

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2023

Ročník XXVII, číslo 1/2023

Brno 2023

Obsah

- 1 Optimalizace metody stanovení močovinového dusíku spektrofotometricky**
Václav Rypl, Libuše Tůmová, Alena Žalmanová, Radomila Turnvaldová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení NRL Plzeň,
Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň 1
- 2 Stanovení prvků ve výluhu Mehlich 3, ověření úpravy JPP – snížení navážky**
Vladimíra Vilamová, Jiří Mikula
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Opava,
Jaselská 16, 746 01 Opava 10
- 3 Zavedení kvalitativní detekce transgenů MON 87751 u sóji**
Jana Stehlíková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,
Hroznová 2, 603 00 Brno 31

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Optimalizace metody stanovení močovinového dusíku spektrofotometricky

Václav Rypl, Libuše Tůmová, Alena Žalmanová, Radomila Turnvaldová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Plzeň, Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň

vaclav.rypl@ukzuz.cz

1 Úvod

Tato práce má za cíl optimalizovat spektrofotometrické stanovení močovinového dusíku N-NH₂. Současný postup je založen na práci s relativně koncentrovanými extrakty a vykazuje značné množství interferencí. Smyslem práce je zvýšit citlivost stanovení, aby bylo možné extrakt vzorku dostatečně naředit a zbavit se tak velké části rušivých vlivů.

2 Materiál a metody

2.1 Vzorky

Pro ověření optimalizované metody byly použity vzorky hnojiv analyzovaných v Oddělení NRL Praha a Oddělení Plzeň v letech 2019, 2020, 2021 a 2022. Seznam a popis vzorků je v Příloze 1.

2.2 Chemikálie

Byly použity chemikálie jako v JPP 20150.1 Stanovení obsahu amidického dusíku spektrofotometricky a dále

4-dimethylaminobenzaldehyd

Postup přípravy: Do kádinky se naváží 1,6 g 4-dimethylaminobenzaldehydu, rozpustí se ve 100 ml deionizované vody a přidá se 10 ml koncentrované HCl. Roztok se dobře promíchá.

Lze ho uchovat ve vhodné nádobě v chladnu a temnu přibližně 1 měsíc.

2.3 Přístroje a pomůcky

UV-VIS Spektrofotometr (Cary 60, Agilent).

Rotační třepačka.

Stohmannovy baňky, 250 ml.

Automatická pipeta (100 – 5000) µl.

Orbitální minitřepačka GVLab, Gilson.

2.4 Metody

2.4.1 Původní metoda

Jako referenční metoda pro analýzu vzorků hnojiva byla použita metoda 20150.1 Stanovení obsahu amidického dusíku spektrofotometricky, Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – Zkoušení hnojiv – 2. vydání – Brno 2015.

2.4.2 Optimalizovaná metoda

Extrakce vzorku

Do 250ml Stohmannovy baňky se naváží 0,5 g vzorku a 1 g aktivního uhlí. Přidá se přibližně 150 ml deionizované vody, uzavře se silikonovou zátkou a třepe se na rotační třepačce 1 hodinu. Následně se doplní deionizovanou vodou po značku a přefiltruje.

Příprava kalibrační křivky

Základní standardní roztok se připraví tak, že do 1000ml odměrné baňky se naváží 2,5 g močoviny, přidá se 500 ml deionizované vody, rozpustí se a doplní se deionizovanou vodou po značku.

Kalibrační roztoky se připraví tak, že do 50ml odměrných baněk se napipetuje základní standardní roztok podle tabulky 1.

Tabulka 1. Příprava kalibračních standardů močoviny.

	Pipetovaný objem (ml)	Výsledná koncentrace (mg/l)
std1	0	0
std2	0,4	20
std3	1	50
std4	2	100
std5	3	150
std6	4	200
std7	5	250

Následně se jednotlivé roztoky doplní po značku deionizovanou vodou a promíchají se.

Roztok pro přídavek (500 mg močoviny/l)

Pro přípravu roztoku pro přídavek se použije 1000ml odměrná baňka, do které se navážíme 0,5 g močoviny, přidá se 500 ml deionizované vody, rozpustí se a doplní po značku deionizovanou vodou.

Příprava standardů k měření

Do zkumavky se automatickou pipetou napipetuje 5 ml jednotlivých kalibračních roztoků, 0,5 ml roztoku pro přídavek a 5 ml roztoku 4-dimethylaminobenzaldehydu. Roztoky se promíchají například pomocí orbitální minitřepačky. Stejným způsobem se připraví blank i slepé pokusy.

Příprava extraktů vzorků k měření

Do zkumavky pomocí automatické pipety napipetujeme vzorek v závislosti na obsahu močoviny tak, aby celkový objem byl 5 ml, viz tabulka 2.

Tabulka 2. Ředění.

Ředění	Vzorek (ml)	H ₂ O (ml)
1 ×	5	0
2 ×	2,5	2,5
5 ×	1	4
10 ×	0,5	4,5

Do každé zkumavky se přidá 0,5 ml roztoku pro přídavek a 5 ml roztoku 4-dimethylaminobenzaldehydu. Roztoky se promíchají například na orbitální minitřepače. Vzorky lze měřit po 15 minutách.

Měření

Měří se na UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 435 nm v 1cm průtokové kyvetě se sipprem.

3 Výsledky a diskuse

Tato práce vychází z postupu 2.5.2.2 Stanovení močovinného dusíku fotometrickou metodou při obsahu do 3 %, publikovaného v JPP Zkoušení hnojiv, část I. 2004, který ale nebyl téměř využíván kvůli jeho problematické použitelnosti pro rutinní práci vyplývající z nestability dané teplotou a reakčním prostředím. Pro potřeby optimalizace citlivosti metody byla testována různá reakční prostředí jako methanol, ethanol, acetonitril a voda. Nejvyšších citlivostí bylo dosaženo při použití ethanolu a nejnižších při použití vody, nicméně všechny varianty s použitím organického rozpouštědla vykazovaly znaky vysoké nestability měření. V extrémních případech vykazoval standard 20 mg/l močoviny při opakovaných měřeních výsledné hodnoty blízké 10 mg/l, což znamená chybu 50 %. Pro kvantitativní analýzu jsou takové odchylky neakceptovatelné. Podařilo se potvrdit teplotu jako jeden ze zdrojů těchto nestabilit, ale zjevně je zdrojů nestabilit více. Důsledkem tedy bylo nesplnění předpokladu o nižší mezi stanovitelnosti takové metody. Řešením se ukázalo použití vody jako reakčního média spolu s přídavkem 0,5 ml standardu 500 mg/l močoviny do každé zkumavky blanku, standardů, vzorků i slepých pokusů. Standard 20 mg/l močoviny tak při opakovaných měřeních vykazuje chybu maximálně kolem 5 %. Toto zvýšení stability umožnilo snížení meze detekce, a tedy i měření při nižších koncentracích močoviny. To umožňuje prostým naředěním vzorku omezit interference dané spektrofotometrickou metodou. Tyto interference mohou být fyzikálního původu, protože vzorky, které vykazovaly nesprávné výsledky, obsahovaly olej jako pojivo. Odchylky tedy vysvětlujeme jako nescifickou absorpci vlivem rozptýlených kapének oleje ve zkoumaném roztoku, pro jejichž odstranění je prostá filtrace nedostatečná a zpravidla nepomáhá ani centrifugace, jako řešení se ale jeví prosté naředění vzorku a zvýšení poměru navážek aktivní uhlí/vzorek. Příkladem mohou být vzorky 2022_197 a 2022_367, kde

původní výsledky močovinného dusíku byly 4,26 % respektive 16,14 % a optimalizovanou metodou bylo dosaženo výsledků 1,97 % respektive 13,30 %. Hodnota 16,14 % je navíc jednoznačně nesprávná, protože celkový obsah dusíku stanovený pomocí CN-analyzátoru byl jen 14,81 %; není možné, aby bylo močovinného dusíku ve vzorku více než celkového dusíku. Další skupinou interferencí jsou interference chemické od molekul s volnou aminoskupinou, typicky se jedná o aminokyseliny. Typickým zástupcem je vzorek 2020_248, který má podle výrobce obsahovat aminokyseliny a opravdu výsledek původní metodou dává výsledek 15,75 % a optimalizovanou metodou 13,89 %. Původní výsledek je tedy podle předpokladu falešně vyšší. Tyto interference nelze odstranit, lze je pouze omezit naředěním vzorku a volbou vlnové délky 435 nm. Jako předpoklad použití této metody se jeví použití spektrofotometru s kvalitní optikou, která umožní měření v nízkých absorbancích a s velmi nízkými šumy, protože citlivost metody je přibližně 0,007 absorbančních jednotek na 10 mg/l močoviny. Lze říci, že součet jednotlivých forem dusíku ve vzorku by měl být roven celkovému obsahu dusíku ve vzorku. Při použití spektrofotometrických metod pro stanovení amonného, dusičnanového a močovinného dusíku by jejich součet měl odpovídat celkovému dusíku stanovenému pomocí CN-analyzátoru. Pokud tento součet neodpovídá, je to příznakem interference nebo chyby v některé z metod. Příkladem je vzorek 2022_457, kde suma dusičnanového, amonného a močovinného dusíku (původní metodou) činí 6,69 %, výsledek celkového dusíku z CN-analyzátoru ale je 5,28 % dusíku, je zde tedy patrný nesoulad. Pokud se do sumy jednotlivých forem dusíku započte močovinný dusík stanovený optimalizovanou metodou, výsledek tohoto součtu je 5,18 % dusíku, což už výborně odpovídá hodnotě naměřené CN-analyzátozem. Výsledkem těchto pozorování je tedy doporučení měřit formy dusíku vždy přímými metodami a součet naměřených hodnot porovnat s hodnotou celkového dusíku.

Při použití poměru navážek aktivního uhlí a vzorku 2 : 1, tj. 1 g aktivního uhlí a 0,5 g vzorku nebylo nutné provádět u testovaných vzorků další kroky pro odbarvení roztoků. Ve všech případech vznikly čiré roztoky, proto nebylo nutné použít Carrezův roztok.

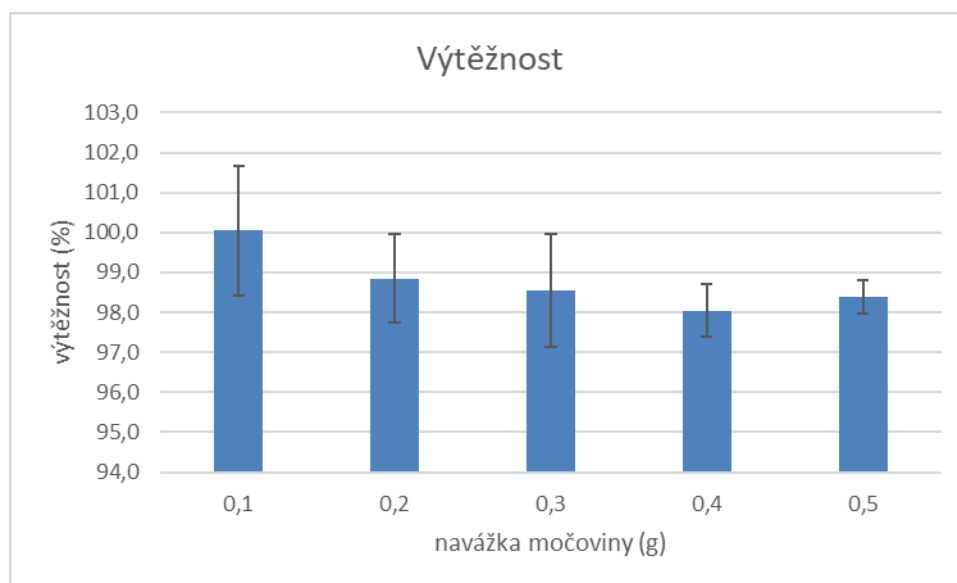
3.1 Výtěžnost

Pro ověření výtěžnosti metody a správnosti byl použit certifikovaný materiál močoviny. Do 250ml Stohmannových baněk bylo naváženo (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5) g močoviny. Následně

byly všechny extrakty naředěny $10 \times$ podle tabulky 2 na výsledný objem 5 ml, bylo přidáno 0,5 ml roztoku pro přídavek (500 mg/l) a 5 ml roztoku 4-dimethylaminobenzaldehydu. Vzorby byly změřeny po 15 minutách na UV-VIS spektrofotometru a byly vypočítány výtěžnosti vzhledem k teoretickému obsahu dusíku v močovíně 46,65 %. Postup byl opakován dvakrát, viz tabulka 3.

Tabulka 3. Výtěžnost.

Navážka (g)	1. měření (%)	2. měření (%)	Průměr (%)	sd (%)
0,1	98,9	101,2	100,1	1,6
0,2	98,1	99,6	98,9	1,1
0,3	99,6	97,5	98,5	1,4
0,4	97,6	98,5	98,0	0,7
0,5	98,1	98,7	98,4	0,4



Obrázek 1. Výtěžnost.

Při celkové průměrné výtěžnosti 98,8 % lze považovat optimalizovanou metodu za dostatečně účinnou v celém rozsahu kalibrace spektrofotometru i při různých navážkách a za metodu poskytující správné výsledky.

3.2 Správnost

Správnost byla prokázána analýzou referenčního materiálu K5-močovina krokem „Správnost porovnáním s rozmezím referenční hodnoty“ pomocí software Labsystém 7. Varovné meze obsahu močovinného dusíku z regulačního diagramu referenčního materiálu K5-močovina 43,98 % a 48,67 % byly vloženy do výpočtu. K analýze správnosti bylo použito 14 měření referenčního materiálu K5-močovina s průměrem 45,284 % se směrodatnou odchylkou 0,228089 %, RSD 0,504 rel.% a intervalem spolehlivosti (95 %) 45,1528 – 45,4144 se závěrem správnost „prokázána“.

3.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla vypočítána pomocí software Labsystém 7 krokem „Opakovatelnost (střední přesnost)“ z paralelních měření 37 vzorků. Výsledná hodnota opakovatelnosti (střední přesnosti) činí 0,130388 % močovinného dusíku, tj. 0,885 rel.%. Jako praktická hodnota opakovatelnosti byla zvolena hodnota 5 rel.%.

3.4 Nejistota

Nejistota byla vypočítána pomocí software Labsystém 7 krokem „Nejistota z paralelních st.“ z paralelních měření 37 vzorků s koeficientem rozšíření rovnému 2. Výsledná hodnota rel. rozšířené nejistoty činí 0,307184 % močovinného dusíku, tj. 1,77 rel.%. Jako praktická hodnota „Relativní rozšířené nejistoty“ byla zvolena hodnota 10 rel.%.

3.5 Mez detekce

Meze detekce a stanovitelnosti byly získány kontinuální měřením 10 slepých pokusů. Výpočet byl proveden v software Labsystém 7 krokem „Meze (MD/MS)“. Výsledná hodnota meze detekce (LOD) činí 0,7551 mg/l a meze stanovitelnosti (LOQ) 2,517 mg/l močoviny. Kvalifikovaným odhadem a po přepočtu na hmotnostní procenta obsahu močovinného dusíku činí LOD 0,06 % a LOQ 0,2 %.

4 Závěr

Optimalizovaná metoda stanovení močovinného dusíku poskytuje dostatečně správné a přesné výsledky a je vhodná pro rutinní použití v laboratoři. V případě analýz komplikovaných matic s vysokými obsahy různých druhů organických materiálů však bude vždy správnější použití výkonnější instrumentace pro stanovení močoviny jako např. HPLC-UV nebo HPLC-MS. Spektrofotometrickou metodu lze tedy považovat za velmi rychlou a ekonomickou variantu stanovení močoviny, která ale bude zpravidla dostačující pro matrice typu hnojiv obsahujících vyšší koncentrace močoviny.

5 Literatura

1. Jednotné pracovní postupy – Zkoušení hnojiv, 2. vydání, ÚKZÚZ, Brno 2015.
2. Jednotné pracovní postupy – Zkoušení hnojiv, část I.: Stanovení dusíku, Brno 2004.

Příloha 1

Seznam a popis vzorků použitých pro optimalizaci metody stanovení močoviny.

LIMS	skupenství	popis vzorku
2019_21	pev.	NPK(S) 15-15-15-(20)
2019_81	pev.	NPK(S) 15-15-15 (7)
2019_89	pev.	NPK(S) 15-15-15-(20)
2019_101	pev.	SULFAMMO 23 (23% N + 31%SO ₃ + 3%MgO, TIMAC)
2019_102	pev.	ASTELIS N24 V
2019_356	pev.	ASTELIS N24 V
2019_357	pev.	ASTELIS N24 V
2019_358	pev.	ASTELIS N24 V
2019_494	kap.	FORTESTIM alfa
2019_495	kap.	FORTESTIM beta
2019_496	kap.	FORTESTIM gama (NPK 12-6-6)
2020_22	pev.	NPK(S) 15-15-15-(20)
2020_52	kap.	NPK 7,0 - 4,6 - 4,1 + 0,05 % MgO
2020_53	pev.	Allinex
2020_54	pev.	NPK 24,6-4,7-23,6 (Cucumex Hnojivo pro plodovou zeleninu, HU-BEN Čerčany)
2020_93	pev.	NPK 9-6-15 (Kaufland)
2020_94	kap.	FORTESTIM alfa
2020_248	kap.	QUANTUM amino
2021_65	pev.	Hnojivo s fosforem nad 5 % - Cd 50
2021_80	kap.	SEACTIV Axis
2021_227	kap.	CAMPOFORT Garant Ca
2021_228	kap.	FORTEalfa FENOL
2022_36	kap.	(ES) Hnojivo na kvetoucí rostliny
2022_82	kap.	Kapalné hnojivo na révu
2022_96	kap.	(ES) BIOPON gelové hn. na hortenzie
2022_100	kap.	(ES) Kapka, kapalné hnojivo na pokojové rostliny kvetoucí
2022_109	pev.	CERERIT Hobby 13-6-14 (+2MgO+0,3Fe) (O1146)
2022_121	pev.	(ES) YaraVera UREA 46% N
2022_194	pev.	NPK 13-4-22
2022_197	pev.	Hnojivo na bobuloviny (V771)
2022_367	pev.	Hnojivo pro trávníky (XXX)
2022_457	kap.	Kapalné hnojivo na citrusy (O1185)

Stanovení prvků ve výluhu Mehlich 3, ověření úpravy JPP – snížení navážky

Vladimíra Vilamová, Jiří Mikula

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Opava, Jaselská 16 2, 746 01 Opava
vladimira.vilamova@ukzuz.cz

1 Úvod

Práce má za cíl ověřit možnost snížení navážky vzorků a tím i snížení množství použitých chemikálií při extrakci půdy ve výluhu Mehlich 3 pro stanovení makro a mikroprvků v rámci Agrochemického zkoušení zemědělských půd.

Cílem úpravy jednotného pracovního postupu je snížit množství spotřebovávaných chemikálií a vzorků při stanovení prvků ve výluhu Mehlich 3 vzhledem k ekologickým a ekonomickým aspektům celého procesu. Dále je potřeba, aby dodaný a upravený vzorek poskytl maximální množství informací o dané půdě. Snížením navážky pro výluh Mehlich 3 zbude více vzorku půdy na další analýzy a bude se moci provést větší množství stanovení.

2 Materiál a metody

2.1 Použité vzorky

Pro testování účinnosti extrakce snížením navážky a použitých chemikálií byly vybrány vzorky z agrochemického zkoušení zemědělských půd z různých lokalit a s různými obsahy stanovovaných prvků. Měření a porovnání bylo provedeno na pracovištích v Opavě, Brně a Plzni. Každé pracoviště změřilo sérii přibližně 100 půdních vzorků. Pracoviště v Opavě změřilo také opakovaně dostupné referenční materiály.

2.2 Chemikálie

Pro přípravu půdního extraktu podle Mehlicha 3: viz Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – Analýza půd I, postup 30068.1 Příprava půdního extraktu podle Mehlicha 3.

Pro analýzu extraktu podle Mehlicha 3 metodou ICP-OES: viz Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – Analýza půd I, postup 30074.1 Analýza extraktu podle Mehlicha 3 metodou ICP-OES.

2.3 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy.

Rotační třepačka (35 ± 5) ot/min.

Centrifuga.

Optický emisní spektrofotometr s indukčně vázanou plazmou.

2.4 Extrakce půd pomocí činidla Mehlich 3 a stanovení makro a mikroprvků

2.4.1 Příprava extraktu standardním způsobem

Na analytických vahách se do uzavíratelné plastové nádoby o objemu (200 – 400) ml naváží 10 g vzorku půdy a přidá se 100 ml extrakčního činidla Mehlich 3 (připravený podle postupu JPP AP I, postup 30068.1). Vzorek se extrahuje 10 minut na rotační třepačce a následně se odstředí 5 minut při minimálně 3500 ot/min.

2.4.2 Příprava extraktu upraveným způsobem

Na analytických vahách se do uzavíratelné plastové nádoby o objemu (200 – 400) ml naváží 5 g vzorku půdy a přidá se 50 ml extrakčního činidla Mehlich 3 (připravený podle postupu JPP AP I, postup 30068.1). Vzorek se extrahuje 10 minut na rotační třepačce a následně se odstředí 5 minut při minimálně 3500 ot/min.

V získaných extraktech byly metodou ICP OES (JPP ÚKZÚZ, AP 1, postup 30074.1) měřeny obsahy základních živin vápníku, hořčíku, draslíku, fosforu a dále nutričně významných nebo

rizikových prvků jako je síra, měď, zinek, železo, hliník, mangan, bor a kadmium měření základních živin. Vzorky byly pro měření uspořádány tak, aby byly vždy těsně za sebou změřeny vzorky z 10 g a 5 g navážky a tím se minimalizovaly další vlivy měření (časová stabilita výluhů, stabilita kalibrační křivky apod.). Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v Příloze 1, která je dostupná na vyžádání u autorů této práce.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Stanovení makro a mikroprvků – vyhodnocení analýzy referenčních materiálů

Na pracovišti v Opavě byly pro obě navážky provedeny analýzy dostupných používaných referenčních materiálů. Přípravě těchto vzorků půd je věnována velká pozornost, aby se minimalizovala chyba způsobená nehomogenitou vzorku. Tyto vzorky byly jednak zařazeny do série měřených vzorků a pak byly měřeny také samostatně, každý referenční vzorek třikrát pro obě navážky, aby se zjistila variabilita daného parametru pro obě metody.

3.1.1

Pro zjištění správnosti výsledků byly použity dva aktuálně používané interní referenční materiály (5513G a 5621G), naměřené hodnoty pro obě navážky byly vyhodnoceny pomocí regulačních diagramů vedených v programu Labsystém 7. Jako kritérium byly nastaveny varovné meze vedených regulačních diagramů, viz Tabulka 1.

Tabulka 4. Vyhodnocení správnosti analýzy referenčních vzorků.

Označení referenčního vzorku	Navážka	10 g		5 g	
	Varovné meze RD	Parametr mg/kg	Hodnocení	Parametr mg/kg	Hodnocení
		Al (aa)/sv		Al (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	789,8 - 904	833	Vyhovuje	821,5	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	1150 - 1254	1220	Vyhovuje	1184	Vyhovuje
		B (aa)/sv		B (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	1,223 - 1,329	1,31	Vyhovuje	1,29	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	0,2596 - 0,369	< 0,50	Vyhovuje	< 0,50	Vyhovuje
		Ca (aa)/sv		Ca (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	3355 - 3593	3415	Vyhovuje	3491	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	1143 - 1245	1186	Vyhovuje	1148	Vyhovuje
		Cd (aa)/sv		Cd (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	0,0689 - 0,1008	< 0,1	Vyhovuje	< 0,1	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	0,05386 - 0,07878	< 0,1	Vyhovuje	< 0,1	Vyhovuje
		Cu (aa)/sv		Cu (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	3,255 - 3,825	3,569	Vyhovuje	3,476	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	1,995 - 2,321	2,318	Vyhovuje	2,141	Vyhovuje
		Fe (aa)/sv		Fe (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	168,7 - 209,7	179	Vyhovuje	174,2	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	431,5 - 486	456,3	Vyhovuje	442,8	Vyhovuje
		S (aa)/sv		S (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	16,3 - 17,88	16,32	Vyhovuje	17,35	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	17,49 - 18,65	17,99	Vyhovuje	17,65	Vyhovuje
		K (aa)/sv		K (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	197,9 - 209,7	207,7	Vyhovuje	202,1	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	111,8 - 117,6	114,3	Vyhovuje	113,4	Vyhovuje
		Mg (aa)/sv		Mg (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	193,3 - 209,2	198,9	Vyhovuje	194,3	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	188 - 203	191,7	Vyhovuje	188,6	Vyhovuje
		Mn (aa)/sv		Mn (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	204,6 - 223	211,81	Vyhovuje	210,86	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	97,87 - 103,8	101,74	Vyhovuje	101,16	Vyhovuje
		P (aa)/sv		P (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	52,49 - 58,23	53,7	Vyhovuje	53,49	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	55,63 - 60,5	57,01	Vyhovuje	56,72	Vyhovuje
		Zn (aa)/sv		Zn (aa)/sv	
VRM 74 - 5621G	4,769 - 6,13	4,969	Vyhovuje	5,221	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	2,502 - 3,674	2,522	Vyhovuje	3,236	Vyhovuje

Vyhodnocení: Hodnoty všech stanovovaných parametrů se pro oba aktuálně používané referenční materiály a pro obě navážky nacházejí ve varovných mezích regulačních diagramů vedených v Labsystému LS7.

3.1.2

Byly porovnány rozdíly výsledků stanovovaných parametrů analyzovaných referenčních vzorků pro obě navážky s hodnotou opakovatelnosti pro daný prvek a koncentrační hladinu, viz Tabulka 2.

Tabulka 2. Vyhodnocení rozdílu analýzy referenčních vzorků.

Navážka	10 g	5 g			
	Parametr mg/kg	Parametr mg/kg	Rozdíl	Opakovatelnost	Hodnocení
Označení vzorku	Al (aa)/sv	Al (aa)/sv	%	%	
VRM 65 - 5621D	536,8	521,1	3,0	10	Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	1154	1130	2,1	10	Vyhovuje
VRM 67 - 5617C	888,8	872,4	1,9	10	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	1210	1204	0,5	10	Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	808,3	788,9	2,4	10	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	851,3	846,8	0,5	10	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	750,8	753	0,3	10	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	1085	1065	1,9	10	Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	712,4	702,7	1,4	10	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	833	821,5	1,4	10	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	1220	1184	3,0	10	Vyhovuje
	B (aa)/sv	B (aa)/sv			
VRM 65 - 5621D	1,18	1,11	6,1	30	Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	< 0,50	< 0,50			Vyhovuje
VRM 67 - 5617C	0,71	0,68	4,3	30	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	< 0,50	< 0,50			Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	1,50	1,48	1,3	30	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	0,70	0,71	1,4	30	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	1,57	1,60	1,9	30	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	< 0,50	< 0,50			Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	0,71	0,75	5,5	30	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	1,31	1,29	1,5	30	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	< 0,50	< 0,50			Vyhovuje
	Ca (aa)/sv	Ca (aa)/sv			
VRM 65 - 5621D	6269	5901	6,0	8	Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	1632	1588	2,7	8	Vyhovuje
VRM 67 - 5617C	1855	1795	3,3	8	Vyhovuje

Navážka	10 g	5 g			
	Parametr mg/kg	Parametr mg/kg	Rozdíl	Opakovatelnost	Hodnocení
VRM 68 - 5513E	1915	1919	0,2	8	Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	3449	3332	3,5	8	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	1737	1740	0,2	8	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	5809	5763	0,8	8	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	2178	2136	1,9	8	Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	1672	1668	0,2	8	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	3415	3491	2,2	8	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	1186	1148	3,3	8	Vyhovuje
	Cd (aa)/sv	Cd (aa)/sv			
VRM 65 - 5621D	< 0,1	< 0,1			Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	< 0,1	< 0,1			Vyhovuje
VRM 67 - 5617C	0,17	0,16	6,1	20	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	< 0,1	< 0,1			Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	0,112	0,104	7,4	20	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	0,13	0,131	0,8	20	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	< 0,1	< 0,1			Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	0,12	0,113	6,0	20	Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	0,158	0,171	7,9	20	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	< 0,1	< 0,1			Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	< 0,1	< 0,1			Vyhovuje
	Cu (aa)/sv	Cu (aa)/sv			
VRM 65 - 5621D	3,038	3,089	1,7	10	Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	2,038	2,329	13,3	10	Nevyhovuje
VRM 67 - 5617C	6,92	6,431	7,3	10	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	1,019	1,022	0,3	10	Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	4,345	4,283	1,4	10	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	5,317	5,043	5,3	10	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	3,671	3,65	0,6	10	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	3,525	3,667	3,9	10	Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	7,037	6,925	1,6	10	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	3,569	3,476	2,6	10	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	2,318	2,141	7,9	10	Vyhovuje
	Fe (aa)/sv	Fe (aa)/sv			
VRM 65 - 5621D	121	119,6	1,2	10	Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	519,5	514,6	0,9	10	Vyhovuje
VRM 67 - 5617C	554,8	552,1	0,5	10	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	583	584,5	0,3	10	Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	225,8	220,5	2,4	10	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	567,3	568,9	0,3	10	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	204,2	202,4	0,9	10	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	484	467,3	3,5	10	Vyhovuje

Navážka	10 g	5 g			
	Parametr mg/kg	Parametr mg/kg	Rozdíl	Opakovatelnost	Hodnocení
VRM 73 - 5617E	340,1	332,5	2,3	10	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	179	174,2	2,7	10	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	456,3	442,8	3,0	10	Vyhovuje
	S (aa)/sv	S (aa)/sv	%	%	
VRM 65 - 5621D	21,03	20,85	0,9	10	Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	27,4	27,69	1,1	10	Vyhovuje
VRM 67 - 5617C	18,02	18,45	2,4	10	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	28,81	29,3	1,7	10	Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	16,92	17,2	1,6	10	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	18,28	18,67	2,1	10	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	23,85	24,27	1,7	10	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	20,76	21,1	1,6	10	Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	12,91	13,31	3,1	10	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	16,32	17,35	6,1	10	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	17,99	17,65	1,9	10	Vyhovuje
	K (aa)/sv	K (aa)/sv			
VRM 65 - 5621D	210,6	200,3	5,0	10	Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	166,7	166,1	0,4	10	Vyhovuje
VRM 67 - 5617C	449,2	428	4,8	10	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	217,8	218,8	0,5	10	Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	299,1	289,3	3,3	10	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	402,7	401,6	0,3	10	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	199,7	199,3	0,2	10	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	198	194,2	1,9	10	Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	349,9	344,9	1,4	10	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	207,7	202,1	2,7	10	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	114,3	113,4	0,8	10	Vyhovuje
	Mg (aa)/sv	Mg (aa)/sv			
VRM 65 - 5621D	159,7	152,6	4,5	10	Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	296,6	287,7	3,0	10	Vyhovuje
VRM 67 - 5617C	190	188,4	0,8	10	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	415,8	415,2	0,1	10	Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	187,7	181,7	3,2	10	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	164,8	165,3	0,3	10	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	273,9	273,1	0,3	10	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	553,6	533,6	3,7	10	Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	172,9	170,6	1,3	10	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	198,9	194,3	2,3	10	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	191,7	188,6	1,6	10	Vyhovuje

Navážka	10 g	5 g			
	Parametr mg/kg	Parametr mg/kg	Rozdíl	Opakovatelnost	Hodnocení
Označení vzorku	Mn (aa)/sv	Mn (aa)/sv	%	%	
VRM 65 - 5621D	192,26	184,38	4,2	10	Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	162,42	156,64	3,6	10	Vyhovuje
VRM 67 - 5617C	225,28	214,06	5,1	10	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	233,59	231,37	1,0	10	Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	240,67	234,60	2,6	10	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	221,79	216,80	2,3	10	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	171,89	168,85	1,8	10	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	208,13	201,67	3,2	10	Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	173,60	172,68	0,5	10	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	211,81	210,86	0,4	10	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	101,74	101,16	0,6	10	Vyhovuje
	P (aa)/sv	P (aa)/sv			
VRM 65 - 5621D	54,34	52,89	2,7	8	Vyhovuje
VRM 66 - 5513D	69,51	70,85	1,9	8	Vyhovuje
VRM 67 - 5617C	231,7	219,8	5,3	8	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	28,04	27,72	1,1	10	Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	80,3	79,07	1,5	8	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	218,7	221,9	1,5	8	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	34,92	35,8	2,5	10	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	21,81	24,05	9,8	10	Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	149,8	148,7	0,7	8	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	53,7	53,49	0,4	8	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	57,01	56,72	0,5	8	Vyhovuje
	Zn (aa)/sv	Zn (aa)/sv			
VRM 65 - 5621D	4,563	5,213	13,3	10	Nevyhovuje
VRM 66 - 5513D	2,931	3,51	18,0	10	Nevyhovuje
VRM 67 - 5617C	4,764	4,532	5,0	10	Vyhovuje
VRM 68 - 5513E	3,22	3,536	9,4	10	Vyhovuje
VRM 69 - 5621E	5,696	5,869	3,0	10	Vyhovuje
VRM 70 - 5617D	4,374	4,671	6,6	10	Vyhovuje
VRM 71 - 5012A	2,537	2,844	11,4	30	Vyhovuje
VRM 72 - 5513F	5,111	5,366	4,9	10	Vyhovuje
VRM 73 - 5617E	4,315	4,665	7,8	10	Vyhovuje
VRM 74 - 5621G	4,969	5,221	4,9	10	Vyhovuje
VRM 75 - 5513G	2,522	3,236	24,8	30	Vyhovuje

Vyhodnocení: Bylo provedeno 132 porovnání rozdílů výsledků pro navážku 10 g a 5 g s hodnotou opakovatelnosti pro daný prvek a koncentrační hladinu. Rozdíl výsledků byl $129 \times$ menší než povolená hodnota opakovatelnosti, $3 \times$ byl rozdíl větší než povolená hodnota opakovatelnosti pro daný prvek a koncentrační hladinu, tj. 2,27 % stanovení nevyhovělo podmínce opakovatelnosti ($2 \times \text{Zn}$, $1 \times \text{Cu}$). Nevyhovující rozdíl byl u kontrolních vzorků z archivu, které se používaly v letech 2013 – 2014.

3.1.3

Pro zjištění míry statistické variability posuzovaných metod byly opakovaně (třikrát) analyzovány dostupné referenční vzorky. Naměřené hodnoty, vypočtené směrodatné odchylky a RSD (%) jsou uvedeny v Příloze 2, která je dostupná na vyžádání u autorů této práce.

Vyhodnocení: Pro 11 referenčních vzorků a 12 sledovaných parametrů bylo vypočteno 132 směrodatných odchylek (RSD). Z toho 121 výsledků (tj. 91,7 %) má hodnotu $\text{RSD} < 5 \%$, 8 výsledků (tj. 6,06 %) má hodnotu mezi (5 – 10) % ($1 \times \text{B}$, $2 \times \text{Cu}$, $2 \times \text{Cd}$, $3 \times \text{Zn}$) a jen $3 \times$ (tj. 2,27 %) je hodnota $\text{RSD} > 10 \%$ ($3 \times \text{Zn}$). Z posuzovaných parametrů je největší variabilita (rozptyl) u Zn, což platí pro obě navážky a koresponduje to i s RSD a regulačními diagramy aktuálně vedenými v Labsystému 7 pro navážku 10 g. Žádný parametr nevykazuje systematicky větší variabilitu pro některou variantu metody.

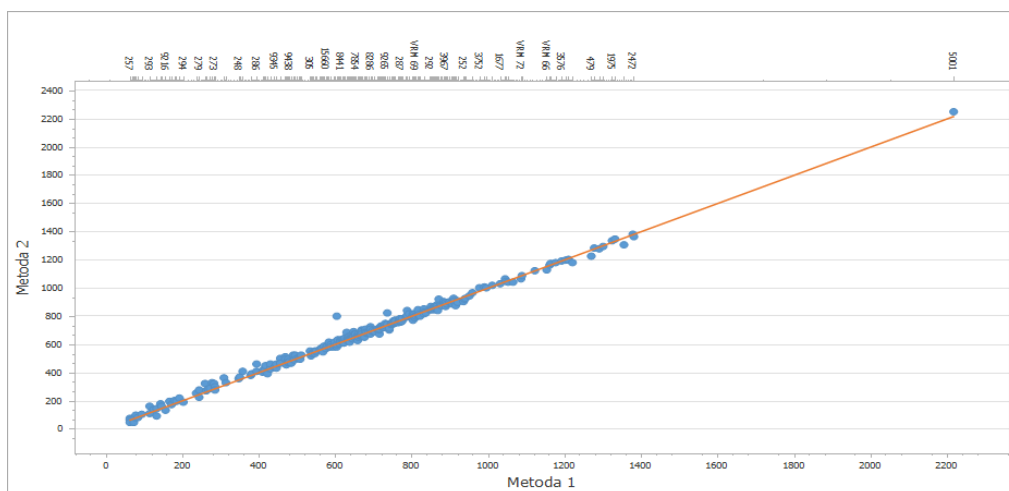
3.2 Stanovení makro a mikroprvků – vyhodnocení porovnání navážek

Analýzy půd ve výluhu Mehlich 3 byly prováděny na pracovištích v Opavě, Plzni a Brně. Každé pracoviště náhodně vybralo asi 100 vzorků z různých lokalit republiky. Příprava výluhu a měření metodou ICP OES bylo provedeno pro navážku 10 g a 5 g suchého vzorku, všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v Příloze 1, která je dostupná na vyžádání u autorů této práce.

Výsledky byly vyhodnoceny programem Effvalidation, metoda Správnost/srovnání dvou metod/laboratorií - t-test na rozdíl výsledků. Pro každý parametr je vyhodnocení uvedeno v grafech 1 až 12. Pracoviště v Brně neměřilo Cd, zde je menší počet dat.

3.2.1 Hliník

Obrázek 1. Graf pro Al – t-test na rozdíl výsledků.

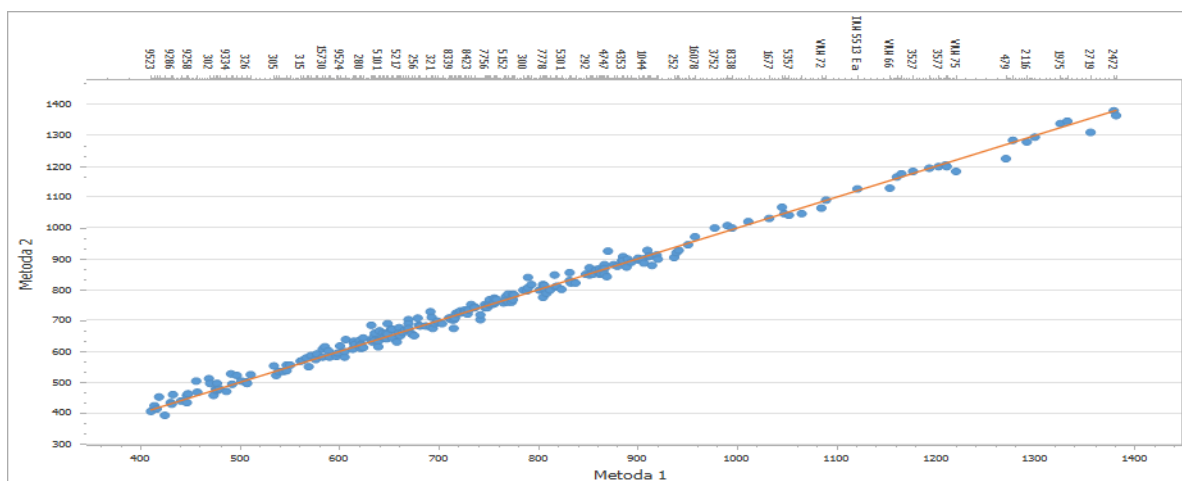


Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-4,6352	22,1574	-7,181 - -2,0894	Zamítnuta	98,43	True

Závěr: Srovnávané analytické metody neposkytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

Obrázek 1a. Graf pro Al – t-test na rozdíl výsledků – koncentrace nad 400 mg/kg, vyloučení nejvyššího bodu.



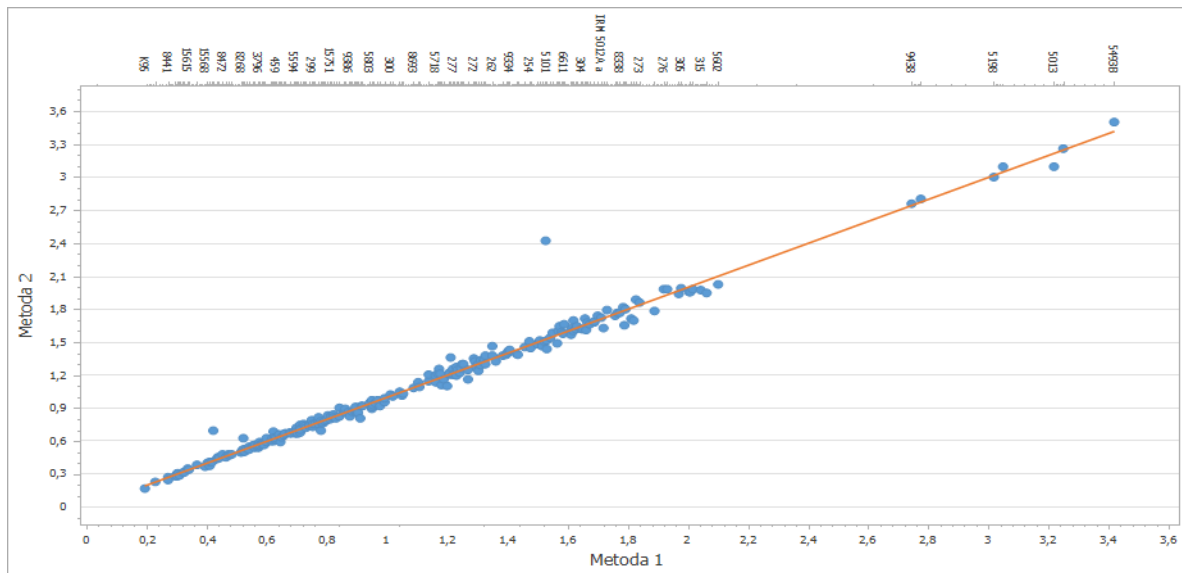
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-1,6489	16,7529	-3,7467 - 0,4488	Přijata	98,16	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.2 Bor

Obrázek 1. Graf pro B – t-test na rozdíl výsledků.



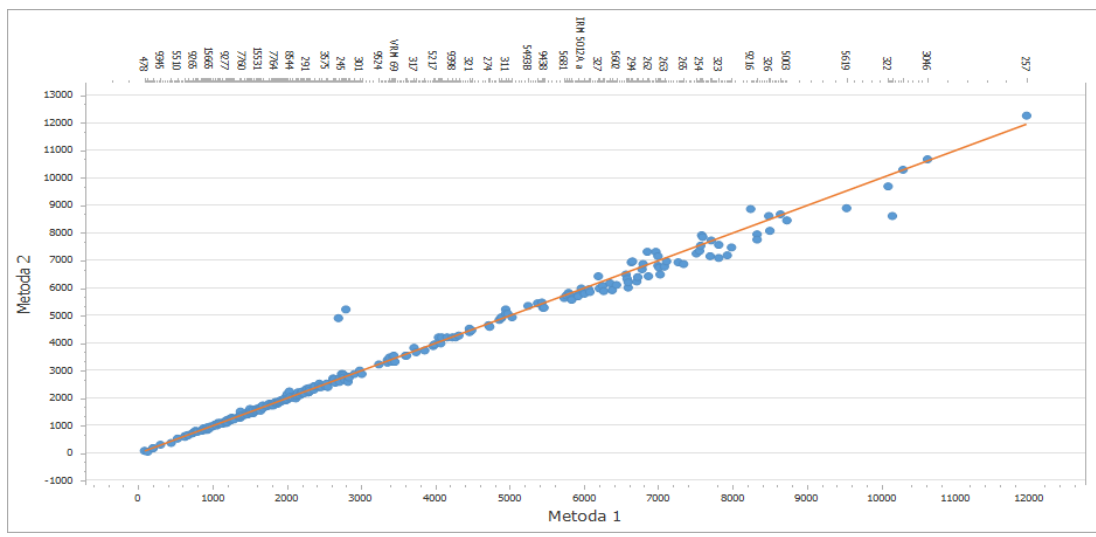
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,0022	0,0696	-0,0107 - 0,0063	Přijata	99,88	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.3 Vápník

Obrázek 3. Graf pro Ca – t-test na rozdíl výsledků.



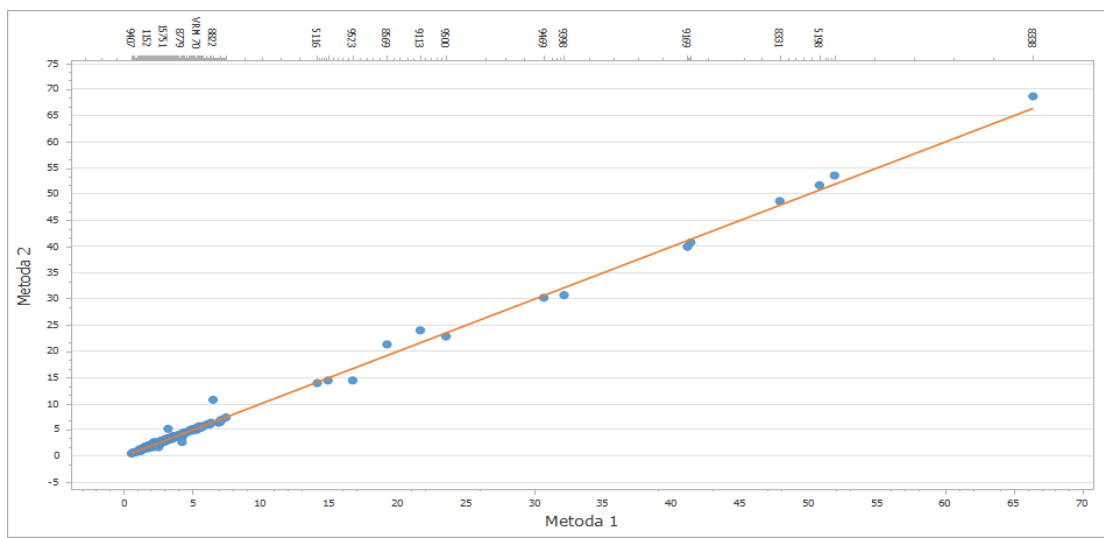
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
30,6269	268,7448	-0,2512 - 61,5049	Přijata	97,21	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.4 Měď

Obrázek 2. Graf pro Cu – t-test na rozdíl výsledků.



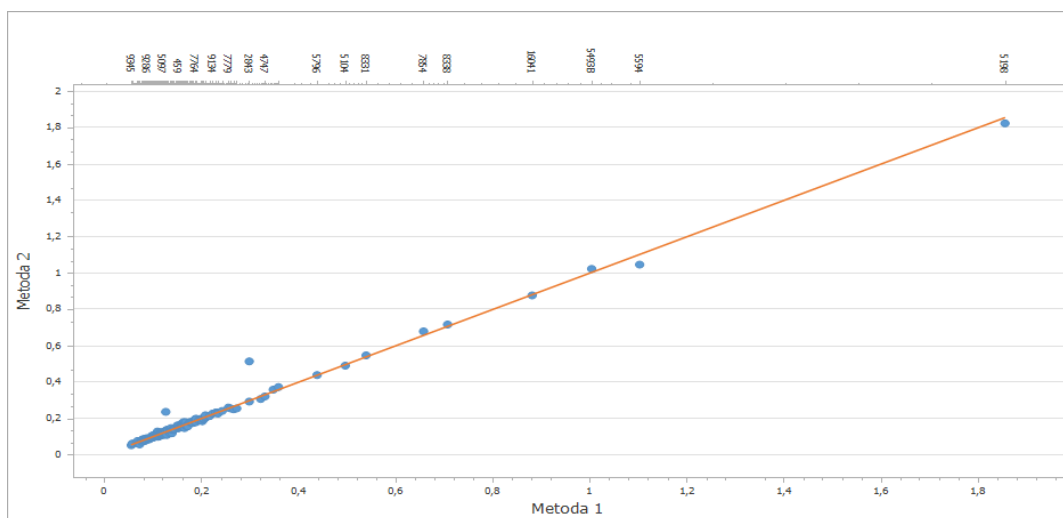
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,0377	0,4559	-0,09 - 0,0147	Přijata	101,29	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.5 Kadmium

Obrázek 3. Graf pro Cd – t-test na rozdíl výsledků.



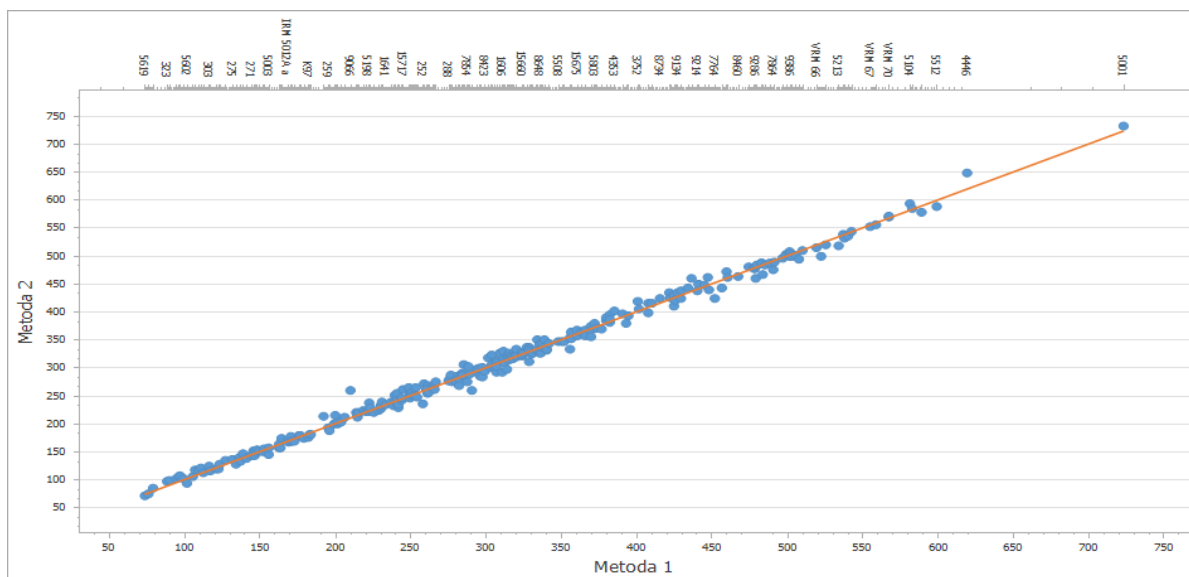
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,0006	0,0205	-0,0037 - 0,0025	Přijata	99,2	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.6 Železo

Obrázek 4. Graf pro Fe – t-test na rozdíl výsledků.



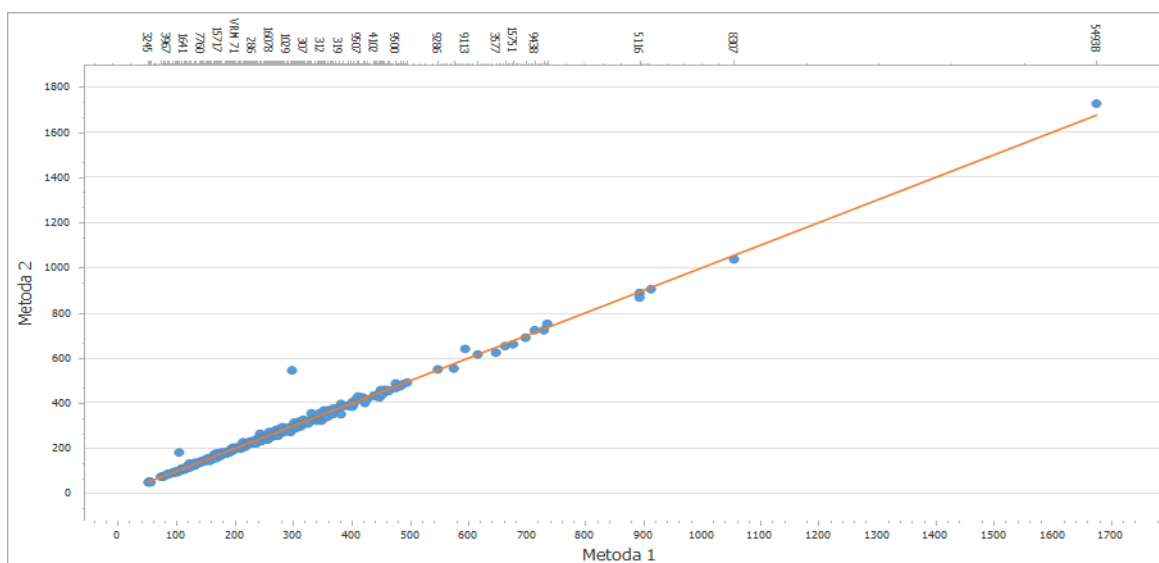
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílů	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,7998	8,8753	-1,8196 - 0,2199	Přijata	99,25	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.7 Draslík

Obrázek 5. Graf pro K – t-test na rozdíl výsledků.



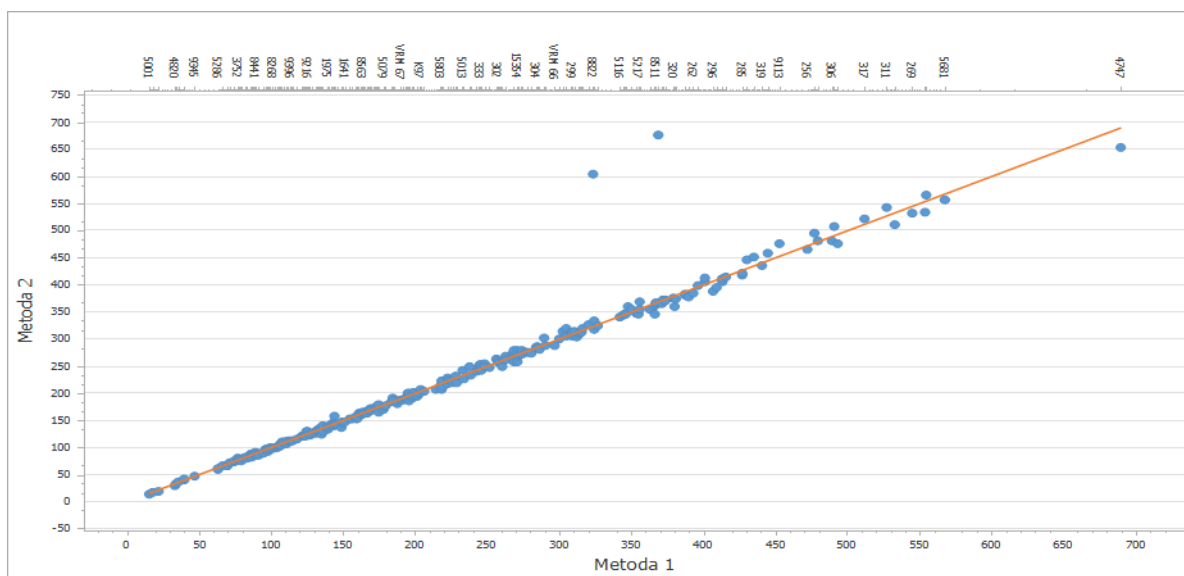
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
1,4413	17,8008	-0,604 - 3,4866	Přijata	100,37	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.8 Hořčík

Obrázek 6. Graf pro Mg – t-test na rozdíl výsledků.



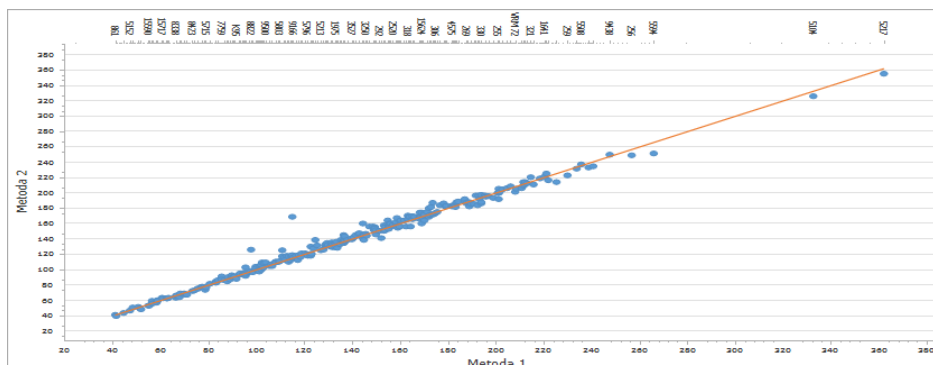
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-1,0273	25,3848	-3,944 - 1,8893	Přijata	101,35	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.9 Mangan

Obrázek 9. Graf pro Mn – t-test na rozdíl výsledků.

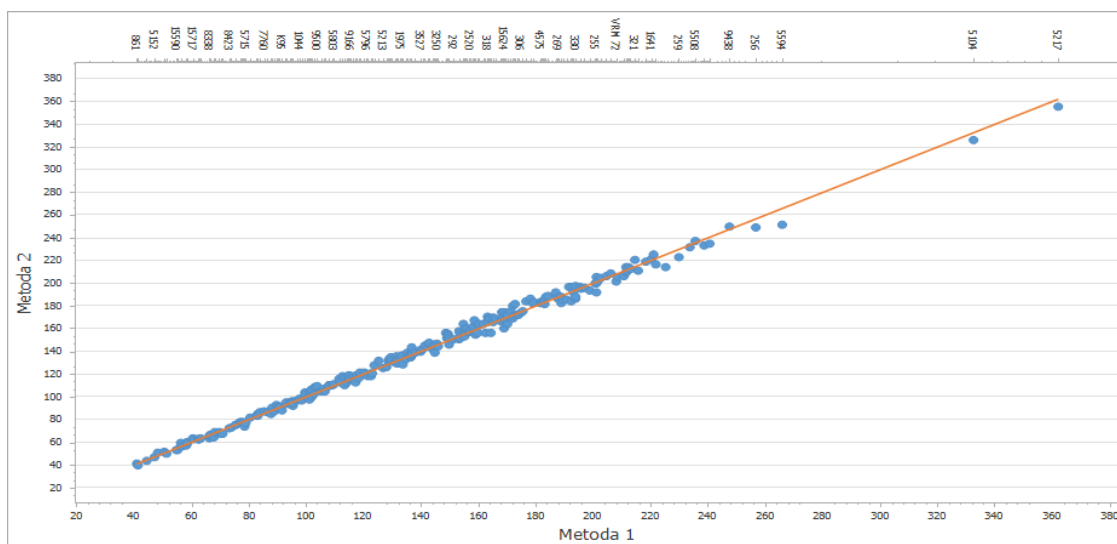


Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-1,0165	5,3836	-1,634 - -0,399	Zamítnuta	98,51	True

Závěr: Srovnávané analytické metody neposkytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

Obrázek 7a: Graf pro Mn – t-test na rozdíl výsledků – po vyloučení odlehlých bodů.



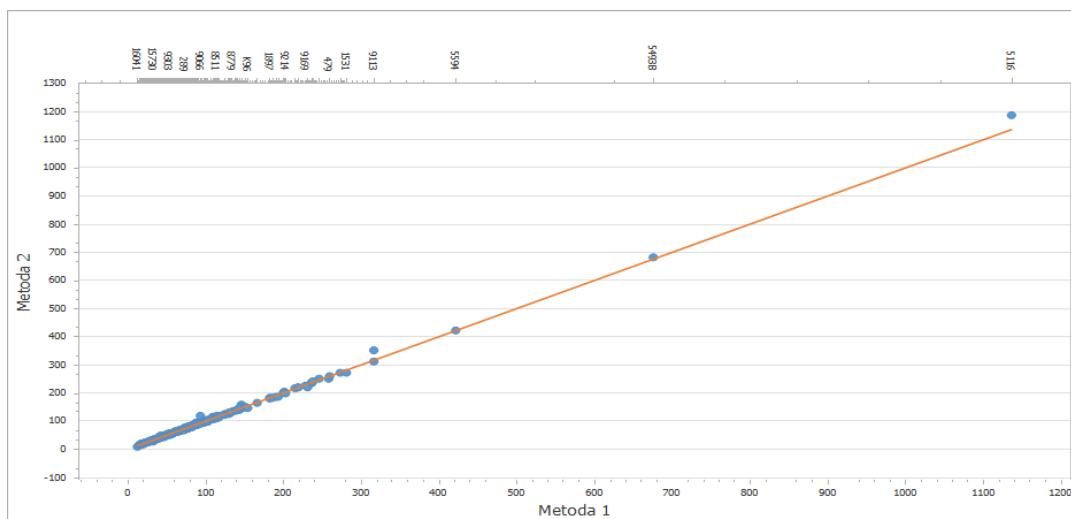
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,4211	3,5843	-0,8432 - 0,0011	Přijata	98,91	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.10 Fosfor

Obrázek 8. Graf pro P – t-test na rozdíl výsledků.

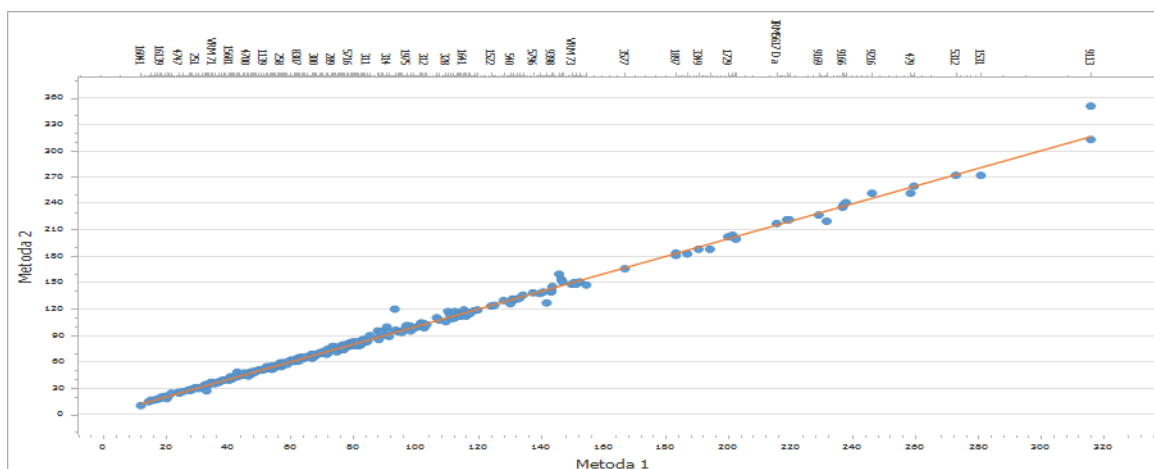


Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,5022	4,5215	-1,0217 - 0,0173	Přijata	102,33	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

Obrázek 9a. Graf pro P – t-test na rozdíl výsledků – po vyloučení nejvyšších bodů.



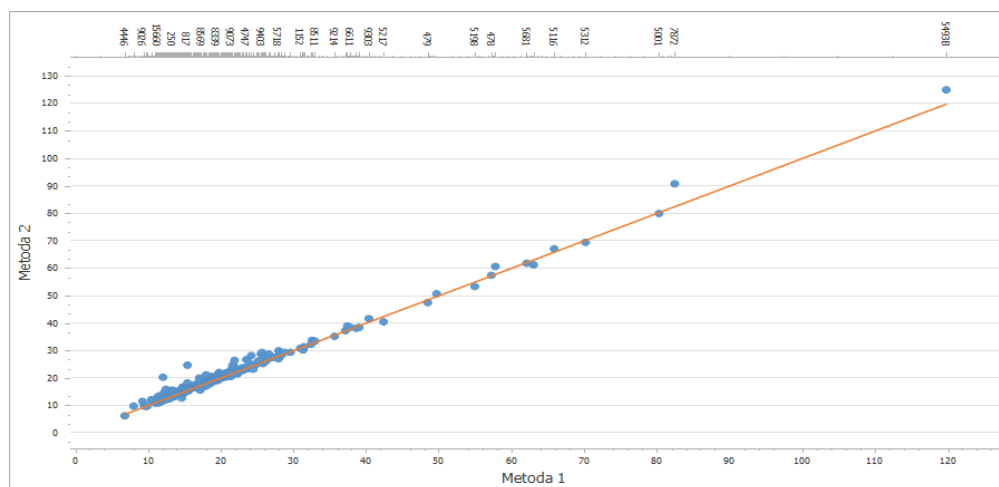
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,2658	3,6167	-0,6828 - 0,1512	Přijata	100,19	True

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.11 Síra

Obrázek 10. Graf pro S – t-test na rozdíl výsledků.

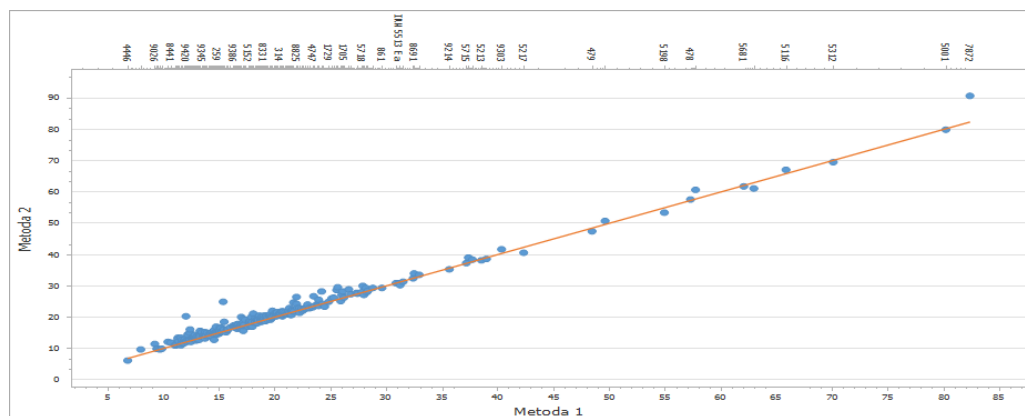


Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,6528	1,2919	-0,8012 - -0,5044	Zamítnuta	101,03	True

Závěr: Srovnávané analytické metody neposkytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

Obrázek 11a. Graf pro S – t-test na rozdíl výsledků – po vyloučení nejvyššího bodu



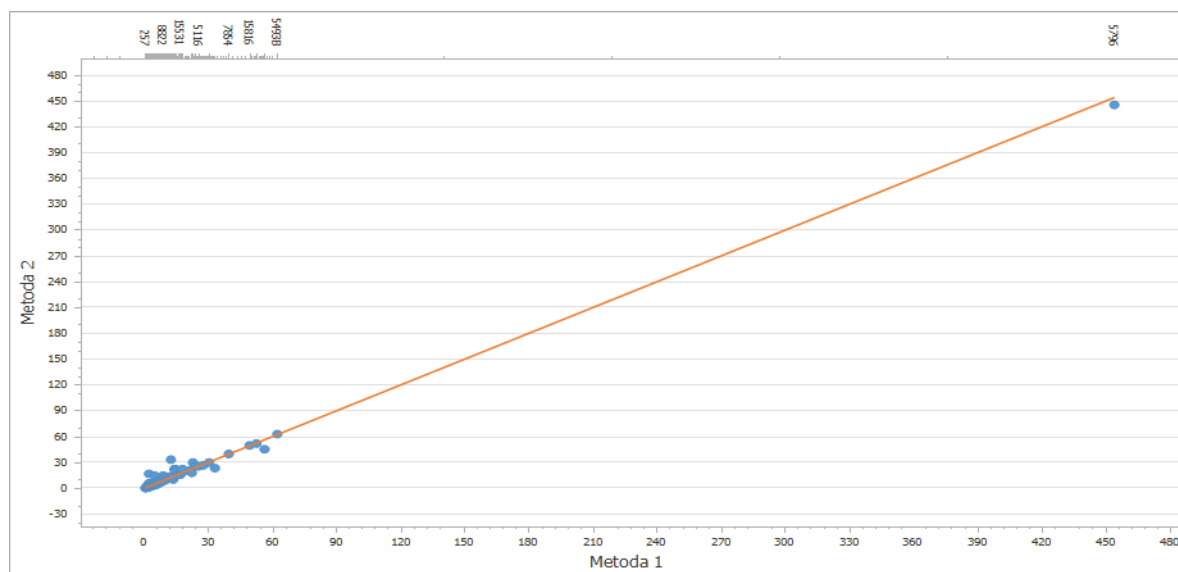
Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,6365	1,2627	-0,7816 - -0,4915	Zamítnuta	99,9	True

Závěr: Srovnávané analytické metody neposkytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

3.2.12 Zinek

Obrázek 12. Graf pro Zn – t-test na rozdíl výsledků.

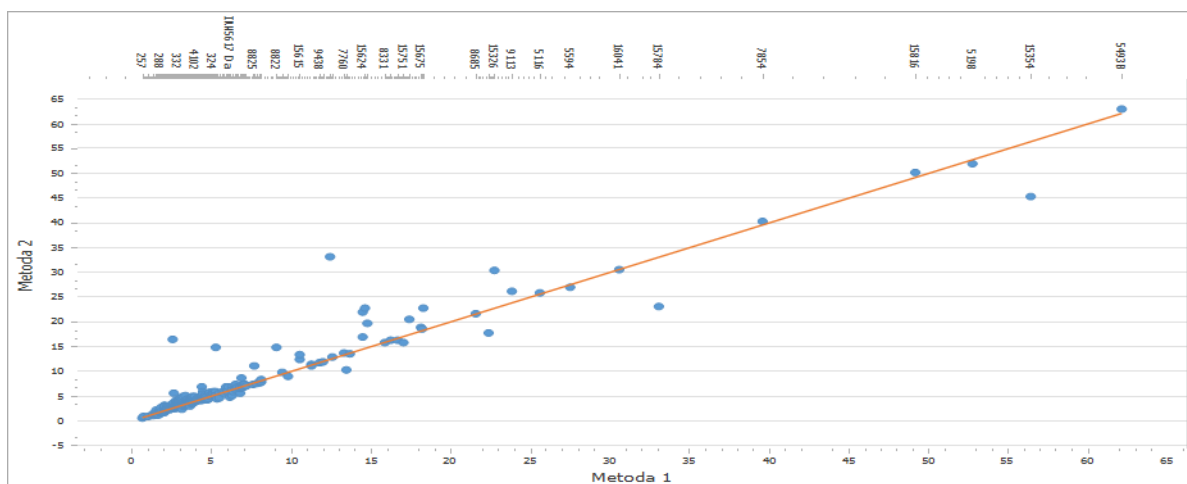


Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,396	2,1841	-0,647 - -0,1451	Zamítnuta	97,95	True

Závěr: Srovnávané analytické metody neposkytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

Obrázek 13a. Graf pro Zn – t-test na rozdíl výsledků po vyloučení nejvyššího bodu.



Vyhodnocení

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza	Výtěžnost	Kritéria přijatelnosti
-0,4271	2,1226	-0,6714 - -0,1828	Zamítnuta	97,55	True

Závěr: Srovnávané analytické metody neposkytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 95 % až 105 %.

Závěrečné vyhodnocení t-testu na rozdíl výsledků:

1. Porovnání dvou metod t-testem na rozdíl výsledků programem Effvalidation prokázalo, že výtěžnost porovnávaných metod je pro všechny parametry v intervalu 95 % až 105 %.
2. Srovnávané analytické metody poskytly statisticky stejné výsledky pro všechny základní živiny, což je Ca, K, Mg a P, dále pro parametry B, Cu, Cd, Fe a pro Mn (po vyloučení odlehlých bodů). Pro parametr Al porovnání statisticky vyhovuje pro koncentrace od 400 mg/kg, což ve vzorovém souboru činilo 85 % výsledků, pro nižší koncentrace nebyly výsledky statisticky stejné. Použité metodě z aktuálního souboru nevyhověly parametry S a Zn. Pro parametr S lze považovat zamítnutí hypotézy za náhodné, rozdíly jsou malé a kritérium je příliš přísné. Průměrný rozdíl pro všechna stanovení S je 4,92 %. Pro parametr Zn je běžný větší rozptyl výsledků i pro navážku 10 g, o čemž svědčí regulační meze vedených regulačních diagramů pro opakované měření referenčních vzorků a regulační meze vedených regulačních diagramů duplicitních vzorků v Labsystému.

4 Závěr

Z provedených porovnání je zřejmé, že snížení navážky nemá vliv na správnost výsledků. Pro stanovení prvků v extraktu Mehlich 3, připraveném podle JPP AP I, postup 30068.1, je možné použít postup s navážkou sníženou na 5 g a s přidavkem 50 ml vyluhovacího činidla bez jakékoliv další změny v postupu. Množství získaného extraktu je pro měření prvků dostatečné. Touto úpravou postupu lze ušetřit významné množství chemikálií a snížit tak ekologickou zátěž pracoviště i přímé náklady na analýzy. Dále se sníží spotřeba kontrolních vzorků a také vzorků analyzovaných půd, které mohou být využity k dalším analýzám.

5 Přílohy

Příloha 1. Výsledky měření extraktů vzorků půd z navážky 10 g a 5 g – pracoviště Opava, Plzeň, Brno.

Příloha 2. Naměřené hodnoty opakovaného měření referenčních vzorků a výpočty relativních směrodatných odchylek.

Obě přílohy jsou dostupné na vyžádání u autorů této práce.

Zavedení kvalitativní detekce transgenu MON 87751 u sóji

Jana Stehlíková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdMB Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno
jana.stehlikova@ukzuz.cz

1 Úvod

Geneticky modifikovaný organismus (GM organismus, GMO) je organismus, jehož genetický materiál byl úmyslně změněn, a to způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací. Dotčené techniky jsou uvedeny v Zákonu o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty č. 78/2004 Sb. v aktuálním znění.

Geneticky modifikované (GM) nebo také transgenní plodiny jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál (DNA) pomocí genových technologií. Jedná se o šlechtitelské metody z oblasti biotechnologií, které mimo jiné umožňují mezidruhový přenos genů.

MON 87751 je geneticky modifikovaná sója, jejíž DNA byla modifikována pomocí cry1A.105 a cry2Ab2 pocházejících z *Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis*. Produktem jsou proteiny Cry1Ab, Cry1F a Cry1Ac a cry2Ab2 delta-endotoxin způsobující poškození střevní výstelky hmyzu *Lepidoptera*.

Výsledkem je rezistence vůči škůdcům řádu *Lepidoptera*.

Cílem práce je rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u sóji o kvalitativní stanovení MON 87751 a určení meze detekce stanovení.

2 Princip

Základem metody detekce genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o běžně používanou metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmnožení konkrétního požadovaného úseku DNA. V tomto případě se jedná o klasickou PCR s elektroforetickou detekcí amplikonu na agarózovém gelu.

3 Materiál a metody

Pro zavedení analýzy byly použity izoláty DNA z certifikovaných referenčních materiálů (CRM) od The American Oil Chemist's Society (AOCS)

AOCS 0215-A, Non-Modified soybean powder, No MON89788, MON87701, MON87705, MON87708, MON87769 (pure, < 0,1 %), laboratorní značení: CRM 19/2014

AOCS 0215-A, MON 87751 Soybean Monsanto Event MON87751 Powder, (pure), laboratorní značení: CRM 1/2019

Izolace byla provedena pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin® Food – MACHEREY-NAGEL). U izolátů DNA byla změřena koncentrace, byly otestovány na kvalitu i amplifikovatelnost DNA.

3.1 Přístroje a pomůcky

Extrakce DNA

Váhy s přesností 0,01 g.

Vodní lázeň nebo termoblok, přednostně s vibrací, třepáním.

Centrifuga.

Minishaker, vortex.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Přenosná UV lampa.

Digestoř.

pHmetr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Nízkoobjemový spektrofotometr, vlnové délky (230, 260, 280) nm.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

pHmetr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.

Elektroforetická vana, zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.

Fotodokumentační zařízení se softwarem.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

PCR reakce – amplifikace

PCR box.

Minishaker, vortex.

Termální cykler.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l a sterilní špičky s filtrem i bez filtru.

Plastové sterilní zkumavky, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.

Výrobník ledu.

Lednice.

Mrazicí box.

Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

3.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

Extrakce DNA

NucleoSpin[®] Food, výrobce Macherey – Nagel, kit pro izolaci genomické DNA z potravin a krmiv.

Lysis Buffer CF.

Buffer C4.

Wash buffer CQW.

Wash buffer C5 (koncentrát).

Elution buffer CE.

NucleoSpin[®] Food Columns (plus Collection Tubes).

Proteinase K (lyofilizát).

Proteinase buffer PB.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Agaróza pro molekulární biologii.

Pracovní roztok 1 × TAE pro elektroforézu.

1% Pracovní roztok interkalačního barviva (ethidium bromid).

EZ Load Precision Molecular Mass Standard, BIO-RAD.

6 × Loading Dye Solution.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. EZ LoadTM Molecular Ruler 50 bp PCR Biorad).

Ribonuklease A 10 mg / ml (DNase and protease free).

PCR reakce – amplifikace

REDTaq[®] ReadyMixTM PCR Reaction Mix with MgCl₂, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq).

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

PCR voda.

Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů

Voda vhodná pro PCR.

Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

Amplifikační primery: Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Genери-Biotech.

Primery pro vnitřní (referenční) gen sóji, sójový lektin:

GMO-3: 5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC G-3'

GMO-4: 5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG-3'

Primery pro MON88751:

MON87751 primer 1: 5'-GGC CTA ACT TTT GGT GTG ATG ATG-3'

MON87751 primer 2: 5'-CTA AAT TGC TCT TTG GAG TTT ATT TTG TAG -3'

3.3 Pracovní postup

Pro zavádění byly použity postupy JPP 10252.1 Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR-kit Nucleospin Food, JPP 10255.1 Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO), JPP 10257.1 Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR a JPP 10259.1 Vyhodnocení výsledků stanovení GMO metodou PCR.

Tabulka 1. Složení reakční směsi pro PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR), vnitřní gen sóji i MON87751.

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			6,5
RedTaq PCR MIX	2 ×	1 ×	12,5
Primer F	20 μM	0,4 μM	0,5
Primer R	20 μM	0,4 μM	0,5
Templátová DNA	10 ng/μl	50 ng	5
Objem směsi vč. templátu			25

Vnitřní gen sóji

Primery: GMO3 /GMO4

Délka amplikonu: 118 bp

Tabulka 2. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	45	35
Annealing	57	50	
Elongace	72	60	
Závěrečná elongace	72	355	1

MON 87751

Primery: MON87751 primer 1/ MON87751 primer 2

Délka amplikonu: 87 bp

Tabulka 3. Amplifikační program.

Fáze	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a extenze	60	60	

4 Výsledky a diskuse

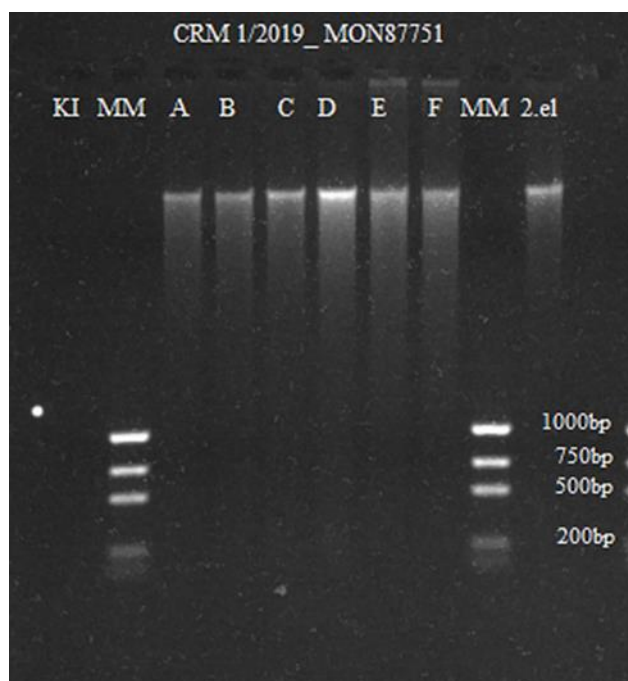
Kvalita DNA

Pro zavádění byla extrahována DNA z CRM GM negativní sóji (CRM 19/2014) a z CRM sóji MON87851 (CRM 1/2019). U izolátů byla změřena koncentrace (tabulka 4), otestována kvalita i amplifikovatelnost DNA (obrázky 1, 2, 3, 4).

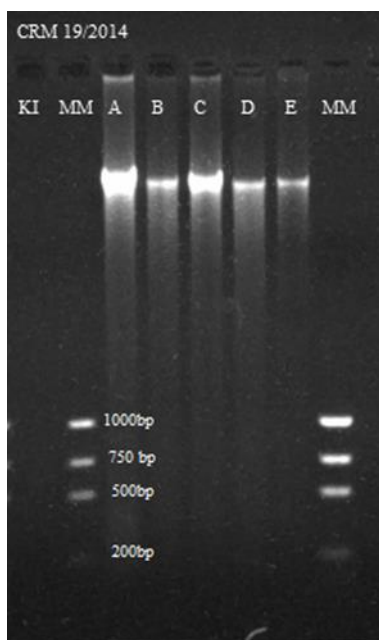
Kritéria čistoty daná poměrem A 260/280 byla splněna u všech izolátů (doporučený poměr absorbancí je v rozmezí 1,7 až 2,0), u poměru A 260/230 jsou hodnoty pro některé izoláty nižší (doporučený poměr absorbancí je v rozmezí 1,6 až 2,2). Důvodem může být přítomnost zbytkových sacharidů nebo samotná nízká koncentrace DNA v izolátu. Pokud se prokáže apmplifikovatelnost DNA, je možné s izolátem dále pracovat. Kvalita na gelu a koncentrace izolátů vyhovovala požadavkům na analýzu a všechny izoláty byly pro analýzy vyhovující.

Tabulka 4. CRM 1/2019– hodnoty naměřených koncentrací a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.

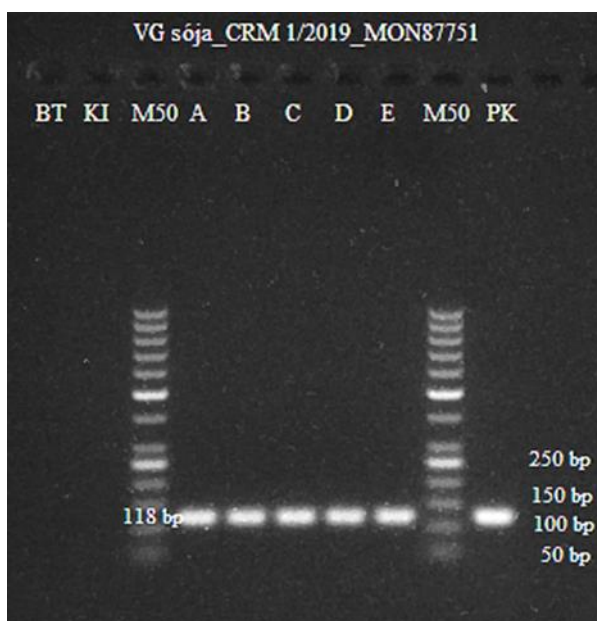
CRM		Koncentrace ng/μl	A 260/A 280	A 260/230
Sója CRM 19/2014	A	44,6	1,74	1,73
	B	24,3	1,90	1,69
	C	33,5	1,82	1,45
	D	25,7	1,73	1,46
	E	29,8	1,70	1,62
Sója CRM 1/2019 MON 87751 100 % GM m/m	A	37,8	1,95	1,59
	B	14,6	1,86	1,50
	C	38,0	1,93	1,64
	D	17,8	1,84	1,33
	E	15,3	1,78	1,47



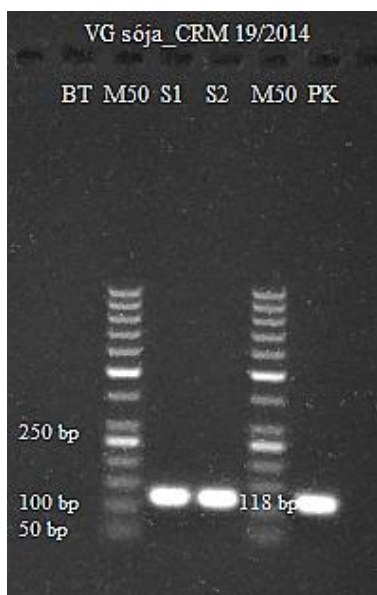
Obrázek 1. Kvalita izolátů DNA, CRM 1/2019 izoláty A, B, C, D, E (F a směs z 2.eluce). MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.



Obrázek 2. Kvalita vyizolované DNA, CRM 19/2014, izoláty A, B, C, D, E. MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.



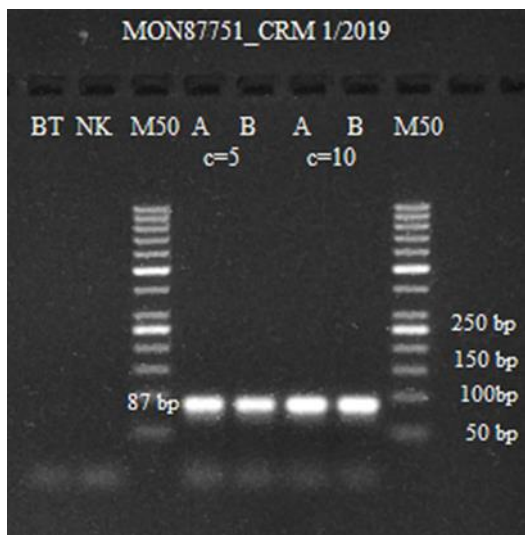
Obrázek 3. Vnitřní gen sóji (118bp) - CRM 1/2019, izoláty A, B, C, D, E; BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 34/2012.



Obrázek 4. Vnitřní gen sóji (118bp) - CRM 19/2014, směs izolátů S, BT – beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, PK-CRM 34/2012.

Správnost stanovení MON 87751

Bylo provedeno stanovení MON87751 z izolátů (A, B) CRM 1/2019 s koncentrací DNA v izolátu 5ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl. Zkoušky byly pozitivní (obrázek 5).



Obrázek 5. Stanovení MON87751 (87 bp), BT – beztemplátová kontrola, M50-marker 50 bp, NK – CRM 19/2014, CRM 1 /2019: Izoláty A, B v koncentracích 5 ng DNA/ul a 10 ng DNA/ul.

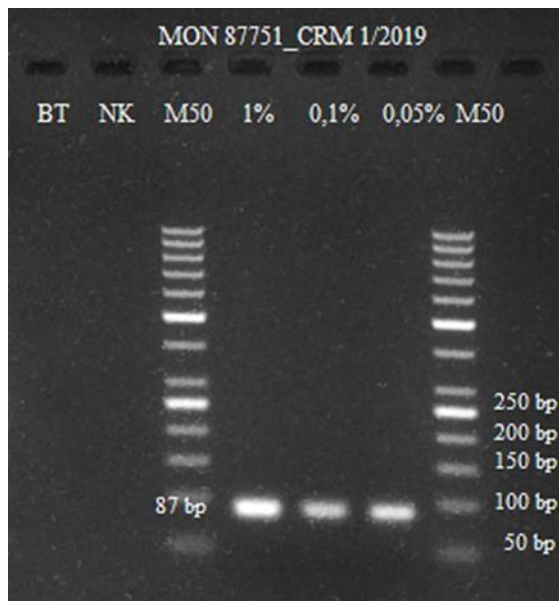
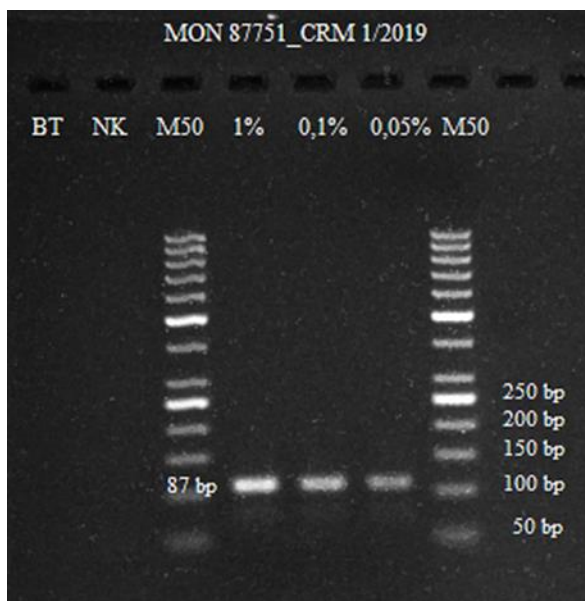
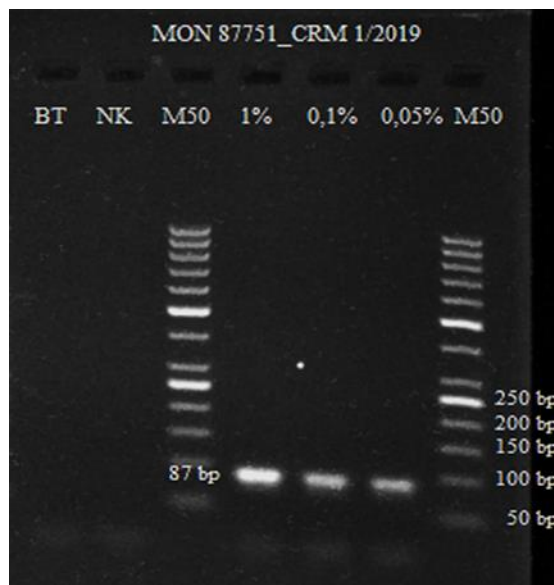
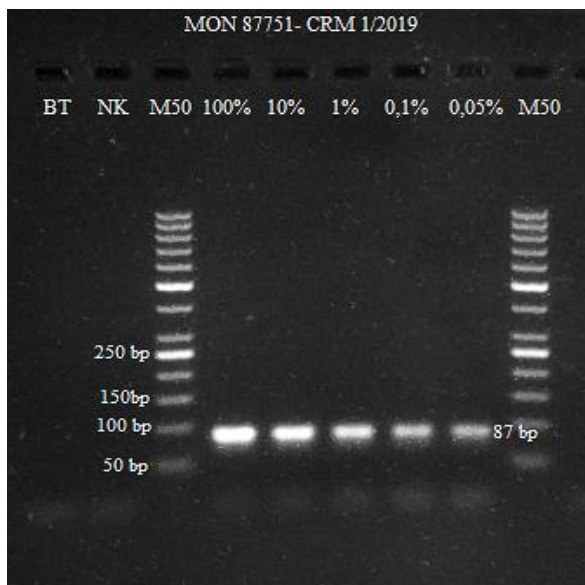
Mez detekce stanovení MON87751

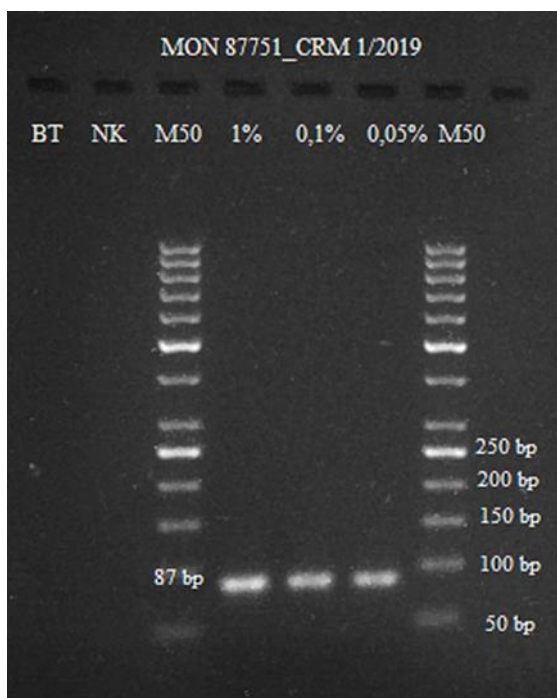
Dále byla stanovena mez detekce metodou ředící řady s použitím izolátu nemodifikované genomické DNA sóji (CRM 19/2014). Byla provedena amplifikace izolátu DNA CRM 1/2019 o obsahu modifikace 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 % a 0,05 % GM m/m a následně opakována pro rozsah 1 %, 0,1 % a 0,05 % GM m/m.

K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních (obrázky 6, 7-10).

Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace MON87751 lze detekovat na hladině 0,05 % GM m/m.

Mez detekce se ověřila provedením pěti nezávislých PCR (amplifikací) zaváděné modifikace.





Obrázky 6 – 10. Stanovení MD transgenu MON87751 (87 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 19/2014, M50-marker 50 bp. CRM 1/2019: 100 %, 10 %, 1 %; 0,1 %; 0,05 %. Amplifikační kit REDTaq. PCR proběhla do koncentrace 0,05 %.

Během verifikace se postupovalo podle metod JPP (postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1) a metody validované EURL. Zachovaly se sekvence primerů i amplifikační programy. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaný certifikovaný referenční materiál vykazuje pruh v příslušném místě.

Detekovatelnost pruhů DNA je závislá zejména na koncentraci templátové DNA, kvalitě templátové DNA (závisí na způsobu izolace, skladování apod.), kvalitě amplifikačních primerů, kvalitě gelu, použitém interkalačním barvivu a provedení elektroforézy.

5 Závěr

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci nové genetické modifikace sóji MON87751 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OdMB.

Metoda stanovení sóji MON87751 byla zavedena s mezí detekce 0,05 % GM m/m.

Tato metoda se zařadí jako další parametr při zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv a osiv.

6 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1.
2. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011.
3. Event-Specific Method for the Quantification of Soybean MON 87751 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2016.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXVII, 2023/1

Ročník: XXVII, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2023

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 42

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196