

Národní referenční laboratoř

Bulletin 2020

Ročník XXIV, číslo 1/2020

Brno 2020

Obsah

- 1 Stanovení citrininu v surovinách rostlinného původu**
Martina Čumová, Simona Wawroszová, Zuzana Nehybová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
- 2 Kvalita organické hmoty půdy – stanovení celkového organického uhlíku**
Václav Rypl, Oddělení NRL Plzeň, Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň
David Čížmár, Odbor NRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno 10
- 3 Využití spektrofotometrických metod pro stanovení obsahu amonného a dusičnanového dusíku v hnojivech**
Václav Rypl, Libuše Tůmová, Oddělení NRL Plzeň, Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň
Ludmila Hamplová, Oddělení NRL Praha, Za Opravnou 4, 150 00 Praha 28

Stanovení citrininu v surovinách rostlinného původu

Martina Čumová, Simona Wawroszová, Zuzana Nehybová

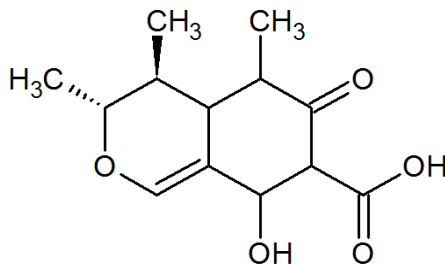
1 Úvod

Citrinin je sekundární metabolit hub, který je toxický pro lidi a zvířata. Proto by se měl jeho výskyt preventivně sledovat v krmivech a surovinách pro jejich výrobu. V laboratoři Oddělení reziduálních analýz byla zavedena metoda pro stanovení citrininu, která je založena na QuEChERS extrakci s následnou analýzou pomocí LC-MS. Metoda je vhodná pro sledování citrininu v surovinách rostlinného původu a splňuje všechny legislativní požadavky na výkonnostní kritéria.

2 Teoretická část

2.1 Úvod

Citrinin (CIT), který se také nazývá monascidin A nebo antimycin, je toxický sekundární metabolit plísní rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Monascus* [1]. Citrinin (Obrázek 1) patří mezi tzv. skladištní mykotoxiny, tzn., že se vytváří převážně až ve sklizeném obilí během skladování. Přítomen však může být i ve fazolích, ovoci, v ovocných a zeleninových šťávách, bylinách, koření a ve zkažených mléčných výrobcích. Navíc se citrinin vyskytuje, jakožto nežádoucí látka, v červené rýži, která se vyrábí fermentací s použitím plísně *Monascus*. Tato rýže se dlouhá staletí používá v Asii v tradiční medicíně ke konzervaci masa nebo barvení potravin.



Obrázek 1. Strukturní vzorec CIT.

Studie toxicity CIT na zvířatech prokázaly, že po opakovaných dávkách byly hlavním cílovým orgánem ledviny, přičemž byly pozorovány významné rozdíly v náchylnosti mezi jednotlivými testovanými druhy zvířat [1]. Nefrotoxické účinky CIT se projevují také u lidí. Citrinin narušuje propustnost membrány proximálního tubulu a tím ovlivňuje transport vápenných iontů. Tyto účinky mají za následek vznik adenomů, histopatologických změn, nekrózu renálního tubulu a při vysokých dávkách mohou způsobit i smrt. Doposud provedené *in vitro* a *in vivo* studie, prokázaly genotoxické (poškozuji genetický materiál), mutagenní (způsobují změnu v genetické informaci) a teratogenní (poškozuji plod) účinky citrininu [2]. Na základě dostupných dat doposud není dle IARC citrinin klasifikován jako karcinogen a je zařazen do třetí skupiny [1].

Houby produkující CIT jsou zároveň významnými producenty také ochratoxinu A a aflatoxinů, a proto se tyto mykotoxiny vyskytují v kontaminovaném obilí a rýži často společně. V jablečných šťávách a džemech je pak častý společný výskyt citrininu s patulinem. Toxické účinky společně vyskytujících se mykotoxinů se pak mohou nejen sčítat ale i násobit.

Množství mykotoxinu je k datu legislativně upravováno pouze v doplňcích stravy na bázi rýže fermentované červenými kvasinkami *Monascus purpureus* (Obrázek 2). Ačkoliv nejsou doposud stanoveny maximální limity pro CIT v krmivech a krmných surovinách, Evropská Unie žádá EFSA o sběr dat o výskytu CIT v dalších potravinách a krmivech.



Obrázek 2. Kvasinka *Monascus purpureus* [3].

Z tohoto důvodu byla vyvinuta metoda pro stanovení CIT v krmných surovinách pro zvířata. Citrinin je z matrice extrahován spolu s dalšími analyty pomocí QuEChERS extrakce s následnou analýzou na vysoko-účinném kapalinovém chromatografu s hmotnostně spektrometrickou

detekcí (LC-MS). Vyvinutá metoda byla následně použita pro monitoring tohoto nebezpečného nefrotoxinu v krmivech a v surovinách pro jejich výrobu.

3 Praktická část

3.1 Chemikálie

Methanol (čistota LC-MS), kyselina mravenčí (čistota LC-MS) a mravenčan amonný (pro MS) byly pořízeny od firmy Fluka. Ultračistá voda byla připravena Milli-Q systémem (Millipore Corporation, USA). Acetonitril (čistota HPLC) a standard CIT byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (Německo). Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním citrininu v acetonitrilu. Takto připravený zásobní roztok byl uchováván při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 Přístroje a pomůcky

Ultraúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters, USA), vybavený UPLC kolonou, ACQUITY UPLC BEH C18, $50\text{ mm} \times 2,1\text{ mm} \times 1,7\text{ }\mu\text{m}$ (Waters, USA) a předkolonou, ACQUITY BEH C18 VanGuard, $5\text{ mm} \times 2,1\text{ mm} \times 1,7\text{ }\mu\text{m}$ (Waters, USA). Analytické váhy, ultrazvuková lázeň, horizontální třepačka s rychlostí do 300 kmitů/min, centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 ot/min, centrifugační zkumavky polypropylenové (PP) se šroubovacím víčkem o objemech 15 ml a 50 ml, centrifugační zkumavka Eppendorf o objemu 1,5 ml, stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (Labicom, Česká republika), skleněné vialky o objemu 2 ml.

3.3 Postup přípravy vzorku

Homogenní vzorek byl navážen do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Ke vzorku bylo následně přidáno 10 ml 0,1% HCOOH. Poté bylo do zkumavky přidáno 10 ml acetonitrilu. Citrinin byl ze vzorku extrahován 20min třepáním na horizontální třepačce při 150 kmitech/min. Poté byla přidána pevná směs solí (MgSO_4 a NaCl) a směsí bylo intenzivně třepáno, aby došlo k rozrušení vzniklých hrudek. Vzorek byl poté 5 min odstředěn při 5000 ot/min. Vrchní acetonitrilová vrstva byla převedena do 15ml polypropylenové zkumavky. Zkumavka byla poté uchovávána 2 h při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tak, aby došlo k vytěsnění lipidových koextraktů vzorku. Takto vymražený extrakt byl opět odstředěn 5 min při 3900 ot/min. Přesně 0,5 ml acetonitrilové vrstvy

bylo převedeno do zkumavky Eppendorf, která byla poté doplněna vodou na celkový objem 1 ml. Po promíchání byl roztok zfiltrován přes membránový filtr a převeden do vialky.

3.4 UPLC-MS/MS stanovení

Extrakty převedené do 2ml vialky byly analyzovány metodou UPLC-MS/MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů. Kompletní nastavení přístroje a podmínky měření jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. Před analýzou reálných vzorků byla ověřena citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy byla zajištěna využitím MRM módu při MS detekci.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky UPLC stanovení.

UPLC – Acquity Waters	
Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Předkolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Nástřik	2,5 μl
Slabý promývací roztok	Deionizovaná voda/methanol (90/10)
Silný promývací roztok	Methanol
Mobilní fáze A	0,1% kyselina mravenčí v deionizované vodě
Mobilní fáze B	0,1% kyselina mravenčí a 1mM mravenčan amonný v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Gradient mobilní fáze	0 min (5 % B) – 0,2 min (5 % B) – 1,2 min (45 % B) – 4,5 min (99,5 % B) – 8 min (99,5 % B) – 8,1 min (5 % B) – 10 (5 % B)

Tabulka 2. Podmínky stanovení pro Xevo TQ MS Waters.

	RT	Prekursor	CV (eV)	Produktový ion	CE (eV)	Produktový ion	CE (eV)
CIT	1,74	251	25	233	20	205	25
Teplota iontového zdroje – 150 °C, teplota sušícího plynu – 450 °C, průtok sušícího plynu – 700 l/h, průtok „cone gas“ – 45 l/h, průtok kolizního plynu – 0,18 ml/min, napětí na kapiláře – 3 kV, ionizace elektrosprejem v pozitivním módu							

4 Výsledky a diskuse

4.1 Validace stanovení citrininu

Metoda pro stanovení citrininu, založená na QuEChERS extrakci s následnou LC-MS analýzou, byla validována ve vzorcích rostlinného původu (pšenice a kompletní krmná směs). Blankové matrice byly obohaceny na čtyřech koncentračních hladinách (5 µg/kg, 10 µg/kg, 20 µg/kg a 100 µg/kg). Obohacení bylo provedeno v šesti opakováních pro každou matici zvlášť. V rámci validace byla hodnocena citlivost, správnost, přesnost, selektivita a rozšířená nejistota. V obou testovaných materiálech byla splněna všechna validační kritéria, a to podle SANTE 11945/2015 [4]. Mezi stanovitelnosti (LOQ) byla nejnižší validovaná hladina a lze ji tedy nazývat jako tzv. reportovací limit (RL). Výsledná validační data jsou uvedena v tabulkách 3 a 4.

Selektivita je schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V případě LC-MS analýz jsou pozorovány matricové efekty (ME) v jejichž důsledku je ovlivněn signál analytu přítomností matrice (Tabulka 4). V rámci validace byly ME sledovány v extraktech obou testovaných matic. Matriční efekt byl počítán podle vztahu: $ME = \text{směrnice kalibrační křivky v matrici} / \text{směrnice kalibrační křivky v rozpouštědle} \times 100$. Vzhledem k přítomnosti ME v obou testovaných materiálech byla kvantifikace obsahu citrininu provedena s využitím matricové kalibrace.

Stanovení nejistoty vycházejí z vícenásobného měření matrice obohacené standardem CIT na různých hladinách. Rozšířená nejistota odpovídá směrodatné odchylce stanovených dat vynásobené faktorem pokrytí 2 (Tabulka 3).

Správnost metody (70 – 120) % pro stanovení citrininu současně s požadavkem na maximální rozšířenou nejistotu (≤ 50) podle SANTE 11945/2015 [4] byl splněn v obou testovaných materiálech až na hladině 20 µg/kg. Tato hladina může být tedy i LOQ, tj. RL metody.

Tabulka 3. Správnost a přesnost metody pro stanovení CIT v pšenici a kompletním krmivu.

Matrice	Hladina (µg/kg)	Správnost (%)	Přesnost (%)	Rozšířená nejistota (%)
Pšenice	5*	31*	36	72*
	10*	29*	16	32
	20	100	2	4
	100	91	1	2
Krmivo	5*	30*	45	90*
	10*	36*	9	18
	20	98	5	5
	100	102	3	3

*... hodnoty nevyhovují legislativním požadavkům

Tabulka 4. Limity detekce, reportovací limity, linearita a matriční efekty pro citrinin.

	LOD (µg/kg)	RL (µg/kg)	R ²	ME (%)
Solvent	3	–	0,9996	–
Pšenice	5	20	0,9994	85
Krmivo	5	20	0,9993	87

Pro identifikaci CIT ve vzorcích byla použita kritéria podle SANTE 11945/2015 [4], tj. retenční čas (RT) a poměr sledovaných kvantifikačních a konfirmačních iontů. Povolená odchylka RT pro LC je $\pm 2,5$ %. Povolený rozsah poměrů sledovaných iontů je závislý na relativní intenzitě sledovaných iontů. Přítomnost sledované látky ve vzorku je potvrzena, pokud poměr intenzity sledovaných iontů stanovený ve vzorku odpovídá poměru stanoveného ve standardu.

Správnost metody byla navíc ověřena pomocí certifikovaného referenčního materiálu FAPAS 17160: Ochratoxin A and citrinin in maize flour (kukuřice). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5. Ověření správnosti metody pro stanovení citrininu pomocí CRM.

Analyt	Název	Předložená hodnota (µg/kg)	Změřená hodnota (µg/kg)	z-score
Citrinin	FAPAS 17160	87,9 ± 6,49	92,5	0,71

Výsledky měření CRM potvrdily schopnost, správně stanovit citrinin ve vzorcích rostlinného původu.

4.2 Analýza reálných vzorků

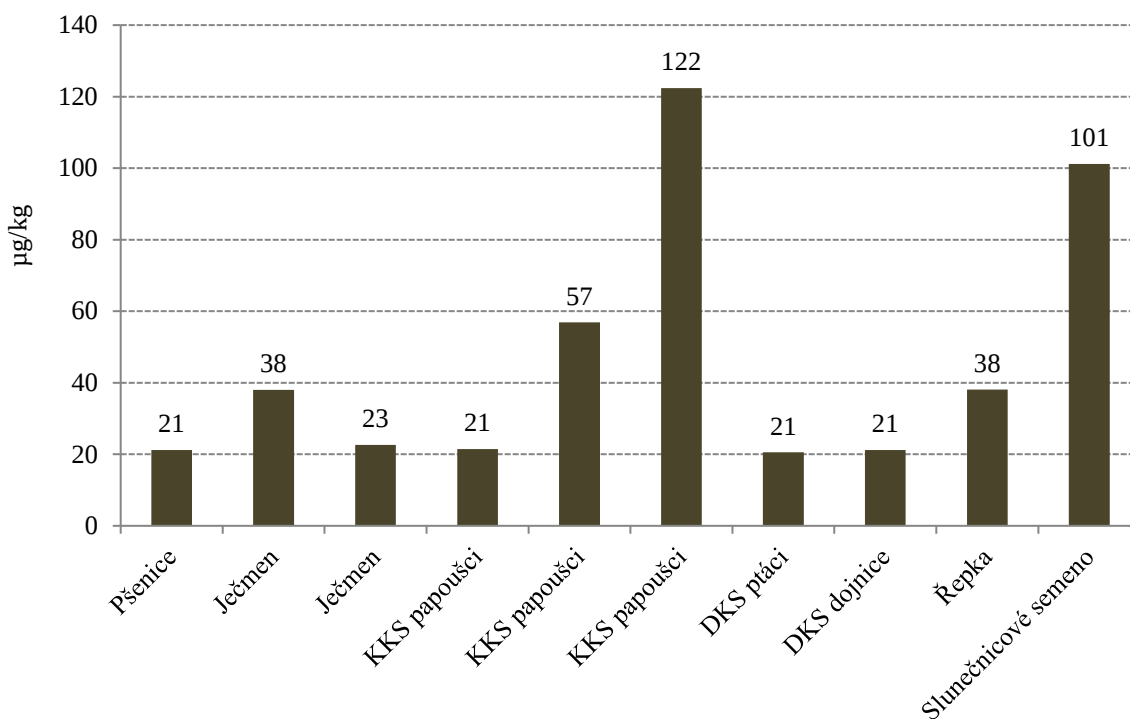
Vyvinutá metoda byla aplikována pro sledování citrininu v reálných vzorcích krmiv. V rámci monitoringu citrininu bylo během let 2016 až 2018 na ÚKZÚZ testováno vyvinutou metodou celkem 107 vzorků krmiv a surovin pro jejich výrobu. Citrinin byl obsažen v množství nad RL (tj. nad 20 µg/kg) v 10 vzorcích, což činí přibližně 10 % z celkového množství testovaných vzorků (Tabulka 6).

Tabulka 6. Přehled analyzovaných vzorků a jejich kontaminace CIT v množství nad RL a v množství nad LOD, ale pod RL.

Analyt	Počet testovaných vzorků	Počet kontamin. vzorků nad RL	Počet kontamin. vzorků nad LOD ale pod RL
Pšenice	27	1	1
Ječmen	15	2	1
Kukuřice	9	0	0
KKS	14	3	2
DKS	12	2	1
Senáž	3	0	1
Seno	7	0	0
Oves	5	0	0
Mláto	2	0	0
Ostatní	9	1	0
Žito	2	0	1
Slunečnicové semeno	2	1	0
Celkem	107	10	7

V dalších devíti vzorcích byl CIT detekován avšak nekvantifikován, protože se množství citrininu nacházelo nad LOD, ale pod RL. Jednalo se o vzorky pšenice, ječmene, kompletních krmiv pro nosnice a papoušky, doplňkového krmiva pro dojnice, senáže a žita (Tabulka 6).

Citrinin se v pozitivních vzorcích nejčastěji nacházel v množství lehce nad RL, tj. 20 µg/kg. Větší množství CIT pak bylo detekováno ve vzorcích ječmene (38 µg/kg), krmné směsi pro papoušky (57 µg/kg) a v řepce (38 µg/kg). Nejvíce tohoto mykotoxinu bylo obsaženo ve vzorku krmné směsi pro papoušky (122 µg/kg) a ve slunečnicovém semenu (101 µg/kg). Přehled kontaminace je uveden na obrázku 3.



Obrázek 3. Množství citrininu v pozitivních vzorcích.

Doposud nejsou stanoveny maximální limity pro citrinin v krmivech a surovinách pro jejich výrobu, a proto nelze zjištěné obsahy tohoto mykotoxinu v testovaných vzorcích z tohoto pohledu hodnotit. Nicméně, z výsledku monitoringu vyplývá, že se tento nebezpečný nefrotoxin v daném materiálu vyskytuje a je žádoucí vyvinutou metodu využívat ke sledování obsahu CIT v testovaných vzorcích a nálezy hlásit úřadu EFSA tak, jak požaduje Evropská komise.

Analyzované vzorky byly podrobeny také monitoringu dalších mykotoxinů, avšak v žádném případě nebyl pozorován společný výskyt aflatoxinů a citrininu. Avšak, ve čtyřech obilovinách byl citrinin detekován společně s ochratoxinem A. Společný výskyt mykotoxinů je vždy nežádoucí, protože může dojít nejen ke sčítání toxických účinků jednotlivých mykotoxinů, ale i k jejich násobení (synergismu).

5 Závěr

V práci bylo validováno stanovení citrininu ve vzorcích rostlinného původu. Validované parametry splňovaly požadavky uvedené v SANTE 11945/2015 [4]. Správnost metody byla ověřena pomocí certifikovaného referenčního materiálu. Vyvinutá metoda je vhodná pro stanovení citrininu v krmivech a surovinách pro jejich výrobu. Metoda je navíc snadná, rychlá, finančně úsporná a lze ji rozšířit o nové analyty.

Monitoring CIT probíhající v letech 2016 až 2018 potvrdil přítomnost tohoto analytu v několika vzorcích, a proto je vhodné tento nebezpečný nefrotoxin nadále sledovat a pozitivní nálezy hlásit úřadu EFSA tak, jak požaduje Evropská komise.

6 Literatura

1. EFSA. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. EFSA Journal 2012;10(3):2605.
2. FLAJS D., PERAICA M. (2009). Toxicological properties of citrinin. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju. Záhřeb: Institute for Medical Research and Occupational Health, 60(4), str. 457-464, ISSN 0004-1254.)
3. Monascus Purpureus, dostupné z: <https://www.chungvisinh.com/monascus-purpureus-nbrc-4478.html/>. Citováno (18.12.2018).
4. European Commission. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE 11945/2015.

Kvalita organické hmoty půdy – stanovení celkového organického uhlíku

Václav Rypl, David Čížmár

1 Úvod

Norma pro stanovení Cox po oxidaci chromsírovou směsí bude zrušena. Důvody jsou bezpečnostní a environmentální. V mnoha laboratořích se proto přechází na stanovení celkového organického uhlíku (TOC) pomocí elementárních analyzátorů. Cílem práce je ověřit a optimalizovat metodu spolu s nalezením matematického vztahu mezi starým parametrem Cox a novým parametrem TOC. Nový parametr TOC by měl být dále použit k vytvoření kalibrace pro NIRS. Zároveň budou změřeny hodnoty celkového dusíku (TN), které budou využity ke zpřesnění stávající nebo vytvoření nové kalibrace pro NIRS.

Hodnota parametru TOC se vypočte po změření celkového uhlíku (TC) a anorganického uhlíku (IC) odečtením hodnoty IC od hodnoty TC.

2 Materiál a metody

2.1 Chemikálie

2.1.1 EDTA, 99,4 – 100,6 %, Merck

2.1.2 Sulfadiazin, min. 99,0 %, Sigma

2.1.3 CaCO_3 , srážený p.a., Reag. Ph Eur, Merck

2.1.4 Na_2CO_3 , bezvodý p.a., 99,0 %, Lach - Ner

2.1.5 H_3PO_4 , Kyselina orthofosforečná, p.a. 85 %, $\rho = 1,7 \text{ kg}\cdot\text{dm}^{-3}$, Lach - Ner

2.1.6 Deionizovaná voda.

2.1.7 H_3PO_4 – přibližně 20%.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s asi 500 ml deionizované vody (2.1.6) se přidá 250 ml H_3PO_4 (2.1.5). Po vytemperování se doplní po značku deionizovanou vodou a promíchá.

2.1.8 Set chemikálií pro přístroj Primacs SNC100 firmy Skalar.

2.2 Přístroje a pomůcky

2.2.1 CN analyzátor Primacs SNC-100 firmy Skalar.

2.2.2 Laboratorní váhy Sartorius CP64.

2.2.3 Michačka zkumavek, Lab dancer S40.

2.2.4 Sada kelímků pro stanovení TC a TN.

2.2.5 Sada kelímků pro stanovení IC.

2.3 Vzorky půd

Jako první byly analyzovány vzorky půd z archivu pracoviště ÚKZÚZ, viz. Obrázek 1 a Tabulka 1. Pomocí těchto vzorků byla metoda optimalizována.

Obrázek 1. Vzorky z archivu.

Klic	c_lok	rok	mesic	den	horiz	opak	kultura	kultura_t	ph_vym	p_m3	k_m3	mg_m3	ca_m3	cox_nir	n_nir	glomalín	c_ox	m_0_01	okres	naz_orp	kraj	bpej_t	vyr_obl_t	kl_typ_t	kl_subtyp	kl_subtyp_vyběr
6901K-2001-4-17-0-0	6901K	2001	4	17	0	0	7	trvalé trav	7.48	9	224	138	13200	3.09	-1	7.57	4.14	35.25	Havlíčkův	CHOTĚBOŘ	Vysočina	MT4 mírn	Bramborá	ANTROPO	AN-ko	kontamin
7024B-2001-9-24-0-0	7024B	2001	9	24	0	0	2	orná půda	7.08	65	276	551	8548	2.29	-1	3.74	2.72	65.45	Prostějov	PROSTĚJOV	Olomoucký	T3 teplý	Řepařská	ČERNVICE	CC-p	pelická
5004B-2001-9-25-0-0	5004B	2001	9	25	0	0	2	orná půda	7.18	125	340	262	5135	-1	-1	-1	1.49	35.35	Chomutov	KADAŇ	Ústecký	T1 teplý	Řepařská	ČERNOZE	CE-m	modální
7014B-2001-6-13-0-0	7014B	2001	6	13	0	0	4	vinice	7.28	131	351	163	3470	1.58	-1	2.69	0.79	16.7	Břeclav	MIKULOV	Jihomorav	VT velmi	Kukuřičná	ČERNOZE	CE-m	modální
8025B-2001-10-19-0-0	8025B	2001	10	19	0	0	7	trvalé trav	6.5	27	157	458	5720	2.85	-1	2.33	3.43	50.65	Nový Jičín	NOVÝ Jičín	Moravsko	MT3 mírn	Řepařská	FLUVIZEM	FL-m	modální
7011B-2001-9-10-0-0	7011B	2001	9	10	0	0	2	orná půda	7.05	73	184	418	4725	1.49	-1	3.28	1.42	47.3	Brno venk	ŽDOLOCH	Jihomorav	VT velmi	Řepařská	FLUVIZEM	FL-m	modální
2005B-2001-5-5-0-0	2005B	2001	5	5	0	0	2	orná půda	7.33	84	127	170	3838	1.59	-1	2.54	1.73	32.15	Praha-záp	ČERNOŠOV	Středočes	MT1 mírn	Řepařská	FLUVIZEM	FL-m	modální
5003B-2001-5-10-0-0	5003B	2001	5	10	0	0	2	orná půda	7.55	250	245	269	10715	-1	-1	-1	1.68	33.55	Litoměřice	ROUDNICE	Ústecký	T1 teplý	Řepařská	FLUVIZEM	FL-m	modální
5901KO-2001-9-5-0-0	5901KO	2001	9	5	0	0	2	orná půda	7.6	27	118	332	5835	-1	-1	-1	1.44	19.3	Louny	LOUNY	Ústecký	T1 teplý	Řepařská	FLUVIZEM	FL-m	modální
8017B-2001-10-4-0-0	8017B	2001	10	4	0	0	2	orná půda	4.68	36	224	142	1498	1.6	-1	1.79	1.68	36.2	Přerov	HRANICE	Olomoucký	MT3 mírn	Řepařská	GLEJ	GL-m	modální
2007B-2001-4-4-0-0	2007B	2001	4	4	0	0	7	trvalé trav	6.63	61	430	247	4210	2.37	-1	3.24	3.27	33.75	Benešov	VOTICE	Středočes	MCH mírn	Bramborá	GLEJ	GL-m	modální
2032B-2001-4-5-0-0	2032B	2001	4	5	0	0	2	orná půda	7.03	41	126	116	3330	1.26	-1	2.31	1.17	35.35	Praha-vých	BRANDÝS	Středočes	T2 teplý	Řepařská	HNĚDOZE	HN-m	modální
5014B-2001-6-27-0-0	5014B	2001	6	27	0	0	3	chmelnice	7.4	151	349	517	5408	-1	-1	-1	1.06	47.65	Louny	PODBOŘ	Ústecký	MT1 mírn	Řepařská	HNĚDOZE	HN-m	modální
7021B-2001-9-27-0-0	7021B	2001	9	27	0	0	2	orná půda	7.6	49	209	210	7195	1.02	-1	1.09	0.84	25.15	Kroměříž	KROMĚŘÍŽ	Zlínský	T3 teplý	Řepařská	HNĚDOZE	HN-m	modální
5017B0-2001-4-25-0-0	5017B0	2001	4	25	0	0	7	trvalé trav	6.25	64	101	397	2505	-1	-1	-1	3.52	18.85	Jablonec	JABLONEC	Liberecký	MCH mírn	Horská	KAMBIZEN	KA-r	arenická
8023B-2001-10-8-0-0	8023B	2001	10	8	0	0	7	trvalé trav	6.33	76	95	248	3190	2.4	-1	2.79	3.71	25.1	Bruntál	BRUNTÁL	Moravsko	MCH mírn	Bramborá	KAMBIZEN	KA-m	modální
8901KO-2001-10-15-0-0	8901KO	2001	10	15	0	0	2	orná půda	7.08	73	111	184	2495	1.46	-1	3.08	1.09	16.45	Jeseník	JESENÍK	Olomoucký	MT3 mírn	Řepařská	KAMBIZEN	KA-m	modální
2023B-2001-4-27-0-0	2023B	2001	4	27	0	0	2	orná půda	4.83	96	121	83	1007	1.17	-1	2.24	0.97	24.25	Přibram	DOBŘÍŠ	Středočes	MT2 mírn	Bramborá	LUVIZEM	LU-m	modální
6013B-2001-4-17-0-0	6013B	2001	4	17	0	0	7	trvalé trav	4.53	43	144	395	2348	1.08	-1	2.33	1.09	39.65	Jičín	JÍČÍN	Královéhr	MT2 mírn	Řepařská	PSEUDOG	PG-m	modální
4012B-2001-8-21-0-0	4012B	2001	8	21	0	0	2	orná půda	4.8	230	163	31	750	-1	-1	-1	1.04	17.45	Píseň-sev	KRALOUP	Píseňský	MT1 mírn	Bramborá	REGOZEM	RG-r	arenická
2021B-2001-5-30-0-0	2021B	2001	5	30	0	0	2	orná půda	5.53	93	105	91	976	0.82	-1	2.27	0.55	18.75	Nymburk	LYSÁ NAD	Středočes	T2 teplý	Řepařská	REGOZEM	RG-r	arenická
6015B-2001-3-14-0-0	6015B	2001	3	14	0	0	2	orná půda	7.4	102	280	136	10603	1.43	-1	1.59	1.58	55.65	Náchod	NÁCHOD	Královéhr	MT2 mírn	Řepařská	RENDZINA	RZ-m	modální
7019B-2001-6-11-0-0	7019B	2001	6	11	0	0	4	vinice	7.65	160	327	361	19975	1	-1	0.5	1.05	43.85	Hodonín	KYJOV	Jihomorav	T2 teplý	Kukuřičná	RENDZINA	RZ-m	modální

Tabulka 1. Klíč – první sloupec obrázku 1: Vzorky z archivu.

označení vzorku
7024B-2001-9-24-O-0
5004B-2001-9-25-O-0
7014B-2001-6-13-O-0
8025B-2001-10-19-O-0
7011B-2001-9-10-O-0
2005B-2001-5-5-O-0
5003B-2001-5-10-O-0
5901KO-2001-9-5-O-0
8017B-2001-10-4-O-0
2007B-2001-4-4-O-0
2032B-2001-4-5-O-0
5014B-2001-6-27-O-0
7021B-2001-9-27-O-0
5017BO-2001-4-25-O-0
8023B-2001-10-8-O-0
8901KO-2001-10-15-O-0
2023B-2001-4-27-O-0
4012B-2001-8-21-O-0
2021B-2001-5-30-O-0
7019B-2001-6-11-O-0

Následně byly analyzovány vzorky zapsané v knize LIMS AZP Opava z let 2017, 2018 a 2019 viz tabulka 2 Výsledky.

2.4 Metody

2.4.1 TC – celkový uhlík

Uhlík přítomný v půdě se oxiduje na oxid uhličitý termickým rozkladem v proudu kyslíku při teplotě 1100 °C. Množství uvolněného oxidu uhličitého se stanoví pomocí detektoru pracujícím v infračervené oblasti spektra. Během ohřevu vzorku půdy na teplotu rovnou nebo vyšší než 900 °C se kvantitativně rozloží organický uhlík i přítomné uhličitany.

2.4.2 IC – anorganický uhlík

Anorganický (uhličitánový) uhlík se uvolní jako oxid uhličitý po okyselení vzorku neoxidující minerální kyselinou a přivedení směsi k varu. Uvolněný oxid uhličitý se vytěsňuje proudem kyslíku a stanoví se pomocí detektoru pracujícím v infračervené oblasti spektra.

2.4.3 TOC – celkový organický uhlík

Celkový organický uhlík se vypočte jako $TOC = TC - IC$

2.4.4. TN – celkový dusík

Vzorky se spalují při teplotě 1100 °C v proudu kyslíku. Ze vniklé směsi plynů se odebere alikvot, ze kterého je po redukci oxidů dusíku separován N_2 , jenž se pomocí helia přivede na teplotně vodivostní detektor (TCD).

3 Diskuse a výsledky

3.1 Stanovení TC a TN

Stanovení TC a TN probíhá v přístroji Primacs současně.

Přístroj se kalibruje pomocí EDTA (2.1.1). Navážky se zvolí tak, aby co nejlépe odpovídaly předpokládaným obsahům celkového uhlíku ve vzorku. Nejvyšší možný obsah uhlíku v jedné navážce je 200 mg C. Počet navážek kalibračního standardu je nejméně čtyři, standardní je pět, ale možný je i vyšší počet. Velikost navážky se volí také s ohledem na nízké obsahy dusíku v půdách. EDTA je výhodný kalibrační standard pro vzorky půd, protože obsahuje podobný poměr C:N, takže i relativně nízké koncentrace celkového dusíku v půdách nepadají pod spodní bod kalibrační křivky.

Jako teplota pro spálení a termický rozklad byla nastavena hodnota 1100 °C, ostatní parametry byly ponechány podle doporučení výrobce. Teplota 1100 °C představuje kompromis mezi účinností rozkladu vzhledem k míře a rychlosti opotřebení aktivních součástí přístroje a servisním nákladům.

Pro vlastní analýzu se do speciálních keramických kelímků (2.2.4) navažuje zpravidla (0,6 – 1) g vzorku. Podle potřeby je možné navážku snížit v případě vysokých obsahů C. Zvyšování navážky je také možné, dosáhne se lepších detekčních limitů, ale znamená to vyšší spotřebu chemikálií v přístroji (2.1.8), a tím i vyšší náklady. V případě takto vysokých navážek nebývá problém s homogenitou a prosev < 2 mm u vzorků AZPP je možné použít přímo, bez další úpravy na třecí misce nebo achátovém mlýnu. Jako kontrolní vzorek se použije sulfadiazin (2.1.2).

3.2 Stanovení IC

Přístroj se kalibruje pomocí CaCO_3 (2.1.3). Navážky se zvolí tak, aby co nejlépe odpovídaly předpokládaným obsahům uhličitánového uhlíku ve vzorku. Jako nejvhodnější se jeví použití šesti navážek kalibračního standardu. Jako kontrolní vzorek se použije Na_2CO_3 (2.1.4).

Jako neoxidující minerální kyselina byl zvolen 20% roztok H_3PO_4 (2.1.7). Ke vzorku nebo standardu přístroj automaticky dávákuje 4 ml 20% roztoku H_3PO_4 (2.1.7), tuto směs dále zahřeje k varu a proudem kyslíku vzniklý CO_2 přivede na IR detektor.

Pro vlastní analýzu se doporučuje do speciálních skleněných kelímků (2.2.5) navažovat (200 – 300) mg vzorku, nicméně byly testovány i navážky až 800 mg. Navážený vzorek je poté zvlhčen asi 2 ml vody (2.1.6) a obsah kelímku se opatrně promíchá pomocí míchačky zkumavek (2.2.3). Kelímek se pak vloží do zásobníku přístroje.

3.3 Určení TOC

Celkový organický uhlík (TOC) se určí podle vztahu:

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$$

Kde

TOC je celkový organický uhlík (Total Organic Carbon)

TC celkový uhlík (Total Carbon)

IC anorganický uhlík (Inorganic Carbon)

3.4 Výsledky

První datový sloupec tabulky 2 obsahuje hodnoty Cox stanovené titrační dichromanovou metodou, TOC jsou vypočtené hodnoty z měření ve sloupcích 7 a 8. TOCn jsou korigované hodnoty TOC, kde $\text{TOC} = \text{TC}$, je-li $\text{pH}(\text{CaCl}_2) < 6,8$. Sloupec 5 obsahuje hodnoty Cox naměřené pomocí metody NIRS a sloupec 6 obsahuje poměr TOC ku TC vyjádřený v procentech. V posledním sloupci jsou hodnoty naměřeného celkového dusíku.

Tabulka 2. Výsledky.

	Cox_ titr	TOC	TOCn	pH (CaCl₂)	Cox_ nir	TOC/ TC	TC	IC	TN
Označení vzorku	%	%	%		%	rel%	%	%	%
7024B-2001-9-24-O-0	2,72	2,86	2,86	7,08	2,29	99,4	2,88	0,02	0,28
5004B-2001-9-25-O-0	1,49	1,60	1,60	7,18		98,4	1,62	0,03	0,16
7014B-2001-6-13-O-0	0,79	0,91	0,91	7,28	1,58	93,1	0,98	0,07	0,09
8025B-2001-10-19-O-0	3,43	3,91	3,93	6,50	2,85	99,6	3,93	0,02	0,38
7011B-2001-9-10-O-0	1,42	1,70	1,70	7,05	1,49	98,7	1,72	0,02	0,17
2005B-2001-5-5-O-0	1,73	1,71	1,71	7,33	1,59	98,3	1,74	0,03	0,16
5003B-2001-5-10-O-0	1,68	2,00	2,00	7,55		78,6	2,55	0,55	0,17
5901KO-2001-9-5-O-0	1,44	1,70	1,70	7,60		92,5	1,84	0,14	0,15
8017B-2001-10-4-O-0	1,68	1,84	1,84	4,68	1,60	99,9	1,84	0,00	0,20
2007B-2001-4-4-O-0	3,27	3,54	3,57	6,63	2,37	99,0	3,57	0,04	0,34
2032B-2001-4-5-O-0	1,17	1,28	1,28	7,03	1,26	98,9	1,30	0,01	0,14
5014B-2001-6-27-O-0	1,06	1,21	1,21	7,40		97,6	1,24	0,03	0,13
7021B-2001-9-27-O-0	0,84	1,00	1,00	7,60	1,02	72,1	1,39	0,39	0,11
5017BO-2001-4-25-O-0	3,52	3,69	3,73	6,25		98,9	3,73	0,04	0,33
8023B-2001-10-8-O-0	3,71	3,90	3,92	6,33	2,40	99,4	3,92	0,02	0,34
8901KO-2001-10-15-O-0	1,09	1,18	1,18	7,08	1,46	98,4	1,20	0,02	0,12
2023B-2001-4-27-O-0	0,97	1,04	1,04	4,83	1,17	99,8	1,04	0,00	0,10
4012B-2001-8-21-O-0	1,31	1,47	1,48	4,80		99,8	1,48	0,00	0,13
2021B-2001-5-30-O-0	0,55	0,65	0,66	5,53	0,82	99,1	0,66	0,01	0,07
7019B-2001-6-11-O-0	1,05	1,15	1,15	7,65	1,00	28,6	4,02	2,87	0,13

21830/17	1,53	1,62	1,63	5,03	1,18	99,4	1,63	0,01	0,19
22274/17	1,79	1,88	1,89	5,84	1,29	99,4	1,89	0,01	0,19
22295/17	1,70	1,78	1,79	4,96	1,22	99,2	1,79	0,02	0,18
22465/17	1,34	1,41	1,43	6,03	0,85	98,4	1,43	0,02	0,16
494/18	1,72	1,83	1,84	5,22	1,23	99,3	1,84	0,01	0,19
514/18	0,93	0,96	0,98	4,82	0,84	98,7	0,98	0,01	0,12
635/18	1,30	1,47	1,48	4,41	1,43	99,5	1,48	0,01	0,16
1417/18	0,93	1,09	1,10	5,31	1,03	98,8	1,10	0,01	0,14
1478/18	0,88	1,01	1,02	6,41	0,85	98,6	1,02	0,01	0,13
1504/18	1,09	1,30	1,32	6,55	1,15	98,5	1,32	0,02	0,16
1979/18	1,36	1,46	1,46	7,02	1,11	98,0	1,49	0,03	0,16
2021/18	1,66	1,95	1,97	5,52	0,76	99,4	1,97	0,01	0,18
2023/18	0,97	1,16	1,16	5,25	0,97	99,3	1,16	0,01	0,13
2036/18	1,87	1,94	1,94	5,09	0,835F	99,7	1,94	0,01	0,21
2058/18	1,01	1,18	1,19	5,14	0,90	98,8	1,19	0,01	0,13
12042/18	1,33	1,40	1,41	5,83	0,97	99,0	1,41	0,01	0,17
12063/18	1,31	1,28	1,28	7,36	1,01	94,9	1,35	0,07	0,16
12368/18	1,26	1,37	1,39	6,42	1,11	98,8	1,39	0,02	0,16
12505/18	1,41	1,49	1,50	5,15	1,24	99,4	1,50	0,01	0,17
12556/18	1,17	1,31	1,32	4,63	1,00	99,2	1,32	0,01	0,15
12653/18	1,18	1,24	1,25	5,92	1,12	98,7	1,25	0,02	0,15
14425/18	1,16	1,28	1,29	5,38	0,86	99,1	1,29	0,01	0,15
14530/18	1,80	1,96	1,97	5,29	1,32	99,4	1,97	0,01	0,22
14599/18	1,17	1,20	1,22	6,36	1,11	98,5	1,22	0,02	0,15
14854/18	1,74	1,79	1,81	5,84	1,34	98,8	1,81	0,02	0,22
15004/18	1,76	1,80	1,80	6,96	1,14	95,1	1,89	0,09	0,23
15159/18	1,40	1,40	1,42	6,45	1,36	98,9	1,42	0,02	0,16
15470/18	1,72	1,88	1,90	5,99	0,97	99,3	1,90	0,01	0,21
15739/18	0,64	0,70	0,72	6,74	1,20	96,7	0,72	0,02	0,08
16379/18	2,44	2,58	2,59	5,65	0,99	99,5	2,59	0,01	0,26
16600/18	3,30	3,61	3,63	5,49	1,06	99,5	3,63	0,02	0,35
17428/18	1,23	1,32	1,32	7,03	1,40	92,4	1,43	0,11	0,16
17641/18	1,32	1,46	1,46	6,84	1,33	91,4	1,59	0,14	0,17
17686/18	1,40	1,48	1,49	4,95	1,17	99,5	1,49	0,01	0,16
17877/18	1,19	1,29	1,29	4,55	1,00	99,6	1,29	0,01	0,16
17960/18	1,76	1,96	1,97	6,01	1,31	99,4	1,97	0,01	0,22
18088/18	1,85	1,96	1,98	6,21	1,30	98,6	1,98	0,03	0,22
18481/18	1,60	1,75	1,76	5,86	0,90	99,4	1,76	0,01	0,20
18669/18	1,21	1,33	1,34	5,78	0,81	98,9	1,34	0,02	0,16
18891/18	1,44	1,56	1,57	5,89	1,11	99,3	1,57	0,01	0,17
18897/18	1,24	1,27	1,28	6,76	0,97	98,8	1,28	0,02	0,15

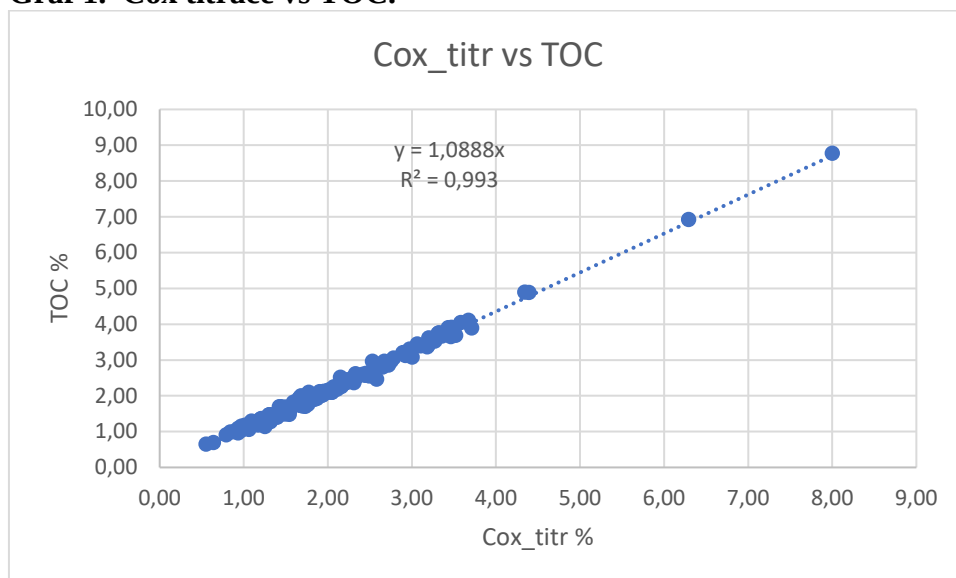
19071/18	1,33	1,46	1,46	6,90	1,08	98,0	1,48	0,03	0,18
19740/18	2,33	2,62	2,62	7,54	1,38	88,7	2,95	0,33	0,27
19955/18	1,98	2,12	2,13	5,85	0,88	99,3	2,13	0,02	0,21
19998/18	2,31	2,54	2,55	5,22	1,34	99,6	2,55	0,01	0,26
20096/18	1,54	1,48	1,49	5,18	1,15	99,5	1,49	0,01	0,16
21116/18	1,70	1,72	1,73	5,42	1,25	99,4	1,73	0,01	0,19
461/17	2,89	3,21	3,21	7,20		70,3	4,57	1,36	0,35
470/17	3,32	3,77	3,80	4,95		99,3	3,80	0,03	0,38
477/17	3,06	3,45	3,47	5,06		99,3	3,47	0,02	0,33
479/17	3,58	4,05	4,08	5,65		99,4	4,08	0,03	0,41
491/17	4,34	4,90	4,93	5,90		99,5	4,93	0,02	0,48
524/17	3,21	3,57	3,57	7,41		94,7	3,76	0,20	0,36
552/17	3,10	3,40	3,40	7,24		97,4	3,49	0,09	0,35
708/17	3,31	3,75	3,75	7,33		96,5	3,89	0,14	0,36
816/17	4,39	4,89	4,89	7,33		79,1	6,19	1,29	0,49
829/17	3,31	3,68	3,72	6,15		99,0	3,72	0,04	0,36
831/17	3,41	3,82	3,86	5,98		99,1	3,86	0,04	0,37
857/17	3,20	3,62	3,64	5,65		99,4	3,64	0,02	0,34
863/17	3,47	3,92	3,94	5,47		99,4	3,94	0,02	0,40
870/17	3,36	3,68	3,68	6,93		97,7	3,76	0,09	0,36
875/17	3,67	4,11	4,11	6,98		98,3	4,18	0,07	0,38
13471/17	2,58	2,47	2,47	7,38		69,6	3,55	1,08	0,26
13484/17	2,95	3,19	3,19	7,46		75,4	4,24	1,04	0,32
13500/17	1,94	2,12	2,12	7,48		53,8	3,94	1,82	0,22
13583/17	2,20	2,44	2,44	7,45		70,8	3,45	1,01	0,25
13587/17	1,77	2,10	2,10	7,44		61,4	3,42	1,32	0,21
13607/17	2,97	3,31	3,31	7,33		71,5	4,62	1,31	0,32
13617/17	3,00	3,09	3,09	7,09		95,4	3,24	0,15	0,31
13661/17	2,54	2,72	2,72	7,47		59,7	4,56	1,84	0,27
13666/17	2,19	2,46	2,46	7,44		59,5	4,13	1,67	0,24
13681/17	2,32	2,53	2,53	7,46		67,5	3,74	1,22	0,25
13729/17	3,50	3,87	3,87	7,24		89,5	4,33	0,45	0,39
13732/17	2,15	2,52	2,52	7,42		73,9	3,41	0,89	0,25
16838/17	1,48	1,62	1,62	7,43		55,5	2,92	1,30	0,19
783/17	2,67	2,97	2,97	6,89		98,8	3,01	0,04	0,29
7221/17	1,59	1,83	1,85	5,80		98,9	1,85	0,02	0,19
7250/17	1,40	1,50	1,52	6,31		98,6	1,52	0,02	0,16
7536/17	1,79	1,98	1,98	6,85		98,3	2,01	0,03	0,22
7545/17	1,90	2,08	2,08	7,38		93,3	2,23	0,15	0,24
8178/17	2,13	2,25	2,28	5,70		98,9	2,28	0,03	0,23
8227/17	1,72	1,76	1,79	5,23		98,3	1,79	0,03	0,18

10472/17	1,50	1,69	1,69	7,39		88,6	1,91	0,22	0,20
10864/17	1,48	1,64	1,64	6,96		97,7	1,67	0,04	0,18
10882/17	1,42	1,59	1,63	6,65		97,6	1,63	0,04	0,17
10895/17	1,63	1,86	1,86	6,80		98,0	1,89	0,04	0,19
10898/17	1,20	1,36	1,36	7,22		90,2	1,51	0,15	0,16
10901/17	1,72	1,91	1,95	6,70		98,0	1,95	0,04	0,21
10902/17	1,68	1,86	1,86	7,32		92,0	2,03	0,16	0,21
10907/17	1,78	2,01	2,01	6,88		97,5	2,06	0,05	0,20
10908/17	1,30	1,47	1,47	7,21		95,6	1,54	0,07	0,16
12580/17	1,06	1,07	1,09	5,76		98,4	1,09	0,02	0,13
13192/17	2,66	2,92	2,94	5,46		99,2	2,94	0,03	0,28
13207/17	8,00	8,78	8,80	5,35		99,8	8,80	0,02	0,67
13245/17	1,55	1,62	1,65	6,62		98,0	1,65	0,03	0,18
13299/17	2,78	3,06	3,07	4,65		99,5	3,07	0,02	0,31
13304/17	1,14	1,23	1,25	4,85		98,3	1,25	0,02	0,15
13319/17	1,82	2,00	2,01	4,87		99,2	2,01	0,02	0,22
13322/17	1,44	1,53	1,55	6,05		98,7	1,55	0,02	0,17
13351/17	2,48	2,60	2,65	6,53		98,3	2,65	0,05	0,26
13379/17	1,40	1,46	1,46	7,30		83,6	1,75	0,29	0,16
13488/17	2,13	2,29	2,29	7,21		96,9	2,36	0,07	0,24
13492/17	2,28	2,49	2,49	6,93		98,6	2,52	0,04	0,26
13496/17	2,75	2,97	2,97	7,39		92,1	3,22	0,26	0,31
13522/17	1,94	2,03	2,06	6,20		98,6	2,06	0,03	0,22
13527/17	1,90	2,04	2,06	5,56		98,9	2,06	0,02	0,23
13531/17	1,99	2,10	2,10	7,28		78,3	2,68	0,58	0,24
13535/17	1,87	2,00	2,00	7,06		97,9	2,04	0,04	0,21
13569/17	1,23	1,32	1,34	6,39		98,4	1,34	0,02	0,14
13573/17	1,95	2,13	2,13	7,40		84,2	2,53	0,40	0,22
13578/17	1,87	1,99	1,99	6,93		98,1	2,02	0,04	0,21
13595/17	2,33	2,53	2,53	7,44		67,6	3,74	1,21	0,26
13606/17	2,12	2,29	2,29	7,22		96,5	2,37	0,08	0,24
13635/17	1,21	1,37	1,37	7,16		95,9	1,43	0,06	0,16
13671/17	2,30	2,40	2,40	7,38		88,0	2,73	0,33	0,24
13676/17	1,74	1,92	1,92	7,40		79,2	2,43	0,51	0,21
13727/17	1,90	2,12	2,15	6,42		98,7	2,15	0,03	0,23
13763/17	2,53	2,97	2,97	7,53		91,5	3,25	0,28	0,28
13294/17	2,49	2,56	2,57	4,89		99,5	2,57	0,01	0,25
14343/17	1,69	1,87	1,89	6,22		98,9	1,89	0,02	0,20
15720/17	1,17	1,19	1,20	4,66		99,2	1,20	0,01	0,14
16760/17	1,49	1,60	1,60	7,37		83,8	1,91	0,31	0,19
18413/17	2,01	2,16	2,18	5,40		99,1	2,18	0,02	0,21

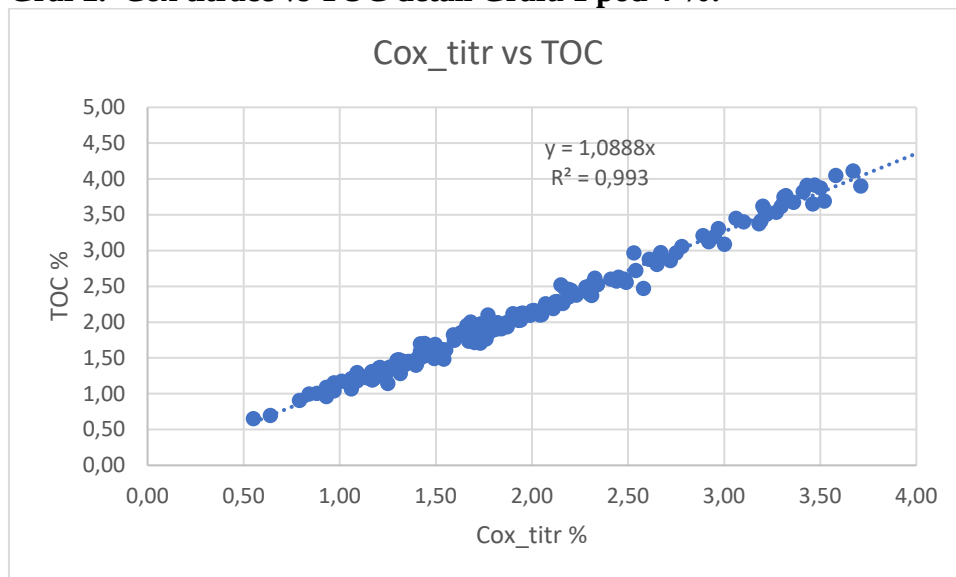
18640/17	1,18	1,21	1,24	5,61		98,2	1,24	0,02	0,15
17378/18	2,00	2,16	2,16	7,00	2,07	96,3	2,24	0,08	0,24
17400/18	1,93	2,03	2,03	7,42	2,66	87,6	2,31	0,29	0,22
17405/18	1,60	1,78	1,78	7,40	1,89	89,8	1,98	0,20	0,20
17419/18	1,47	1,62	1,62	7,41	1,64	95,9	1,69	0,07	0,18
17436/18	1,07	1,14	1,14	7,10	1,26	91,7	1,25	0,10	0,15
17568/18	1,82	1,91	1,91	7,21	1,79	96,1	1,99	0,08	0,22
17573/18	1,84	1,94	1,94	7,32	1,85	83,8	2,32	0,38	0,22
17576/18	1,67	1,74	1,74	7,15	1,60	93,9	1,85	0,11	0,19
17620/18	1,40	1,42	1,42	7,47	1,48	77,8	1,83	0,41	0,17
19066/18	2,11	2,19	2,19	7,41	2,21	94,6	2,31	0,13	0,27
19259/18	2,05	2,10	2,10	7,52	1,96	66,2	3,18	1,07	0,24
19261/18	3,22	3,51	3,51	7,39	1,67	91,8	3,82	0,31	0,37
19749/18	2,61	2,88	2,88	7,06	2,98	97,1	2,97	0,09	0,28
19762/18	2,17	2,47	2,49	6,35	2,82	99,0	2,49	0,02	0,24
19767/18	2,31	2,37	2,41	6,47	3,28	98,6	2,41	0,03	0,24
19769/18	2,19	2,35	2,35	7,27	3,57	94,5	2,49	0,14	0,23
19771/18	1,77	1,88	1,92	6,13	2,55	97,7	1,92	0,04	0,19
19788/18	1,73	1,98	2,00	5,94	2,60	98,9	2,00	0,02	0,19
19266/18	1,84	1,91	1,91	7,05	2,42	92,6	2,06	0,15	0,22
19302/18	1,76	1,77	1,77	7,62	1,84	59,6	2,96	1,20	0,21
19314/18	1,25	1,15	1,15	7,69	1,07	26,6	4,30	3,16	0,15
19325/18	2,05	2,17	2,17	7,50	2,14	74,6	2,91	0,74	0,23
19737/18	2,34	2,53	2,54	5,44	2,50	99,6	2,54	0,01	0,24
19743/18	2,23	2,38	2,38	7,54	1,56	78,7	3,02	0,64	0,26
19773/18	0,95	1,08	1,09	4,64	2,02	99,4	1,09	0,01	0,12
19787/18	1,49	1,50	1,51	5,09	1,85	99,2	1,51	0,01	0,16
20090/18	2,04	2,10	2,18	6,51	1,70	96,2	2,18	0,08	0,22
20098/18	1,54	1,58	1,61	5,50	1,72	98,5	1,61	0,02	0,18
20706/18	2,16	2,26	2,26	7,01	1,88	95,9	2,36	0,10	0,23
20792/18	2,34	2,53	2,55	5,42	1,91	99,1	2,55	0,02	0,27
20798/18	1,81	1,91	1,93	6,40	1,53	98,6	1,93	0,03	0,22
20980/18	2,65	2,81	2,83	5,68	2,03	99,3	2,83	0,02	0,29
20996/18	3,46	3,65	3,67	5,12	2,22	99,6	3,67	0,01	0,37
20999/18	2,45	2,63	2,65	5,68	1,86	99,2	2,65	0,02	0,28
21003/18	2,41	2,60	2,63	5,86	1,51	99,1	2,63	0,02	0,28
21012/18	2,07	2,26	2,26	6,82	1,66	97,7	2,31	0,05	0,25
21086/18	3,19	3,42	3,43	4,24	2,17	99,6	3,43	0,01	0,35
21134/18	2,92	3,13	3,15	5,10	2,35	99,3	3,15	0,02	0,31
21135/18	3,18	3,37	3,39	5,40	2,55	99,5	3,39	0,02	0,33
6520/19	6,29	6,93	6,93	7,43	5,55 F	77,4	8,96	2,03	0,65

Pozn.: Bylo provedeno opakované stanovení titrační metodou Cox. U vzorku 4012B-2001-8-21-O-0 byla původní hodnota 1,04 nahrazena hodnotou 1,31, u vzorku 1979/18 hodnota 1,14 nahrazena hodnotou 1,36 a u vzorku 13583/17 původní hodnota 1,40 nahrazena hodnotou 2,20.

Graf 1. Cox titrace vs TOC.



Graf 2. Cox titrace vs TOC detail Grafu 1 pod 4 %.



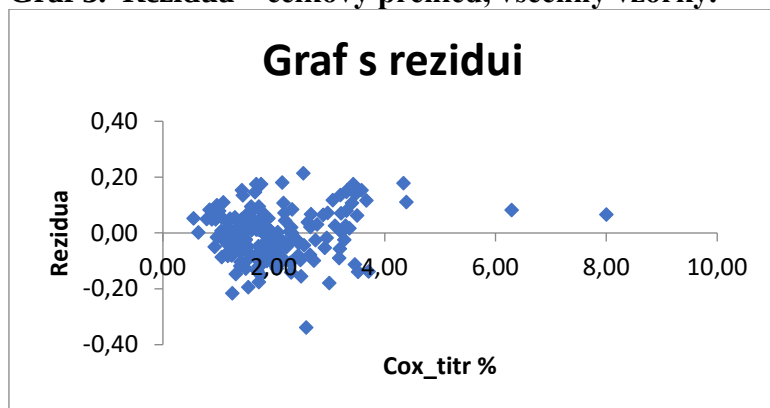
Z grafů 1 a 2 je patrná velmi dobrá korelace mezi hodnotami Cox_titr a TOC.

Byly vypočítány lineární regrese pro všechny vzorky, pro hladinu (0 – 2) %, pro hladinu (0 – 4) %, pro hladinu (2 – 4) % i pro hladinu nad (4 – 10) %, ale v té se nachází příliš málo dat. Na všech těchto hladinách nebylo možné zamítnout hypotézu, že posun po ose y se neliší

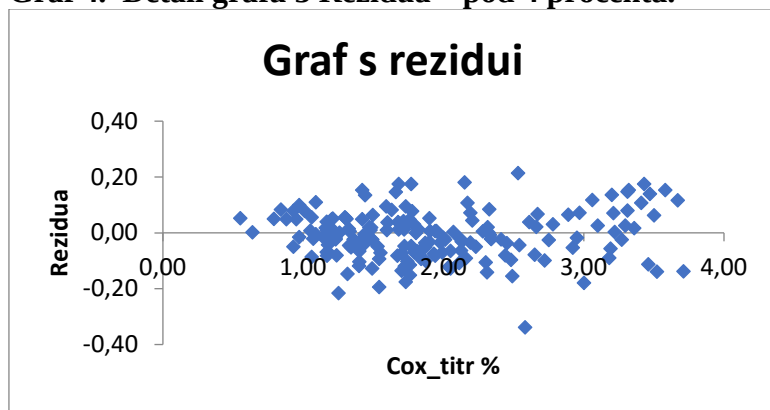
od nuly. Takže ve všech případech regresní přímka prochází počátkem a nejlepším popisem vztahu hodnot Cox_titr a TOC je směrnice regresní přímky. Této výsledku bylo dosaženo i pro dvojici parametrů Cox_titr a TOCn.

Na grafu reziduí lze vidět rovnoměrné rozložení kolem nuly, což naznačuje, že použitý regresní model je správný, že směrnice je v celém rozsahu konstantní, a že není nutné dělení vzorků do koncentračních hladin.

Graf 3. Rezidua – celkový přehled, všechny vzorky.



Graf 4. Detail grafu 3 Rezidua – pod 4 procenta.



Tabulka 3. Lineární regrese Cox_titr vs TOC celkový přehled, všechny vzorky.

	Koeficienty	Chyba stř. hodnoty	t Stat	Hodnota P	Dolní 95%	Horní 95%	Dolní 99,0%	Horní 99,0%
Hranice	0							
Soubor X 1	1,0888	0,00289	376,3	2,5E-266	1,0831	1,0945	1,0813	1,0963

Tabulka 4. Lineární regrese Cox_titr vs TOC (0 – 2) %.

	Koeficienty	Chyba stř. hodnoty	t Stat	Hodnota P	Dolní 95%	Horní 95%	Dolní 99,0%	Horní 99,0%
Hranice	0							
Soubor X 1	1,0789	0,00474	227,5	5,1E-150	1,0695	1,0883	1,0665	1,0913

Tabulka 5. Lineární regrese Cox_titr vs TOC (0 – 4) %.

	Koeficienty	Chyba stř. hodnoty	t Stat	Hodnota P	Dolní 95%	Horní 95%	Dolní 99,0%	Horní 99,0%
Hranice	0							
Soubor X 1	1,0858	0,00311	348,9	1,6E-255	1,0796	1,0919	1,0777	1,0939

Tabulka 6. Lineární regrese Cox_titr vs TOC (2 – 4) %.

	Koeficienty	Chyba stř. hodnoty	t Stat	Hodnota P	Dolní 95%	Horní 95%	Dolní 99,0%	Horní 99,0%
Hranice	0							
Soubor X 1	1,0892	0,00450	242,0	4,9E-99	1,0802	1,0982	1,0773	1,1011

Tabulka 7. Lineární regrese Cox_titr vs TOC (4 – 10) %.

	Koeficienty	Chyba stř. hodnoty	t Stat	Hodnota P	Dolní 95%	Horní 95%	Dolní 99,0%	Horní 99,0%
Hranice	0							
Soubor X 1	1,1051	0,00644	171,5	4,37E-07	1,0846	1,1256	1,0674	1,1427

Z tabulek 3 až 7 vyplývá, že směrnice jsou shodné bez ohledu na koncentrační hladinu. Jako přepočítávací koeficient se jeví nejvhodnější zaokrouhlená hodnota směrnice z tabulky 3, a potom

$$\text{TOC} = \text{Cox} \times 1,09 \text{ a naopak } \text{Cox} = \text{TOC}/1,09.$$

Hodnota 1,09 je zahrnuta ve všech intervalech spolehlivosti s výjimkou koncentrační hladiny (0 – 2) % na hladině 5 %. Na hladině 1 % už se do intervalu vejde.

3.5 Opakovatelnost, nejistota, mez stanovitelnosti

Tabulka 8. Opakovatelnost.

	Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost (%)	n
TN	0.2071	0.0047	2.29	25
	Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost (%)	n
TC	2.3376	0.0575	2.46	25
	Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost (%)	n
IC	1.2547	0.0129	1.03	13

Jako praktická hodnota bylo zvoleno 5 % pro všechny parametry. Výpočty byly provedeny v programu EffiValidation, krokem Opakovatelnost-paralelních měření.

Tabulka 9. Nejistota.

	Charakteristika	Hodnota %
TN	Rel. rozšířená nejistota	4.6
	Charakteristika	Hodnota %
TC	Rel. rozšířená nejistota	4.9
	Charakteristika	Hodnota %
IC	Rel. rozšířená nejistota	2.1

Jako praktické hodnoty byly zvoleny pro TN 10 % a pro TC a IC 8 %. Výpočty byly provedeny v programu EffiValidation, krokem Nejistoty-z dat pro vyhodnocení přesnosti-paralelní měření.

Tabulka 10. Nejistota TOC.

TOC	relativní nejistota	
	2,7	%
	relativní rozšířená nejistota k = 2	
	5,3	%

Nejistota stanovení TOC byla vypočítána součtem nejistot stanovení TC a IC a vynásobena koeficientem rozšíření $k = 2$. Jako praktická hodnota relativní rozšířené nejistoty byla zvolena hodnota 10 %.

Mez detekce IC byla vypočtena na 0,019 % a mez stanovitelnosti na 0,033 %. Jako praktická hodnota meze stanovitelnosti IC byla zvolena hodnota 0,05 %.

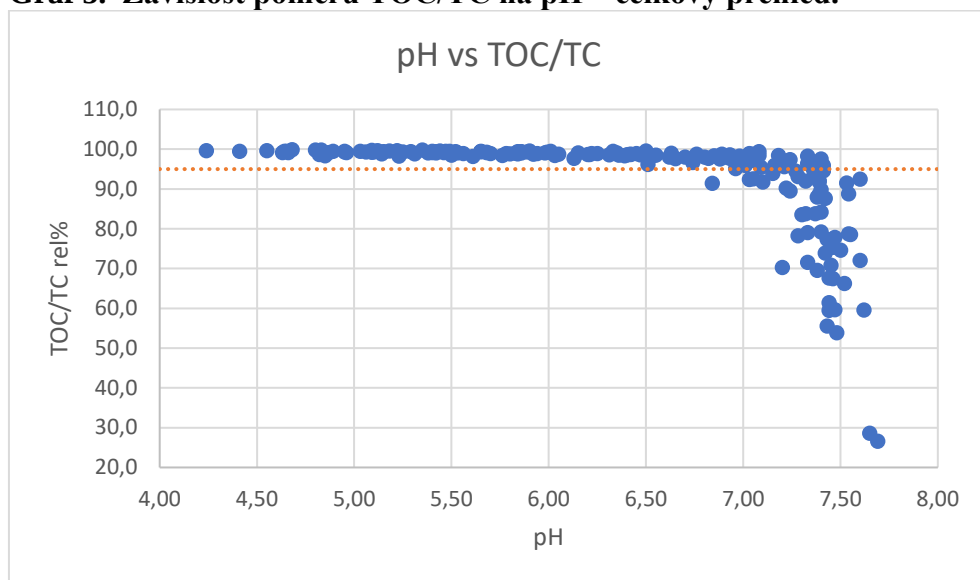
Mez detekce TN byla vypočtena na 0,036 % a mez stanovitelnosti na 0,056 %. Jako praktická hodnota meze stanovitelnosti TN byla zvolena hodnota 0,05 %.

Výpočty byly provedeny v programu EffiValidation, krokem Plná validace-meze-z kalibrační přímky.

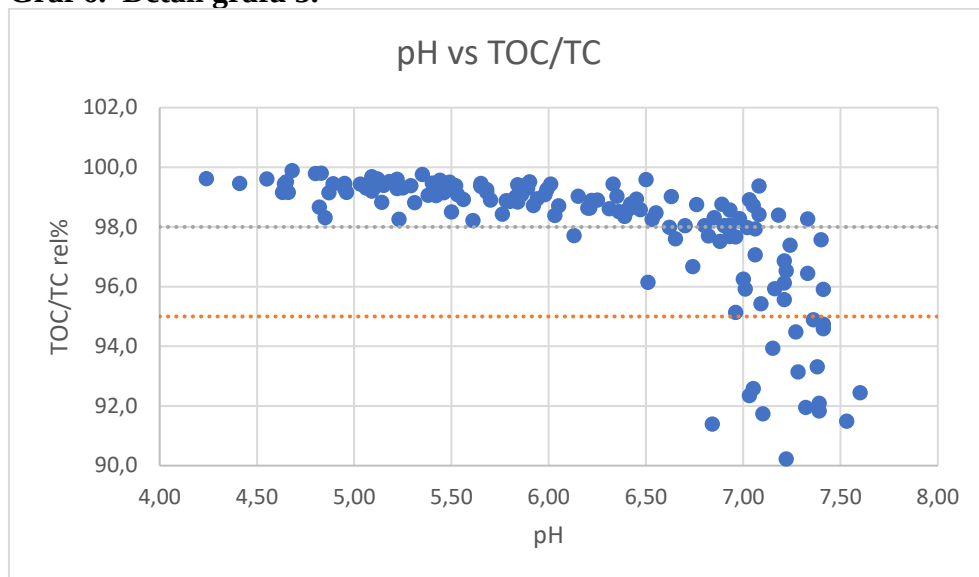
3.6 TOCn

Jak již bylo zmíněno výše, TOCn je korigovaná hodnota TOC, kdy při $\text{pH} < 6,8$ se může zanedbat obsah anorganického (uhličitanového) uhlíku a prohlásit, že TC se rovná TOC. V naprosté většině navíc u půd s $\text{pH} < 6,8$ byla koncentrace IC pod mezí stanovitelnosti tj. 0,05 %. Z poměru TOC/TC lze vyčíst, že hodnota TOC se pro půdy s $\text{pH} < 6,8$ neliší od hodnoty TC o více než 5 rel.%, ale zpravidla je tato chyba menší než 2 rel. %. Graficky jsou tyto skutečnosti znázorněny v grafech 5, 6, 7 a 8.

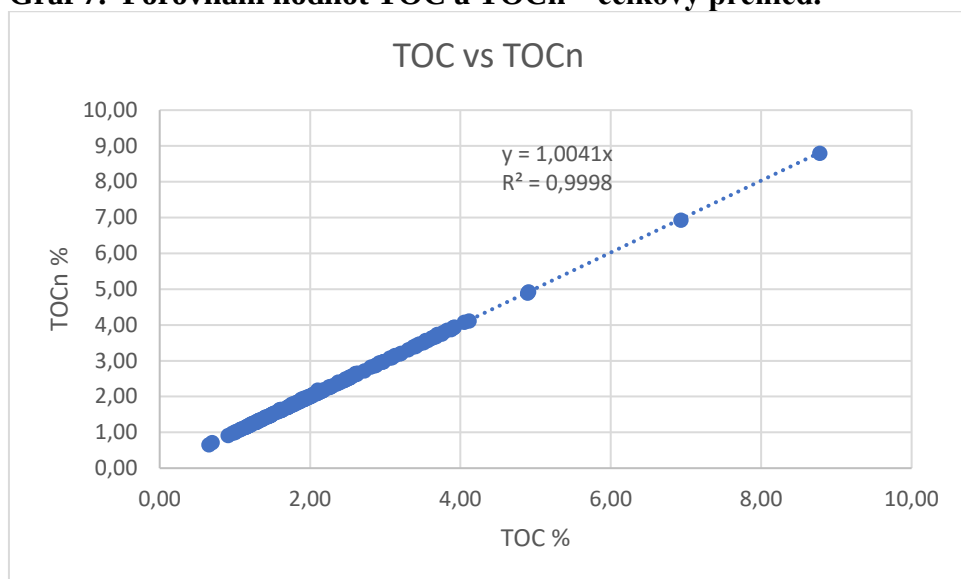
Graf 5. Závislost poměru TOC/TC na pH – celkový přehled.



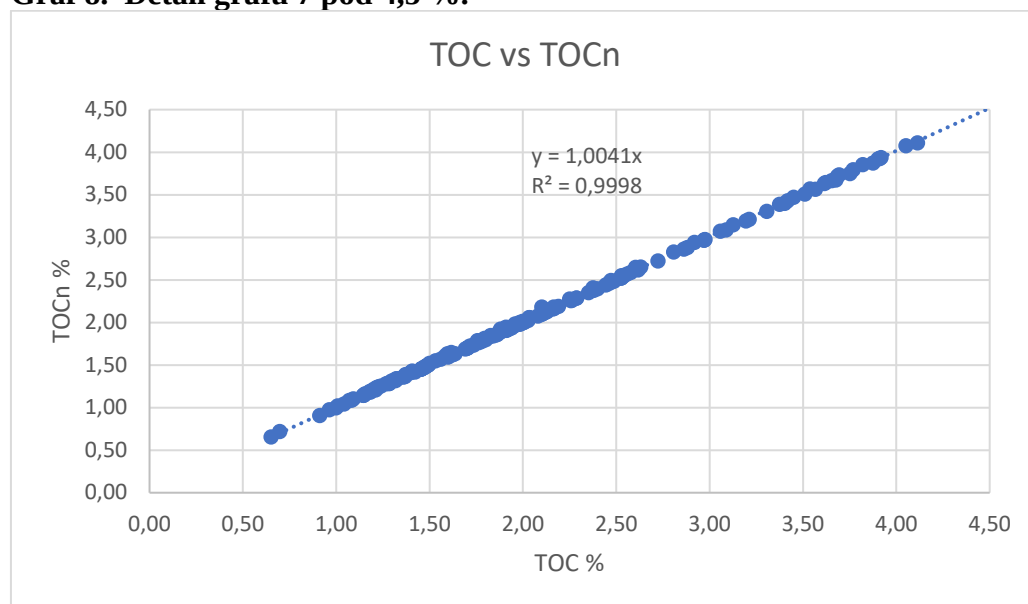
Graf 6. Detail grafu 5.



Graf 7. Porovnání hodnot TOC a TOCn – celkový přehled.



Graf 8. Detail grafu 7 pod 4,5 %.



Z grafů 7 a 8 je patrné, že hodnoty TOC a TOCn jsou téměř totožné.

Při rutinním měření vzorků AZZP se zpravidla měří pH a dělá se orientační zkouška na obsahu uhličitánů. Využitím těchto dat by bylo možné snížit množství vzorků pro měření IC o zhruba (70 – 80) %. Vzhledem k tomu, že měření IC je delší než měření TC, by došlo ke snížení celkového čistého času potřebného pro analýzu TOC o přibližně 50 % a tím i ke snížení nákladů. Měření jednoho vzorku TC a TN trvá asi 8 min, měření jednoho vzorku IC trvá mírně přes 10 min.

4 Závěr

Metoda stanovení TOC je dostatečně efektivní náhradou za titrační metodu stanovení Cox v půdách. Vztah těchto veličin se řídí rovnicí $TOC = Cox \times 1,09$ v celém zkoumaném koncentračním rozsahu a není potřeba vzorky rozdělovat do koncentračních hladin.

Dále je vhodné využít hodnoty pH pro selekci vzorků s pravděpodobným obsahem uhličitánů (anorganický uhlík) a stanovení IC provádět jen na těchto vzorcích. To umožní snížení časové a finanční náročnosti stanovení TOC a tím i zvýšení produktivity.

5 Literatura

- 1 Kvalita půdy – Stanovení organického a celkového uhlíku po termickém rozkladu, ČSN ISO 10694, 1998
- 2 Kaly, upravený bioodpad, půdy a odpady – Stanovení celkového organického uhlíku (TOC) suchým spalováním, ČSN EN 15936, 2013
- 3 Jednotné pracovní postupy – Analýza půd III, ÚKZÚZ Brno 2011, ISBN 978-80-7401-044-6

Využití spektrofotometrických metod pro stanovení obsahu amonného a dusičnanového dusíku v hnojivech

Václav Rypl, Libuše Tůmová, Ludmila Hamplová

1 Úvod

Cílem práce bylo zjistit, zda je možné nahradit časově náročné a pracné stanovení N-NH₄ pomocí tlakového vzduchu spektrofotometrickou metodou. Dále je třeba pro stanovení N-NO₃ ověřit použití přímého spektrofotometrického stanovení namísto výpočtu, pro který je třeba nejdříve stanovit celkový obsah dusíku metodou podle Devarda a poté celkový obsah N-NH₄.

2 Materiál a metody

2.1 Chemikálie

2.1.1 Chemikálie N-NH₄

2.1.1.1 Destilovaná nebo deionizovaná voda

2.1.1.2 Reakční roztok

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s asi 500 ml vody (2.1.1.1) se rozpustí 34 g salicylanu sodného, 25 g citronanu sodného, 25 g vínanu sodného a 0,12 g nitroprusidu sodného. Po dokonalém rozpuštění se baňka doplní vodou (2.1.1.1) po značku a pečlivě zamíchá. Roztok se uchovává v chladu a temnu. Doba použití je minimálně 1 týden.

2.1.1.3 Alkalický chlornan sodný, (NaClO).

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s asi 250 ml vody (2.1.1.1) se rozpustí 30 g hydroxidu sodného a přidá se 10 ml chlornanu sodného (min. obsah 5% aktivního Cl⁻). Po rozpuštění a ochlazení se roztok doplní vodou po značku. Roztok se uchovává v chladu a temnu. Doba použití 1 týden.

2.1.1.4 Síran amonný, ((NH₄)₂SO₄), základní standardní roztok, c (N-NH₄) = 1000 mg/l

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se v asi 250 ml vody (2.1.1.1) rozpustí 4,7189 g síranu amonného (NH₄)₂SO₄, předsušeného 2 h při (105 ± 2) °C, doplní vodou (2.1.1.1)

do objemu 990 ml, vytemperuje na teplotu $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a poté doplní vodou (2.1.1.1) po značku. Roztok se pečlivě promíchá. Doba použití je maximálně 3 měsíce.

2.1.1.5 Síran amonný, $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, pracovní standardní roztok (A), $c(\text{N-NH}_4) = 100 \text{ mg/l}$

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se pipetuje 100 ml zásobního standardního roztoku (2.1.1.4), doplní vodou (1) do objemu 990 ml, vytemperuje na teplotu $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a poté doplní vodou (2.1.1.1) po značku. Roztok se pečlivě promíchá. Roztok se připravuje vždy čerstvý.

2.1.1.6 Síran amonný, $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, pracovní standardní roztok (B), $c(\text{N-NH}_4) = 50 \text{ mg/l}$

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 50 ml zásobního standardního roztoku (2.1.1.4), doplní vodou (2.1.1.1) do objemu 90 ml, vytemperuje na teplotu $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a poté doplní vodou (2.1.1.1) po značku. Roztok se pečlivě promíchá. Roztok se připravuje vždy čerstvý.

2.1.2 Chemikálie N- NO_3

2.1.2.1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.

2.1.2.2 Kyselina sírová, (H_2SO_4) , koncentrovaná, 96%, $(\rho=1,84 \text{ g.dm}^{-3})$.

2.1.2.3 Kyselina sírová, (H_2SO_4) , zředěná 1+9,

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se asi k 700 ml vody (2.1.2.1) opatrně přidává 100 ml koncentrované H_2SO_4 . Po ochlazení se doplní objem vodou (1) po značku.

2.1.2.4 Kyselina sírová, H_2SO_4 , zředěná v poměru 1+1,

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se asi k 450 ml vody (2.1.2.1) opatrně přidává 500 ml koncentrované H_2SO_4 . Po ochlazení se doplní objem vodou (1) po značku a pečlivě promíchá.

2.1.2.5 Síran měďnatý, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, roztok $c(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 2,5\%$.

Příprava: Ve 100ml odměrné baňce se v asi 50 ml vody (2.1.2.1) rozpustí 2,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Obsah baňky doplní vodou (2.1.2.1) po značku.

2.1.2.6 Dusičnan sodný, NaNO_3 , zásobní standardní roztok, $c(\text{N-NO}_3) = 1000 \text{ mg/l}$.

Příprava: V 1000ml odměrné baňce s asi 500 ml vody (2.1.2.1) se rozpustí 6,068 g dusičnanu sodného (NaNO_3). Poté se doplní vodou (2.1.2.1) po značku a po uzavření pečlivě promíchá. Roztok je stálý po dobu 6 měsíců při uchování ve skle, v chladu a temnu.

2.1.2.7 Dusičnan sodný, (NaNO_3), pracovní standardní roztok, $c(\text{N-NO}_3) = 50 \text{ mg/l}$.

Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 5 ml zásobního standardního roztoku (2.1.2.6) a doplní se vodou (2.1.2.1) po značku a pečlivě promíchá.

2.1.2.8 Reduktor

Příprava: k 20 g granulí zinku o průměru asi (3 až 5) mm se přidá 150 ml vody (2.1.2.1) a 15 ml zředěné kyseliny sírové (2.1.2.4). Nechá se působit do očištění povrchu granulí.

Potom se granule opláchnou vodou (2.1.2.1) a kapalina se odsaje na Büchnerově nálevce. K opláchnutým granulím se v kádince přidá 150 ml vody (2.1.2.1) a po kapkách za stálého míchání se přidá 25 ml roztoku síranu měďnatého (2.1.2.5). Po zčernání granulí se opláchnou pečlivě vodou (2.1.2.1). Po usušení se uchovají v uzavřené skleněné nádobě.

2.1.2.9 Roztok pro ředění koncentrovaných vzorků.

Příprava: Do 250ml odměrné baňky s asi 200 ml vody (2.1.2.1) se přidá 10 ml zředěné kyseliny sírové (2.1.2.3), objem se doplní po značku vodou (2.1.2.1) a pečlivě se promíchá.

2.2 Materiál

Pro porovnání byly vybrány vzorky z „LIMS - Hnojiva centrální“ analyzované klasickými metodami a tyto vzorky byly následně analyzovány spektrofotometrickými metodami.

Tabulka 1. Vzorky pro stanovení N-NH₄.

č.vz. LIMS	rok LIMS	popis
78	2016	kap. Greenworld, hnojivo pro pelargonie
101	2016	kap. NPK 6 - 4 - 6
186	2016	pev. NPK 13 - 5 - 5 + 2Mg + Fe, trávnick. hnojivo proti krtkům
352	2016	kap. Substral, koncentrát pro rajčata
353	2016	pev. Substral, pro konifery a rododendrony
700	2016	kap. NPK 7 - 5 - 6 + ME
702	2016	kap. Agrecol, hnojivo na balkonové rostliny, NPK 5 - 3 - 7 + ME
703	2016	kap. Agrecol, hnojivo na orchideje, NPK 5 - 5 - 5 + ME
735	2016	kap. Ferti B, dusíkaté hnojivo + ME
738	2016	kap. Fertigreen kombi NPK 7 - 7 - 5
189	2017	NPK 19-6-20+3MgO+3S+ME(ES) (Kristalon pokojové rostliny)
190	2017	NPK 19-6-20 (Kristalon Muškát v láhvi)
191	2017	Kristalon Gold v láhvi
255	2017	Hnojivo pro rododendrony s dlouhodobým účinkem 16-7-15+2MgO+ME
325	2017	NPK 6-7-6+ME (Kapalné hnojivo na muškáty)
335	2017	Green Plant Nutrition
336	2017	Palm Nutrition
349	2017	NPK 17-6-24 + 15 SO ₃ + ME - Kristalon balkon. květiny
376	2017	Biopon - gelové hnojivo UNIVERZÁLNÍ (ES)
377	2017	Biopon gelové hnojivo ORCHIDEJE (ES)
378	2017	NPK 7-5-6 + ME Cererit Forestina/Lovochemie (ES)
379	2017	NPK 8-13-11 Cererit (ES)
380	2017	NPK (MgO,SO ₃) 18-7-20(2-12) Forestina mineral (ES) Na muškáty a jiné balkonové květiny
381	2017	NPK 19-6-20+3MgO+3S+ME(ES) (Kristalon pokojové rostliny)
536	2017	Multi N+S Amino
537	2017	Multi N
565	2017	Vitafol plex
569	2017	Silva Tabs NPK 20-15-10 + 2,5 % MgO + ME
570	2017	Aucyt start
571	2017	Primseed

Tabulka 2 Vzorky pro stanovení N-NO₃.

č.vz. LIMS	rok LIMS	popis
63	2016	kap. organo-miner. NPK + CaO + MgO + ME
78	2016	kap. Greenworld, hnojivo pro pelargonie
352	2016	kap. Substral, koncentrát pro rajčata
700	2016	kap. NPK 7 - 5 - 6 + ME
702	2016	kap. Agrecol, hnojivo na balkonové rostliny, NPK 5 - 3 - 7 + ME
703	2016	kap. Agrecol, hnojivo na orchideje, NPK 5 - 5 - 5 + ME
738	2016	kap. Fertigreen kombi NPK 7 - 7 - 5
62	2017	kap. Cererit s guánem a mořskými řasami
121	2017	pev. KAS27, VDLUFA
189	2017	NPK 19-6-20+3MgO+3S+ME(ES) (Kristalon pokojové rostliny)
190	2017	NPK 19-6-20 (Kristalon Muškát v láhvi)
191	2017	Kristalon Gold v láhvi
255	2017	Hnojivo pro rododendrony s dlouhodobým účinkem 16-7-15+2MgO+ME
325	2017	NPK 6-7-6+ME (Kapalné hnojivo na muškáty)
335	2017	Green Plant Nutrition
336	2017	Palm Nutrition
376	2017	Biopon - gelové hnojivo UNIVERZÁLNÍ (ES)
377	2017	Biopon gelové hnojivo ORCHIDEJE (ES)
378	2017	NPK 7-5-6 + ME Cererit Forestina/Lovochemie (ES)
380	2017	NPK (MgO,SO ₃) 18-7-20(2-12) Forestina mineral (ES) Na muškáty a jiné balkonové květiny
381	2017	NPK 19-6-20+3MgO+3S+ME(ES) (Kristalon pokojové rostliny)

2.3 Metody

2.3.1 N-NH₄ – spektrofotometrické stanovení

Dusík v amonné formě obsažený ve vzorku reaguje s chlornanem a salicylanem za vzniku modrého zbarvení (salicylátový analog indofenolu). Intenzita zbarvení se měří fotometricky při 660 nm. Výsledky se vyhodnocují metodou kalibrační křivky.

2.3.1.1 Přístroje a pomůcky

2.3.1.1.1 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.

2.3.1.1.2 Třepačka rotační, (30 – 45) ot/min.

2.3.1.1.3 Filtrační papír střední a vysoké hustoty.

2.3.1.1.4 Centrifuga, 4000ot/min.

2.3.1.1.5 Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 660 nm a kyvetou 10 mm.

2.3.1.1.6 Dilutor nebo vhodné dávkovací zařízení.

2.3.1.1.7 Míchadlo na zkumavky.

2.3.1.2 Pracovní postup

2.3.1.2.1 Kalibrace

Kalibrační roztoky se připraví podle tabulky č. 3.

Tabulka 3. Příprava roztoků kalibrační křivky pro měření N-NH₄.

Pořadové číslo roztoku	Objem baňky (ml)	Pipetovaný objem Prac. std. roztoku (B) (ml)	Koncentrace N-NH ₄ v roztoku (mg/l)
0	100	0	0
1	100	0,5	0,25
2	100	1	0,5
3	100	2	1,0
4	100	3	1,5
5	100	4	2
6	100	5	2,5
7	100	6	3,0
8	100	7	3,5

Objem 100ml odměrných baněk se doplní vodou (2.1.1.1) po značku a obsah se pečlivě promíchá.

2.3.1.2.2 Příprava výluhu vzorku

Do 500ml Stohmanovy baňky se naváží přibližně 2,5 g vzorku s přesností na 0,0001 g. Ke vzorku v baňce se přidá přesný objem 250 ml vody (2.1.1.1). Baňka se uzavře zátkou a třepe se 60 min v rotační třepačce při (35–45) ot/min. Roztok se promíchá a zfiltruje přes suchý filtr střední hustoty do suché nádoby. Prvních 50 ml filtrátu se nepoužije. Filtrát musí být čirý. Stejným

způsobem se připraví i slepý pokus. Takto připravené výluhy se před přípravou k měření ředí vodou (2.1.1.1) podle tabulky č. 4. Slepý pokus se neředí.

Tabulka 4 Příprava ředění výluhů pro měření N-NH₄.

Deklarovaný obsah N-NH ₄ v hnojivu (%)	Objem baňky (ml)	Pipetovaný objem výluhu vzorku (ml)	Použité ředění (x)
Do 0,5	100	5	20
0,5 – 2,5	100	1	100
2,5 – 5,0	200	1	200
Nad 5,0	500	1	500

Objem baněk se doplní vodou (2.1.1.1) po značku. Obsah baňky se důkladně promíchá.

2.3.1.2.3 Příprava výluhu pro měření

Do zkumavek o objemu 20 ml se pipetují 3 ml slepého pokusu, kalibračního standardního roztoku nebo zředěného výluhu vzorku. Přidá se 5 ml reakčního roztoku (2.1.1.2), obsah zkumavky se důkladně promíchá a nechá 15 min stát. Poté se přidá 5 ml roztoku alkalického chlornanu sodného (2.1.1.3), opět se dokonale promíchá a nechá se 60 min vybarvovat.

2.3.1.2.4 Měření obsahu amonného dusíku

Po ukončení vybarvovací reakce se přístroj nastaví podle doporučení výrobce. Přístrojová nula se nastaví na vodu (2.1.1.1). Měří se absorbance kalibračních roztoků a analyzovaných vzorků při vlnové délce $\lambda = 660 \text{ nm}$ v kyvetě o optické délce 10 mm. Výsledky se vyhodnocují metodou kalibrační křivky.

2.3.1.2.5 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah amonného dusíku vyjádřený hmotnostním zlomkem w_{spfa} v procentech se vypočte podle vztahu

$$w_{spfa} = \frac{(c_v - c_s) \times V \times V_1}{m \times a_1 \times 10000} \quad (\%)$$

V celkový objem zásobního roztoku vzorku v ml,

V_1 objem po naředění roztoku vzorku v ml,

a_1 objem použitého alikvotního podílu z celkového objemu zásobního roztoku v ml,

m hmotnost navážky vzorku v g,

c_v množství N-NH₄ ve vzorku, odečtené z kalibrační křivky v mg/l,

c_s množství N-NH₄ ve slepém pokusu, odečtené z kalibrační křivky v mg/l.

2.3.2 N-NO₃ – spektrofotometrické stanovení

Dusičnany absorbují v UV oblasti spektra při 210 nm. Po redukci dusičnanů na dusitany se provede druhé měření při 210 nm a z rozdílu naměřených hodnot se vypočítá obsah dusíku vyjádřený jako dusičnanový dusík (N-NO₃).

2.3.2.1 Přístroje a pomůcky

2.3.2.1.1 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.

2.3.2.1.2 Třepačka rotační, (30 – 45) ot/min.

2.3.2.1.3 Filtrační papír střední a vysoké hustoty.

2.3.2.1.4 Centrifuga, 4000ot/min.

2.3.2.1.5 Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 210 nm a kyvetou 10 mm.

2.3.2.1.6 Dilutor nebo vhodné dávkovače.

2.3.2.1.7 Míchadlo na zkumavky.

2.3.2.2 Pracovní postup

2.3.2.2.1 Kalibrace

Kalibrační roztoky se připraví podle tabulky č.5

Tabulka 5. Příprava kalibračních roztoků.

Pořadové číslo roztoku	Objem baňky (ml)	Pipetovaný objem Prac. std. roztoku (2.1.2.7) (ml)	Koncentrace kalibračního roztoku (mg/l)
0	100	0	0
1	100	5	2,5
2	100	10	5
3	100	15	7,5
4	100	20	10

Objem 100ml odměrných baněk se doplní vodou (2.1.2.1) po značku. Pečlivě se promíchá.

2.3.2.2.2 Příprava výluhu vzorku

Do 500ml Stohmanovy baňky se naváží přibližně 2,5 g vzorku s přesností 0,0001 g. Ke vzorku v baňce se přidá přesný objem 250 ml vody (2.1.2.1). Baňka se uzavře zátkou a třepe se 60 min v rotační třepačce při (35 – 45) ot/min. Roztok se promíchá a zfiltruje přes suchý filtr střední hustoty do suché nádoby. Prvních 50 ml filtrátu se nepoužije. Filtrát musí být čirý. Stejným způsobem se připraví i slepý pokus. Takto připravené výluhy se před přípravou k měření ředí vodou (2.1.2.1) podle tabulky č. 6.

Slepý pokus se neředí.

Tabulka 6. Příprava ředění výluhů pro měření N-NO₃.

Deklarovaný obsah N-NO ₃ v hnojivu (%)	Objem baňky (ml)	Pipetovaný objem výluhu vzorku (ml)	Použité ředění (x)
do 0,5	100	10	10
0,5 – 1,0	100	5	20
1,0 – 2,5	100	2	50
2,5 – 5,0	100	1	100
5,0 – 10,0	200	1	200
Nad 10,0	500	1	500

Objem baněk se doplní vodou (2.1.2.1) po značku. Obsah baňky se důkladně promíchá.

2.3.2.2.3 Příprava výluhu pro měření

Do dvou zkumavek o objemu 10 ml se pipetuje 1,5 ml slepého pokusu, kalibračního standardního roztoku nebo zředěného výluhu vzorku, přidá se 6,0 ml vody (2.1.2.1) a 0,3 ml zředěné kyseliny sírové (2.1.2.3). Objem zkumavek se promíchá a do jedné se přidají 2 až 3 granule reduktoru (2.1.2.8). Zkumavky bez granulí se uzavrou zátkou, s reduktorem se nechají bez zátky stát přes noc.

2.3.2.2.4 Měření obsahu dusičnanového dusíku

Přístrojová nula se nastaví na vodu. Měří se absorbance jednotlivých roztoků kalibrační křivky při 210 nm v kyvetě o optické délce 10 mm. Stejným způsobem se měří i hodnota slepého pokusu a připravených vzorků. Při překročení rozsahu kalibrační křivky se stanovení opakuje s použitím vzorku zředěného ředicím roztokem (2.1.2.9).

2.3.2.2.5 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah dusičnanového dusíku vyjádřený hmotnostním zlomkem w_{spfd} v procentech se vypočte podle vztahu

$$w_{spfd} = \frac{((Cv - Cr) - (Csl - Cslr)) \times V \times V1}{m \times a1 \times 10000} \quad (\%)$$

V celkový objem zásobního roztoku vzorku v ml,

V_1 celkový objem po naředění roztoku vzorku v ml,

a_1 objem použitého alikvotního podílu z celkového objemu zásobního roztoku v ml

m hmotnost navážky vzorku v g,

C_v množství N-NO₃ ve vzorku, odečtené z kalibrační křivky v mg/l,

C_r množství N-NO₃ ve vzorku po redukci, odečtené z kalibrační křivky v mg/l.

C_{sl} množství N-NO₃ ve slepém pokusu, odečtené z kalibrační křivky v mg/l,

C_{slr} množství N-NO₃ ve slepém pokusu po redukci, odečtené z kalibrační křivky v mg/l

2.4 Výsledky a diskuze

2.4.1 N-NH₄ tlakový vzduch

Klasické stanovení amonného dusíku se provádí metodou promývání tlakovým vzduchem JPP Zkoušení hnojiv, postup č. 20138.1. Tato metoda zahrnuje extrakci, následné vymytí N-NH₄ tlakovým vzduchem a jeho jímání do kyseliny sírové a závěrečné titrační stanovení.

Metoda je velmi pracná a také časově náročná. Data pořízená touto metodou byla získána z LIMS.

2.4.2 N-NO₃ výpočet

Pro stanovení dusičnanového dusíku je nejprve stanoven celkový dusík s použitím Devardovy slitiny podle JPP Zkoušení hnojiv, postup č. 20131.1. Poté se stanovuje amonný dusík podle JPP

Zkoušení hnojiv, postup č. 20130.1 destilačně titrační metodou a z rozdílu získaných hodnot se vypočítá koncentrace dusičnanového dusíku ve zkoumaném vzorku.

Destilačně titrační stanovení s použitím Devardovy slitiny trvá přibližně 25 min a dalších 5 min trvá destilačně titrační stanovení amonného dusíku. Z toho je patrné, že stanovení dusičnanového dusíku je časově značně náročné.

Data pořízená touto metodou jsme získali z LIMS.

2.4.3 Porovnání stanovení N-NH₄ tlakovým vzduchem a spektrofotometricky

2.4.3.1 Výsledky stanovení N-NH₄

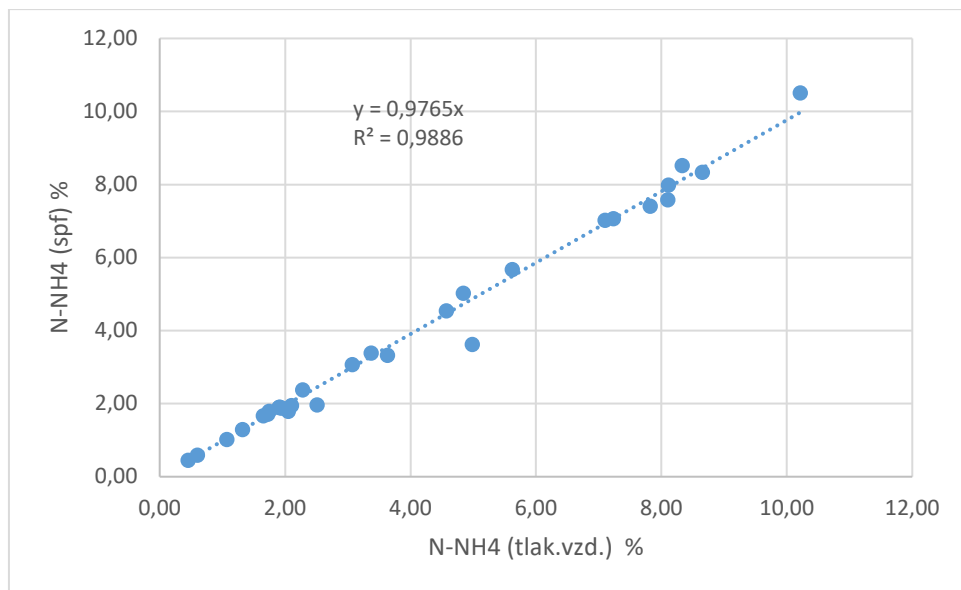
Tabulka 7. Výsledky N-NH₄.

Č. vzorku r. 2016 + 2017	N-NH ₄ (spř) %	N-NH ₄ (tlak. vzd.) %
78	3,08	3,07
101	1,79	1,74
186	1,97	2,51
352	1,02	1,07
353	3,32	3,63
700	1,91	1,91
702	1,29	1,32
703	1,71	1,72
735	3,39	3,37
738	5,02	4,84
189	7,02	7,10
190	8,34	8,65
191	10,51	10,21
255	7,07	7,23
325	1,95	2,10
335	0,45	0,45
336	0,59	0,60
349	8,52	8,33
376	1,67	1,65
377	1,90	1,90
378	1,79	2,05
379	7,58	8,10
380	3,62	4,98
381	7,41	7,82
536	5,67	5,62

537	7,99	8,11
565	2,38	2,28
569	1,88	1,94
570	1,90	1,91
571	4,54	4,57

2.4.3.2 Porovnání výsledků N-NH₄

Graf 1. N-NH₄ tlakovým vzduchem a N-NH₄ spektrofotometricky.



Tabulka 8. Regrese – posun po ose y N-NH₄.

	Koeficienty	Chyba stř. hodnoty	t Stat	Hodnota P	Dolní 95%	Horní 95%	Dolní 99,0%	Horní 99,0%
Hranice	-0,0664	0,0978	-0,6787	0,5029	-0,2668	0,1340	-0,3368	0,2040
Soubor X 1	0,9876	0,0199	49,62	7,7E-29	0,9468	1,0283	0,9326	1,0426

Posun po ose y je nevýznamný.

Tabulka 9. Regrese – směrnice N-NH₄.

	Koeficienty	Chyba stř. hodnoty	t Stat	Hodnota P	Dolní 95%	Horní 95%	Dolní 99,0%	Horní 99,0%
Hranice	0	#####	####	####	####	####	####	####
Soubor X 1	0,9765	0,0113	86,292	1,6E-36	0,9534	0,9997	0,9453	1,0077

Na hladině 1 % nelze zamítnout hypotézu, že směrnice je rovna 1.

Tabulka 10. Párový t-test $N-NH_4$.

Dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu $N-NH_4$	<i>Soubor 1</i>	<i>Soubor 2</i>
Stř. hodnota	4,026	3,909603
Rozptyl	8,241577	8,129552
Pozorování	30	30
Pears. korelace	0,994364	
Hyp. rozdíl stř. hodnot	0	
Rozdíl	29	
t Stat	2,094524	
$P(T \leq t) (1)$	0,022531	
t krit (1)	1,699127	
$P(T \leq t) (2)$	0,045063	
t krit (2)	2,04523	
alfa = 5 %		

Na hladině 5 % zamítáme hypotézu, že rozdíly jsou rovné 0.

Tabulka 11. Párový t-test $N-NH_4$.

Dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu $N-NH_4$	<i>Soubor 1</i>	<i>Soubor 2</i>
Stř. hodnota	4,026	3,909603
Rozptyl	8,241577	8,129552
Pozorování	30	30
Pears. korelace	0,994364	
Hyp. rozdíl stř. hodnot	0	
Rozdíl	29	
t Stat	2,094524	
$P(T \leq t) (1)$	0,022531	
t krit (1)	2,462021	
$P(T \leq t) (2)$	0,045063	
t krit (2)	2,756386	
alfa = 1 %		

Na hladině 1 % nelze zamítnout hypotézu, že rozdíly jsou rovné 0.

Z výsledků vyplývá, že metody poskytují shodné výsledky.

2.4.4 Porovnání stanovení N-NO₃ výpočtem a spektrofotometricky

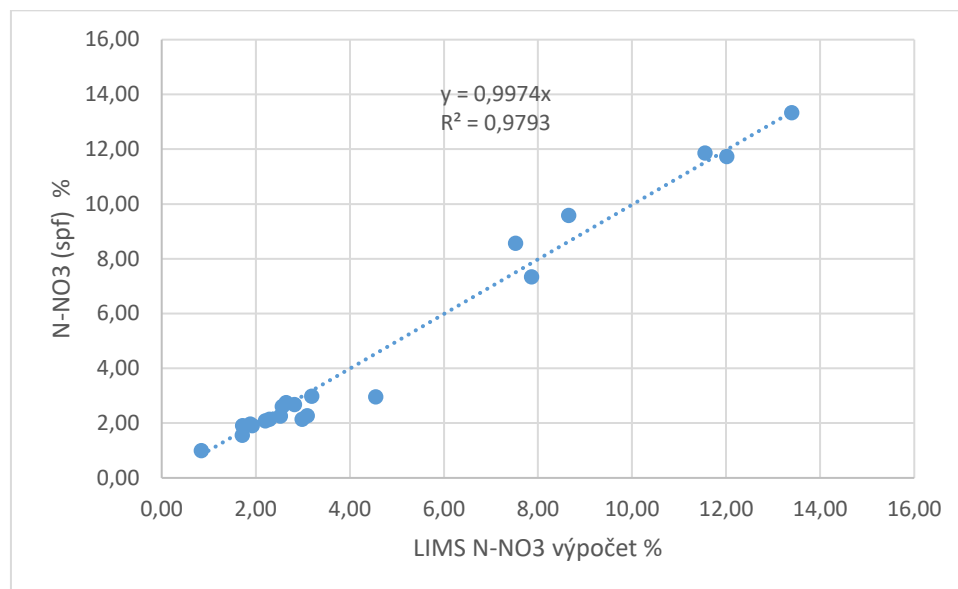
2.4.4.1 Výsledky stanovení N-NO₃

Tabulka 12. Výsledky N-NO₃.

č. vzorku r. 2016 +2017	N-NO ₃ (spf) %	LIMS NO ₃ výpočet %
63	2,97	4,55
78	1,91	1,92
352	1,00	0,84
700	1,56	1,71
702	2,68	2,82
703	2,15	2,29
738	2,26	2,52
62	2,99	3,19
121	13,34	13,39
189	11,87	11,55
190	8,57	7,52
191	9,59	8,65
255	2,15	2,98
325	1,97	1,88
335	2,27	3,09
336	2,09	2,20
376	2,61	2,56
377	2,75	2,64
378	1,91	1,72
380	7,34	7,86
381	11,74	12,01

2.4.4.2 Porovnání výsledků N-NO₃

Graf 2. N-NO₃ výpočtem a N-NO₃ spektrofotometricky.



Tabulka 13. Regrese – posun po ose y N-NO₃.

	Koeficienty	Chyba stř. hodnoty	t Stat	Hodnota P	Dolní 95%	Horní 95%	Dolní 99,0%	Horní 99,0%
Hranice	-0,2327	0,1977	-1,1775	0,2536	-0,6465	0,1810	-0,7983	0,3328
Soubor X 1	1,0277	0,0331	31,093	9,3E-18	0,9585	1,0969	0,9332	1,1223

Posun po ose y je nevýznamný

Tabulka 14. Regrese – směrnice N-NO₃.

	Koeficienty	Chyba stř. hodnoty	t Stat	Hodnota P	Dolní 95%	Horní 95%	Dolní 99,0%	Horní 99,0%
Hranice	0	#####	####	####	####	####	####	####
Soubor X 1	0,9974	0,0209	47,705	4,5E-22	0,9538	1,0410	0,9379	1,0569

Na hladině 5 % nelze zamítnout hypotézu, že směrnice je rovna 1.

Tabulka 15. Párový t-test N-NO₃.

Dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu N-NO ₃	<i>Soubor 1</i>	<i>Soubor 2</i>
Stř. hodnota	4,66119	4,557612
Rozptyl	14,74104	15,87532
Pozorování	21	21
Pears. korelace	0,990316	
Hyp. rozdíl stř. hodnot	0	
Rozdíl	20	
t Stat	0,842646	
P(T<=t) (1)	0,204695	
t krit (1)	1,724718	
P(T<=t) (2)	0,409391	
t krit (2)	2,085963	
alfa = 5 %		

Na hladině 5 % nelze zamítnout hypotézu, že rozdíly jsou rovné 0.

Z výsledků vyplývá, že metody poskytují shodné výsledky.

2.4.5 Opakovatelnost a nejistota

2.4.5.1 Opakovatelnost N-NH₄ spektrofotometricky

Opakovatelnost byla vypočítána pomocí programu EffiValidation z paralelních stanovení.

Tabulka 16. Opakovatelnost N-NH₄ spektrofotometricky.

Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
4,743	0,082	1,73	20

Jako praktická hodnota opakovatelnosti byla zvolena hodnota 4 %.

2.4.5.2 Nejistota N-NH₄ spektrofotometricky

Nejistota byla vypočítána pomocí programu EffiValidation z paralelních stanovení.

Tabulka 13. Nejistota N-NH₄ spektrofotometricky.

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	4,743
St. nejistota	0,082
Rel. st. nejistota (%%)	1,7
Faktor pokrytí	1,96
Rozšířená st. nejistota	0,161
Rel. rozšířená nejistota	3,4

Jako praktická hodnota nejistoty byla zvolena hodnota 6 %. Tato hodnota není významně odlišná od nejistoty stanovení N-NH₄ destilačně titrační metodou, která činí 4 %.

2.4.5.3 Opakovatelnost N-NO₃ spektrofotometricky

Opakovatelnost byla vypočítána pomocí programu EffiValidation z paralelních stanovení.

Tabulka 17. Opakovatelnost N-NO₃ spektrofotometricky.

Průměr měření	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
5,381	0,069	1,28	20

Jako praktická hodnota opakovatelnosti byla zvolena hodnota 4 %.

2.4.5.4 Nejistota N-NO₃ spektrofotometricky

Nejistota byla vypočítána pomocí programu EffiValidation z paralelních stanovení.

Tabulka 18. Nejistota N-NO₃ spektrofotometricky.

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	5,381
St, nejistota	0,069
Rel, st, nejistota (%%)	1,3
Faktor pokrytí	1,96
Rozšířená st, nejistota	0,135
Rel, rozšířená nejistota	2,5

Jako praktická hodnota nejistoty byla zvolena hodnota 8 %.

Metody jsou určeny pro vyšší obsahy N-NH₄ a N-NO₃ v hnojivech, kdy je třeba vzorky mnohonásobně ředit (obvykle 100 ×), proto nebyly určovány meze detekce a stanovitelnosti. Pro oba parametry lze doporučit použití těchto metod od koncentrace 0,3 %.

3 Závěr

Stanovení N-NH₄ tlakovým vzduchem a spektrofotometrické stanovení N-NH₄ poskytují shodné výsledky.

Stanovení N-NO₃ výpočtem a spektrofotometrické stanovení N-NO₃ poskytují shodné výsledky.

Spektrofotometrická stanovení N-NH₄ a N-NO₃ představují velmi efektivní alternativu k standardním destilačně titračním a titračním metodám. Jsou výrazně rychlejší a méně pracná.

4 Literatura

- 1 J.C.Forster: Soil nitrogen (1995) Assay of anaerobic ammonification.
- 2 J. Zbírál: Ověření citlivého stanovení dusičnanů v mokřém depozitu z monitorovacích bodů. Závěrečná zpráva vývojového úkolu 11/92. ÚKZÚZ Brno, 1992.

- 3 VDLUFA, Methodenbuch, Band 1, Die Untersuchung von Böden. VDLUFA Verlag, Darmstadt 1991.
- 4 Cawse, P.A. 1967. The determination of nitrate in soil solution by ultraviolet spectrophotometry. Analyst (London) 92:311-315.
- 5 Jednotné pracovní postupy – Zkoušení hnojiv, Brno 2015, ISBN 978-80-7401-100-9.
- 6 Jednotné pracovní postupy – Analýza srážkových a lyzimetrických vod, Brno 2015, ISBN 978-80-7401-109-2.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXIV 2020/1

Ročník: XXIV, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2020

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 47

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196.