

Česká

Chromatografická

škola



## SPECIFIKA PŘÍPRAVY VZORKU V ANALÝZE POTRAVIN A KRMIV

Michal Douša, PhD.

ZENTIVA

## Obsah

- Základní pojmy
  - Odběr vzorku
  - Příprava (úprava) vzorku
- Zkoušení reprezentativnosti odběru vzorku a homogenity partie
  - Praktické zkušenosti přípravy vzorku
    - Závěr

## Základní pojmy

- **Partií** (šarží) se rozumí množství krmiva nebo potraviny, které vykazují jednotnost svým vnějším uspořádáním, označením a místním uložením.
- **Vzorek** je definován jako část vzorkované partie (šarže).
- Za **dílčí vzorek** se považuje hmotnostní část jedné partie získaná jedním náběrem při vzorkování. Smícháním dílčích vzorků odebraných ze vzorkovaného celku vzniká **souhrnný vzorek**, jenž odpovídá průměrné jakosti vzorkovaného celku. Tento vzorek bývá většinou hmotnostně větší, než je potřeba, a proto se zmenšuje na **konečný vzorek**.
- **Souhrnný vzorek** je vzorek složený ze všech dílčích vzorků odebraných z jedné partie.

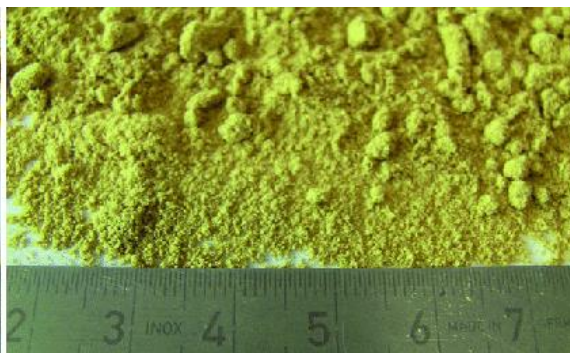
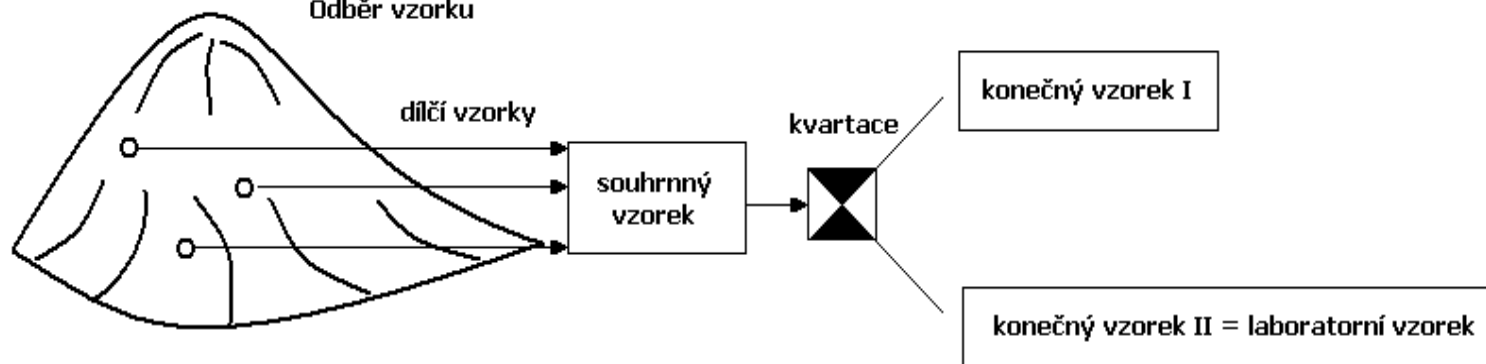
## Základní pojmy

- **Konečný vzorek** je vzorek, který je připravený redukcí souhrnného vzorku dělením. V určitém případě může být souhrnný vzorek i vzorkem konečným a to tehdy, je-li hmotnost souhrnného vzorku příliš malá.
- **Laboratorní vzorek** je vzorek konečný, určený k laboratornímu zkoušení.
- **Zkušební vzorek** je reprezentativní část laboratorního vzorku, který vzniká redukcí dělením.
- **Rozhodčí vzorek** je reprezentativní část konečného vzorku určeného pro závazná rozhodnutí o jakosti krmiva (zapečetěn a jeho ověřena pravost).
- **Analytem** se rozumí jakostní znak.

# Základní pojmy

Vzorkovaná partie

Odběr vzorku



## Odběr vzorku



### Cíl:

- stanovení průměrné hodnoty sledovaného znaku ve vzorkovaném celku
  - posouzení proměnlivosti sledovaného znaku ve vzorkovacím celku
- rozhodnout, zda průměrná hodnota sledovaného znaku ve vzorkovaném celku odpovídá předepsaným tolerančním mezím

### Metody odběru vzorku se řídí :

- druhem a cílem vlastní analýzy
- druhem vzorkovaného celku a jeho fyzikálními vlastnostmi (velikost částic, specifická hmotnost, lepivost)
  - množstvím a způsobem uložení vzorkovaného materiálu

## Odběr vzorku



### Vzorkovaný celek a jeho vlastnosti

Pro značně rozdílné smyslové, fyzikální a chemické vlastnosti, které ovlivňují způsob a techniku vzorkování i druh vzorkovacích pomůcek, se krmiva (Vyhláška č. 497/2004 ze dne 10. září 2004, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 124/2001 Sb., kterou se stanoví požadavky na odběr vzorků a principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků) dělí na:

- suchá sypká
- objemná suchá
- objemná vlhká čerstvá
- objemná vlhká konzervovaná
- pastovitá
- kapalná tekutá

## Odběr vzorku



### Vzorkovaný celek a jeho vlastnosti

U potravin je situace ještě složitější (Vyhláška č. 231/2016 Sb. Vyhláška o odběru, přípravě a metodách zkoušení kontrolních vzorků potravin a tabákových výrobků a NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 691/2013 ze dne 19. července 2013, kterým se mění nařízení (ES) č. 152/2009):

- balené / nebalené potraviny
- mražené / nemražené
- mléčné výrobky, cukrovarské výrobky, maso a masné výrobky, vejce
- ovoce a zelenina
- atd



## Odběr vzorku



Vzorkování, příprava vzorku pro zkoušení a vlastní zkoušení vzájemně úzce souvisí a pro náhodnou chybu odběru vzorku  $\sigma_S$ , chybu přípravy vzorku  $\sigma_P$  a chybu analýzy  $\sigma_A$  by teoreticky mělo platit:

$$\sigma_S \leq \sigma_P \leq \sigma_A$$

Vzorek, který se odebírá pro stanovení průměrného složení, musí být reprezentativní, tj. musí mít kvalitativní a kvantitativní složení odpovídající průměrnému složení vzorku, ze kterého byl odebrán. Celková chyba získaného průměru  $x$  analytu  $\sigma_L^2$  je způsobena: (a) chybou **přípravy vzorku**  $\sigma_P^2$  (nehomogenita) a (b) analytickou chybou **analytické metody**  $\sigma_A^2$  :

$$\sigma_L^2 = \sigma_P^2 + \sigma_A^2$$

## Odběr vzorku



Pro binární směs, kde je pro zjednodušení středná hustota materiálu binární směsi stejná ( $\rho_I = \rho_{II}$ ) se může chyba přípravy (odběru) vyjádřit jako

$$\sigma_P^2 = \frac{(1-x)}{x} \cdot \frac{m}{m_P}$$

**Chyba způsobená odběrem vzorku  $\sigma_P$  roste:**

- se zmenšující se průměrnou hodnotou analytu **x**
- s klesající hmotností odebraného vzorku **m<sub>P</sub>**
- s rostoucí zrnitostí ( průměrná hmotnost částice) materiálu **m**.

## Odběr vzorku



$$\sigma_P^2 = \frac{(1-x)}{x} \cdot \frac{m}{m_p}$$

Pokud  $x \rightarrow 1$ , pak  $m_p \rightarrow m$ . Hmotnost odebraného vzorku **nemá vliv** na chybu přípravy.

Pokud  $x = 0.5$  (binární směs), pak když  $m_p = m \Rightarrow \sigma_P^2 = 1$

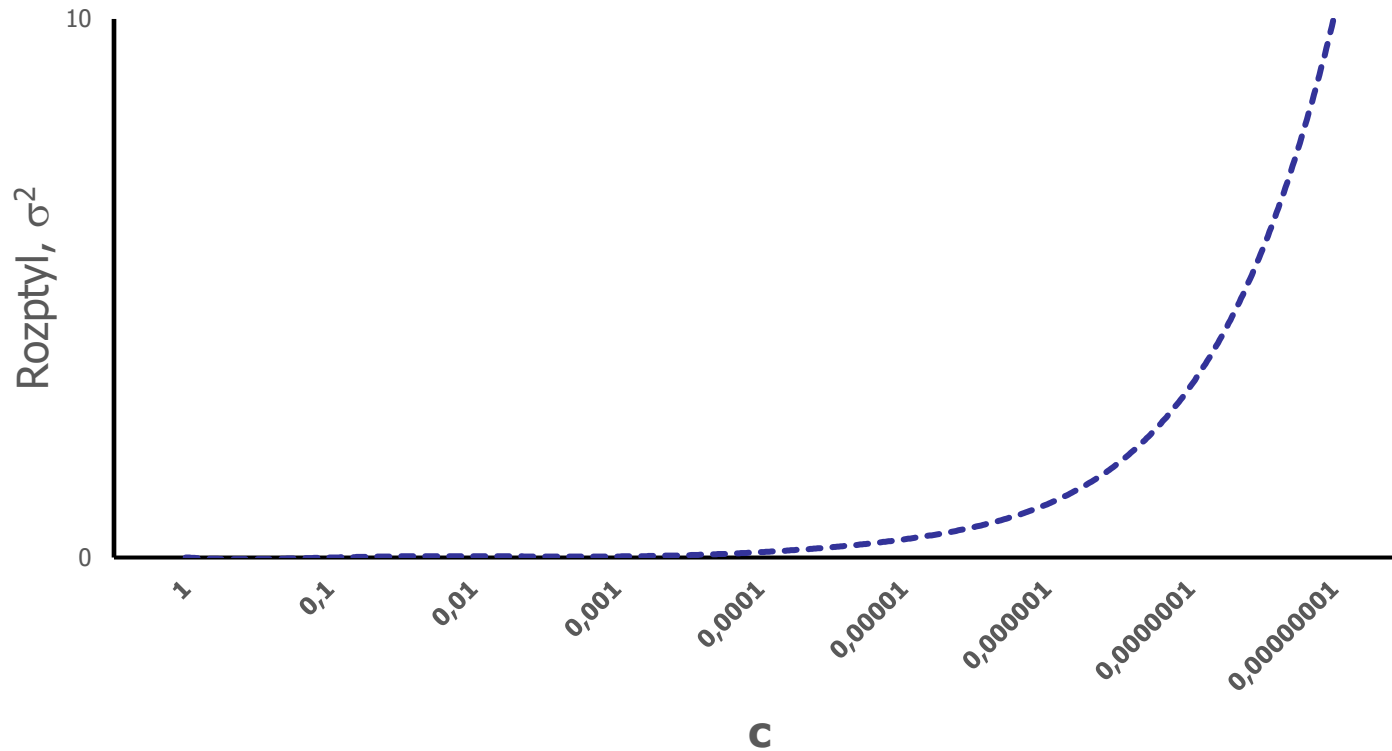
Pokud  $x = 0.5$  (binární směs), pak když  $10m_p = m \Rightarrow \sigma_P^2 = 0.1$

Pokud  $x \rightarrow 0$ , pak  $m_p \gg m$ . Hmotnost odebraného vzorku **má signifikantní vliv** na chybu přípravy.

## Odběr vzorku

Pokud  $m = m_p$ , pak

$$\sigma_P^2 = \frac{(1-x)}{x} \cdot \frac{m}{m_p} = \frac{(1-x)}{x}$$



## Odběr vzorku



Na celkovou chybu metody má vedle chyby odběru a metody vliv i počet odebraných dílčích vzorků  $m$  a počet paralelních stanovení  $n$ , provedených na každém konečném

vzorku:

$$\sigma_L^2 = \frac{\sigma_P^2}{m} + \frac{\sigma_A^2}{m \cdot n}$$

Za předpokladu, že chyba metody  $\sigma_A^2$  je rovna nebo menší než chyba odběru vzorku  $\sigma_P^2$  musí platit  $\sigma_A^2 = \sigma_P^2/k$ , kde  $k \geq 1$ .

$$\sigma_L^2 = \frac{\sigma_P^2}{m} \left( 1 + \frac{1}{k^2 n} \right)$$

## Odběr vzorku



Celková chyba analytické metody se tedy zmenší výrazněji odběrem **většiho** počtu dílčích vzorků **m** než zvětšením počtu paralelních stanovení **n** na konečném vzorku.

Pro  $k = 1 \Rightarrow \sigma_P^2 = \sigma_A^2 = 1$  platí:

m	n	$\sigma^2$
1	2	1.500
2	2	0.750
2	3	0.667
3	1	0.667
3	2	0.500
1	100	1.010

!

Pro různá  $k > 1 \Rightarrow \sigma_A^2 < \sigma_P^2$  platí

m	n	k	$\sigma^2$
1	2	1	1.500
1	2	2	1.125
1	2	5	1.020
1	2	10	1.005
1	2	20	1.001
1	2	100	1.000

## Odběr vzorku



### Způsoby vzorkování

Z hlediska způsobu vzorkování se může vzorkování rozdělit:

**Statické vzorkování** je způsob odběru, při němž se jednotlivé dílčí vzorky odebírají ze vzorkované partie, která je v klidu umístěna volně.

U **dynamického vzorkování** se jednotlivé dílčí vzorky odebírají ze vzorkované partie, která je v pohybu v předem definovaných časových intervalech. Jednotlivé časové intervaly jsou určeny na základě objemu vzorkovaného materiálu a jeho heterogenity.

## Odběr vzorku



### Způsoby vzorkování

Podle pravděpodobnostního odběru můžeme vzorkování rozdělit na:

- Namátkové vzorkování,
- Autoritativní vzorkování (vzorkování s úsudkem),
- Tendenční vzorkování,
- Systematické vzorkování,
- Prosté náhodné vzorkování,
- Stratifikované náhodné vzorkování,
- Systematický odběr.



## Odběr vzorku



### Minimální hmotnost konečného vzorku (krmiva)

Druh a rozsah partie	Hmotnost konečného vzorku
1. Pevná krmiva	0.5 kg
2. Tekutá a polotekutá krmiva	0.5 l
3. Doplnkové látky	0.05 kg
Premixy	0.25 kg

Vzorky se **odebírají a sestavují tak**, aby nedošlo oproti vzorkované partii k nežádoucím změnám, a aby nebyly znečištěny jinými materiály.

## Příprava (úprava) vzorku



Úprava vzorku se musí vždy provádět za takových podmínek, aby nedocházelo k nevratným změnám v látkovém složení upravovaného vzorku (oddělování šťávy, vysychání vzorku, kontaminaci, rozprášení, atd.).

Úprava vzorku se děje především (a) **homogenizací**, (b) **dělením** a (c) **mletím**.

### Homogenizace

Účelem homogenizace je, aby v **každé** vydělené části byly zastoupeny **všechny** částice a ve **stejném** poměru jako v původním vzorku.

## Příprava (úprava) vzorku



### Homogenizace

Laboratorní vzorek, který nevyžaduje žádnou předběžnou úpravu se homogenizuje **mícháním** a to *mechanicky* nebo *ručně*. K zamezení nebo minimalizaci **křížové kontaminace** se používají vždy čisté pomůcky a zařízení (nutné čištění a kontrola kontaminace – tzv. validace čištění).

**Mechanická homogenizace** - laboratorní homogenizátor; míchá se po dobu stanovenou návodem výrobce přístroje. Nedoporučuje používání vysokootáčkových mixerů, ve kterých dochází k flotaci částic vzorku a naopak dochází k jeho segregaci.



## Příprava (úprava) vzorku



### Homogenizace

Při **ruční homogenizaci** se laboratorní vzorek vysype na podložku a diagonálním přesypáváním vzorku pomocí zvedání rohů podložky se míchá. Tento postup se opakuje minimálně 10 krát. Potom se dále vzorek upravuje dělením.

U **pastovitých vzorků** se vzorek se homogenizuje mixováním a **celý** vzorek se dále použije jako **laboratorní vzorek**. V případě salámů (konzerv) se celý vzorek semele 2 krát na masovém strojku, který se poté rozebere a vyčistí tak, že zachycené podíly ve strojku se přidávají k umleté hmotě. Ta se potom celá mixuje tak dlouho, až se hmota v mísící nádobě dokonale spojí. **Dělení pastovitých vzorků** je zcela nepřípustné.

## Příprava (úprava) vzorku



### Úprava vzorku dělením

Laboratorní vzorek se upravuje dělením za účelem **získání potřebného počtu a hmotnosti** laboratorního vzorku buď přímo nebo po předběžné úpravě. Vzorek se dělí jen tehdy, je-li dosažené potřebné homogenity a velikost částic vyhovuje pro tuto úpravu. Dělením se musí získat díly, u nichž **nesmí být porušena** průměrné složení vzorku. Provádí se mechanicky nebo ručně.

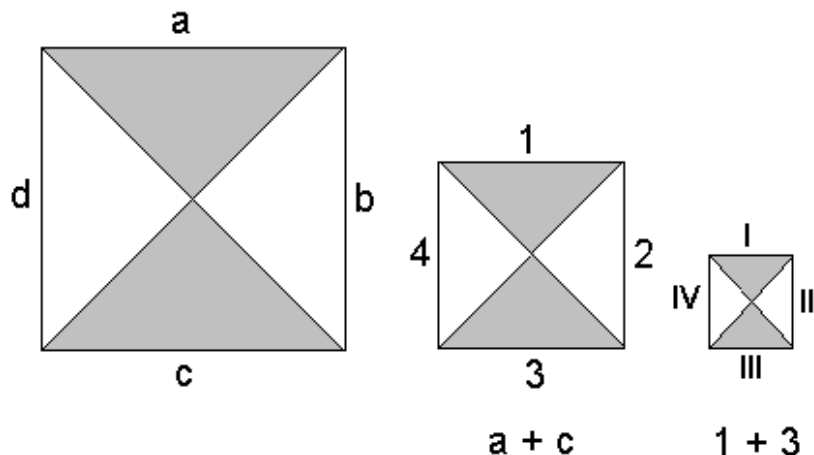
**Ruční dělení** (suchých a předsušených vzorků ) se provádí zpravidla kvartací, kdy se vždy protilehlé výseče, získané z tvaru zploštělého kužele homogenizovaného laboratorního vzorku, spojí a zbývající dvě výseče se vylučují.

## Příprava (úprava) vzorku



### Úprava vzorku dělením

Takto se postupuje opakovaně až do získání potřebné hmotnosti laboratorního vzorku. Ke kvartaci se používá šablon nebo i rukou po stlačení kuželovité vrstvy do kruhové vrstvy; tato se křížově dělí a dále se postupuje jako při použití šablon.



Postup zmenšování vzorku čtvercovým dělením (kvartací).  
Průměrný (konečný) vzorek potřebné hmotnosti vznikne smísením **I + III**. dílu

## Příprava (úprava) vzorku



### Úprava vzorku dělením

**Mechanické dělení** se provádí různými druhy mechanických děličů, které musí splňovat tyto funkční požadavky:

- poskytnout nejméně jednu reprezentativní část z celkové hmotnosti děleného laboratorního vzorku
- zajistit poměrné dělení i pro ne zcela homogenní vzorky
- pracovní rychlost pohyblivých částí děličů musí být rovnoměrná a průměr cest musí být nejméně 2,5krát větší než je maximální velikost částic děleného vzorku
- dělicí poměr musí být konstantní v požadovaných mezích
- poskytnout minimální hmotnost jedné části pro přípravu analytického vzorku.

## Příprava (úprava) vzorku



### Úprava vzorku dělením

Při mechanickém dělení naopak děliče nesmí:

- měnit svou funkci vlivem děleného vzorku krmiva
- ovlivňovat obsahy analytů ve vzorku.





## Příprava (úprava) vzorku



### Úprava vzorku mletím

Laboratorní vzorek se upravuje mletím vždy pokud velikost jeho částic je větší než 1 mm. Pokud zvýšený obsah tuku by negativně ovlivnil úpravu laboratorního vzorku mletím, nebo stanovované složky, je nutné vzorek před úpravou mletím odtučnit diethyletherem nebo hexanem (pokud to neovlivní některý z jakostních znaků).



## Příprava (úprava) vzorku



### Úprava vzorku mletím

Vzorek se semele v **laboratorním mlýnku** s vloženým sítem se čtvercovými oky o délce 0,5 nebo 1 mm nebo kruhově raženými oky o průměru 0,5 nebo 1 mm podle požadavků zkoušek.

- Mletí se provede tak, aby nedošlo k nadměrnému **zahřátí** vzorku.
- Semletý vzorek musí beze zbytku propadnout sítem o výše uvedených parametrech.
- Části vzorku, které by sítem nepropadly je nutno vrátit zpět do mlýnku k mletí.
- Po ukončení mletí se mlýnek rozebere (funkční část) zbaví dokonale zbytků vzorku, které se přidají k semletému vzorku a upraví homogenizací.

## Příprava (úprava) vzorku



### Úprava vzorku mletím

- Při přípravě k mletí, při vlastním mletí i jeho ukončení je nutno dbát, aby nedošlo ke ztrátám nebo kontaminaci vzorku.

K uchování vzorků se používají výhradně vzorkovnice různých velikostí s uzávěrem o vhodném objemu, které jsou dokonale uzavíratelné (podle potřeby i hermeticky).

Vzorkovnice musí být zhotoveny z **materiálu**, který nemůže ovlivnit původní jakost a musí zabránit případné kontaminaci vzorku (i biologické kontaminaci – škůdci).

## Zkoušení reprezentativnosti odběru vzorku a homogenity partie

Rozdělení základní složky **A** v materiálu se bude pokládat za homogenní, když se chemické složení jednotlivých partií  $\delta A$  liší jen v rámci náhodných chyb. Tzn., že výsledek analýzy jedné partie (šarže) se neliší významně od průměrného složení celé partie (šarže).

Celkový rozptyl  $\sigma^2$  je dán rozptylem, způsobený nehomogenitou  $\sigma_y(I)^2$  a rozptylem měření  $\sigma_y(II)^2$ , tj.

$$\sigma^2 = \sigma_y(I)^2 + \sigma_y(II)^2$$

## Zkoušení reprezentativnosti odběru vzorku a homogenity partie

Platí-li pro homogenitu, že celková chyba  $\sigma$  a chyba stanovení  $\sigma_y(II)$  jsou si přibližně stejné tj.  $\sigma \approx \sigma_y(II)$  pak nehomogenita můžeme být pokládat za prokázanou v případě, že  $\sigma > \sigma_y(II)$ .

Zásadní mezí pro průkaz homogenity je tedy veličina  $\sigma_y(II)$ . Čím menší je směrodatná odchylka  $\sigma_y(II)$ , tím větší je průkaznost nehomogenity. Nemohogenita je pokládána za prokázanou, je-li

$$F = \left( \frac{s}{s_y} \right)^2 > F(P; f_1; f_2)$$

kde  $s$  je výběrová směrodatná odchylka vzorkovaných partií,  $s_y$  je výběrová směrodatná odchylka stanovení, resp.  $s^2$  jako jejich rozptyl.

## Zkoušení reprezentativnosti odběru vzorku a homogenity partie

Homogenita je tedy **relativní** vlastnost vztažená na směrodatnou odchylku stanovení a ta musí být menší, než je kolísání obsahu sledované látky.

### Výpočet homogenity partie (šarže)

Při posuzování homogenity partie můžeme postupovat dvěma způsoby. První je hodnocení na základě **analýzy rozptylu** nebo na základě **testování rozdílu dvou rozptylů**.

## Zkoušení reprezentativnosti odběru vzorku a homogenity partie

### Analýza rozptylu

Pro testovací kritérium analýzy rozptylu F-statistiky můžeme tedy odvodit vztahy pro rozptyl  $s^2$  mezi jednotlivými úrovněmi (meziúrovňový rozptyl) a rozptyl analytické metody (residuální rozptyl)  $s_v^2$ . Pro rozptyl mezi jednotlivými úrovněmi platí:

$$s^2 = \frac{1}{k-1} \sum_{j=1}^k n_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2$$

kde  $k$  je celkový počet odebraných dílčích vzorků (počet úrovní),  $n_j$  počet opakování uvnitř úrovně (počet paralelních opakování pro jednotlivé dílčí vzorky),  $\bar{x}_j$  je průměr uvnitř úrovně,  $\bar{x}$  je průměr ze všech analytických stanovení (celkový průměr).

## Zkoušení reprezentativnosti odběru vzorku a homogenity partie

### Analýza rozptylu

Pro rozptyl analytické metody platí:

$$s_y^2 = \frac{1}{N - k} \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$$

kde  $x_{ij}$  je i-té stanovení j-tého vzorku,  $\bar{x}_j$  je průměr stanovení uvnitř úrovně,  $N$  je celkový počet analýz provedených na všech vzorcích,  $k$  je celkový počet odebraných dílčích vzorků.



## Zkoušení reprezentativnosti odběru vzorku a homogenity partie

### Analýza rozptylu

Testovací kritérium má tvar:

$$F = \left( \frac{s}{s_y} \right)^2 > F(\alpha; k - 1; N - k)$$

Platí-li  $F > F_{\text{krit}}$  je posuzovaná partie, šarže (resp. zařízení) nehomogenní.

*Příklad:* Pro testování 8 odebraných dílčích vzorků ( $k = 8$ ) a při testování každého vzorku pro  $n = 2$  paralelních stanovení je pro hladinu významnosti 0,95 testovací kritérium  $F(0,05; k-1 = 7; N-k = 8)$

## Zkoušení reprezentativnosti odběru vzorku a homogenity partie

Průměr:	44.5	$F_{\text{vyp}}$ :	<b>3.059</b>
Meziúrovňový rozptyl $s^2$ :	0.36	$F_{\text{krit}}$ (P=0.95):	<b>3.500</b>
Reziduální rozptyl $s_y^2$ :	0.12		

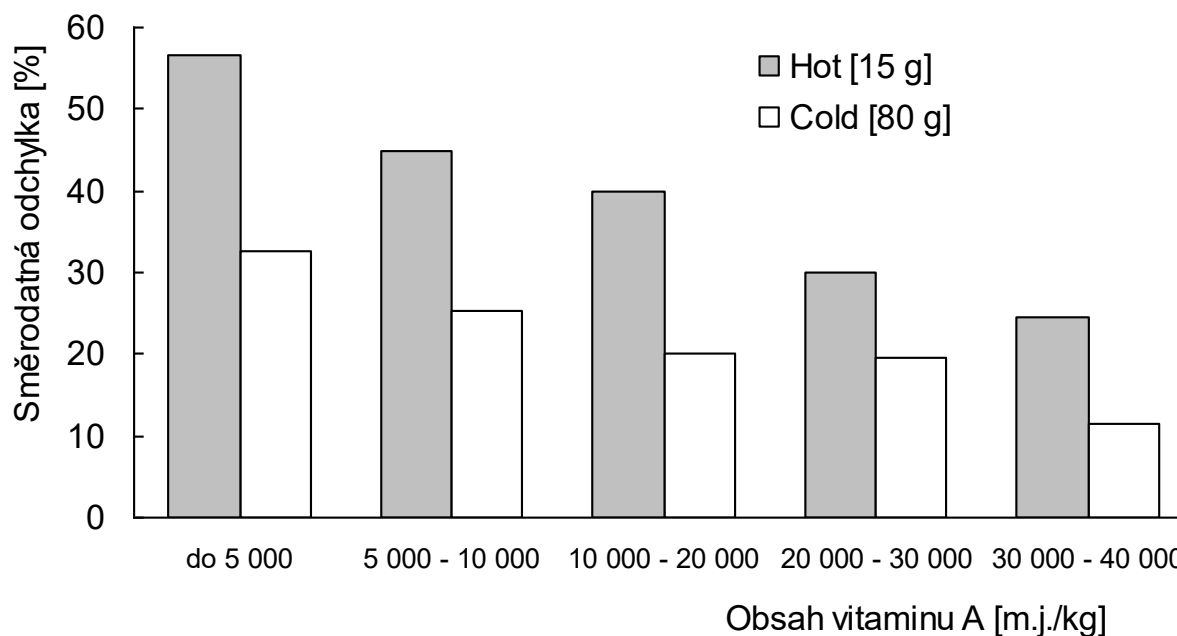
Závěr: Vzorek je HOMOGENNÍ

Číslo vzorku	$X_1$	$X_2$	Průměr
1	44.7	45.3	45.0
2	44.7	44.4	44.6
3	44.7	45.0	44.9
4	44.2	43.8	44.0
5	45.4	44.7	45.1
6	44.7	44.4	44.6
7	43.7	44.2	44.0
8	44.0	44.6	44.3

## Praktické zkušenosti přípravy vzorku

### Vliv hmotnosti vzorku na směrodatnou odchylku stanovení

Vliv hmotnosti vzorku na směrodatnou odchylku stanovení lze ukázat na stanovení vitamínu A (**Hot** – navážka vzorku 15 g, **Cold** – navážka vzorku 80 g)



## Praktické zkušenosti přípravy vzorku

### Vliv počtu zkušebních vzorků na správnou hodnotu

$$\sigma_L^2 = \frac{\sigma_P^2}{m} \left( 1 + \frac{1}{k^2 n} \right)$$

V laboratoři byla analyzován vzorek na stanovení lasalocidu ve vápenci o deklaraci 10 mg/kg.

Bylo odebráno 10 zkušebních vzorků ( $m = 10$ ) a tyto vzorky byly analyzovány ve dvou paralelních stanovení ( $n=2$ ). Výsledky:  $\bar{X} = 9,9 \text{ mg/kg}$ ,  $RSD = 9,6 \%$ . Z těchto vzorků byl připraven jeden průměrný vzorek ( $m = 1$ ) a byl analyzován ve třech opakováních ( $n=3$ ). Výsledky:  $\bar{X} = 9,4 \text{ mg/kg}$ ,  $RSD = 15,7 \%$ . Z výsledků je zřejmé, že zvýšení počtu vzorků ( $m$ ) je účinnější než zvýšení počtu paralelních stanovení ( $n$ ) – dostáváme správnější a přesnější výsledky.

## Závěr

1. Odběr a příprava vzorku mají zásadní vliv na výslednou hodnotu získanou analytickou metodou => pokud zkoušený vzorek **není reprezentativní** vůči původnímu materiálu, **nelze vztáhnout výsledek analýzy** k jeho vlastnostem, bez ohledu na to, jak **dobrá** je analytická metoda nebo jak **pečlivě** je provedena analýza.

## Závěr

2. Zkoušený vzorek (navážka pro analýzu) musí být vzorkem **reprezentativním**. Aby se zajistilo, že zkoušený vzorek (u pevných vzorků navážka) je vskutku **homogenní**, může být nezbytné zmenšit velikost částic mletím a nebo drcením.
3. Je třeba zabránit **kontaminaci vzorku** – balení vzorků a nástroje používané k manipulaci se vzorky musí být voleny tak, aby všechny povrchy, které přijdou do kontaktu se vzorkem, byly v zásadě inertní (plasty, kovy apod). Křížová kontaminace – laboratoř musí mít postupy pročištění všech položek použitých k odběru a přípravě vzorků, včetně pomocného zařízení (pipety, kádinky, baňky apod).

## Závěr

4. Je třeba porozumět **problémům odběru a přípravy vzorků** a následné analýzy a podle toho navrhnout způsob manipulace se vzorkem (vzorkování a příprava). Použitá strategie vzorkování bude záviset na povaze problému, například zda: **a)** se požaduje průměrná koncentrace analytu v materiálu, **b)** se požaduje profil analytu v materiálu, **c)** je podezření, že materiál je kontaminován konkrétním analytem, **d)** kontaminující látky jsou distribuovány heterogenně v materiálu (vyskytují se v ohniscích).

**Česká  
Chromatografická  
Škola**

**HPLC 2021**



[WWW.CESKACHROMATOGRAFICKASKOLA.CZ](http://WWW.CESKACHROMATOGRAFICKASKOLA.CZ)

**16.-19. května 2021  
Vinařství U Kapličky, Zaječí**



## DĚKUJI ZA POZORNOST



[Otázky – osobně nebo e-mailem hplc@hplc.cz](mailto:hplc@hplc.cz)