

Postup při validaci metody lze shrnout takto

- definice cílů a rozsahu validace (verifikace) konkrétní metody, určení doby použitelnosti metody,
- definice validačních parametrů a kriterií – určení rozsahu (typu) validace,
- plánování validačního experimentu: počet koncentračních úrovní a počet opakování – je zabudováno v software Effivalidation,
- ověření správné funkce přístroje,
- kvalifikace materiálu: činidel, rozpouštědel, skla, návaznost na standardy,
- průzkumová validace (v případě neúspěchu návrat do vývoje metody nebo zmírnění požadavků),
- plná validace (v případě neúspěchu návrat do vývoje metody nebo zmírnění požadavků),
- kontrola způsobilosti systému pro ověření správného funkce metody před rutinním použitím (regulační diagramy),

- definice kriterií pro revalidaci metody,
- vypracování validační zprávy,
- sepsání/revize Standardního operačního postupu (nebo jiné řízené dokumentace) popisující rutinní použití zvalidované metody.

7 Dokumentace

7.1 Validační plán

Validační plán má obsahovat tyto údaje

- identifikace normy nebo jiného dokumentu, ze kterého validovaná metoda vychází,
- legislativní požadavky na metodu nebo její výkonnost, pokud existují,
- typ a rozsah validace,
- typ a složení matrice, pokud je složení matrice známo,
- validované parametry,
- použité CRM, IRM a účast v kruhových testech,
- odhad minimální akceptovatelné výkonnosti metody (opakovatelnost, mez stanovitelnosti, nejistota) vycházející z požadavků normy, legislativy, zákazníka,
- jméno pracovníka zodpovědného za provedení,
- termín dokončení validace.

7.2 Validační zpráva

Validační zpráva má obsahovat tyto údaje

- cíl a určení metody,
- seznam analytů,
- typ látek a matric, pro které je metoda určena,
- seznam všech chemikálii, činidel, referenčních materiálů a standardů s údajem o čistotě, dodavateli nebo s detailním popisem přípravy,
- postup na kontrolu kvality standardů a použitých chemikálií,
- seznam zařízení a požadavky na jeho funkčnost/výkon,
- detailní popis provedení experimentu, včetně přípravy vzorků. Popis musí být natolik detailní, aby ho mohla zreprodukovat kompetentní osoba na obdobném přístroji.

- parametry metody s důrazem na kritické parametry zjištěné při vyhodnocení robustnosti,
- statistické vyhodnocení metody,
- postup pro kontrolu kvality metody při rutinním použití (kontrola způsobilosti systému),
- reprezentativní obrázky, např. chromatogramy, spektra a kalibrační křivky,
- limity pro přijetí metody,
- očekávanou nejistotu výsledků,
- kritické body metody, pokud se vyskytují,
- jméno osoby, která metodu vyvinula a zvalidovala,
- odkazy na literaturu, pokud jsou,
- shrnutí a závěry,
- schvalovací seznam se jmény, funkcemi, daty a podpisy osob, zodpovědných za kontrolu a schválení analytické metody,
- další komentáře, pokud jsou potřebné.

Bulletin Národní referenční laboratoře XV 2011/1

Ročník:	XV, č. 1
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2011
Odpovědný redaktor:	Ing. Iva Strížová
Náklad:	130 výtisků
Počet stran:	48
Tisk:	ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
	e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196