

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2016

Ročník XX, číslo 3/2016

Brno 2016

Obsah

1	Ověření homogenity vzorku pro sledování mykotoxinů Martina Čumová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno	1
2	Zavedení stanovení HBCD metodou LC-MS/MS Petra Kosubová, Klára Kantošová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno	17
3	Zavedení metody pro stanovení (horkou) vodou extrahovatelného uhlíku Stanislav Malý Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB NRL Hroznová 2, 656 06 Brno	24
4	Vývoj kalibračních rovnic na sušinu a dusíkaté látky ve vzorcích žita setého metodou FT-NIR spektroskopie David Čížmár, Radvana Šulová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno	37

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Ověření homogenity vzorku pro sledování mykotoxinů

Martina Čumová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno
Hroznová 2, 656 06 Brno
martina.cumova@ukzuz.cz

1 Úvod

V roce 2013 se v Římě uskutečnilo Výroční setkání konsorcia Národních referenčních laboratoří pro mykotoxiny. Příspěvek účastníka setkání ze švédské NRL se zabýval přípravou vzorku pro sledování mykotoxinů - způsobem mletí, homogenizací a umenšením vzorku. V současnosti mnoho laboratoří neprovádí pravidelné testy homogenity vzorku. V této práci byl navržen postup pro ověření homogenity přípravy vzorku pro sledování vybraných mykotoxinů. Tento postup byl aplikován na vzorky, které byly připraveny podle JPP ÚKZÚZ 10575.1 Multireziduální metoda stanovení mykotoxinů metodou LC-MS/MS.

2 Teoretická část

Vyšetření přítomnosti kontaminantů musí mít co nejvyšší vypovídací schopnost. Pozornost se tedy věnuje nejen samotné analýze, ale především přípravě vzorku a jeho odběru pro zajištění dostatečně reprezentativního vzorku. Právě odběr vzorků pro sledování mykotoxinů je nejkřehčím článkem v postupu jejich analýzy. Chybné vzorkování materiálu a odběr poměrné části z celkového odebraného vzorku tvoří podle mnohých autorů okolo 90 % celkové chyby mykotoxinové analytiky [1]. Na vině je totiž nízká koncentrace těchto látek v dané komoditě a jejich nerovnoměrné rozložení. Mikroskopické vláknité houby (plísně), které mykotoxiny produkují, se běžně vyskytují v izolovaných místech, tzv. ohniscích či ložiscích [2, 3].

V souvislosti se zajištěním co nejvyššího stupně reprezentativnosti laboratorního vzorku byla vypracována pravidla, která uvádí Vyhláška Ministerstva zemědělství 211/2004 Sb. a její přílohy [4]. Metody odběru vzorku a metody analýzy pro úřední kontroly množství mykotoxinů

v potravinách jsou dány Nařízením 401/2006/ES [5]. Tento dokument zahrnuje i opatření v případě heterogenní distribuce mykotoxinů ve vzorkovaném materiálu [2]. Obecně platí, že homogenita vzorku pro testování v laboratoři může být zvýšena použitím vyšší navážky. Neustále je však zapotřebí klást důraz na homogenizaci vzorku například mletím na velmi jemné částice s následným promíslením.

Vzorky pro sledování mykotoxinů se v NRL ÚKZÚZ homogenizují pomocí mlýnu VM7 (KOVO-PROGRES, Hranice, ČR) (Obrázek 1).



Obrázek 1. Mlýn VM7 pro homogenizaci vzorků určených pro sledování mykotoxinů.

3 Praktická část

Mlýn VM7 (KOVO-PROGRES, Hranice, ČR), je určen k jemnému mletí suchých zrnitých a vláknitých materiálů v dávkách do 150 g a pro kontinuální mletí. Technické specifikace tohoto zařízení jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Technické údaje mlýnu VM7.

Parametr	Specifikace
Typ	286
Příkon	2,2 kW
Maximální vstup zrna	10 mm, ojediněle 15 mm
Výstupní zrnitost	(0,5 – 1) mm podle síta
Otáčky nožů	9000 ot/min
Napájecí napětí	3 × 380 V, 50 Hz
Rozměry	(225 × 460 × 500) cm
Hmotnost	40 kg

Pro hodnocení homogenity vzorků připravených pomocí mlýnu VM7 byly vybrány tři rozdílné materiály, které reprezentují většinu materiálů, které se na daném zařízení homogenizují. Zároveň byla výběrová kritéria podrobena specifické kontaminaci každého vzorku tak, aby bylo hodnoceno co nejvíce parametrů.

Vzorky byly následně analyzovány metodou podle JPP ÚKZÚZ 10575.1 Multireziduální metoda stanovení mykotoxinů metodou LC-MS/MS. Analyty byly ze vzorku extrahovány pomocí modifikované QuEChERS metody s následnou analýzou ultraúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí (UPLC-MS/MS). Soupis vzorků a sledovaných analytů je uveden v Tabulce 2.

Analyzováno bylo vždy 12 navážek z každého vzorku, a to v paralelním měření. Pro vyhodnocení homogenity se postupovalo podle ISO 13528:2005. Získaná data byla vyhodnocena pomocí softwarové sady Microsoft Office Excel 2010 a získané protokoly jsou přílohou k této práci.

4 Výsledky a diskuse

Homogenita mletí na mlýnu VM7 byla ověřena podle ISO 13528:2005. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 2. Podrobné ověření homogenity je uvedeno pro každý vzorek a každý analyt zvlášť v přílohách této práce.

Tabulka 2. Ověření homogenity vzorků pro analýzu mykotoxinů připravených pomocí mlýnu VM7 (KOVO-PROGRES, Hranice, ČR).

Vzorky	Vz. 913/2014	Vz. 1165/2014	Vz. 1443/2014
Deoxynivalenol (DON)	OK	NA	OK
Zearalenon (ZON)	OK	NA	OK
Ochratoxin A (OTA)	NA	OK	NA
Enniatin B (ENB)	NA	OK	OK
Fumonisin B1 (FB1)	NA	NA	OK
T-2 toxin (T-2)	NA	NA	OK
Beauvericin (BEA)	NA	NA	OK
Enniatin B1 (ENB1)	NA	NA	OK
Materiál	Kukuřice	Tritikále	Doplňková krmná směs

NA... příslušný parametr nebyl analyzován

5 Závěr

V rámci práce byla ověřena homogenita vzorků připravených pomocí mlýnu VM7. Používaný mlýn poskytuje dostatečně homogenní materiál pro analýzu mykotoxinů v krmivech a surovinách pro jejich výrobu.

6 Příloha

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			1443-DON	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_{t..}$	between-test- portion ranges (B.5), w_t
1	847.05	752.7	799.875	94.35
2	803.61	883.4	843.505	79.79
3	831.36	819.2	825.28	12.16
4	803.17	711.79	757.48	91.38
5	831.88	776.63	804.255	55.25
6	845.02	816.11	830.565	28.91
7	738.55	749.47	744.01	10.92
8	699.93	816.19	758.06	116.26
9	825.17	822.15	823.66	3.02
10	690.22	728.2	709.21	37.98
11	780.26	796.77	788.515	16.51
12	812.12	683.98	748.05	128.14
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
number of samples g			12	
general average (B.6)			786.03875	
STD of sample averages (B.7), s_x			42.08241568	
within-samples STD (B.8), s_w			49.76384301	
between-samples STD (B.9), s_s			23.0805042	
Expected standard deviation for proficiency assessment				172.928525
Homogeneity		ok		
Měřeno na XEVO				

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			913-DON	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_t$	between-test- portion ranges (B.5), w_t
1	184.89	306.63	245.76	121.74
2	194.19	311.94	253.065	117.75
3	171.66	279.75	225.705	108.09
4	221.39	246.58	233.985	25.19
5	350.55	321.42	335.985	29.13
6	278.06	314.84	296.45	36.78
7	220.98	204.37	212.675	16.61
8	331.67	177.06	254.365	154.61
9	180.25	256.93	218.59	76.68
10	204.84	283.58	244.21	78.74
11	311.26	199.66	255.46	111.6
12	278.61	205.66	242.135	72.95
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
number of samples g			12	
general average (B.6)			251.5320833	
STD of sample averages (B.7), s_x			34.27289589	
within-samples STD (B.8), s_w			63.65310162	
between-samples STD (B.9), s_s			0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				55.33705833
Homogeneity		ok		
Měřeno na XEVO				

Homogeneity check
(ISO 13528 Annex B)

913-ZON

Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_{t..}$	between-test- portion ranges (B.5), w_t
1	11.57	22.25	16.91	10.68
2	15.24	16.56	15.9	1.32
3	7.75	7.7	7.725	0.05
4	7.48	12.07	9.775	4.59
5	17.28	17.58	17.43	0.3
6	27.85	30.31	29.08	2.46
7	59.36	10.3	34.83	49.06
8	67.59	11.49	39.54	56.1
9	8.25	35.4	21.825	27.15
10	6.27	45.41	25.84	39.14
11	13.37	18.44	15.905	5.07
12	23.12	11.04	17.08	12.08
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
number of samples g			12	
general average (B.6)			20.98666667	
STD of sample averages (B.7), s_x			9.645656897	
within-samples STD (B.8), s_w			18.41399377	
between-samples STD (B.9), s_s			0	

Expected standard deviation for proficiency assessment

4.617066667

Homogeneity

ok

Měřeno na XEVO

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			1165-OTA	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_{t..}$	between-test- portion ranges (B.5), w_t
1	9.21	2.58	5.895	6.63
2	11.24	1.66	6.45	9.58
3	8.51	6.58	7.545	1.93
4	9.2	6.73	7.965	2.47
5	3.44	1.99	2.715	1.45
6	6.22	2.84	4.53	3.38
7	13.97	3.49	8.73	10.48
8	18	4.22	11.11	13.78
9	1.61	7.04	4.325	5.43
10	1.13	4.39	2.76	3.26
11	6.53	9.13	7.83	2.6
12	4.16	6.94	5.55	2.78
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
number of samples g			12	
general average (B.6)			6.28375	
STD of sample averages (B.7), s_x			2.50213284	
within-samples STD (B.8), s_w			4.625138286	
between-samples STD (B.9), s_s			0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				1.382425
Homogeneity		ok		
Měřeno na XEVO				

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			1165-ENB	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_{t,}$	between-test- portion ranges (B.5), w_t
1	24.28	30.82	27.55	6.54
2	24.31	30.83	27.57	6.52
3	31.1	47.41	39.255	16.31
4	30.52	47.87	39.195	17.35
5	24.52	53.1	38.81	28.58
6	24.62	52.93	38.775	28.31
7	27.98	36.29	32.135	8.31
8	28.8	35.93	32.365	7.13
9	40.61	44.96	42.785	4.35
10	40.76	44.62	42.69	3.86
11	43.87	42.72	43.295	1.15
12	43.93	43.49	43.71	0.44
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
number of samples g			12	
general average (B.6)			37.34458333	
STD of sample averages (B.7), s_x			5.945030185	
within-samples STD (B.8), s_w			10.05365667	
between-samples STD (B.9), s_s			0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				8.215808333
Homogeneity		ok		
Měřeno na XEVO				

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			1443-FB1	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_{t..}$	between-test- portion ranges (B.5), w_t
1	236.08	273.37	254.725	37.29
2	300.9	276.69	288.795	24.21
3	325.18	249.14	287.16	76.04
4	372.59	269.05	320.82	103.54
5	329.55	250.78	290.165	78.77
6	306.99	241.43	274.21	65.56
7	286.27	269.64	277.955	16.63
8	229.09	262.31	245.7	33.22
9	221.17	237.37	229.27	16.2
10	270.08	256.07	263.075	14.01
11	278	248.65	263.325	29.35
12	307.5	264.36	285.93	43.14
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
number of samples g			12	
general average (B.6)			273.4275	
STD of sample averages (B.7), s_x			24.13235281	
within-samples STD (B.8), s_w			37.38506576	
between-samples STD (B.9), s_s			0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				60.15405
Homogeneity		ok		
Měřeno na XEVO				

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			1443-T-2	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_{t..}$	between-test- portion ranges (B.5), w_t
1	6.76	3.7	5.23	3.06
2	10.93	6.98	8.955	3.95
3	7.35	8.45	7.9	1.1
4	7.86	6.17	7.015	1.69
5	5.78	6.08	5.93	0.3
6	8.94	4.88	6.91	4.06
7	6.5	6.43	6.465	0.07
8	4.28	7.3	5.79	3.02
9	6.23	4.93	5.58	1.3
10	7.49	4.6	6.045	2.89
11	10.9	4.59	7.745	6.31
12	6.37	7.33	6.85	0.96
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
number of samples g			12	
general average (B.6)			6.70125	
STD of sample averages (B.7), s_x			1.091429682	
within-samples STD (B.8), s_w			2.096732577	
between-samples STD (B.9), s_s			0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				1.474275
Homogeneity		ok		
Měreno na XEVO				

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			1443-ZON	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_{t,}$	between-test- portion ranges (B.5), w_t
1	183.95	186.99	185.47	3.04
2	196.93	169.94	183.435	26.99
3	194.14	174.71	184.425	19.43
4	192.02	159.56	175.79	32.46
5	197.54	162.07	179.805	35.47
6	195.38	162.85	179.115	32.53
7	161.22	155.04	158.13	6.18
8	193.82	189.07	191.445	4.75
9	189.33	173.07	181.2	16.26
10	192.7	152.66	172.68	40.04
11	187.66	174.33	180.995	13.33
12	176.44	181.45	178.945	5.01
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
number of samples g			12	
general average (B.6)			179.28625	
STD of sample averages (B.7), s_x			8.202788917	
within-samples STD (B.8), s_w			16.6036305	
between-samples STD (B.9), s_s			0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				39.442975
Homogeneity		ok		
Měřeno na XEVO				

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			1443-ENB	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_{t..}$	between-test- portion ranges (B.5), w_t
1	103.88	79.29	91.585	24.59
2	102	78.03	90.015	23.97
3	79.96	87.95	83.955	7.99
4	81.4	88.19	84.795	6.79
5	82.87	77.95	80.41	4.92
6	81.61	79.59	80.6	2.02
7	85.54	100.2	92.87	14.66
8	85.96	98.14	92.05	12.18
9	82.47	86.02	84.245	3.55
10	82.03	88.91	85.47	6.88
11	76.62	79.9	78.26	3.28
12	77.3	80.07	78.685	2.77
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
number of samples g			12	
general average (B.6)			85.245	
STD of sample averages (B.7), s_x			5.283692321	
within-samples STD (B.8), s_w			8.56128933	
between-samples STD (B.9), s_s			0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				18.7539
Homogeneity		ok		
Měřeno na XEVO				

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)			1443-BEA	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_{t..}$	between-test- portion ranges (B.5), w_t
1	121.6	99.94	110.77	21.66
2	123.35	99.44	111.395	23.91
3	121.9	98.05	109.975	23.85
4	119.31	96.32	107.815	22.99
5	109.55	88.09	98.82	21.46
6	108.72	87.92	98.32	20.8
7	81.18	98.14	89.66	16.96
8	82.13	100.03	91.08	17.9
9	98.68	89.18	93.93	9.5
10	96.99	90.31	93.65	6.68
11	93.62	83.28	88.45	10.34
12	93.67	84.27	88.97	9.4
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
number of samples g			12	
general average (B.6)			98.56958333	
STD of sample averages (B.7), s_x			9.069370395	
within-samples STD (B.8), s_w			12.86075668	
between-samples STD (B.9), s_s			0	
Expected standard deviation for proficiency assessment				21.68530833
Homogeneity		ok		
Měřeno na XEVO				

Homogeneity check (ISO 13528 Annex B)				1443-ENB1	
Sample t	value#1, $x_{t,1}$	value#2, $x_{t,2}$	sample average (B.4), $\bar{x}_{t..}$	between-test- portion ranges (B.5), w_t	
1	32.53	25.01	28.77	7.52	
2	33.27	25.39	29.33	7.88	
3	25.79	31.98	28.885	6.19	
4	25.53	32.53	29.03	7	
5	26.35	24.71	25.53	1.64	
6	27.47	24.65	26.06	2.82	
7	27.1	27.91	27.505	0.81	
8	26.56	27.57	27.065	1.01	
9	26.44	26.54	26.49	0.1	
10	26.69	27.89	27.29	1.2	
11	25.26	23.87	24.565	1.39	
12	25.07	24.44	24.755	0.63	
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
number of samples g			12		
general average (B.6)			27.10625		
STD of sample averages (B.7), s_x			1.671081747		
within-samples STD (B.8), s_w			3.041779222		
between-samples STD (B.9), s_s			0		

7 Literatura

1. SÝKOLOVÁ S, NEDĚLNÍK J: Mykotoxiny – stav výskytu v zemědělských surovinách a krmivech v ČR a v Evropě. Vědecký výbor fytosanitárního a životního prostředí, 2003. [Online]. Citováno dne: 15. 3. 2012. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-15-03.pdf>
2. STEJSKAL V, FRANKOVÁ M: Sborník ze semináře: Metody odběru a analýzy vzorků, komodit, potravin a půdy. Praha, Ministerstvo zemědělství České republiky, 2009: p. 94.

3. RASMUSSEN RR, STORM IM, RASMUSSEN PH, SMEDSGAARD J, NIELSEN KF: Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(2): 765-776.
4. RASMUSSEN RR, STORM IM, RASMUSSEN PH, SMEDSGAARD J, NIELSEN KF: Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(2): 765-776.
5. EU: Nařízení komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách. 2006.

Zavedení stanovení HBCD metodou LC-MS/MS

Petra Kosubová, Klára Kantošová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno
Hroznová 2, 656 06 Brno
petra.kosubova@ukzuz.cz

1 Úvod

Hexabromocyklododekany (HBCD) patří mezi bromované zpomalovače hoření, které se používají ve stavebním průmyslu jako součást polystyrenových pěn využívaných k tepelným izolacím budov. HBCD vykazují charakteristiky perzistentních organických polutantů a jsou zařazeny do seznamu Stockholmské úmluvy. V rámci projektu „Rizika a přínosy aplikace exogenní organické hmoty na půdu” bylo navrženo sledování těchto látek. Jelikož stanovení těchto analytů nebylo na pracovišti zavedeno, bylo nutné navrhnout a ověřit postup přípravy vzorků půd a organických materiálů a postup měření metodou LC-MS/MS.

2 Teoretická část

Exogenní organické materiály (EOM), např. komposty a digestáty, mohou mít po zapracování do půdy mnoho pozitivních vlivů, jako je zlepšení kvality půdy a její úrodnosti (1). Tyto materiály ale mohou být kontaminovány různými organickými látkami, které mohou mít nežádoucí vliv na zdraví lidí a volně žijících zvířat. Informací o obsahu, osudu a efektech organických polutantů v těchto materiálech je známo velmi málo (2, 3). Jedním z cílů projektu bylo zjistit výskyt HBCD ve vybraných EOM a studovat dopad jejich aplikace na kontaminaci půd v rámci nádobových a polních experimentů.

HBCD se používaly jako bromované zpomalovače hoření např. v elektronických zařízeních, plastových a textilních výrobcích. V současnosti je jejich používání značně omezeno Stockholmskou konvencí o POPs. Dočasnou výjimku představuje použití HBCD ve stavebnictví při výrobě polystyrenových isolačních pěn. I přes omezenou výrobu a používání jsou tyto kontaminanty stále detekovány v životním prostředí a odpadních materiálech jako jsou čistírenské kaly, komunální bioodpad nebo vedlejší produkty

průmyslových výrob (4). Pokud se mají tyto odpadní materiály používat v zemědělství jako hnojiva, měly by být hodnoceny na základě kontrolní analýzy.

V současnosti není k dispozici žádný normovaný postup určený pro analýzu HBCD. V rámci práce byl na základě literární rešerše vybrán postup přípravy založený na extrakci do směsi organických rozpouštědel a přečištění pomocí disperzní extrakce na tuhou fázi (DSPE) (5). Koncové stanovení bylo provedeno pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS), přičemž pro kvantifikaci byla využita metoda izotopového ředění a vnitřního standardu. Uvedená metoda byla ověřena pro stanovení HBCD v půdních vzorcích a dalších organických materiálech a aplikována při řešení výše zmiňovaného projektu.

3 Praktická část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Standardy a referenční materiály

Standardy o koncentraci 50 µg/ml toluenu (Wellington Laboratories, Kanada):

α-1,2,5,6,9,10-hexabromocyklododekan,

β-1,2,5,6,9,10-hexabromocyklododekan,

γ-1,2,5,6,9,10-hexabromocyklododekan,

izotopově značený α-1,2,5,6,9,10-hexabromo[¹³C₁₂]cyklododekan (IS1),

izotopově značený γ-1,2,5,6,9,10-hexabromo[¹³C₁₂]cyklododekan (IS2).

3.1.2 Chemikálie

Dichlormethan (Merck), acetonitril (Merck), methanol (Merck), PSA sorbent (Supelco), kyselina octová o čistotě LC-MS (Sigma-Aldrich), deionizovaná voda.

3.1.3 Laboratorní pomůcky a vybavení pro přípravu vzorku

Analytické váhy (Sartorius), ultrazvuková lázeň Ecoson (Labicom), odstředivka Sigma 2-16K (Sigma), vysokorychlostní míchadlo (Vortex), polypropylenové zkumavky (15 ml), koncentrátor Termovap (Ecom), stříkačky (2 ml), stříkačkové PTFE filtry (0,2 µm), dávkovače Hamilton, automatické pipety, skleněné vialky, běžné laboratorní vybavení a laboratorní sklo.

3.1.4 Postup přípravy

Do 15ml plastové zkumavky byl navážen 1 g upraveného vzorku a byl obohacen vnitřním standardem (IS1). Vzorek byl extrahován v ultrazvukové lázni 15 min. 5 ml 50% dichlormethanu v acetonitrilu. Poté byl extrakt odstředěn, supernatant byl odebrán do čisté zkumavky a extrakce byla ještě jednou opakována. Spojený extrakt byl zkoncentrován pod proudem dusíku na objem 2 ml a byl přečištěn DSPE sorbentem PSA (100 mg). Poté byl extrakt znovu odstředěn a supernatant byl zkoncentrován pod proudem dusíku téměř do sucha a následně doplněn methanolem na objem 0,5 ml. Po promíchání byl extrakt filtrován přes 0,2 µm PTFE filtr do vialky a obohacen nástřikovým standardem (IS2) (6).

3.1.5 Přístrojové vybavení a podmínky pro koncové stanovení

Extrakt byly analyzovány pomocí ultraúčinného kapalinového chromatografu ve spojení s trojnásobným kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (Acquity UPLC – TQ MS Xevo, Waters, USA). Chromatografická separace byla provedena na koloně Acquity UPLC® BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 µm) gradientovou elucí mobilní fáze složené z methanolu (0,1% CH₃COOH) a deionizované vody (0,1% CH₃COOH). Průtok byl 0,6 ml/min. Teplota kolony byla 50 °C a objem nástřiku 5 µl. Ionizace byla provedena elektrosprejem v negativním módu a MS detekce probíhala v režimu sledování vybraných přechodů (MRM). Pro kvantifikaci byl použit specifický přechod: [M-H]⁻ → [Br]⁻.

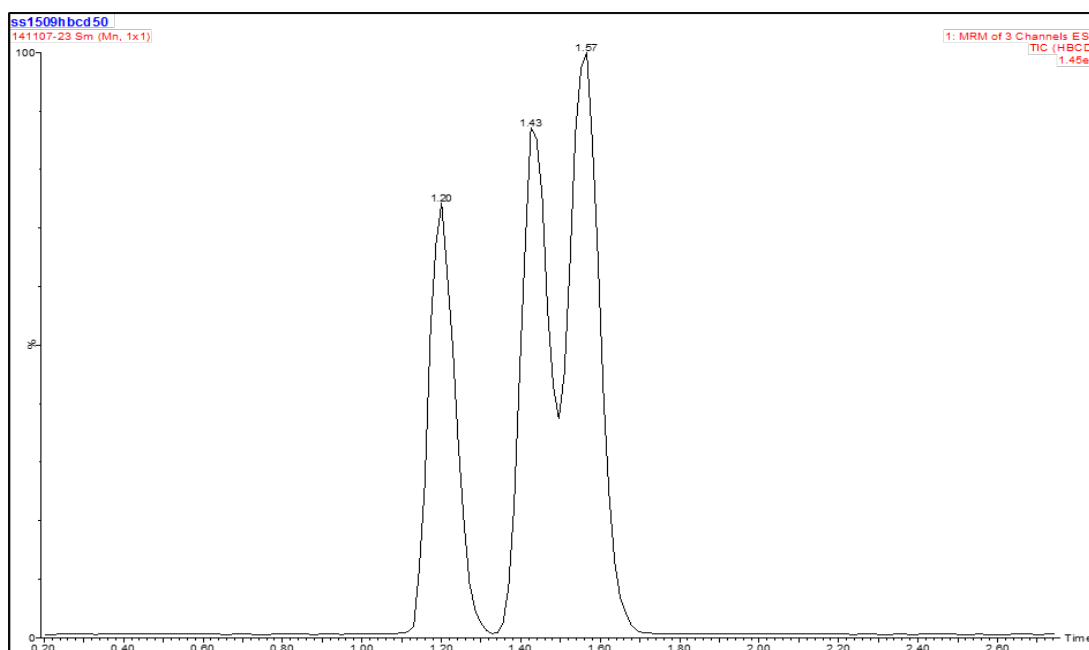
3.2 Výsledky a diskuse

3.2.1. Pracovní charakteristiky metody

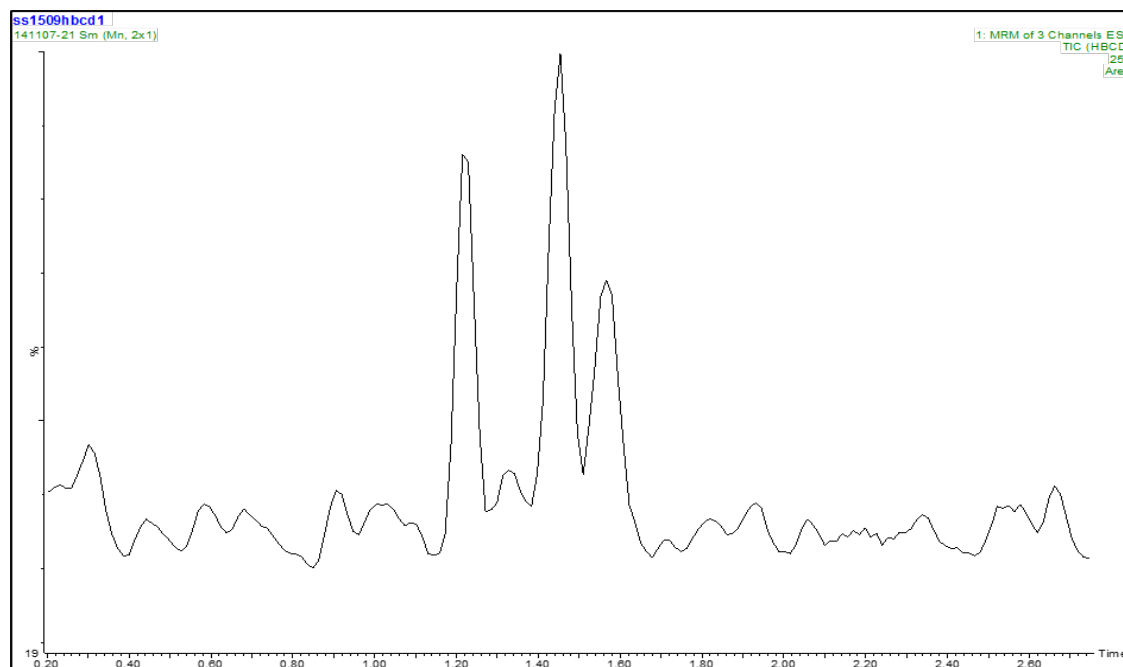
S použitím uvedených měřicích podmínek bylo dosaženo chromatografické separace sledovaných isomerů HBCD (viz Obrázek 1), což bylo nezbytné pro správnou kvantifikaci jednotlivých isomerů. Limit kvantifikace 0,5 ng/g byl odvozen z poměru signálu k šumu z chromatogramu nejnižšího kalibračního bodu (viz Obrázek 2) a kalibrace byla pro jednotlivé isomery provedena v rozsahu 0,5 ng/g až 250 ng/g (viz Obrázek 3).

Referenční materiály nejsou pro HBCD k dispozici. Správnost metody byla tudíž stanovena pomocí výtěžnosti vnitřního standardu, ¹³C₁₂-α-HBCD (IS1). Vzorek půdy byl před extrakcí touto látkou obohacen na hladině 12,5 ng/g a jeho obsah stanoven pomocí ¹³C₁₂-γ-HBCD (IS2) přidaného do finálního extraktu před měřením taktéž na hladině 12,5 ng/g. Analýzou 176 půdních vzorků bylo zjištěno, že postup vykazuje výtěžnost 82 % a relativní

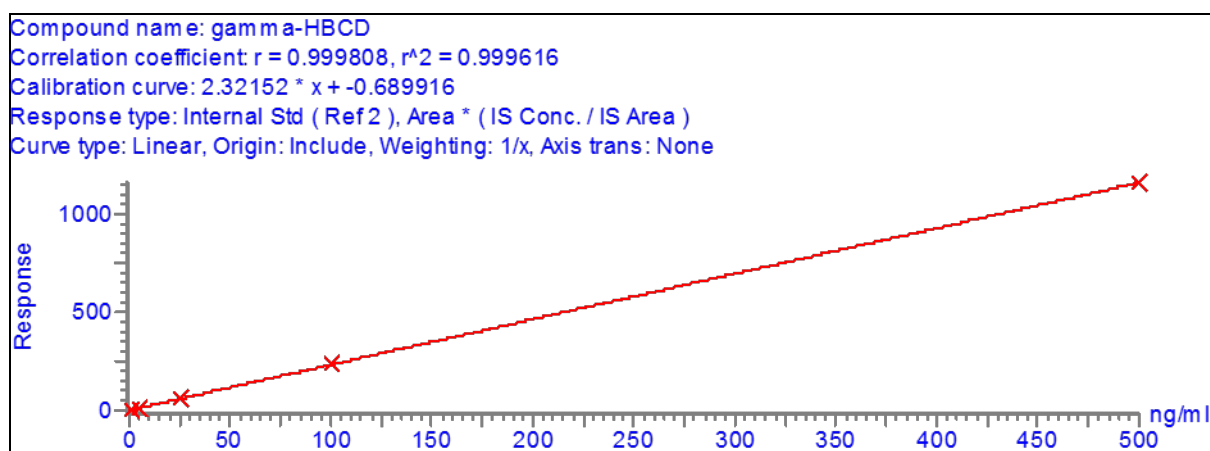
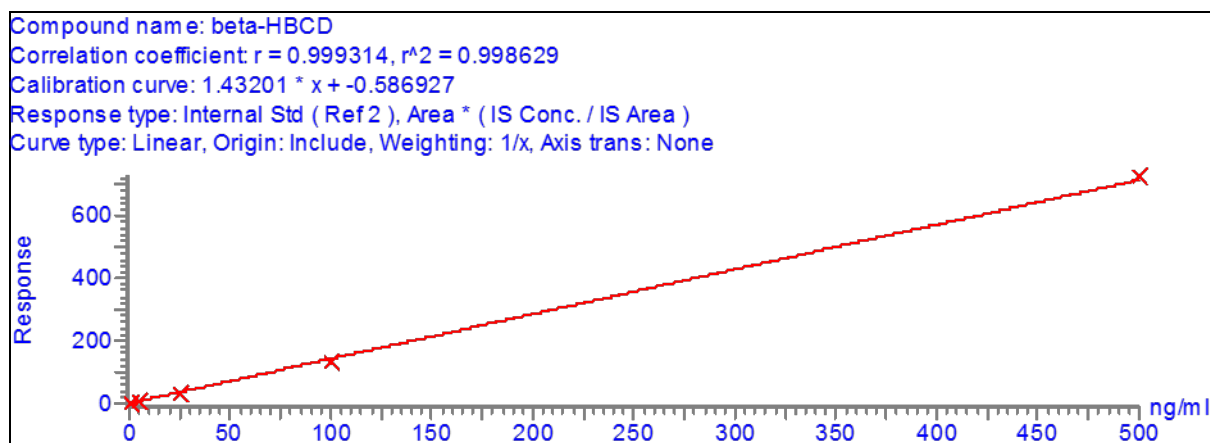
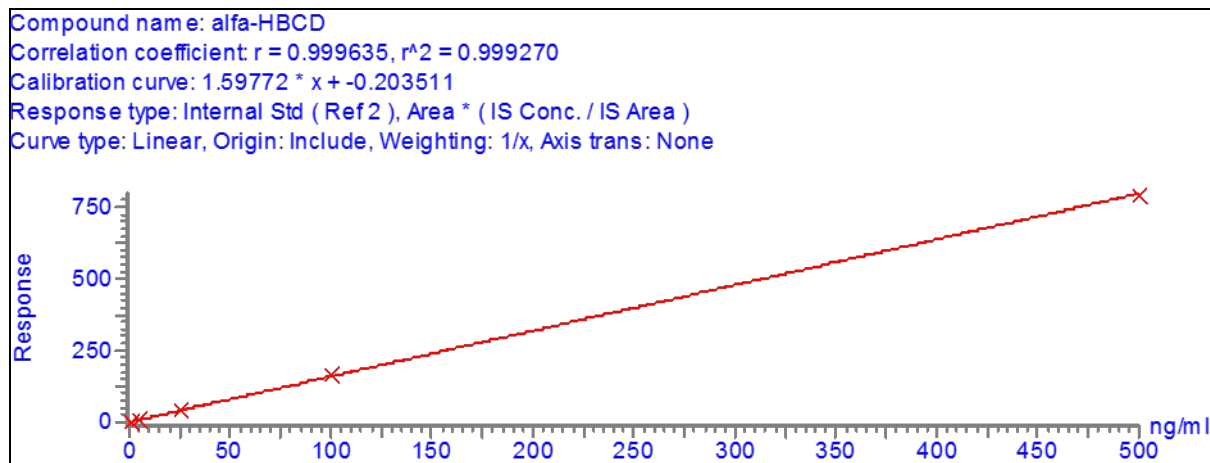
standardní odchylku 16 % stanovenou za podmínek reprodukovatelnosti. Stanovené parametry vyhovují minimálním požadavkům pro správnost a přesnost analytické metody uvedeným ve směrnici 2002/657/ES (7).



Obrázek 1. Chromatografická separace isomerů HBCD na koloně Acquity UPLC BEH C18.



Obrázek 2. Chromatogram nejnižšího kalibračního bodu odpovídající 0,5 ng/g.



Obrázek 3: Kalibrační závislosti isomerů HBCD.

3.2.2. Analýza reálných vzorků

Ověřeným postupem bylo nejprve připraveno a analyzováno 7 vzorků testovaných kompostů a digestátů (viz Tabulka 1). HBCD nebyly detekovány v masokostní moučce a digestátu z řízků cukrové řepy. Nejvyšší obsah HBCD byl stanoven v kompostu z domovního odpadu. Nálezy HBCD v EOM nebyly hodnoceny, protože v současnosti neexistuje žádný legislativní předpis v rámci EU určující maximální limity pro obsah HBCD v kompostech a digestátech. Dále byla provedena analýza HBCD ve 244 vzorcích půd. S výjimkou 3 vzorků, ve kterých byl stanoven γ -HBCD na hladinách nižších než 1 ng/g, byly všechny nálezy pod LOQ nebo nebyly HBCD ve vzorcích vůbec detekovány (8).

Tabulka 1. Obsahy HBCD v testovaných kompostech a digestátech.

EOM	Ag	Ra	Dg	Mb	Sm	Bp	Dw	LOQ
Obsah sumy 3 isomerů HBCD (mg/kg sušiny)	0,035	0,032	0,002	ND	0,002	ND	0,130	0,002
ND – nedetekováno, LOQ –kvantifikační limit								

4 Závěr

Uvedená metoda byla ověřena pro stanovení HBCD v abiotických matricích. Metoda poskytla pracovní charakteristiky, které vyhovují legislativním požadavkům. Ověřená metoda byla uplatněna při řešení mezinárodního projektu, jehož cílem bylo studium kontaminace exogenní organické hmoty a jejího vlivu při aplikaci na půdu. Výskyt HBCD v testovaných materiálech nebylo možné posoudit, protože nebyl k dispozici žádný právní předpis definující maximální přípustné obsahy v kompostech a digestátech. V půdních vzorcích byly nálezy HBCD zcela ojedinělé.

5 Literatura

1. Berner A, Bieri M, Galli U, Fuchs JG, Mayer J, Schleiss, K (2004) Effects of Composts and Digestate on the Environment, Soil Fertility and Plant Health. Review of the Current Literature. FiBL-Report, The PDF can be downloaded at <http://orgprints.org/2631/>.
2. Brändli RC, Bucheli TD, Kupper T, Furrer R, Stahel WA, Stadelmann FX, Tarradellas J (2007) Organic pollutants in compost and digestate. Part 1. Polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons and molecular markers. J Environ Monit 9: 456–464.

3. Lasaridi K, Protopapa I, Kotsou M, Pilidis G, Manios T, Kyriacou A (2006) Quality assessment of composts in the Greek market: the need for standards and quality assurance. *J Environ Manage* 80: 58–65.
4. Stockholmská úmluva o persistentních organických látkách z 22. května 2001, <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>
5. GARCÍA-VALCÁRCEL, Ana Isabel a José Luis TADEO. Determination of hexabromocyclododecane isomers in sewage sludge by LC-MS/MS. *Journal of Separation Science*. 2009, vol. 32, issue 22, s. 3890-3897. DOI: 10.1002/jssc.200900424.
6. Bieganski A, Malý S, Franc M, Tuf I, Váňa M, Brzezinska M, Siebielec G, Lipiec J, Šarapatka B (eds.) *Laboratory manual* (2015). Central Institute For Supervising and Testing in Agriculture, 121 pp.
7. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
8. Kosubová P, Galazka R: Vliv exogenní organické hmoty na chemické vlastnosti půdy: Aplikace exogenní organické hmoty na půdu a riziko kontaminace stopovými prvky a persistentními organickými polutanty. Editoři: Malý S, Siebielec G: *Testování exogenní organické hmoty pro bezpečnou aplikaci na půdu* (2015). Publikace k projektu „Rizika a přínosy aplikace exogenní organické hmoty na půdu“. ÚKZÚZ Brno, p. 5 – 13.

Zavedení metody pro stanovení (horkou) vodou extrahovatelného uhlíku

Stanislav Malý

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno
stanislav.maly@ukzuz.cz

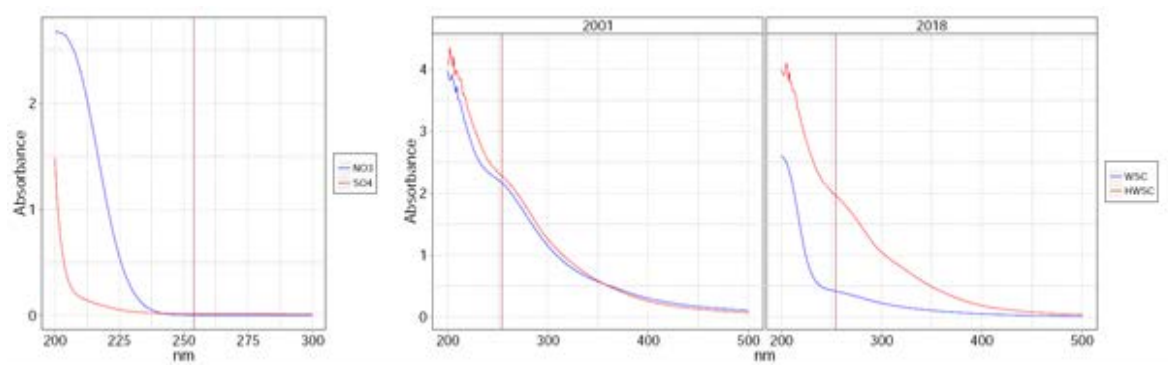
1 Úvod

Půdní organická hmota (SOM, soil organic matter) je nepostradatelná pro řadu klíčových funkcí a procesů, které půda zajišťuje pro fungování celého ekosystému. Jako příklad můžeme uvést agregaci půdních částic a s ní související ochranu proti erozi, schopnost půdy zadržovat vodu, vázat organické polutanty a tím snižovat jejich biodostupnost, vázat minerální živiny a bránit jejich vyplavování, sloužit jako substrát půdním mikroorganismům a bezobratlým a ovlivňovat tepelný režim půdy (Blanco-Canqui, 2013). Uvedené funkce SOM souvisejí s její strukturou a vazbou na minerální částice. Předložená práce se zabývá zavedením metody pro stanovení labilní frakce SOM. Pro extrakci se používá buď voda, kdy se získají zejména nízkomolekulární sloučeniny snadno využitelné půdními mikroorganismy (WSC, z ang. water soluble C) nebo horká voda, pomocí které dochází k extrakci mikrobiální biomasy, extracelulárních enzymů a některých polymerních sloučenin (HWSC, z ang. hot water soluble C), které ovlivňují půdní agregaci. Jak WSC, tak HWSC jsou považovány za časný indikátor změn v obsahu SOM vlivem změněných vnějších podmínek, jako je např. způsob obhospodařování půdy (Ghani et al. 2003; Uchida et al., 2012). Za účelem kvalitativního hodnocení SOM byla v uvedených extraktech změřena spektra v UV oblasti. Pro statistickou analýzu byly vzaty hodnoty absorbance při 254 nm, která odpovídá aromatickým skupinám (Matilainen, 2011). Při této vlnové délce již neabsorbují dusičnany a sírany, jejichž přítomnost znemožňuje charakterizaci SOM při kratších vlnových délkách (obrázek 1).

Cílem práce bylo:

1. Zavést metodu pro stanovení WSC a HWSC.
2. Stanovit meze detekce a opakovatelnosti.
3. Vyhodnotit, jakým způsobem ovlivňuje obhospodařování půdy obsah WSC a HWSC.
4. Popsat, jakým způsobem je WSC a HWSC ovlivněno sušením.

5. Popsat vztahy WSC a HWSC s půdními fyzikálně-chemickými a mikrobiologickými charakteristikami.



Obrázek 1. Spektra dusičnanů ($c = 4 \mu\text{g NO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{ml}^{-1}$), síranů ($c = 0,5 \text{ mol SO}_4^{2-} \cdot \text{ml}^{-1}$) a vodných extraktů dvou vybraných půd v UV a viditelné oblasti. Hnědá vertikální čára označuje vlnovou délku 254 nm. HWSC – horkou vodou extrahovatelný C, WSC – vodou extrahovatelný C.

2 Princip

Metoda extrakce vychází z práce Ghani et al. (2003). Půdní vzorek se třepě s vodou při laboratorní teplotě, odstředí se, dekantuje a roztok se filtruje ($0,45 \mu\text{m}$). Ve filtrátu se stanoví celkový uhlík (WSC). K půdě po dekantaci se přidá voda a půdní suspenze se inkubuje 16 h při 80°C . Poté se vzorek odstředí, dekantuje a ve filtrátu ($0,45 \mu\text{m}$) se stanoví celkový uhlík (HWSC). Uhlík byl stanoven pomocí metody 31020.1 Stanovení oxidovatelného uhlíku v půdním extraktu (K_2SO_4).

3 Materiál a metody

3.1 Půdy

Půdní vzorky byly odebírány v rámci monitoringu mikrobiálních vlastností půd ČR. Z celkového počtu 45 lokalit je 28 lokalit na orných půdách, devět na trvalých travních porostech (TTP) a na sedmi došlo během sledovaného období (1993 - 2014) ke změně způsobu obhospodařování. Ve všech případech se jednalo o zatravnění orné půdy, ke kterému došlo v období 1995 – 2005 (data pro jednotlivé plochy jsou dostupná). Ze statistického hodnocení byla vyloučena půda s označením 9117 odebraná na lokalitě Cikar v CHKO Třeboňsko. Důvodem byly extrémně nízké hodnoty některých dříve stanovených mikrobiologických

parametrů (uhlík mikrobiální biomasy, bazální a substrátem indukovaná respirace). Podle sdělení správy CHKO se pravděpodobně jednalo o důsledek rozrytí plochy divokými prasaty.

Vzorky byly po odběru uloženy v ledniče, prosety (2 mm) a zamraženy (-20 °C). Analýzy byly prováděny v období srpen – září 2015. Vzorky byly rozmrazovány přes noc v ledniče a ihned poté byla zahájena extrakce. Pro zjištění, jakým způsobem sušení při laboratorní teplotě ovlivňuje obsah WSC a HWSC bylo vybráno 22 vzorků pokrývajících interval nalezených hodnot WSC/HWSC s přihlédnutím k rozsahu pH (1 M KCl) a obsahu jílovitých částic (< 0,002 mm). V těchto vzorcích byl stanoven WSC a HWSC stejným způsobem jako v čerstvých půdách. Do každé série byl vkládán vzorek orné půdy s interním označením KXV-4, který laboratoř používá pro tvorbu regulačních diagramů.

Přehled základních fyzikálně-chemických a mikrobiologických půdních vlastností shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1. Základní fyzikálně-chemické a mikrobiologické půdní charakteristiky.

	Obhospodař.	pH 1M KCl	Jíl (%)	C _{ox} (%)	MBC (μg.g ⁻¹)	R _B	R _S
Minimum	Orná (n = 28)	4,5	3,68	1,08	100	0,69	6,5
Medián	Orná	5,6	19,0	1,75	173	1,23	20,0
Maximum	Orná	7,5	54,3	3,91	514	4,86	54,5
Minimum	TTP (n = 9)	3,7	6,17	2,23	221	0,80	14,8
Medián	TTP	4,6	16,8	2,59	393	2,82	22,1
Maximum	TTP	7,5	44,8	5,82	1399	6,72	69,1
Minimum	Změna (n = 7)	4,0	11,1	1,51	185	0,66	13,8
Medián	Změna	4,3	13,9	2,18	384	2,65	32,3
Maximum	Změna	7,6	25,5	3,02	599	3,71	47,8

C_{ox} – oxidovatelný uhlík; Jíl – obsah částic menších než 0,002 mm; MBC – uhlík mikrobiální biomasy, R_B – bazální respirace (μg O₂.g⁻¹.h⁻¹), R_S – substrátem indukovaná respirace (μg O₂.g⁻¹.h⁻¹), TTP – trvalý travní porost, Změna – plochy, na kterých došlo ke změně obhospodařování

3.2 Půdní fyzikálně-chemické a mikrobiologické charakteristiky

Fyzikálně-chemické a mikrobiologické analýzy půd byly provedeny podle Jednotných pracovních postupů ÚKZÚZ (Zbírál et al., 2010; Zbírál et al., 2011). Obsah uhlíku v nefumigovaných půdách při stanovení uhlíku mikrobiální biomasy (MBC) je označen jako C_{ext} . Bazální respirace (R_B) a substrátem indukovaná respirace (R_S) byly stanoveny jako spotřeba O_2 .

3.3 Přístroje a pomůcky

1. Termostat s teplotou udržovanou na $(20 \pm 2) ^\circ C$, s třepačkou ($250 \text{ kyvů} \cdot \text{min}^{-1}$).
2. Vodní lázeň s teplotou udržovanou na $(80 \pm 2) ^\circ C$.
3. Centrifuga s rotorem pro zkumavky (6).
4. Vortex.
5. Sestava pro membránovou filtraci (nálevka pro membránovou filtraci, odsávačka, membránová vývěva).
6. Zkumavky centrifugační, 85ml, se šroubovacím víčkem.
7. Kádinky 250ml.
8. Nitrocelulózové membránové filtry, průměr 50mm, velikost pórů $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. Je třeba se vyhnout dlouhodobému skladování, které vede k uvolnění látek zvyšující pozadí.

Seznam obsahuje přístroje a pomůcky pro extrakci. Zařízení pro analýzu uhlíku jsou uvedena v postupu 31020.1 Stanovení oxidovatelného uhlíku v půdním extraktu (K_2SO_4).

3.4 Pracovní postup

Vodou extrahovatelný uhlík (WSC)

Do centrifugační zkumavky se ve třech opakováních naváží 3 g půdy odpovídající sušině. Ke vzorku se přidá 30 ml vody. Vzniklá suspenze se třepá 30 min na třepačce při $20^\circ C$ při frekvenci $250 \text{ kyvů} \cdot \text{min}^{-1}$. Poté se suspenze centrifuguje 20 min při 5500 g. Supernatant se dekantuje a zfiltruje přes membránový filtr do kádinky. Filtrát se skladuje v ledničce, pokud bude analýza probíhat během následujících dvou dnů, jinak se zamrazí ($-20 ^\circ C$). Paralelně se zfiltruje 30 ml vody jako blank.

Horkou vodou extrahovatelný uhlík (HWSC)

K sedimentu ve zkumavce se přidá dalších 30 ml vody. Vzorek se vortexuje do vytvoření suspenze při $1200 \text{ kyvů} \cdot \text{min}^{-1}$. Suspenze se poté inkubuje na vodní lázni 16 h při $80 ^\circ C$.

Po skončení inkubace se opakuje vortexace (10 s), centrifugace a filtrace. Vzorek se uchovává v ledničce maximálně dva dny, jinak se zamrazí (-20 °C).

Stanovení oxidovatelného uhlíku v extraktech a měření spekter

Uhlík byl stanoven metodou 31020.1 Stanovení oxidovatelného uhlíku v půdním extraktu (K₂SO₄). Díky nízkým koncentracím WSC byla řada standardů rozšířena o koncentrace 1 µg C.ml⁻¹ a 3 µg C.ml⁻¹. Spektra extraktů byla měřena v rozsahu vlnových délek 200 nm až 500 nm po 1 nm. Pro obě analýzy byl použit spektrofotometr Specord 50 (Jena Analytik).

3.5 Výpočet

$$WSC (\mu g \cdot g^{-1}) = C (\mu g \cdot ml^{-1}) \times \frac{V + \frac{w \cdot m}{100}}{m}$$

WSC (µg.g ⁻¹)	obsah vodou extrahovatelného oxidovatelného uhlíku v půdním vzorku přepočtený na sušinu,
C (µg.ml ⁻¹)	koncentrace oxidovatelného uhlíku v extraktu odečtená z kalibrační křivky
V	objem extrakčního činidla (ml),
m	navážka suché půdy (g), které odpovídá dané navážce čerstvé půdy,
w	obsah vody vyjádřený jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

Výpočet HWSC se provádí podle stejného vzorce jako WSC.

3.6 Statistické vyhodnocení a grafické zpracování dat

Data byla vyhodnocena a graficky zpracována pomocí programu R 3.2.1 (R Development Core Team, 2015). Grafy byly vytvořeny pomocí balíčku ggplot2 (Wickham, 2009). Pro zjištění vlivu obhospodařování (orná půda, TTP) byl použit t-test, pro hodnocení vlivu sušení párový t-test. Korelace byla spočítána jako Pearsonův korelační koeficient, parciální korelační koeficienty byly vypočítány pomocí balíčku corpcor (Schaefer et al., 2015).

4 Výsledky a diskuse

4.1 Verifikační parametry

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) byly vypočteny jako součet mediánu a dvojnásobku (LOD), resp. desetinásobku (LOQ) mediánu absolutních odchylek hodnot slepých pokusů ($n = 13$). Slepé pokusy byly připraveny filtrací 30 ml vody přes membránový filtr, který byl identifikován jako hlavní zdroj možného zvýšení pozadí. Nalezená hodnota LOD činila $3,18 \mu\text{g C.ml}^{-1}$, LOQ $7,43 \text{ C.ml}^{-1}$. Relativně vysoká hodnota LOQ je pravděpodobně výsledkem nedostatečné citlivosti analytické metody při koncentracích nižších než $3 \mu\text{g C/ml}$, jak ukázaly kalibrační křivky (data nejsou zobrazena).

Opakovatelnost

Opakovatelnost byla stanovena jako směrodatná odchylka dvanácti měření vzorku KXV-4 vkládaného do jednotlivých sérií. Díky extrémně nízkým hodnotám WSC bylo možno stanovit opakovatelnost pouze pro HWSC a hodnoty A_{254} v obou extraktech. Výsledky shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2. Hodnoty opakovatelnosti ($n=12$) pro HWSC a A_{254} .

	HWSC	A_{254} (WSC)	A_{254} (HWSC)
Průměr	271	1,368	1,001
Směrodatná odchylka	19,2	0,110	0,070
Variační koef. (%)	7,11	7,99	6,56

Průměrná hodnota HWSC je v $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Robustnost

Bylo zjišťováno, jakým způsobem odstředování ovlivňuje hodnoty HWSC a A_{254} ve vzorku KXV-4. Starší práce Jandla a Sollinse (1996) používá při stanovení extrahovatelného uhlíku odstředování při 6500 g . Naopak práce Ghaniho et al. (2003) a následně většina autorů uvádí odstředování při 3500 ot.min^{-1} , přestože takový údaj bez znalosti poloměru použitého rotoru neumožňuje stanovení g , které je z tohoto pohledu rozhodující. V našem experimentu byly porovnány výsledky získané při odstředování extraktů při 3500 ot.min^{-1} (tj. 1370 g) a 7000 ot.min^{-1} (tj. 5470 g). Výsledky shrnuje tabulka 3.

Tabulka 3. Porovnání hodnot HWSC a A₂₅₄ v závislosti na síle odstředování.

	HWSC	A ₂₅₄
Průměr (3500 ot.min⁻¹, n = 3)	265	0,894
Průměr (7000 ot.min⁻¹, n = 3)	271	0,931
p-hodnota (t-test)	0,035	0,232

Průměrné hodnoty HWSC jsou v $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Přestože nalezný rozdíl v HWSC je statisticky signifikantní, vliv odstředovací síly je velmi nízký, rozdíl mezi oběma průměrnými hodnotami činil pouze 2,26 %.

Dále bylo zjišťováno, jakým způsobem doba odstředování (10 min, 20 min) ovlivňuje výše uvedené parametry. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4. Porovnání hodnot HWSC a A₂₅₄ v závislosti na době odstředování při 7000 ot.min⁻¹

	HWSC	A ₂₅₄
Průměr (10 min, n = 3)	271	0,982
Průměr (20 min, n = 3)	271	0,931
p-hodnota (t-test)	0,917	0,032

Při delší době odstředování došlo k poklesu A₂₅₄ o 5,19 %, hodnoty HWSC nebyly ovlivněny.

4.2 Deskriptivní statistika a vliv obhospodařování půdy

Popisná statistika parametrů, které charakterizují labilní frakci organické hmoty, je uvedena v tabulce 5. Z celkového počtu 44 půd se u 28 z nich hodnoty WSC nacházely pod mezí stanovitelnosti, která po přepočtu na sušinu činila o něco více než $73,4 \mu\text{g.g}^{-1}$, odlišně pro každou půdu kvůli různému obsahu vody. Tyto půdy nejsou do výpočtů uvedených v odstavci 4.2 zahrnuty. To znemožňuje činit obecnější závěry a lze pouze konstatovat, že procentuální obsah WSC z C_{ox} se pohyboval v desetinách procent. Vliv způsobu obhospodařování půdy (orná, TTP) na SOM byl zřetelnější v případě HWSC ($p < 0,01$) než v případě C_{ox} ($p < 0,05$). To potvrzuje relativně vyšší citlivost labilní frakce uhlíku na agrotechnické zásahy v porovnání s celkovým uhlíkem. Obsah HWSC dosahoval jednotek procent z C_{ox} a uvedený poměr byl nižší v půdách orných než v travních ($p < 0,001$). To je pravděpodobně způsobeno lepší agregací travních půd díky absenci orby, což vede

k příznivějším podmínkám pro růst mikroorganismů. Hodnoty mediánů HWSC a poměru HWSC/C_{ox} zatravněných orných půd se nacházely mezi půdami ornými a TTP.

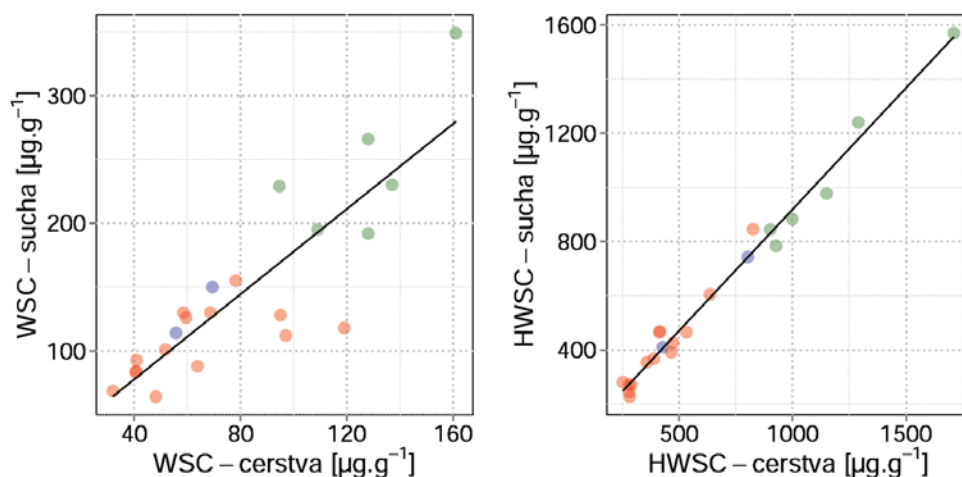
Tabulka 5. Popisná statistika parametrů charakterizující labilní frakci SOM.

	Obhospodař.	WSC μg.g⁻¹	HWSC μg.g⁻¹	HWSC / C_{ox} %
Minimum	Orná (n = 28) ¹	78,0	253	1,42
1. kvartil	Orná	-	305	2,10
Medián	Orná	91,2	397	2,30
3. kvartil	Orná	-	462	2,64
Maximum	Orná	119	893	3,49
Minimum	TTP (n = 9) ¹	94,1	470	2,11
Medián	TTP	128	928	3,06
Maximum	TTP	161	1710	3,89
Minimum	Změna (n = 7) ¹	76,0	228	1,49
Medián	Změna	79,1	622	2,84
Maximum	Změna	83,0	983	3,68

¹ – v případě WSC je celkový počet půd 6 (Orná), 7 (TTP) a 3 (Změna). Kvartily byly spočteny pouze pro orné půdy, v ostatních případech nebyl pro výpočet k dispozici dostatečný počet vzorků. Podobně tomu bylo v případě WSC, kde byla statistika spočtena z hodnot, které se nacházely nad LOQ. C_{ox} – oxidovatelný C, HWSC – horkou vodou extrahovatelný C, TTP – trvalý travní porost, WSC – vodou extrahovatelný C, Změna – plochy, na kterých došlo ke změně obhospodařování.

4.3 Vliv sušení na obsah WSC a HWSC

Standardně se obsah WSC a HWSC stanovuje v čerstvých půdách. To přináší jednak zvýšené nároky na transport a skladování vzorků, jednak znemožňuje analýzu archivovaných půd. Proto byl proveden experiment s cílem stanovit, do jaké míry je obsah WSC a HWSC ovlivněn sušením. Z celkového počtu 22 vzorků použitých pro tento experiment jich 12 mělo hodnoty WSC nižší než LOQ. Těsné proložení bodů zobrazující půdy s obsahem WSC pod 80 μg.g⁻¹ v čerstvých vzorcích regresní přímkou vztahu mezi hodnotami v čerstvých a suchých půdách (obr. 2a) ale naznačuje, že kritérium pro výpočet LOQ je značně konzervativní. Proto bylo použito při výpočtu deskriptivní statistiky, v případě regresních modelů (odst. 4.3, 4.4) byly do analýzy vzaty všechny půdy při vědomí nutnosti hodnotit výsledky WSC s opatrností a brát je spíše jako ukazatel pro plánování dalších experimentů.

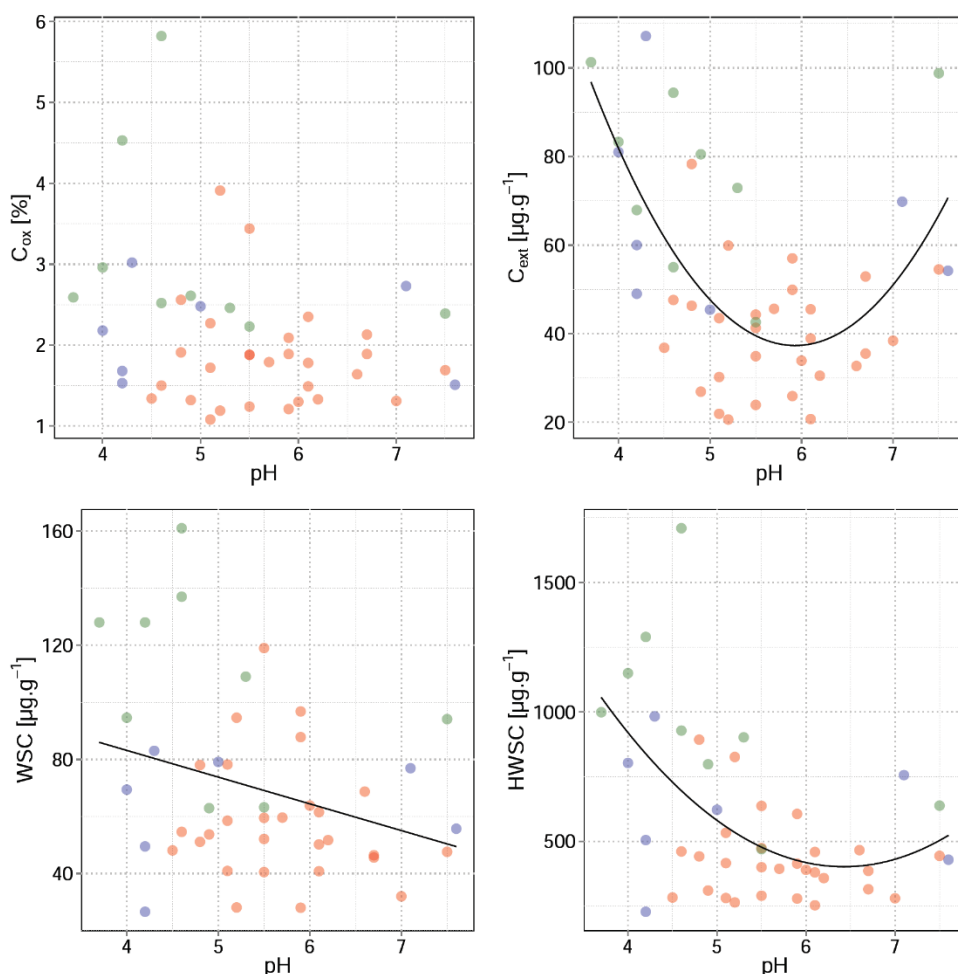


Obrázek 2. Vliv sušení na WSC (a) a HWSC (b). HWSC – horkou vodou extrahovatelný C, WSC – vodou extrahovatelný C. Červená – orná půda, modrá – půdy se změnou obhospodařování, zelená – TTP.

Sušení vedlo k výraznému zvýšení obsahu WSC, které v průměru činilo 85,2 % ($p < 0,001$). Pravděpodobně se jedná o látky uvolněné z buněk mikroorganismů, které byly usmrceny během sušení a o výsledek desorpce nízkomolekulárních organických sloučenin z povrchů půdních částic. Vztah mezi obsahem WSC v půdách před a po sušení je nicméně vysoce signifikantní ($r^2 = 0,734$; $p < 0,001$). Rozdíly v obou hodnotách jsou výraznější v půdách s vyšším obsahem WSC (obrázek 2a). Nebyl zjištěn vliv pH a obsahu jílu na nalezené rozdíly (data nejsou ukázána). Vliv sušení na HWSC byl zcela odlišný. Jednak došlo ke zvýšení HWSC, v průměru se ale jednalo pouze o 5,81 % ($p < 0,01$). Vztah mezi hodnotami HWSC v čerstvých a suchých půdách byl navíc velmi těsný ($r^2 = 0,984$; $p < 0,001$) (obrázek 2b).

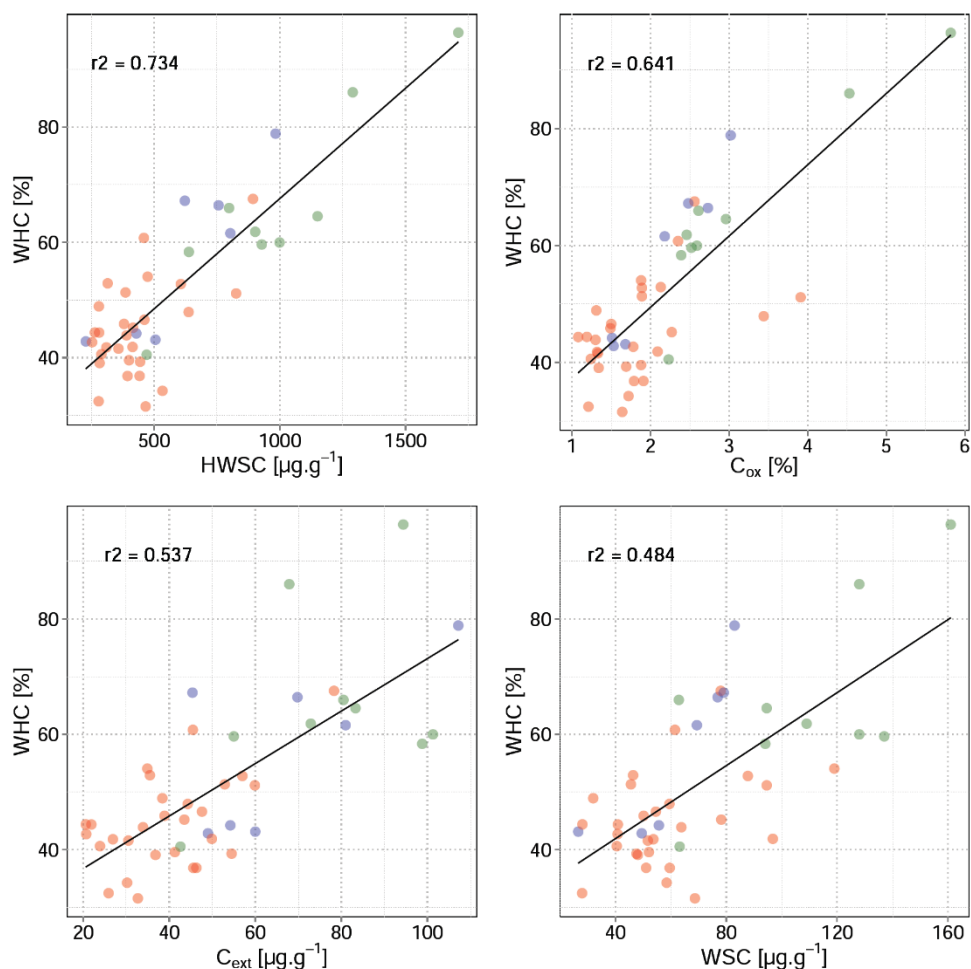
4.4 Vzájemné vztahy mezi WSC, HWSC a ostatními fyzikálně-chemickými a mikrobiologickými půdními vlastnostmi

Regresní analýza neprokázala vliv obsahu jílovitých částic na C_{ox} , WSC a HWSC. V případě pH bylo nalezeno minimum C_{ext} a HWSC v půdách s hodnotami pH kolem 6,0, resp. 6,5 (obrázky 3b, 3c). Tuto skutečnost lze vysvětlit zvýšenou aktivitou půdních mikroorganismů při pH blízké se neutrálnímu, což v konečném důsledku vede k vyšší spotřebě labilního substrátu. Naopak viditelný negativní trend mezi pH a C_{ox} , patrný z grafu (obrázek 3a), nebyl na rozdíl od WSC signifikantní. To ukazuje na nižší citlivost celkového obsahu organické hmoty k pH.



Obr. 3. Vztah mezi pH (1 M KCl) a C_{ox} (a), C_{ext} (b), WSC (c) a HWSC (d). C_{ox} – oxidovatelný C, C_{ext} – extrahovatelný C (0,5 M K_2SO_4), HWSC – horkou vodou extrahovatelný C, WSC – vodou extrahovatelný C. Proložení bodů provedeno pomocí lineární regrese, v případě obr. b a d s kvadratickým členem. Červená – orná půda, modrá – půdy se změnou obhospodařování, zelená – TTP.

Důležitou vlastností SOM je schopnost zadržovat vodu. Jako pomocný parametr pro stanovení optimálního obsahu vody při měření respirace byla stanovována maximální vodní kapacita (WHC, water holding capacity). Ačkoliv se nejedná o charakteristiku používanou půdními fyziky, z hlediska srovnávacího má potřebnou vypovídací hodnotu. Z obrázku 4 vyplývá, že těsnost vztahu mezi WHC a jednotlivými frakcemi SOM klesala v pořadí $HWSC > C_{ox} > C_{ext} > WSC$. Nejvyšší hodnota regresního koeficientu r^2 v případě HWSC pravděpodobně souvisí se skutečností, že tato frakce obsahuje organickou hmotu pocházející ze zlyzovaných mikrobiálních buněk, které jsou klíčové pro tvorbu půdních agregátů a tím pádem i pro vodní režim půdy.



Obrázek 4. Vztah mezi maximální vodní kapacitou WHC a půdní organickou hmotou. C_{ox} – oxidovatelný C, C_{ext} – extrahovatelný C (0,5M K_2SO_4), HWSC – horkou vodou extrahovatelný C, WSC – vodou extrahovatelný C. Červená – orná půda, modrá – půdy se změnou obhospodařování, zelená – TTP.

Mikrobiální parametry charakterizující mikrobiální biomasu a mineralizační aktivitu úzce korelovaly s jednotlivými frakcemi SOM (tabulka 6). Skutečnost, že nejvyšší korelační koeficienty byly nalezeny v případě HWSC lze vysvětlit tím, že tato frakce obsahuje jak uhlík mikrobiální biomasy, tak uhlík sloužící jako substrát. Vysoké korelační koeficienty v případě C_{ox} nejsou pravidlem, protože pouze určitá část SOM je daných podmínek mikroorganismy využitelná.

Tabulka 6. Korelační koeficienty mezi frakcemi SOM a mikrobiálními parametry.

	MBC	R_B	R_S
C_{ox}	0,807	0,810	0,577
HWSC	0,866	0,867	0,611
WSC	0,675	0,736	0,505
C_{ext}	0,661	0,717	0,518

Všechny uvedené koeficienty jsou signifikantní ($p < 0,05$). C_{ox} – oxidovatelný C, C_{ext} – extrahovatelný C (0,5M K₂SO₄), HWSC – horkou vodou extrahovatelný C, MBC – C mikrobiální biomasy, R_B – bazální respirace, R_S – substrátem indukované respirace, WSC – vodou extrahovatelný C.

Korelační analýza prokázala negativní vztah mezi MBC a A₂₅₄. To ukazuje, že složitější látky aromatické povahy jsou obtížněji využitelné pro syntézu mikrobiální biomasy. Protože A₂₅₄ závisí na obsahu organických sloučenin, byla pro statistické hodnocení použita parciální korelace. Ta umožňuje odfiltrovat vztah mezi koncentrací C a MBC, jinými slovy spočítat korelační koeficient mezi MBC a A₂₅₄ jako by koncentrace organické hmoty ve vodných extraktech byla konstantní. V případě HWSC byl tento vztah vysoce signifikantní ($r = -0,478$; $p < 0,01$), v případě WSC byl mírně nad hranicí signifikantnosti ($r = -0,286$; $p = 0,063$).

Zavěrem je třeba zdůraznit, že těsnější vztahy HWSC s půdními charakteristikami v porovnání s WSC jsou s vysokou pravděpodobností do značné míry důsledkem přesnějšího stanovení HWSC.

5 Závěr

V rámci práce byly zavedeny postupy pro extrakci WSC a HWSC. Věrohodné stanovení WSC vyžaduje citlivější analytickou metodu než je použitá fotometrická. HWSC lze spolehlivě stanovit stávající metodou v čerstvých i suchých půdách. Analýza ukázala vyšší citlivost labilní frakce SOM v porovnání s C_{ox} vzhledem k obhospodařování půdy, půdním a mikrobiologickým vlastnostem.

6 Literatura

1. Blanco-Canqui H., Shapiro C.A., Wortmann C.S., Drijber R.A., Mamo M., Shaver T.M., Ferguson R.B. Soil organic carbon: The value to soil properties. Journal of Soil and Water Conservation, **2013**, 129A-134A.

2. Ghani A., Dexter M., Perrott K.W. Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilisation, grazing and cultivation. *Soil Biology and Biochemistry*, **2003**, 1231–1243.
3. Jandl R., Sollins P. Water-extractable soil carbon in relation to the belowground carbon cycle. *Biology and Fertility of Soils*, **1997**, 196-201.
4. Matilainen A., Gjessing E.T., Lahtinen T., Hed L., Bhatnagar A., Sillanpää M. An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere*, **2011**, 1431-1442.
5. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, **2015**, Vienna, Austria.
6. Schaefer J., Opgen-Rhein R., Zuber V., Miiika, Ahdesmaeki A., Silva P.D., Strimmer K. corpcor: Efficient estimation of covariance and (partial) correlation. R package version 1.6.8., **2012**.
7. Uchida Y., Nishimura S., Akiyama H. The relationship of water-soluble carbon and hot-water-soluble carbon with soil respiration in agricultural fields. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, **2012**, 116-122.
8. Wickham H. ggplot2: elegant graphics for data analysis. **2009**, Springer New York.
9. Zbíral J., Honsa I. Et al. Jednotné pracovní postupy, Analýza půd I. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, **2010**, 253 s.
10. Zbíral J., Malý S., Váňa M.. Jednotné pracovní postupy, Analýza půd III. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, **2011**, 290 s.

Vývoj kalibračních rovnic na sušinu a dusíkaté látky ve vzorcích žita setého metodou FT-NIR spektroskopie

David Čížmár, Radvana Šulová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno
Hroznová 2, 656 06 Brno
david.cizmar@ukzuz.cz

1 Souhrn

Metodou FT-NIR spektroskopie byly vytvořeny a optimalizovány kalibrační modely pro stanovení obsahu sušiny a N-látek ve vzorcích žita setého. Všechny vzorky pocházely z laboratoře odrůdového zkušebnictví. Ve vzorcích byly známy koncentrační obsahy sledovaných parametrů, které byly získány pomocí laboratorních referenčních metod (LRM). Příslušné kalibrační modely pak byly následně ověřeny pomocí Studentova t testu na porovnání dvou analytických metod. Výsledky ukázaly, že metoda FT-NIR spektroskopie je vhodná pro stanovení obsahu sušiny a N-látek ve vzorcích žita setého.

2 Úvod

Obilniny tvoří ekonomicky, agronomicky i spotřebitelsky nejdůležitější skupinu plodin v celé struktuře rostlinné výroby. Mají rozhodující postavení ve výživě člověka, protože patří mezi hlavní energetickou složku potravy. Kromě lidské výživy slouží celé rostliny nebo zrna ke krmení hospodářských zvířat. Výhodou většiny obilnin je vysoká koncentrace v nich obsažených užitečných látek. K nejvýznamnějším obilninám v ČR patří pšenice, ječmen, žito, oves, tritikale a kukuřice.

Obilniny jsou jednoleté plodiny. Jarní formy se sejí a sklízí v jednom vegetačním období. Ozimé obilniny se vysévají počátkem podzimu a sklízí se v létě následujícího roku.

V současné době u nás převažují ozimé formy obilnin. Díky delší vegetační době ve srovnání s jarními formami mají ozimé obilniny větší časový prostor na tvorbu asimilačního aparátu a výnosotvorných prvků a dosahují vyššího sklizňového výnosu. Ozimé formy jsou rozhodující při pěstování pšenice obecné, pšenice tvrdé, ječmene, žita (výhradně), tritikale (výhradně).

V této práci se věnuje pozornost žitu setému.

Žito seté (*Secale cereale*) je obilnina z čeledi lipnicovitých (Poaceae). Staroslověnský název žita je rež. Pro pěstování žita jsou vhodnější vyšší nadmořské polohy, a proto se pěstuje především v severní a střední Evropě a také v Asii. Žito se v České republice nejvíce pěstuje v podhorských oblastech jižních, východních a západních Čech.

Žito se vyskytuje ve formě ozimé a jarní. V zemědělství se upřednostňuje forma ozimá. Je důležité, aby obilky neobsahovaly námel, který je jedovatý. Tato obilovina je nenáročná na přírodní podmínky. Žito odnožuje brzy na podzim a v ČR se vysévá od září až do poloviny října do písčitohlinité a hlinitopísčité půdy. Nejčastěji se pěstuje v horách v podzolových půdách – překoná i mírnou kyselost půdy.

Na chemické složení zrna mají vliv vedle odrůdy také klimatické podmínky, průběh počasí, půda a agrotechnika a výživa.

Obilky žita obsahují asi 70 % sacharidů, (9 – 15) % bílkovin, 1,5 % tuků a minerální látky. Žito obsahuje rozpustnou vlákninu, která dokáže vázat množství vody a tím chrání sliznici střev. Významné minerální látky obsažené v žitě jsou vápník, draslík a fosfor, které mají význam pro zdravý vývoj kostí, železo – podporující krvetvorbu, síra, fluor a hořčík – na posílení imunity.

Sacharidy představují nejdůležitější skupinu zásobních látek a spolu se souvisejícími enzymy jako tzv. sacharido- nebo škrobo-amylázový komplex jsou základem pekařské jakosti žita. Největší podíl sacharidů připadá na škrob, (52 – 59) %, který se vyznačuje mazovatěním při nižších teplotách a je také snáze enzymaticky degradovatelný ve srovnání s ostatními obilninami.

Dusíkaté látky jsou souborem látek v rostlinném organismu, které kromě tří základních biogenních prvků obsahují často síru a fosfor. V rostlinách se nalézají vedle sebe nízkomolekulární dusíkaté látky (aminokyseliny a amidy) a vysokomolekulární látky (bílkoviny). Bílkoviny se dělí podle rozpustnosti v různých rozpouštědlech na albuminy (rozpustné ve vodě), globuliny (rozpustné v roztocích solí), prolaminy (rozpustné v kyselinách, alkalických loužích a zředěných alkoholech) a gluteliny (rozpustné ve zředěných kyselinách a loužích).

Vyšší obsah bílkovin v žitě je však technologicky významný, neboť zvyšují schopnost žitné mouky vázat vodu, přispívají i k lepší konzistenci těsta a i k dobrým vlastnostem chleba. Žitné bílkoviny mají vyšší obsah albuminů a globulinů, které jsou bohaté na esenciální

aminokyseliny, což znamená, že biologická hodnota žitných bílkovin je vyšší než u pšenice. Souvisí s tím i vyšší průměrný obsah lyzinu v bílkovinách žita oproti pšenici.

Na druhé straně vlivem některých antinutričních látek v žitě je stravitelnost a tedy i využitelnost žitných bílkovin nižší (uvádí se o 10%) oproti využitelnosti pšeničných bílkovin.

Žitné zrno i mouky z něho semleté obsahují vedle vlákniny celou řadu bioaktivních látek:

β -glukany, maltodextiny, fenolové kyseliny, tokotrieny, flavonoidy, fytoestrogeny (lignany), proteasové inhibitory, saponiny atd.

Žito ovšem obsahuje také některé nežádoucí složky (alkylresorcinoly, kyseliny fytové, ferulové) antinutriční povahy, které se negativně projevují při jeho vyšším zastoupení v krmných dávkách, zejména u mladých zvířat a drůbeže.

Žito se využívá jak k potravinářským tak i krmným účelům. V potravinářském průmyslu k výrobě žitného chleba, žitného perníku, žitovky, melty, žitné těstoviny, sladové náhražky, žitné kořalky z obilek, žitného piva. Námel se ve farmácii využívá k výrobě léčiv. Odpad při zpracování žita slouží ke krmení zvěře, sláma se využívá na rohožky, došky nebo jako podestýlka.

Cílem této práce bylo vytvořit a optimalizovat kalibrační modely pro stanovení obsahu sušiny a dusíkatých látek (N-látek) metodou NIR spektroskopie a zároveň vyhodnotit možnosti využití této moderní analytické metody na predikci vybraných parametrů v žitě setém.

3 Materiál a metody

3.1 Princip stanovení sušiny a dusíkatých látek (N-látek)

Vytvoření NIR kalibračního modelu pro daný parametr spočívá ve vztažení informace získané absorpcí v NIR oblasti s hodnotou stanovenou laboratorní referenční metodou (LRM) do vzájemného poměru a získání regresní závislosti.

V následující části jsou velmi stručně popsány klasické laboratorní metody mokré chemie, pomocí kterých byly získány referenční hodnoty použité pro kalibraci NIR spektrometru. Výsledek referenčních hodnot v kalibraci se uvádí jako průměr ze dvou paralelních stanovení. Stanovení obsahu vlhkosti vychází z normy ČSN EN 712. Tato norma je platná pro stanovení vlhkosti v obilovinách a výrobcích z obilovin. Obsah vlhkosti se stanoví vážkově jako úbytek po vysušení vzorku při 130 °C.

Stanovení obsahu dusíkatých látek (N-látek), stanovení hrubého proteinu vychází z normy ČSN EN ISO 20483. Tato norma je platná pro stanovení obsahu dusíkatých látek v obilovinách

a luštěninách. Dusíkaté látky se stanoví metodou podle Kjeldahla a to titračně alkalimetricky (acidimetricky) po mineralizaci vzorku horkou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru převedením na síran amonný, vytěsněním amoniaku hydroxidem sodným a jeho predestilováním do kyseliny sírové (borité).

3.2 Stanovení metodou NIR spektroskopie

Pro vytvoření přesného NIR kalibračního modelu je obecně základním požadavkem dostatečný počet analyzovaných vzorků. Rozsah analyzovaných vzorků odrůdového zkušebnictví klasickými laboratorními metodami (LRM) je mimořádný, ÚKZÚZ je v rámci ČR ojedinělým pracovištěm zaměřeným na tento typ laboratorního testování. Požadavek na dostatečné množství vzorků pro vytvoření robustních kalibračních modelů byl spolehlivě splněn. V případě žita bylo proměřeno celkem 111 vzorků pro kalibraci parametru sušiny, 129 vzorků na parametr N-látky. Vzorky použité na kalibraci NIR spektrometru pocházely ze všech regionálních pracovišť ÚKZÚZ a byly nashromážděny za období přibližně 3 let.

Všechny vzorky žita pro stanovení obou parametrů byly před měřením pomlety na laboratorním mlýnku Mill 3100 a následně prosety přes síto 0,8 mm. NIR spektra takto připravených vzorků byla nasnímana v křemenných kyvetách o průměru 3 cm v režimu reflektance. NIR měření byla prováděna v blízké infračervené spektrální oblasti přístrojem Nicolet Antaris s Fourierovou transformací. Spektrální reflektance udávaná jako průměr ze 120 spekter byla zobrazena jako logaritmus inverzní reflektance ($\log 1/R$) ve 0,5 nm intervalech v rozsahu vlnových délek (1000 – 2500) nm. Každý vzorek byl změřen dvakrát, pro další vývoj kalibračního modelu pak bylo použito průměrné spektrum.

Pro správný vývoj NIR kalibračního modelu je důležité, aby koncentrační rozsah kalibrovaného parametru byl co možná nejvyšší. Koncentrační rozsahy pro stanovované parametry ve vzorcích žita jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Složení vzorků žita použitých pro kalibraci přístroje Nicolet Antaris měřených v reflektanci

	Sušina (%)	N-látky (%/s)
N _K (počet vzorků)	111	129
Minimum	88,12	6,98
Maximum	90,99	13,38
Průměr	89,76	9,67

Důležitým předpokladem vytvoření úspěšného kalibračního modelu je dále skutečnost, že laboratorní referenční metoda používaná pro kalibraci NIR spektrometru musí být dostatečně přesná. Výsledky referenčních hodnot obou parametrů získaných klasickými metodami mokré chemie jsou prezentovány jako průměr paralelních stanovení.

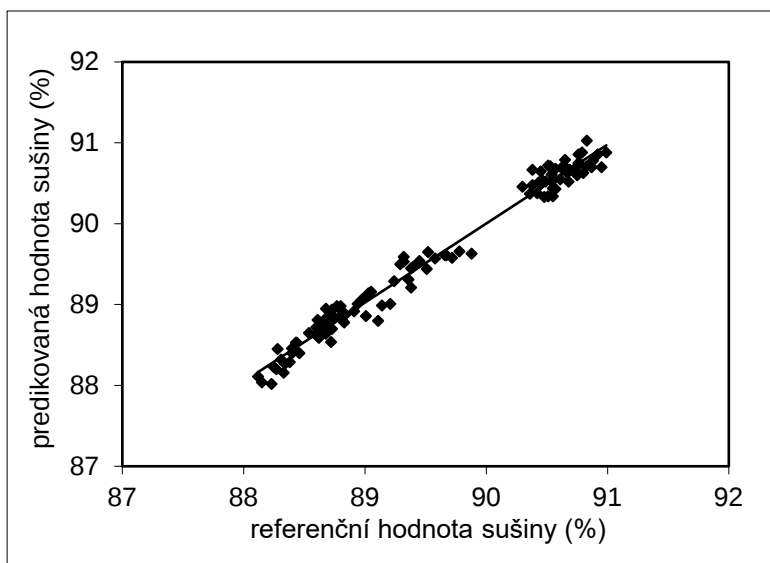
V prvním kroku před vlastní regresní tvorbou kalibračního modelu byla na jednotlivé soubory kalibračních spekter (vzorků) aplikována matematická korekce spekter SNV, která eliminuje vliv velikosti částic. Tento krok je velmi důležitý u vzorků, které před vlastní NIR analýzou prošly úpravou síťováním nebo pro vlastní měření NIR spektroskopii nebyly pomlety. Na takto upravených NIR spektrech pro všechny parametry byla provedena analýza hlavních komponent, která je vhodná pro detekci a určení odlehlých měření vzorků (spekter). Metodou hlavních komponent (PCA) byla identifikována odlehlá měření, ale současně bylo ověřeno, zda tímto vylučováním nebyly označeny důležité kalibrační vzorky (extrémní body, které mohou odpovídat např. nové plodinové odrůdě nebo koncentrační abnormalitě), čímž by byla snížena robustnost vytvářeného kalibračního modelu.

Tímto způsobem upravené kalibrační soubory pro stanovení vybraných parametrů v žitu po vyloučení odlehlých měření byly dále korigovány regresní metodou PLS. Následně byly jednotlivé kalibrační modely optimalizovány tak, aby poskytovaly co nejvyšší hodnotu korelačního koeficientu R a zároveň co nejnížší střední kvadratickou chybu predikce RMSECV při optimálním počtu latentních proměnných (hlavních komponent) v modelu.

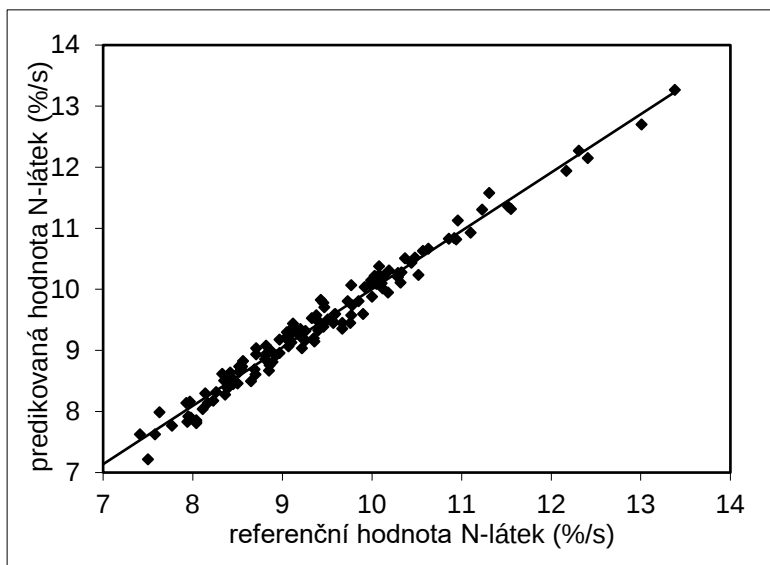
V průběhu tvorby kalibračního modelu byl rovněž vybrány vhodné vlnové délky, a to takové, u kterých se absorpcí záření v NIR spektru projevila zřejmá korelace s laboratorní referenční hodnotou. Výsledkem optimalizace kalibračního modelu je získaný graf referenčních *versus* NIR predikovaných koncentrací (kalibrační závislost, kalibrační křivka) a hodnota střední kvadratické chyby predikce RMSECV a korelačního koeficientu R .

4 Výsledky a diskuse

Na základě výsledků LRM byly vytvořeny kalibrační modely pro oba stanovované parametry metodou NIR spektroskopie ve vzorcích žita předúpravených standardním mletím na laboratorním mlýnku Mill 3100. Na takto upravených vzorcích byly vytvořeny a optimalizovány kalibrační modely pro parametry sušinu i N-látky. Jejich kalibrační závislosti jsou zobrazeny graficky na obrázcích 1 a 2.



Obrázek 1. Kalibrační závislost pro parametr sušina (%).



Obrázek 2. Kalibrační závislost pro parametr N-látky (%/s)-

Souhrnný přehled získaných kvalitativních parametrů kalibračních modelů stanovených regresní metodou PLS pro vybrané parametry v žitu je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2. Kvalitativní parametry kalibračních modelů vzorků žita

Parametr	RMSECV	R
Sušina (%)	0,15	0,98
N-látky (%/s)	0,21	0,99

Legenda: RMSECV – střední kvadratická chyba predikce (CV - příčné validace); R – korelační koeficient

Z tabulky 2 je zřejmé, že pro stanovení parametrů obsahu sušiny a N-látek byly získány vysoké hodnoty korelačního koeficientu (0,98; 0,99).

Predikční schopnosti těchto vytvořených kalibračních modelů pro jednotlivá stanovení ve vzorcích žita byly ověřovány na souboru nezávislých vzorků, které nebyly zahrnuty do vývoje kalibračních modelů. Následným porovnáním výsledků získaných LRM a metodou NIR spektroskopie na testování shodnosti výsledků se ověřovala nulová hypotéza, že rozdíl $|\bar{x}_A - \bar{x}_B|$ není statisticky významný na zvolené hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Pro testování shodnosti byl použit Studentův test t . Vypočtené hodnoty t testu byly porovnány s kritickou hodnotou t_α . Získané výsledky pro jednotlivé parametry jsou prezentovány v tabulce 3.

Tabulka 3. Kvalitativní parametry porovnání 2 analytických metod.

Parametr	k	$\bar{x}_A$ (LRM)	$\bar{x}_B$ (NIR)	α	t	$t_\alpha(0,05)$
Sušina (%)	16	90,10	90,27	0,05	1,25	2,145
N-látky (%/s)	16	10,38	10,27	0,05	0,98	2,145

Legenda: k – počet vzorků; $\bar{x}_A$ (LRM) – průměrná koncentrace získaná laboratorní referenční metodou; $\bar{x}_B$ (NIR) – průměrná koncentrace získaná metodou NIR spektroskopie; α – zvolená hladina významnosti (0,05); t – vypočtená hodnota Studentova testu t ; t_α – kritická (tabulková) hodnota Studentova testu t

Z tabulky 3 je zřejmé, že vypočtené hodnoty t pro sušinu a N-látky jsou nižší oproti tabulkové (kritické) hodnotě t_α . Z toho vyplývá, že metoda NIR spektroskopie v porovnání s laboratorní referenční metodou poskytuje statisticky shodné výsledky pro stanovení vybraných parametrů ve vzorcích žita setého.

5 Závěr

Na dostatečně obsáhlém souboru vzorků žita setého byly optimalizovány kalibrační modely pro stanovení vybraných nutričních parametrů sušiny a N-látek metodou FT-NIR spektroskopie.

Z prezentovaných grafů kalibračních závislostí a hodnot kvalitativních parametrů (RMSECV, R) vytvořených kalibračních modelů na vzorcích upravených standardním mletím je zřejmé, že hodnoty sušiny a N-látek stanovené laboratorní referenční metodou predikované metodou NIR spektroskopie spolu vysoce korelují ($R = 0,98; 0,99$).

Zároveň byly ověřeny predikční schopnosti kalibračních modelů a tedy i porovnány dvě analytické metody. Prezentované výsledky potvrdily vhodnost metody NIR spektroskopie a lze ji tak ji doporučit pro predikování těchto sledovaných parametrů v žitu setém.

6 Literatura

1. Špaldon, E. a kol.: Rostlinná výroba. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1976
2. ČSN ISO 712, obiloviny a výrobky z obilovin – Stanovení vlhkosti – Praktická referenční metoda, 1/2003.
3. ČSN EN ISO 20483, Obiloviny a luštěniny – Stanovení obsahu dusíku a výpočet obsahu dusíkatých látek – Kjeldahlova metoda, 4/2007.
4. Eckschlager, K., Horsák, I., Kodejš, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. SNTL/ ALFA Praha, 1980.

Bulletin Národní referenční laboratoře XX 2016/3

Ročník: XX, č. 3

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2016

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 44

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196