

Stanovení P a Ca v krmných směsích metodou XRF spektrometrie

Ing. Tomáš Černožský, CSc., Ing. Milan Pouzar, Univerzita Pardubice, Laboratoř atomové spektroskopie, Ústav ochrany životního prostředí, Čs. Legii 511, 532 10 Pardubice

Abstrakt

V této práci je popsána rychlá a levná metoda stanovení obsahu P a Ca ve vzorcích krmných směsí za použití „low cost“ stolního vlnově dispersního rentgenfluorescenčního spektrometru (WD XRF). Ke kalibraci XRF spektrometru byly použity reálné vzorky krmných směsí. V těchto vzorcích byl nejprve stanoven obsah P a Ca metodou ICP OES po mikrovlnné mineralizaci. Vzorky krmných směsí nebyly před analýzou pomocí WD XRF nijak upravovány. V práci je popsán postup volby vhodného způsobu plnění vzorkovnice XRF spektrometru, optimalizace doby expozice a postup výběru vhodného kalibračního modelu.

Úvod

Stanovení P a Ca v surovinách i konečných produktech bývá důležitým krokem při kontrole jakosti krmiv a při řízení výroby krmných směsí. Znalost obsahu P a Ca v krmivu je důležitou informací při navrhování optimálního složení výživy zvířat /1/. Správný obsah a poměr těchto dvou prvků v krmivu může mít vliv na dosahovaný přírůstek hospodářských zvířat /2,3/.

K prvkové analýze krmiv, potravinářských produktů a surovin pro jejich výrobu lze využít celou řadu analytických postupů. Stanovení nutričně významných prvků pomocí AAS a ICP OES a ICP-MS vyžaduje poměrně náročnou úpravu vzorku. Příprava vzorku pro tyto metody v sobě obvykle zahrnuje některý ze způsobů mineralizace. Mikrovlnná mineralizace ve směsích kyselin byla použita například při analýze nutričních prvků a kontaminantů v krmivech pro prasata metodami ICP OES a GF AAS /4/ a při prvkové analýze vzorků sojové mouky metodami ICP OES a ICP-MS /5/. Mineralizace na mokré cestě v kyselině dusičné byla použita při analýze vzorků krmiv metodou ICP-MS /6/, automatická „mikro-digestion“ metoda s kyselinou dusičnou byla použita při analýze 17 nutričně významných prvků v krmivech a zemědělských plodinách metodou ICP OES /7/. Mineralizace na suché cestě v muflové peci byla použita při analýze matričních i stopových prvků ve vzorcích papai metodou FAAS /8/. Dva způsoby rozkladu (mikrovlnná mineralizace a klasická mineralizace na mokré cestě) byly porovnávány při analýze vybraných prvků v rostlinných tkáních metodami ICP OES a ICP-MS /9/. Tři způsoby rozkladu (vysokotlaká mikrovlnná mineralizace, klasická mineralizace na mokré cestě a mineralizace na suché cestě v muflové peci) byly porovnávány při analýze matričních a stopových prvků ve vzorcích zeleniny a obilovin metodou ICP OES/10/. Při analýze krmných směsí bývá provedení úplného rozkladu vzorku velmi složité, neboť tyto vzorky mívají často komplikované a značně proměnné složení matrice. Kromě vysokých nároků na přípravu vzorku je podstatnou nevýhodou uvedených metod atomové spektroskopie i poměrně vysoká cena analýzy.

Analýza P ve vzorcích papai byla provedena spektrofotometricky /8/. Stejná metoda byla použita i při analýze Ca ve vzorcích potravin /11/. Nároky spektrofotometrie na přípravu vzorku jsou ještě vyšší než v případě výše popsaných spektrálních metod. Tato metoda je použitelná jen po některé typy analytů a matic. Díky své pracnosti je málo vhodná pro analýzu větších souborů vzorků.

V práci /12/ je popsáno stanovení Ca v rostlinných tkáních metodou jednokolonové iontové chromatografie. Autoři publikace uvádějí, že touto metodou bylo dosaženo výsledků srovnatelných s AAS a ICP OES za podstatně nižších nákladů na provedení analýzy. Tato metoda však také pravděpodobně není vhodná pro provozní sériovou analýzu.

V provozních laboratořích potravinářských závodů a výroben krmných směsí je v současnosti kromě klasických metod (spektrofotometrické, titrační a vážkové stanovení Ca a P /13,14/) velmi rozšířenou analytickou technikou NIRS (near infrared reflectance spectroscopy). Tato metoda je obvykle používána pro analýzu organických složek vzorků, ale jsou popsány i aplikace v oblasti prvkové analýzy. Stanovením Ca i P ve vzorcích sena (semi-arid grassland samples) pomocí NIRS se zabývají práce /15,16/, stanovení P ve vzorcích krmné zeleniny pomocí NIRS je popsáno v publikaci /17/. Tato analytická technika je rychlá, levná. Příprava vzorku se většinou omezuje pouze na proces mletí a sušení. Její nevýhodou je potřeba velkého množství kalibračních standardů. V případě prvkové analýzy dosahuje tato metoda výrazně horší přesnost a správnost, než jakou dosahují klasické metody a metody atomové spektroskopie.

Poměrně často popisovanou aplikací rentgenfluorescenční spektrometrie v oblasti analýzy vzorků s organickou maticí je stanovení matričních a stopových prvků v rostlinných tkáních. Příprava vzorku v sobě v tomto případě obvykle zahrnuje kroky mletí, sušení a lisování s vhodným pojivem /18,19/, případně lisování bez přidavku pojiva /19-22/. V práci /23/, která se zabývá analýzou nutričně významných prvků v listech kukuřice, bylo porovnáváno lisování nemletých částí rostliny a lisování drcených vzorků. V některých případech je možné namleté vzorky rostlinných tkání analyzovat nelisované, pouze nasypané do vhodné vzorkovnice /24/.

Rentgenfluorescenční spektrometrie je rychlá a levná metoda prvkové analýzy. Hlavní výhodou této metody je její poměrně malá náročnost na přípravu vzorku. Rentgenfluorescenční spektrometrie obvykle dosahuje při prvkové analýze vzorků s komplikovanou organickou maticí také lepší přesnosti a správnosti než metody klasické i než uvedené metody spektrální. Přesto je publikováno velmi málo prací, které se zabývají možnostmi využití této techniky v oblasti kontroly potravin a směsných krmiv. Shoda výsledků rentgenfluorescenční spektrometrie a atomové absorpční spektrometrie při analýze vzorků s velmi komplikovanou organickou maticí je popsána např. v práci /25/. Tato publikace se zabývá stanovením minerálních složek ve vzorcích produktů rychlého občerstvení.

V této práci je popsána rychlá a levná metoda stanovení P a Ca v krmných směsích pomocí XRF spektrometrie. Navržená metoda má minimální nároky na úpravu vzorku. Přesnost a správnost navržené metody byla ověřena porovnáním s ICP OES po mikrovlnné mineralizaci vzorku.

Experimentální část

Použitá přístrojová technika

K rentgenfluorescenčnímu stanovení P a Ca ve vzorcích krmných směsí byl použit stolní vakuový vlnově disperzní rentgenfluorescenční spektrometr SPECTROSCAN V (Spectron, St. Petersburg, Russia). K buzení charakteristického záření analytu je v tomto přístroji využívána Pd rentgenka s maximálním výkonem 200 W (při napětí 50 kV a proudu 4 mA). Optická část spektrometru je vybavena pěti zahnutými krystaly v Johansonově uspořádání. Přístroj je vybaven zataveným plynově proporcionálním detektorem naplněným Xe. Parametry XRF stanovení P a Ca jsou shrnuty v **tabulce I**.

Jako metoda přípravy vzorku pro srovnávací metodu ICP OES byla zvolena mikrovlnná mineralizace. Rozklad vzorků byl proveden v mikrovlnném rozkladném zařízení BM 1 S/2 (Plazmatronika, Poznan, Poland). Maximální výkon mikrovlnného generátoru je 700 W. K rozkladům byly použity 150 ml PTFE nádoby. Parametry použitého rozkladného programu jsou shrnuty v **tabulce II**.

Stanovení P a Ca v roztocích připravených mineralizací vzorků krmných směsí bylo prováděno za použití ICP spektrometru GBC Integra XL2 (GBC, Dandenong, Australia). Podmínky měření a technické parametry zařízení jsou shrnuty v **tabulce III**.

Všechny statistické výpočty byly prováděny pomocí programu OPGM /26/

Použité chemikálie

K přípravě kalibračních standardů pro XRF stanovení bylo použito reálných vzorků krmných směsí pro drůbež, prasata a skot (VKS, Pardubice, Czech Republic). K rozkladům vzorků krmných směsí pro standardní metodu ICP OES bylo použito 65 % HNO_3 , 39 % HF a H_3BO_3 - všechny v čistotě p.a. (Lachema, Brno, Czech Republic). Kalibrační standardy pro ICP OES stanovení byly připraveny ředěním jednoprvkových standardních roztoků o koncentraci P a Ca $1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$ (Analytica, Prague, Czech Republic) K přípravě nasyceného roztoku H_3BO_3 a k ředění rozložených vzorků a standardů byla použita demineralizovaná voda získaná pomocí zařízení MILLI Q⁺ (Millipore, Bedford, USA).

Příprava standardů a vzorků pro XRF analýzu

Sada standardů pro kalibraci XRF spektrometru byla připravena z reálných vzorků krmných směsí pro skot, drůbež a prasata. V jednotlivých vzorcích byl metodou ICP OES změřen obsah P a Ca. Byly testovány dva způsoby plnění vzorkovnice XRF spektrometru.. V prvním případě byly krmné směsi volně nasypány, ve druhém případě ručně napěchovány do vzorkovnice o vnitřním průměru 15 mm a objemu 1 cm^3 . Takto nadávkované vzorky byly překryty Mylarovou fólií. Analýza byla prováděna v rotačních pozicích autosampleru, který je součástí XRF spektrometru.

Příprava vzorků pro standardní metodu ICP OES

Do PTFE rozkladné nádoby mikrovlnného mineralizátoru bylo naváženo 500 mg vzorku krmné směsi. Ke vzorku bylo nadávkováno 6 ml koncentrované (65%) HNO_3 a 2 ml koncentrované (39%) HF . Po ukončení druhého rozkladného kroku (tab II.) bylo do rozkladné směsi přidáno 8 ml nasyceného (při 20°C) roztoku H_3BO_3 . Po skončení mineralizace byl získaný roztok doplněn demineralizovanou vodou na objem 50ml.

Výsledky a diskuse

Optimalizace parametrů XRF stanovení

K optimalizaci doby expozice a k výběru vhodné techniky dávkování vzorku byly použity závěry testování vlivu těchto dvou parametrů na přesnost stanovení intenzity $K\alpha$ čar P a Ca. V šesti vzorcích krmných směsí byly při šesti časech expozice (5, 10, 15, 20, 25 a 30 s) změřeny intenzity $K\alpha$ čar analytů v Is^{-1} (impulsy za sekundu). Mezi vzorky vybranými pro toto měření byly dva vzorky krmných směsí pro skot, dva pro drůbež a dva pro prasata. Obsahy P a Ca v těchto vzorcích rovnoměrně pokrývaly koncentrační rozsahy následně zvolené pro kalibraci XRF spektrometru. Každý vzorek byl při zvolené době expozice změřen pětkrát. Z těchto pěti měření byla pak podle rovnice (1) vypočtena pro každý prvek v každém vzorku hodnota výběrového variačního koeficientu intenzity signálu V_x .

$$V_x = s / \bar{x} \quad (1)$$

V rovnici (1) je s výběrová směrodatná odchylka a $\bar{x}$ je výběrový aritmetický průměr. Uvedená měření a následné výpočty V_x byly provedeny zvlášť pro každou z testovaných technik dávkování vzorku.

V programu OPGm v modulu dvoufaktorová ANOVA byl testován vliv doby expozice (faktor A) a techniky úpravy vzorku (faktor B) na hodnotu V_x . Výpočtem pro nejobecnější model dvoufaktorové analýzy rozptylu byly získány výsledky uvedené v tabulkách IV a V. Z nejobecnějšího modelu byly v obou případech postupně vypouštěny statisticky nevýznamné faktory, pro něž platil vztah $F_{\text{exp}} < F_{0,95}(1,70) = 3,978$. Zjednodušený model pro P obsahoval po úpravách pouze jediný významný faktor A (způsob dávkování vzorku.), pro který bylo vypočtené $F_{\text{exp}} = 5,991 > F_{0,95}(1,70) = 3,978$. Zjednodušený model pro Ca obsahoval též pouze faktor A. V tomto případě byla vypočtená $F_{\text{exp}} = 9,724$ také vyšší než kritická hodnota $F_{0,95}(1,70) = 3,978$. V případě P i Ca lze proto považovat vliv techniky úpravy vzorku na přesnost měření čar P $K\alpha$ a Ca $K\alpha$ za statisticky významný.

Jako vhodnější technika dávkování vzorku byla pro daný prvek zvolena ta, která poskytovala nižší střední hodnotu V_x . V případě P byla V_{x1} (volně sypaný vzorek) = 5,167 a V_{x2} (napěchovaný vzorek) = 3,510. Pro Ca byly zjištěny hodnoty $V_{x1} = 8,482$ a $V_{x2} = 4,592$. Pro analýzu obou prvků byla proto zvolena technika dávkování vzorku spočívající v jeho napěchování do vzorkovnice XRF spektrometru.

Jelikož nebyl prokázán statisticky významný vliv zvyšování celkové doby expozice na přesnost měření intenzity analytických čar P a Ca, byla pro oba prvky zvolena minimální testovaná doba expozice 5 s.

Kalibrace XRF spektrometru

Pro kalibraci XRF spektrometru bylo použito osmnáct reálných vzorků krmných směsí (šest vzorků krmných směsí pro drůbež, šest pro skot a šest pro prasata) ve kterých byla pomocí ICP OES předem stanovena koncentrace P a Ca. Koncentrační rozpětí použitých standardů bylo pro P 7,8 – 21,8 g kg^{-1} a pro Ca 7,8 – 67,1 g kg^{-1} .

Naměřené hodnoty intenzit $K\alpha$ čar P a Ca zkorigované o hodnotu pozadí byly vyneseny proti hodnotám koncentrací obou prvků. Pro popis experimentálních dat byly navrženy dva regresní modely. První model ve tvaru

$$C_x = \beta_0 + \beta_1 I_x + \beta_2 I_x^2 + \beta_3 (I_x / I_{NC}) \quad (2)$$

a druhý model ve tvaru

$$C_x = \beta_0 + \beta_1 I_x + \beta_2 I_x^2 + \beta_3 I_{NC} + \beta_4 I_{NC}^2 \quad (3)$$

kde C_x je koncentrace měřeného prvku v g kg^{-1} , I_x je intenzita analytické čáry měřeného prvku v Is^{-1} , I_{NC} je intenzita nekoherentního rozptylu Pd rentgenky v Is^{-1} . Možnostmi využití korekce na rozptýlené záření rentgenky k eliminaci vlivu matrice při analýze rostlinného materiálu pomocí WD XRF se zabývá například Garivait a kol. /27/. Ke statistickému testování významnosti jednotlivých parametrů regresních rovnic (2) a (3) prováděném pomocí programu OPGm byla využita metodika popsaná v učebnici /28/. Pro oba modely byla za použití Studentova testu testována nulová hypotéza $H_0: \beta_x = 0$ (pro model (2) $x = 1-3$, pro model (3) $x = 1-4$) proti $H_A: \beta_x \neq 0$. Z obecných regresních modelů popsaných rovnicemi (2) a (3) byly postupně vypouštěny statisticky nevýznamné členy pro které byla přijata H_0 . Pro tyto členy platil vztah $|t| < t_{0,975}(18-m)$, kde m

vyjadřuje počet dosud nevypuštěných členů regresní rovnice. Rovnice (4) popisuje zjednodušený model pro P vzniklý vypuštěním statisticky nevýznamných parametrů z rovnice (2). V případě Ca byla H_0 : zamítnuta pro všechny členy z rovnice (2) a k popisu experimentálních dat byl proto použit model popsáný rovnicí (5).

$$C_P = \beta_0 + \beta_1 I_P^2 + \beta_3 (I_P / I_{NC}) \quad (4)$$

$$C_{Ca} = \beta_0 + \beta_1 I_{Ca} + \beta_2 I_{Ca}^2 + \beta_3 (I_{Ca} / I_{NC}) \quad (5)$$

Rovnice (6) popisuje zjednodušený model pro P, rovnice (7) pro Ca. Oba tyto modely byly vytvořeny vypuštěním statisticky nevýznamných členů z rovnice (3).

$$C_P = \beta_0 + \beta_2 I_P^2 + \beta_3 I_{NC} \quad (6)$$

$$C_{Ca} = \beta_0 + \beta_1 I_{Ca} + \beta_4 I_{NC}^2 \quad (7)$$

Hodnoty parametrů $\beta_1 - \beta_4$ z rovnic (4) – (6), jejich směrodatné odchylky s a hodnoty odpovídajících t-testů jsou shrnuty v **tabulce VI**. V **tabulce VII** jsou uvedeny souhrnné charakteristiky regrese zjednodušených regresních modelů – koeficient determinace R^2 , residuální směrodatná odchylka RSD a Akaikovo informační kritérium. V této tabulce je též uvedena hodnota F-testu významnosti regresního modelu. V případě P i Ca vykazují zjednodušené modely vzniklé z rovnice (3) vyšší hodnoty R^2 a nižší hodnoty AIC a RSD, než modely vzniklé z rovnice (2). Z toho lze usuzovat, že modely odpovídající rovnicím (6) a (7) popisují naměřená data lépe, než modely odpovídající rovnicím (4) a (5). Výsledný kalibrační vztah pro P měl tedy tvar popsáný rovnicí (8), výsledný kalibrační vztah pro Ca je popsán rovnicí (9).

$$C_P = 10,061 \pm 0,682 + (2,163 \cdot 10^{-6} \pm 5,453 \cdot 10^{-8}) I_P^2 - (9,276 \cdot 10^{-4} \pm 1,467 \cdot 10^{-4}) I_{NC} \quad (8)$$

$$C_{Ca} = 14,05 \pm 3,192 + (9,294 \cdot 10^{-4} \pm 3,976 \cdot 10^{-5}) I_{Ca} - (6,164 \cdot 10^{-7} \pm 1,120 \cdot 10^{-7}) I_{NC}^2 \quad (9)$$

Výpočet detekčního limitu XRF

Detekční limit (DL) byl vypočten jako trojnásobek směrodatné odchylky koncentrace P a Ca naměřené za použití metody XRF ve vzorku s nízkou koncentrací obou analytů. Pro výpočet DL byla použita směrodatná odchylka vypočtená z deseti opakovaných měření koncentrace P a Ca v nejnižších kalibračních standardech. Uvedeným postupem byly získány následující hodnoty detekčních limitů: $DL_P = 0,735 \text{ g kg}^{-1}$, $DL_{Ca} = 2,298 \text{ g kg}^{-1}$. Přestože jsou uvedené hodnoty DL poměrně vysoké, lze konstatovat, že přesnost navržené metody je dostačující pro praktické využití při analýze P a Ca. Limita stanovení (SL) definovaná jako desetinásobek směrodatné odchylky koncentrace P a Ca naměřené za použití metody XRF ve vzorku s nízkou koncentrací obou analytů byla v obou případech nižší než koncentrace nejnižšího kalibračního standardu (C_1). $SL_P = 2,45 < C_{1P} = 7,8$ a $SL_{Ca} = 7,66 < C_{1Ca} = 7,8$.

Srovnání výsledků stanovení P a Ca v krmných směsích metodami XRF a ICP OES

V deseti reálných vzorcích krmných směsí byl stanoven obsah P a Ca metodami XRF a ICP OES po mikrovlnné mineralizaci. Pro oba prvky byl použit program OPGm k vyčíslení parametrů následující regresní rovnice

$$C_{XRF} = \beta_0 + \beta_1 C_{ICP} \quad (10)$$

kde C_{XRF} vyjadřuje koncentraci příslušného prvku v g kg^{-1} změřenou metodou WD XRF a C_{ICP} vyjadřuje koncentraci tohoto prvku v g kg^{-1} změřenou metodou ICP OES.

Nulová hypotéza H_0 : $\beta_0 = 0$ byla testována proti alternativní hypotéze H_A : $\beta_0 \neq 0$ za použití Studentova testu. Pro P byla vypočtena hodnota $t = -0,643$, pro Ca $t = 1,037$. V obou případech platí vztah $|t| < t_{0,975}(8) = 2,306$. Je tedy možné přijmout H_0 : a úseky obou přímek považovat za nulové. Pro oba prvky byla stejným způsobem testována i nulová hypotéza H_0 : $\beta_1 = 1$ proti alternativní hypotéze H_A : $\beta_1 \neq 1$. Pro P byla vypočtena

hodnota $t = 0,675$ a pro Ca $t = -1,255$. I v tomto případě byly absolutní hodnoty obou t –testů nižší než kritická hodnota $t_{0,975}(8) = 2,306$ a bylo proto možné v obou případech přijmout H_0 .

Jelikož pro P i Ca regresní přímky odpovídající rovnici (10) procházejí počátkem soustavy souřadnic a jejich směrnice se statisticky významně neliší od 1, je možné prohlásit, že nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi výsledky WD XRF a ICP OES. Výsledky měření koncentrace Ca a P v reálných vzorcích krmných směsí jsou shrnuty v **tabulce VIII**.

Litratura:

- 1) Clum N.J., Fitzpatrick M.P., Dierenfeld E.S., Zoo Biology, 15, 525 – 537, (1996)
- 2) Huyghebaert G., Archiv Fur Geflugelkunde, 61, 53 – 61, (1997)
- 3) Dy Peñaflores V., Aquaculture, 172, 281 – 289, (1999)
- 4) Chyi P., de la Fuente M., Barrado E., Vega M., Philips C., Fresenius J. Anal. Chem, 361, 343-348, (1998)
- 5) Fingerová H., Koplík R., Fresenius J. Anal. Chem., 363, 545 – 549, 363 (1999)
- 6) Mc Guire J.S., Hite D.A., Journal OF AOAC International, 81, 923-930, (1998)
- 7) Anderson K.A., Atomic Spectroscopy, 17, 30-33, (1996)
- 8) Hardisson A., Rubio C., Baez A., Martin M.M., Alvarez R., Eur. Food Res. Technol., 212, 175-181, (2001)
- 9) Rodushkin I., Ruth T., Huhtasaari A., Anal. Chim. Acta, 191-200, (1999)
- 10) Borkowska-Burnecka J., Miazga W., Zyrmicki W., Chem. Anal., 45, 429-438, (2000)
- 11) Oliveira C.C., Sartini R. P., Zagatto E.A.G., Anal. Chim. Acta, 413, 41-48, (2000)
- 12) Goyal S.S., Hafez A.A.R., Rains D.W., Agronomy Journal, 85, 1192-1197, (1993)
- 13) Česká státní norma ČSN 46 7092-11
- 14) Česká státní norma ČSN 46 7092-12
- 15) Ruano-Ramos A., García-Ciudad A., García-Criado B., Animal Feed Sci. and Technol., 77, 331-343, (1999)
- 16) Dealdana B.R.V., Criado B.G., Ciudad A.G., Corona M.E.P., Commun. Soil Sci. Plant Anal., 26, 1383-1396 (1999)
- 17) Deboever J.L., Eeckhout W., Boucque C.V., Netherlands J. Agrikultural Sci., 42, 357-369, (1994)
- 18) Clark R.B., Frank K.D., Zaifnejad M., Denning J.L., Commun. Soil Sci. Plant Anal., 23, 569-583, (1992)
- 19) Richardson D.H.S., Shore M., Hartree R., Richardson R.M., Sci. Total. Environ., 176, 97-105, (1995)
- 20) Kocman V., Terence E., Tomlinson P., Tomlinson G.H., Commun. Soil Sci. Plant Anal., 22, 2063-2075, (1991)
- 21) Guohui L., Shouzhong F., J. Geochem. Explor., 55, 75-80, (1995)
- 22) Omote J., Hisayuki K., Toda K., Anal. Chim. Acta, 307, 117 – 126, (1995)
- 23) Frank D.F., Burch J., Denning J., Commun. Soil Sci. Plant Anal, 23, 17-20, 2415-2424, (1992)
- 24) Nas S., Gokalp H. Y., Sahin Y., Z. Lebensm. Unters. Forch., 196, 32-37, (1993)
- 25) Nielson K.K., Mahoney A.W., Williams L.S., Rogers V.C., J. Agric. Food Chem., 39, 887-892, (1991)
- 26) Pytela O., Chemometrie pro organické chemiky, Univerzita Pardubice, (2000), ISBN 80-7194-309-6
- 27) Garivait S., Quisefit J.P., de Chateauborg P., Malingre G., X-ray Spectrom., 26, 257-264, (1997)
- 28) Meloun M., Militký M., Forina M., Chemometrics For Analytical Chemistry, PC-Aided Regression and Related Methods, vol. 2, Harwood, Chichester, (1994), pp. 24 – 49

Příloha

Tabulka I Podmínky měření stolního vakuového vlnově dispersního rentgenfluorescenčního spektrometru SPEKTROSCAN V

	P	Ca	Pd NC*
Napětí na rentgence	40 kV	40 kV	40 kV
Proud na rentgence	4 mA	1 mA	4 mA
Krystal	PET	COO ₂	LiF 200
Řád spektra	1	1	2
Analytická čára	P K α (6157 mÅ)	Ca K α (3359,6 mÅ)	Pd NC (1234 mÅ)
Korekce pozadí	OFF Peak (-27 mÅ, + 33 mÅ)	Bez korekce	Bez korekce

* Čára nekoherentního rozptylu Pd rentgenky

Tabulka II Rozkladný program mikrovlnného rozkladného zařízení Plazmatronika BM 1S/2

Krok	Čas [min]	Výkon [%]	Chemikálie
1	5	50	HF, HNO ₃
2	5	70	-
3	10	100	-
4	10	100	H ₃ BO ₃
Minimální tlak		28 at	
Maximální tlak		29 at	

Tabulka III Podmínky měření a technické parametry optického emisního spektrometru GBC Integra XL

	P	Ca
Vlnová délka	213,618 nm	396,847 nm
Výška pozorování	6 mm	6 mm
Řád spektra	3	1
Výkon generátoru	1000W	1000 W
Průtok Ar zmlžovačem	0,6 l min ⁻¹	0.6 l min ⁻¹
Otáčky pumpy	10 otáček min ⁻¹	10 otáček min ⁻¹
Napětí na fotonásobiči	600 V	300 V
Doba integrace signálu	1s	1s
Počet opakování	3	3
Korekce pozadí	Fixed ($\pm 0,013$ nm)	Dynamická

Tabulka IV Analýza rozptylu vlivu doby expozice a způsobu dávkování vzorku na V_x intenzity signálu P – výpočet pro nejobecnější model

Faktor	Sum of Squares	Degrees of Freedom	F _{exp}	F _{0,95}	Significance
A	49,42	1	6,139	4,00	Significant
B	85,89	5	2,134	2,36	Nonsignificant
AB	8,41	5	0,209	2,36	Nonsignificant
Residuum	483	60			
Total	626	71			

V_x – výběrový variační koeficient popsáný rovnicí (1)

Faktor A – způsob dávkování vzorku

Faktor B – doba expozice

Tabulka V Analýza rozptylu vlivu doby expozice a způsobu dávkování vzorku na V_x intenzity signálu Ca – výpočet pro nejobecnější model

Faktor	Sum of Squares	Degrees of Freedom	F_{exp}	$F_{0,95}$	Significance
A	272,3	1	7,970	4,00	significant
B	4,011	5	0,023	2,36	Nonsignificant
AB	1,411	5	0,008	2,36	Nonsignificant
Residuum	2050	60			
Total	2328	71			

Faktor A – způsob dávkování vzorku

Faktor B – doba expozice

Tabulka VI Parametry zjednodušených regresních modelů popsaných rovnicemi (4) – (7)

Prvek	Model	Parametr	Hodnota	Směr. odchylka	t-test*
P	1	β_0	4,903	$3,155 \cdot 10^{-1}$	-
		β_1	$1,843 \cdot 10^{-6}$	$1,126 \cdot 10^{-7}$	16,367
		β_3	5,462	1,125	4,855
Ca	1	β_0	- 7,410	3,787	-
		β_1	$1,258 \cdot 10^{-3}$	$2,284 \cdot 10^{-4}$	5,508
		β_2	$-5,467 \cdot 10^{-9}$	$2,476 \cdot 10^{-9}$	2,208
		β_3	$7,730 \cdot 10^{-1}$	$2,946 \cdot 10^{-1}$	2,624
P	2	β_0	$1,006 \cdot 10^1$	$6,817 \cdot 10^{-1}$	-
		β_2	$2,163 \cdot 10^{-6}$	$5,453 \cdot 10^{-8}$	39,667
		β_3	$-9,276 \cdot 10^{-4}$	$1,467 \cdot 10^{-4}$	6,321
Ca	2	β_0	$1,405 \cdot 10^1$	3,192	-
		β_1	$9,294 \cdot 10^{-4}$	$3,976 \cdot 10^{-5}$	23,376
		β_4	$-6,164 \cdot 10^{-7}$	$1,120 \cdot 10^{-7}$	5,50

* $t_{0,975} (15) = 2,131$; $t_{0,975} (14) = 2,145$

Tabulka VII Souhrn. statistic. charakteristiky regrese pro jednotl. regres. modely popsané rovnicemi (4) – (7)

Prvek	Model	R^2	RSD	AIC	F-test*
P	1	99,05	$5,235 \cdot 10^{-1}$	$-1,93 \cdot 10^1$	$7,782 \cdot 10^2$
P	2	99,33	$4,38 \cdot 10^{-1}$	$-2,57 \cdot 10^1$	$1,112 \cdot 10^3$
Ca	1	98,19	3,06	$4,626 \cdot 10^1$	$2,526 \cdot 10^2$
Ca	2	98,90	2,30	$3,399 \cdot 10^1$	$6,751 \cdot 10^2$

* $F_{0,95} (2,15) = 3,682$; $F_{0,95} (3,14) = 3,344$

Tabulka VIII Výsledky měření obsahu Ca a P (v g kg^{-1}) v reálných vzorcích krmných směsí za použití ICP OES po mikrovlnné mineralizaci a XRF

Vzorek	C_P		C_{Ca}	
	ICP OES	XRF	ICP OES	XRF
A	11,10	11,66	15,22	14,81
B	14,20	14,24	26,06	27,65
C	12,07	12,23	13,59	13,54
D	6,87	7,06	36,90	39,55
E	10,02	9,38	47,88	46,65
F	11,57	11,75	27,22	28,38
G	6,79	6,47	42,04	39,85
H	8,09	7,58	50,62	48,02
I	7,36	7,43	12,97	13,24
J	7,84	8,13	11,04	10,95