

## Charakterystyka metody wagowej oznaczania suchej masy w paszach

Robert Gąsior, Krystyna Ślusarczyk

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,  
Centralne Laboratorium, 32-083 Balice k. Krakowa*

Oznaczanie zawartości suchej masy lub alternatywnie wilgotności, techniką wagowo-suszarkową jest podstawową analizą stosowaną w dziedzinie analiz pasz i żywności. Technikę tę stosuje się od wielu lat i jest ona stosunkowo prosta (PN-ISO 6496:2002; PN-ISO 712:2002; AOAC, 2005). Brak jest jednak prac, które przedstawiałyby charakterystykę tej metody z uwzględnieniem takich parametrów, jak: powtarzalność, odtwarzalność, granica powtarzalności, granica oznaczenia ilościowego i niepewność. Parametry te, ogólnie opisane w literaturze (Arendarski, 2003; Dobecki, 2004; Ellison i in., 2000) są elementami walidacji i mają na celu wykazanie poprawności stosowanej metody zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (OECD Principles of GLP) i wymaganiami normy PN-EN ISO/IEC 17025 (2005). Dodatkowym elementem walidacji jest również wykonanie analiz dostępnych materiałów referencyjnych i porównanie uzyskanych wyników z odpowiednimi wartościami referencyjnymi. Zagadnienia dotyczące walidacji i szacowania niepewności są omawiane w pracach Gąsiora i in. (2005, 2007, 2009), Gąsiora i Pieszki (2006), Gąsiora i Ślusarczyk (2006), Korola i in. (2009).

Badania walidacyjne są niezwykle istotne, ponieważ pomagają lepiej poznać ograniczenia danej metody. Na ich podstawie można również określić sposoby kontrolowania jakości wyników podczas wykonywania rutynowych analiz.

Celem pracy było określenie wybranych parametrów walidacyjnych, niezbędnych do prawidłowej interpretacji wyników badań zawartości suchej masy w paszach.

### Aparatura i sprzęt

W Centralnym Laboratorium Instytutu Zootechniki PIB zwalidowano, zgodnie z wymaganiami normy PN-EN ISO/IEC 17025, procedurę oznaczania zawartości suchej masy, którą stosuje się przy wykonywaniu analiz na potrzeby IZ PIB i podmiotów zewnętrznych. Do oznaczeń, oprócz podstawowego wyposażenia laboratoryjnego wykorzystano: Rozdrabniacz Laboratory Mill, Model 4, Arthur H. Thomas Company, USA; Lab Mill-1 QC-114, Węgry, wagi analityczne o dokładności 0,0001 g i 0,01 g, szklane naczynka wagowe z pokrywką o powierzchni roboczej umożliwiającej równomierne rozsypanie badanej próbki w warstwie 0,3 g/cm<sup>2</sup>, koszyk do wstępnego suszenia, suszarkę elektryczną bez wymuszenia przepływu powietrza oraz owiewową, eksykator z czynnikiem suszącym (Silica Gel Orange, Carl Roth GmbH, Niemcy).

### Przygotowanie próbki badanego materiału, próbki kontrolnej i ślepej oraz obliczanie wyników

Pasze i materiały paszowe rozdrabniano do uzyskania stanu jednorodnego, aby zapobiec jakimkolwiek zmianom w zawartości wilgoci. Pasze o wysokiej wilgotności (kiszonki) poddawano wstępnemu suszeniu. W tym celu pobraną próbkę (50 g lub więcej) odważano, w powtórzeniu z dokładnością odczytu 0,01 g, do naczynia lub pojemnika i suszono w suszarce owiewowej w temperaturze 60°C±10°C do obniżenia się zawartości wilgoci do około 8–12%. Po oko-

ło 1-godzinnym schłodzeniu próbki na powietrzu ważono ją z dokładnością odczytu 0,01g, łącznie i rozdrabniano w rozdrabniaczu. Ziarno zbóż o wilgotności wyższej niż 17% również poddawano wstępnemu suszeniu, przy czym suszono je przez 5 do 7 minut w temperaturze  $130^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ . Właściwe suszenie (4 godziny) pasz rozdrobnionych, zarówno wstępnie podsuszonych, jak i pasz nie wymagających wstępnego podsuszenia, odbywało się w suszarce bez wymuszonego przepływu powietrza w temperaturze  $103^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ , po uprzednim odważeniu około 5 g próbki ( $\pm 0,0001$  g) do zważonego naczynka wraz z pokrywką ( $\pm 0,0001$  g). Próbkę była pobierana z kilku miejsc (próbka reprezentatywna) i równomiernie rozmieszczana na dnie naczynka. Suszenie pasz odbywało się w nie przykrytym naczynku. Naczynko z pokrywką było przed zważeniem również wysuszone w temperaturze  $103^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$  przez około 30 minut. Po zakończonym suszeniu i schłodzeniu w eksykatorze próbki w nakrytym naczynku, próbkę z naczynkiem ważono ( $\pm 0,0001$ g). Próbkę suszono do stałej masy, do momentu, gdy bezwzględna różnica w zawartości suchej masy z dwóch kolejnych ważeń nie różniła się o więcej niż 0,1%. Zawartość suchej masy SM (%) lub wilgotność W (%) były liczone ze wzorów: SM (%) =  $m/E \times 100$  lub W (%) =  $100 - \text{SM}\%$ , gdzie m i E to wyrażone w gramach, odpowiednio: masa badanej próbki po wysuszeniu i początkowa masa badanej próbki. W przypadku zastosowania wstępnego podsuszenia współczynnik podsuszenia WP wynosił  $M/M'$  (M i M' – odpowiednio: masa w gramach badanej próbki po i przed wstępnym podsuszeniem), a sucha masa próbki podsuszanej  $\text{SMp}(\%) = \text{SM}(\%) \times \text{WP}$ . Wilgotność W (%) liczone ze wzoru:  $W(\%) = 100 - \text{SMp}\%$ .

## Walidacja

Badania powtarzalności przeprowadzono na 16 podwójnych próbkach różnych pasz: ziarna zbóż (4), kiszonka (5), siano (1), zielonka (1), młóto (1), mieszanki paszowe dla brojlerów (2) i tuczników (1), sucha karma dla kotów (1). Badania odtwarzalności przeprowadzono na 10 paszach przeanalizowanych w powtórzeniu w różnym terminie (przez jedną lub dwie osoby): ziarna zbóż (4), kiszonka (1), zielonka (1),

mieszanki paszowe dla brojlerów (2) i tuczników (1), sucha karma dla kotów (1). Powtarzalność określano jako nie mniejszą niż współczynnik zmienności pojedynczych oznaczeń przeprowadzonych tą samą metodą, w badaniach identycznego materiału, w tym samym laboratorium, przez tego samego laboranta, w tym samym czasie. Odtwarzalność określano jako nie mniejszą niż współczynnik zmienności pojedynczych oznaczeń przeprowadzonych tą samą metodą, w badaniach identycznego materiału, w tym samym laboratorium, przez jednego lub dwóch laborantów, w różnym czasie. Współczynnik zmienności  $CV_{kn}$  dla k próbek analizowanych w n powtórzeniach był liczony ze wzoru:

$$CV_{kn} = \sqrt{\frac{\sum_k CV_{n2}^2}{k}}$$

gdzie:

współczynnik zmienności ( $CV_{n2}$ ) oznaczenia próbki w powtórzeniu ( $n=2$ ) obliczone ze wzoru:

$$CV_{n2} = 100 \times \frac{SD_{n2}}{X_{sr}}$$

$SD_{n2}$  – odchylenie standardowe z dwóch pomiarów danej próbki,

$X_{sr}$  – średnia z dwóch pomiarów danej próbki.

Jako kryterium powtórzenia oznaczeń (granica powtarzalności) przyjęto podwojony współczynnik zmienności dla powtarzalności. Zastosowanie takiego kryterium polega na porównaniu z nim uzyskanego w badaniach współczynnika zmienności dla powtarzalności. Współczynnik zmienności pomiarów danej próbki analitycznej, przeprowadzonych tą samą metodą, przez tego samego laboranta, w tym samym czasie, nie powinien przekraczać granicy powtarzalności w więcej niż 5% przypadków oznaczeń suchej masy. Granicę oznaczenia ilościowego określono na podstawie odchylenia standardowego z pomiarów ślepej próby (różnice ważeń pustego naczynka) i wyznaczono ze wzoru (Dobecki, 2004):

$$X_{ozn} = \frac{30 \times S_{sp}}{b}$$

gdzie:

$X_{ozn}$  – granica oznaczenia ilościowego,

$S_{sp}$  – odchylenie standardowe z pomiarów ślepej próby,

$b$  – czułość ważenia określona jako stosunek odczytu ważenia do ilości naważonej substancji, wynosząca 1 (g/g).

Czułość (Dobecki, 2004) jest stosunkiem przyrostu sygnału analitycznego do odpowiadającego mu przyrostu stężenia lub zawartości oznaczanego składnika. Zgodnie z tą definicją, czułość dla analiz wagowych wynosi 1 (g/g). W oparciu o czułość wyznaczono zakres oznaczenia suchej masy i wilgotności według opisanej metody.

Określono główne czynniki błędów, składające się na niepewność opisanej metody. Niepewność zdefiniowano jako podwojoną wartość współczynnika zmienności średniej arytmetycznej ( $P \leq 0,05$ ) z analiz danej próbki lub jako maksymalną z dwóch wartości (powtarzalność, odtwarzalność), pomnożoną przez 1,4, zgodnie ze wzorem ( $n=2$ ):

$$2 \times \frac{CV_{n2}}{\sqrt{n}} \approx 1,4 \times CV_{n2}$$

Powtarzalność, odtwarzalność, granicę powtarzalności i niepewność wyrażono w postaci błędu względnego (%). Granicę oznaczenia ilościowego wyrażono w jednostkach zawartości suchej masy lub, alternatywnie, wilgotności (g/kg).

Dodatkowym elementem walidacji było porównanie wyników zawartości wilgotności uzyskanych w analizach materiału referencyjnego (pasza dla drobiu, LGC 7173, LGC Queens Road, Teddington, Middlesex TW11 OLY, UK; www.lgc.co.uk) z wartością referencyjną przypisaną temu materiałowi.

### Niepewność

Na niepewność metody ( $N_c$ ) składa się głównie czynnik niepewności, związany z przygotowaniem próbki i pomiarem w niej zawartości suchej masy (wilgotności) (niepewność oznaczenia suchej masy w próbce,  $N_p$ ). Są to głównie błędy pobierania materiału do oznaczeń,

odważania i suszenia. Błędy te są automatycznie uwzględnione w niepewności  $N_p$  wówczas, jeżeli obliczane z dwóch powtórzeń wyniki dotyczą analiz dwóch równoległe naważonych próbek.

W przypadku pasz wymagających wstępnego podsuszenia, jak na przykład kiszonki, w niepewności  $N_c$  uwzględniono jeszcze czynnik niepewności wstępnego podsuszenia, który złożono z niepewnością  $N_p$  zgodnie z zasadą propagacji Gaussa. Wyliczone niepewności metody  $N_c$  (bez i z podsuszeniem) odnoszą się do analiz w jednym laboratorium. Niepewność metody, wraz z wynikiem traktowanym jako średnia z pomiarów, ma znaczenie praktyczne przy jego interpretacji i określa przedział tolerancji, w jakim powinna znaleźć się, z prawdopodobieństwem 95%, rzeczywista wartość wyniku oznaczenia.

Niepewność powinna być kontrolowana przy każdej analizie próbek przez sprawdzenie powtarzalności i może być większa w przypadku tych analiz, które mimo wykonania powtórnych badań nie spełniają kryterium powtarzalności.

### Pozostałe parametry walidacyjne

Błędy charakteryzujące analizy pasz na zawartość suchej masy (alternatywnie – wilgotności) są relatywnie małe w porównaniu z innymi analizami, w tym z bardziej złożonymi technikami instrumentalnymi (chromatografia, spektrometria absorpcji atomowej). Współczynniki zmienności dotyczące powtarzalności i odtwarzalności oznaczeń zawartości suchej masy nie przekraczały 3%. Granice oznaczenia ilościowego zostały obliczone przy założeniu stosowania odważki analitycznej, wynoszącej 1 g i są wystarczające do tego typu oznaczeń. Wyniki dotyczące powtarzalności, granicy powtarzalności, odtwarzalności, granicy oznaczenia ilościowego i niepewności metody zostały zebrane w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry walidacji metody oznaczania zawartości suchej masy w paszach  
Table 1. Parameters for validation of a method for determining dry matter content of feeds

Powtarzalność Repeatability (%)	Granica powtarzalności Limit of repeatability (%)	Odtwarzalność Reproducibility (%)	Granica oznaczenia ilościowego Limit of quantification (g/100 g)	Niepewność względna Relative uncertainty ( $P \leq 0,05$ ) (%)	Niepewność względna z podsuszeniem Relative uncertainty with drying-off ( $P \leq 0,05$ ) (%)
3	6	3	1	4,2	7

Wiarygodność opisanej metody analitycznej została potwierdzona analizami materiału referencyjnego LGC 7173, dla którego certyfikowana wartość referencyjna, odnosząca się do zawartości suchej masy, wynosiła  $110 \pm 9$  (g/kg). Wartości oznaczone niniejszą metodą nie różniły się istotnie od wartości referencyjnej ( $113,9 \pm 4,8$ ).

## Podsumowanie

Ustalono, że podczas wykonywania analiz należy sprawdzać: powtarzalność oraz zawartość suchej masy w próbce kontrolnej (np. mate-

riał referencyjny). W tym celu określono granicę powtarzalności, której nie powinno się przekraczać w więcej niż 5% przypadków podwójnie wykonywanych analiz każdej próbki. Zwalidowana metoda cechuje się dużą dokładnością i wiarygodnością, co zostało potwierdzone wynikami oznaczeń certyfikowanego materiału referencyjnego i pozwala na dokładne oznaczanie zawartości suchej masy w zakresie 10–990 (g/kg). Zwalidowana metoda oznaczania zawartości suchej masy w paszach weszła do zakresu metod akredytowanych (Polskie Centrum Akredytacji) Centralnego Laboratorium Instytutu Zootechniki PIB.

## Literatura

AOAC (2005). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 934.01, 18th Edition, Maryland, USA.

Arendarski J. (2003). Niepewność pomiarów. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej. Warszawa.

Dobecki M. (2004). Zapewnienie jakości analiz chemicznych. Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera Press, Łódź, ss. 35–111.

Ellison S.L.R., Rosslein M., Williams A. (eds) (2000). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Eurachem/Citac Guide 2000.

Gąsior R., Pieszka M. (2006). Evaluation of vitamins A and E level in meat by HPLC. Anim. Sci., 1, Suppl., pp. 88–89.

Gąsior R., Ślusarczyk K. (2006). Charakterystyka metody oznaczania aminokwasów siarkowych w paszach i żóltkach jaj. Roczn. Nauk. Zoot., 33 (2): 241–253.

Gąsior R., Ślusarczyk K., Szczypuła M. (2005). Validation of a Method for Determining Amino Acids in Acid Hydrolysates of Feeds. Ann. Anim. Sci., 5, 1: 181–197.

Gąsior R., Szczypuła M., Sala S. (2007). Walidacja metody oznaczania azotu w paszach i materiale mięsnym. Roczn. Nauk. Zoot., 34 (1): 131–139.

Gąsior R., Pieszka M., Brzóska F. (2009). Validation of a method for simultaneous determination of tocopherols and tocotrienols in cereals using Normal Phase HPLC. J. Anim. Feed Sci., 18: 173–192.

Korol W., Rubaj J., Bielecka G. (2009). Kryteria oceny niepewności metod badania dodatków paszowych pasz leczniczych i preparatów biobójczych. Mat. II Symp.: Farmacja Weterynaryjna w Polsce. PIWet-PIB, Puławy, 15–16.10.2009, ss. 69–72.

Kramer J.K.G., Blais L., Fouchard R.C., Melnyk R.A., Kallury K.M.R. (1997). A rapid method for the determination of vitamin E forms in tissues and diet by High-Performance Liquid Chromatography using a normal-phase diol column. Lipids, 32, 3: 323–330.

OECD Principles of Good Laboratory Practice; <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-7/a/7ag4a.pdf>

PN-ISO 6496:2002. Pasze. Oznaczanie wilgotności i innych substancji lotnych.

PN-ISO 712:2002. Zboża i przetwory zbożowe. Oznaczanie wilgotności. Rutynowa metoda odwoławcza.

PN-EN ISO/IEC 17025:2005. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących. Polski Komitet Normalizacyjny.

## CHARACTERISTICS OF A METHOD FOR DRY MATTER DETERMINATION IN FEEDS

### Summary

The method for dry matter measurement was characterized by the drying and weighing technique. Validation study was conducted on 16 samples of feed. Repeatability and reproducibility of the method did not exceed 3%. The relative uncertainty of the method ( $P \leq 0.05$ ) taking into account the errors, associated with sample preparation and the dry matter determination was 4,2%, and in the case of additional pre-drying of wet material (silage) was 7%. The limit of quantification was 10 g/kg. While performing routine analysis should be checked: repeatability (repeatability limit of 6%) and dry matter content in the control sample.