

Národní referenční laboratoř

Bulletin 2018

Ročník XXII, číslo 3/2018

Brno 2018

Obsah

- 1 Zavedení detekce DAS40278 a MON87460 u kukuřice**
Kateřina Staňková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie
Hroznová 2, 656 06 Brno 1

- 2 Stanovení chloristanů v hnojivech**
Eva Fojtlová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno
Hroznová 2, 656 06 Brno 28

- 3 Stanovení huminových látek**
Alena Žalmanová, Václav Rypl, Radomila Turnvaldová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdNRL Plzeň
Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň 37

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Zavedení detekce DAS40278 a MON87460 u kukuřice

Kateřina Staňková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB Brno, Hroznová 5, 656 06 Brno

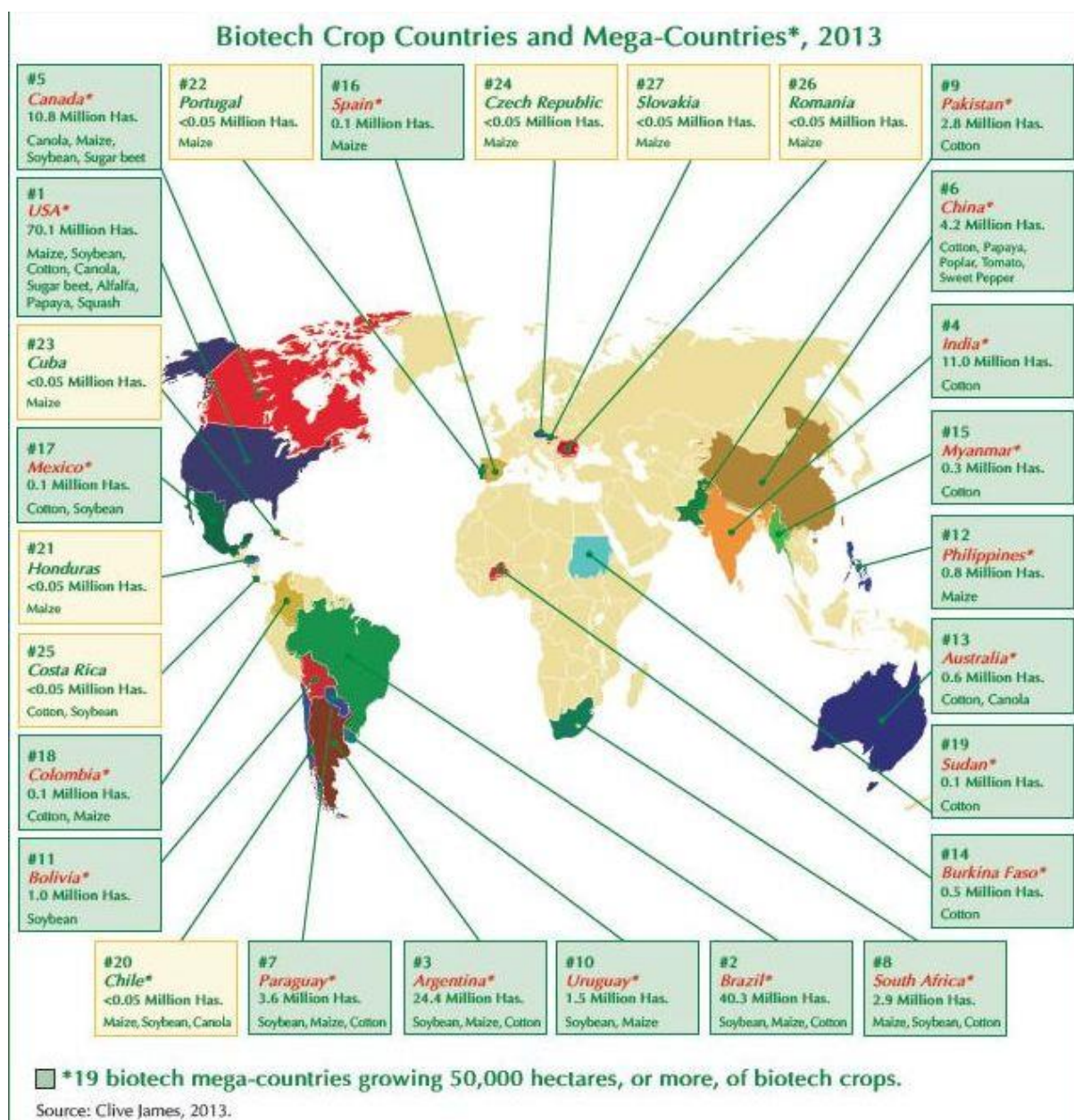
1 Úvod

Geneticky modifikované (dále GM) neboli transgenní rostliny jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál pomocí genových technologií. Jedná se o změny cílené, tedy získané tak, že do rostliny vneseme nebo v ní cíleně deaktivujeme nějaké konkrétní geny.

Typy GM plodin:

- Plodiny zlepšených vlastností (tolerance k herbicidům, rezistence vůči hmyzím škůdcům, rezistence k dalším biotickým a abiotickým stresům).
- Plodiny s přidanou hodnotou produktů (vyšší a kvalitativně zlepšen obsah olejů – řepka, sója, vyšší obsah lysinu – kukuřice, aj.).
- Plodiny, které produkují proteiny (využitelné ve farmacii, speciální enzymy pro průmyslové využití, produkty, které jsou základem bioplastů a biopaliv).

V roce 2013 pěstovalo GM plodiny 18 mil. zemědělců ve 27 zemích světa. Plocha GM plodin zaujímala celkem 175,2 mil. hektarů. Ve srovnání s rokem 2012 došlo k 3% nárůstu (5 mil. ha). V posledních třech letech se na růstu využívané plochy podílejí především rozvojové země, zatímco v průmyslově vyspělých zemích se využívaná plocha nemění. Ve využití GM plodin vede Severní Amerika, následují Jižní Amerika a Asie. Na ostatních kontinentech jsou využívány GM plodiny méně (viz obr. 1). Evropa je známá svým odmítavým postojem ke GM zemědělským plodinám. Pro pěstování jsou povolena pouze GM kukuřice MON810. Z hlediska oseté plochy kukuřicí MON810 v Evropě stojí za zmínku pouze Španělsko. Česká republika, Slovensko, Portugalsko a Rumunsko pěstují GM kukuřici MON810 v zanedbatelné míře. Co se týče GM plodin povolených pro dovoz do EU a následné použití jako potraviny a krmiva, je jejich počet větší. Důvodem je skutečnost, že Evropa není soběstačná v produkci krmiv, takže musí značnou část potřebných komodit dovážet ze třetích zemí. Pro dovoz a použití na výrobu potravin a krmiv je povoleno celkem 58 GM plodin, a to: 7 typů sóji, 37 typů kukuřice, 8 typů bavlníku, 3 typy řepky, 2 typy bakteriální biomasy a 1 typ cukrovky.



Obr. 1. Přehled zemí z celého světa, ve kterých se v roce 2013 pěstovaly GM plodiny.

Rank	Country	Area (million hectares)	Biotech Crops
1	USA*	70.1	Maize, soybean, cotton, canola, sugar beet, alfalfa, papaya, squash
2	Brazil*	40.3	Soybean, maize, cotton
3	Argentina*	24.4	Soybean, maize, cotton
4	India*	11.0	Cotton
5	Canada*	10.8	Canola, maize, soybean, sugar beet
6	China*	4.2	Cotton, papaya, poplar, tomato, sweet pepper
7	Paraguay*	3.6	Soybean, maize, cotton
8	South Africa*	2.9	Maize, soybean, cotton
9	Pakistan*	2.8	Cotton
10	Uruguay*	1.5	Soybean, maize
11	Bolivia*	1.0	Soybean
12	Philippines*	0.8	Maize
13	Australia*	0.6	Cotton, canola
14	Burkina Faso*	0.5	Cotton
15	Myanmar*	0.3	Cotton
16	Spain*	0.1	Maize
17	Mexico*	0.1	Cotton, soybean
18	Colombia*	0.1	Cotton, maize
19	Sudan*	0.1	Cotton
20	Chile	<0.1	Maize, soybean, canola
21	Honduras	<0.1	Maize
22	Portugal	<0.1	Maize
23	Cuba	<0.1	Maize
24	Czech Republic	<0.1	Maize
25	Costa Rica	<0.1	Cotton, soybean
26	Romania	<0.1	Maize
27	Slovakia	<0.1	Maize
Total		175.2	

* 19 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops

** Rounded off to the nearest hundred thousand

Source: Clive James, 2013.

Obr. 2. Tabulka zobrazující přehled druhů pěstovaných GM plodin a počtu osetých hektarů v jednotlivých zemích světa.

2 Cíl

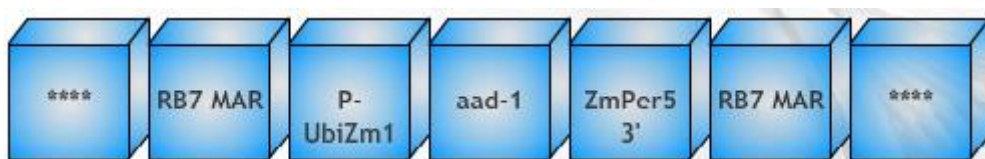
Cílem vývojového úkolu je rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u kukuřice. Nově zaváděnými transgeny jsou DAS40278 a MON87460.

DAS40278

Geneticky modifikovaná odrůda kukuřice DAS40278 byla vytvořena za účelem získání kukuřice tolerantní k herbicidům na bázi kyseliny 2,4 – dichlorfenoxyoctové.

Genom transgenní kukuřice MON87460 obsahuje gen *aad-1*, který kóduje enzym AAD-1 (Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1), který degraduje AOPP (Aryloxyphenoxypropionát) a 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyoctová kyselina). V důsledku toho se stává GM rostlina tolerantní k herbicidům na bázi těchto účinných látek.

Schéma genového konstruktů:



Obr. 3. Schéma genového konstruktů genetické modifikace kukuřice DAS40278.

RB7 MAR	MAR (Matrix attachment region) z <i>Nicotiana tabacum</i> .
P-UbiZm1	Konstitutivní promotor ubiquitinového 1 genu kukuřice (<i>Zea mays</i>).
<i>aad-1</i>	Gene z <i>Sphingobium herbicidovorans</i> , který kóduje AAD-1 protein.
ZmPer5 3'	3' nepřeložený region z kukuřičného (<i>Zea mays</i>) peroxidázového genu.
RB7 MAR	MAR (Matrix attachment region) z <i>Nicotiana tabacum</i> .

Geneticky modifikovaná kukuřice DAS40278 je součástí seznamu geneticky modifikovaných plodin, u kterých probíhá povolovací proces nebo u kterých uplynula doba povolení.

MON87460

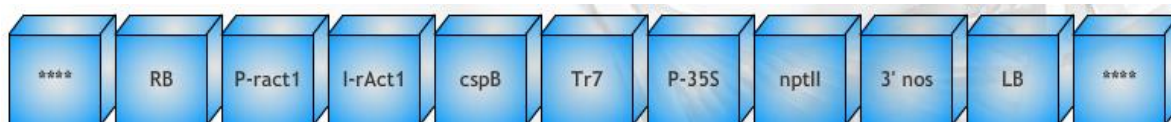
Geneticky modifikovaná odrůda kukuřice MON87460 byla vytvořena za účelem získání kukuřice schopné odolávat abiotickým stresovým faktorům, a to konkrétně suchu.

Genom transgenní kukuřice MON87460 obsahuje kopii genu *cspB* z bakterie *Bacillus*

subtilis, který kóduje CSPB protein (cold shock protein B) odpovědný za toleranci rostlin vůči suchu, a kopii nptII z Tn5 transposonu z bakterie *E. coli* kódující enzym NPTII.

Kromě výše uvedených genů obsahuje genový konstrukt promotor 35S a terminátor NOS. Promotor 35S, terminátor NOS a gen nptII se v laboratoři stanovují v rámci screeningu.

Schéma genového konstruktů:



Obr. 4. Schéma genového konstruktů genetické modifikace kukuřice MON87460.

RB	Pravá hraniční sekvence transpozonu z bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
P-ract1	Sekvence konstitutivního promotoru rýžového (<i>Oryza sativa</i>) aktinového genu.
I-rAct1	Intron rýžového aktinového genu 1.
cspB	Sekvence kódující CspB (cold shock protein B) z bakterie <i>Bacillus subtilis</i> , který zajišťuje toleranci vůči suchu.
Tr7	Terminační sekvence z T-DNA z <i>A. tumefaciens</i> .
P-35S	CaMV promotor.
nptII	sekvence kódující NPTII enzym (neomycin phosphotransferase) z Tn5 transposonu z bakterie <i>E. coli</i> .
3' nos	3' terminační sekvence nopaline synthase genu z bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
LB	Levá hraniční sekvence transpozonu z bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .

Geneticky modifikovaná kukuřice MON87460 je součástí seznamu geneticky modifikovaných plodin, u kterých probíhá povolovací proces nebo u kterých uplynula doba povolení.

3 Princip

Základem metod detekce výše uvedených genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o hojně používanou metodu, při které dochází

k mnohonásobnému zmnožení určitého úseku DNA.

PCR se provádí automatizovaně v termálním cykleru. Před vlastní PCR je důležité provést úplnou počáteční denaturaci DNA. Tím se zajistí, že při prvním kroku cyklu nedojde pouze k částečnému oddělení komplementárních řetězců, ale všechny molekuly původní DNA budou jednořetězcové a přístupné primerům. Následuje denaturační krok prvního cyklu. Během druhého kroku, tzv. annealingu přisedají primery ke specifickým sekvencím matricové DNA. Primery jsou navrženy tak, že se vážou k protilehlým řetězcům dvoušroubovice 3'-konci směrem k sobě a vymezují délku amplifikovaného úseku. Ve třetím kroku cyklu tzv. extenzi jsou primery prodlužovány DNA-polymerázou ve směru od 5'-konce ke 3'-konci. Následující cyklus začíná opět denaturací dvouvláknové DNA a vše se opakuje. Vzhledem ke specifické sekvenci primerů je amplifikovaný úsek mezi nimi stále stejný. Celkový produkt PCR se nazývá amplikon. Má definovanou délku pohybující se od desítek až po tisíce párů bází (bp), která se stanoví pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

4 Materiál a metody

4.1 Přístroje a pomůcky

- 4.1.1 Analytické váhy.
- 4.1.2 Váhy s přesností 0,01 g.
- 4.1.3 Vortex.
- 4.1.4 Centrifuga.
- 4.1.5 Vodní lázeň.
- 4.1.6 Nízkoobjemový spektrofotometr (vlnové délky 230, 260, 280 nm).
- 4.1.7 Minitřepačka.
- 4.1.8 Laminární box.
- 4.1.9 Termální cykler.
- 4.1.10 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 4.1.11 Elektroforetická vana a zdroj napětí.
- 4.1.12 Transiluminátor.
- 4.1.13 Fotodokumentační zařízení se softwarem.
- 4.1.14 pH metr.
- 4.1.15 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky

s filtrem.

- 4.1.16 Plastové zkumavky o objemu 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.
- 4.1.17 Výrobník ledu.
- 4.1.18 Přenosná UV lampa.
- 4.1.19 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, stojánky na zkumavky, nádoba na uchování ledu, odpadní nádoby.

Sterilizace a dekontaminace se provádí dle charakteru materiálu buď tepelně (v sušárně 1 h při (115 – 120) °C) nebo chemicky (např. 70% etanolem, (0,5-1) % chlornanem sodným, apod.).

4.2 Chemikálie

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

- 4.2.1.1. Lysis Buffer CF.
- 4.2.1.2. Buffer C2.
- 4.2.1.3. Buffer C3.
- 4.2.1.4. Wash buffer CQW.
- 4.2.1.5. Wash buffer C5 (koncentrát).
- 4.2.1.6. Elution buffer CE.
- 4.2.1.7. NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).
- 4.2.1.8. Proteinase K (lyofilizát).
- 4.2.1.9. Proteinase buffer PB.

4.2.2 REDTaq®ReadyMix™PCR Reaction Mix with MgCl₂, Sigma-Aldrich

- 4.2.2.1 REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ (dále REDTaq).
- 4.2.2.2 PCR voda.

4.2.3 Amplifikační primery

- 4.2.3.1 IVRI-F: CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC.
- 4.2.3.2 IVRI-R: GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT.
- 4.2.3.3 35s-cf3: CCA CGT CTT CEE AGC AAG TGG.
- 4.2.3.4 35s-cf4: TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC C.

- 4.2.3.5 NOS-1: GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG.
- 4.2.3.6 NOS-3: TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA.
- 4.2.3.7 APH2 F: CTC ACC TTG CTC CTG CCG AGA.
- 4.2.3.8 APH2 R: CGC CTT GAG CCT GGC GAA CAG.
- 4.2.3.9 DAS-40278-9_5'-f1: CAC GAA CCA TTG AGT TAC AAT C.
- 4.2.3.10 DAS-40278-9_5'-r3: TGG TTC ATT GTA TTC TGG CTT TG.
- 4.2.3.11 MON 87460 primer 1: CAC GTT GAA GGA AAA TGG ATT G.
- 4.2.3.12 MON 87460 primer 2: TCG CGA TCC TCC TCA AAG AC.

4.2.4 Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE

- 4.2.4.1 Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na₂EDTA.
- 4.2.4.2 Trizma base.
- 4.2.4.3 Ledová kyselina octová.
- 4.2.4.4 Hydroxid sodný, c (NaOH) = 1 mol.l⁻¹, 10 g NaOH se rozpustí ve vodě a doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

Příprava TAE pufru:

Příprava zásobního roztoku 50 × TAE

1. Příprava 0,5 M zásobního roztoku EDTA:

186,1 g Na₂EDTA se vmíchá do 750 – 800 ml (re)destilované vody. Na₂EDTA se úplně nerozpustí, dokud nebude pH vyšší než 7,0. pH se upraví na 8,5 přidáním NaOH. Potom se doplní (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml. Přefiltruje se přes hustý filtrační papír. Roztok se skladuje neomezeně při laboratorní teplotě.

2. Příprava 2 M Tris:

Naváží se 242 g Trizma base a rozpustí v 650 ml (re)destilované vody. Přidá se 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml předem připraveného 0,5 M zásobního roztoku EDTA (pH 8,5). Doplní se (re)destilovanou vodou do celkového objemu 1000 ml. Neautoklávuje se. Uchovává se v těsně uzavřené láhvi při laboratorní teplotě.

Příprava pracovního roztoku 1 × TAE pro elektroforézu

Odměří se 20 ml zásobního roztoku 50 × TAE a doplní se (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

Příprava agarózového gelu

Používá se 0,8% gel pro stanovení kvality vyizolované DNA (0,64 g agarózy) a 2% gel pro hodnocení amplifikačních fragmentů (1,6 g agarózy nebo agarózy High Resolution). Do Erlenmeyerovy baňky se naváží dané množství práškové agarózy a přidá se 80 ml pracovního 1 × TAE pufru. Vaří se při teplotě (150 – 200) °C na elektromagnetickém míchadle po dobu (15 – 20) minut do doby až se vyčeří roztok a vzduchové bubliny vymizí i po krouživém zamíchání. Mezitím se připraví nalévací vana a vhodný hřebínek.

Po mírném zchladnutí se přidá 10 µl pracovního roztoku ethidiumbromidu (interkalační barvivo sloužící ke zviditelnění DNA v gelu) a míchá se 1 minutu. Poté se vyjme míchadélko a agar se nalije do vany s hřebínkem. Asi po (20 – 30) minutách, v závislosti na teplotě prostředí, lze opatrně vyjmout hřebínek a přenést gel z nalévací vany do elektroforetické vany s pracovním roztokem 1 × TAE pufru.

4.2.5 Ostatní

4.2.5.1 Voda vhodná pro PCR.

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

4.2.5.3 (re)destilovaná voda.

4.2.5.4 Agaróza.

4.2.5.5 Zásobní roztok ethidium bromidu. Pracovní roztok se získá zředěním zásobního roztoku 10 × (re) destilovanou vodou.

4.2.5.6 Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. GeneRuler™50bp DNA Ladder).

4.2.5.7 6 × Loading Dye Solution.

4.2.5.8 Elektroforetický hmotnostní marker pro genomovou DNA (např. EZ Load™ Molecular Ruler Precision Mass, Biorad).

4.2.5.9 (0,5 – 1)% roztok chlornanu sodného.

4.2.5.10 70% etanol.

4.2.5.11 Dekontaminační roztok.

Testovaný materiál

Pozitivní kontroly se používají pro potvrzení přítomnosti amplifikovaného úseku.

Negativní kontroly se používají pro prokázání specifity reakce, a to jen v případě nově zaváděných genetických modifikací.

DAS40278

ERM[®]BF433c (naše označení CRM 6/2014) obsahující 1% kukuřici MON40278 z IRMM Institute for reference Material and Measurements (Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgie).

MON87460

AOCS 0709-A (naše označení CRM 16/2014) obsahující kukuřici MON87460 z AOCS (American Oil Chemists' Society).

Obě pozitivní kontroly jsou ve formě kukuřičné mouky a musí se z nich nejprve vyizolovat DNA.

4.3. Pracovní postup

Izolace DNA

Před začátkem vlastní izolace DNA je nutno připravit tyto roztoky:

Pufr C4: převede se kvantitativně celý obsah tuby obsahující pufr C2 do tuby s obsahem pufru C3 a dobře se promíchá. Výsledný pufr C4 je stabilní po dobu 1 roku uskladněný při laboratorní teplotě. Pro dokonalejší rozpuštění obou komponent se doporučuje inkubace při teplotě 45 °C po dobu 5 min.

Pufr C5: ke koncentráту pufru C5 se přidá (95 – 100)% etanol, a to v množství uvedeném na lahvičce pufru. Po zředění se označí přidání etanolu. Takto upravený pufr lze uchovávat při laboratorní teplotě po dobu 1 roku.

Proteináza K: k lyofilizované Proteináze K se přidá množství proteinázového pufru uvedené na jejím obalu. Roztok proteinázy K je stabilní při teplotě –20 °C po dobu 6 měsíců.

Vlastní izolace DNA probíhá v několika krocích, nejdřív se musí provést příprava pracovní plochy. Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů dekontaminačním roztokem a působením UV záření po dobu 30 min. Vodní lázeň se přehřeje na teplotu 65 °C a dá se přehřát lyzační pufr CF na teplotu 65 °C. Do 2 ml zkumavky se naváží 200 mg zhomogenizovaného vzorku (pozitivní kontroly). Prvním krokem izolace DNA je buněčná lyze, kdy se ke vzorku přidá 550 µl lyzačního pufru CF, dobře se promíchá (15 s), přidá se 10 µl proteinázy K a 10 µl RNázy A a opět se promíchá (2 – 3) s. Inkubuje se při teplotě 65 °C po dobu 30 min. Poté se směs centrifuguje po dobu

10 min (> 10000 g) až se buněčné zbytky usadí. Připraví se podmínky pro vázání DNA na silikagel, a to tak, že se převede 300 μ l čistého supernatantu z kroku 3 do nové 2 ml zkumavky. Přidá se 300 μ l pufru C4 a 200 μ l etanolu (96 – 100)% a vortexuje se 30 s. Tuba NucleoSpin se umístí do nové 2 ml centrifugační zkumavky a přidá se 750 μ l směsi z předchozího kroku. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Následuje promývání DNA, které probíhá ve třech po sobě následujících krocích. V prvním promytí se napipetuje 400 μ l pufru CQW do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Ve druhém promytí se napipetuje 700 μ l pufru C5 do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Ve třetím promytí se napipetuje dalších 200 μ l pufru C5 do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 2 min při 11000 g, aby se úplně odstranil pufr C5 (rezidua etanolu v promývacím pufru C5 mohou inhibovat enzymatickou reakci). Posledním krokem izolace DNA je eluce. Předehřeje se eluční pufr CE na 70 °C. Tuba NucleoSpin se umístí do nové centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml. Na membránu v NucleoSpin tubě se napipetuje 100 μ l předehřátého elučního pufru CE. Inkubuje se 5 min při laboratorní teplotě, a poté se centrifuguje 1 min při 11000 g, aby se shromáždila DNA. Eluát obsahuje čistou genomovou DNA. Pro krátkodobé skladování se uchovává při teplotě (2 – 8) °C, pro dlouhodobé při -20 °C.

Měření koncentrace a určení kvality vyizolované DNA

Důležitým krokem po vyizolování DNA je orientační spektrofotometrické stanovení její koncentrace, případně dalších příměsí a zjištění její kvality – celistvosti pomocí gelové elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu.

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA

Měření při vlnových délkách (230, 260 a 280) nm umožní kromě stanovení koncentrace získané DNA i hodnocení čistoty vzorku. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při (260 a 280) nm a (260 a 230) nm.

Hodnoty poměru 260/280 se nejčastěji pohybují v rozmezí (1,7 - 2,0). Ideální hodnoty jsou (1,7 - 1,8). Jestliže je naměřená hodnota pod 1,7, je DNA znečištěná proteiny nebo jinými organickými látkami. Pokud je naměřená hodnota nad 1,9, je DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami.

Hodnoty poměru 260/230 musí být vyšší než 1,5. Ideální hodnoty jsou (2,0 – 2,2).

Pokud je naměřená hodnota nižší než 1,5 je získaná DNA kontaminována látkami jako jsou fenol a guanidinové soli.

Vlastní měření

Koncentrace DNA se měří proti slepému vzorku, kterým je roztok, v němž je DNA rozpuštěná (v našem případě se jedná o eluční roztok z kitu NucleoSpin® Food). Použijí se 2 µl vzorku. Každý vzorek se měří 2 ×. Naměřené hodnoty se zprůměrují. Pro následnou PCR zpravidla vyhovují koncentrace v rozmezí (5 – 10) ng / µl templátové DNA. Pokud je koncentrace DNA vyšší, je třeba ji na tuto hodnotu naředit vodou vhodnou pro PCR.

Pro vývojový úkol byly vzorky vyextrahované DNA certifikovaných referenčních materiálů naředěny na koncentrace 5 ng/ µl a 10 ng/ µl.

Určení kvality vyizolované DNA

Pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu se zjistí kvalita vyizolované DNA (zda je celistvá nebo degradovaná), přítomnost RNA a proteinů.

Vzorky se smíchají s barvivem 6 × Loading Dye Solution v množství 2 µl barviva a 3 µl vyizolované DNA a spolu s Load Precision Molecular Mass standardem se nanesou do jamek gelu a spustí se elektroforéza (70 V, 75 minut).

Polymerázová řetězová reakce

Pro zavedení detekce nových genetických modifikací byly využity již zavedený JPP postup Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR (postup č. 10250.1) a metody validované European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL GMFF).

Pro určení konkrétních transgenů se používají metody druhově specifické neboli event-specific, které se zaměřují na amplifikaci úseku mezi vložených konstruktem a vlastní genomovou DNA. Pomocí této metody lze rozlišit druhy transgenních organismů, které obsahují stejný genový konstrukt.

Sekvence jednotlivých amplifikačních primerů a amplifikační programy byly převzaty z metod validovaných EURL GMFF. Při zavádění nových PCR detekcí se provedlo z důvodu opakovatelnosti pět na sobě nezávislých PCR reakcí (amplifikací).

Vnitřní gen kukuřice

primery: IVRI-F, IVRI-R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	50	45
Annealing	68	110	
Extenze	72	120	
Závěrečná extenze	72	300	1

délka amplikonu: 226 bp

Promotor 35S

primery: 35s-cf3, 35s-cf4

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	58	40
Annealing	57,5	120	
Extenze	72	105	
Závěrečná extenze	72	180	1

délka amplikonu: 123 bp

Terminátor NOS

primery: NOS-1, NOS-3

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	58	40
Annealing	57,5	120	
Extenze	72	105	1
Závěrečná extenze	72	180	

délka amplikonu: 180 bp

nptII

primery: APH2 F, APH2 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	25	35
Annealing	60	30	
Extenze	72	45	
<u>Finální extenze</u>	<u>72</u>	<u>420</u>	<u>1</u>

délka amplikonu: 215bp

DAS40278

amplifikační primery: DAS-40278-9_5'-f1, DAS-40278-9_5'-r3

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a extenze	60	60	

délka amplikonu: 98bp

MON87460

amplifikační primery: MON 87460 primer 1, MON 87460 primer 2

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a extenze	60	60	

délka ampliconu: 82 bp

Provedení vlastní PCR reakce

Laminární box se vysvítí UV zářením po dobu (20 - 30) minut. Předměty v něm umístěné a jeho prostor se dekontaminují dekontaminačním roztokem. Připraví se pipety, sterilní špičky s filtrem, sterilní zkumavky, odpadní nádoba s vloženým sáčkem na použitý materiál, stojánky, apod.

Stanoví se počet reakcí (tj. počet vzorků, beztemplátová, negativní kontrola (použije-li se) a pozitivní kontrola). Dle tabulek reakčních směsí (Tabulka 1) se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Jednotlivé reagenty se uchovávají v mrazáku, proto se musí předem rozmrazit, buď při laboratorní teplotě, nebo v lednici. Rozpuštěné obsahy zkumavek se promíchají jejím převrácením nebo krátkým vortexováním a zcentrifugují se na minicentrifuze.

PCR směs se připravuje na ledu.

REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂

Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce (Tabulka 1). Reakční směs se důkladně, ale opatrně promíchá (obracení zkumavky, vortex) a rozdělí se po 22,5 µl do označených zkumavek. Poté se do zkumavek přidá 2,5 µl templátové DNA. Do beztemplátové kontroly se místo DNA přidá voda vhodná pro PCR.

Pipetuje se v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, negativní kontrola a nakonec pozitivní kontrola. Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo vypařování směsi během reakce. Zkumavky se promíchají mírným poklepem, zcentrifugují se na minicentrifuze, vloží se do termálního cykleru a zahájí se příslušná PCR amplifikace.

Tabulka 1. Složení reakční směsi REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

Složka	1 reakce (μl)
PCR voda	9
REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl ₂	12,5
Primer F	0,5
Primer R	0,5
Templát	2,5

Elektroforéza v agarózovém gelu

2% gel se vloží do elektroforetické vany a převrství pracovním 1 × TAE pufrém několik mm nad jeho povrch. Vzorky se nanesou do jamek gelu v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, negativní kontrola, elektroforetický marker, vzorky, elektroforetický markera pozitivní kontrola. Objem vzorku nanášeného do jedné jamky závisí na typu hřebínku a jeho potřebném množství. Amplifikáty získané pomocí kitu REDTaq se nanáší přímo z PCR zkumavek, protože obsahují nanášecí barvivo pro elektroforézu. Po nanesení kontrol a markerů do jamek v gelu se spustí elektroforéza. Doporučuje se nastavení zdroje (100 – 140) V, maximum mA, (30 – 60) min chodu. Tyto hodnoty lze měnit dle potřeby a pokynů v návodu pro použití elektroforetického zdroje. Rozdělení a uspořádání pruhů se sleduje prosvícením na transiluminátoru, vyfotografováním přenesením do počítače.

5. Výsledky a diskuze

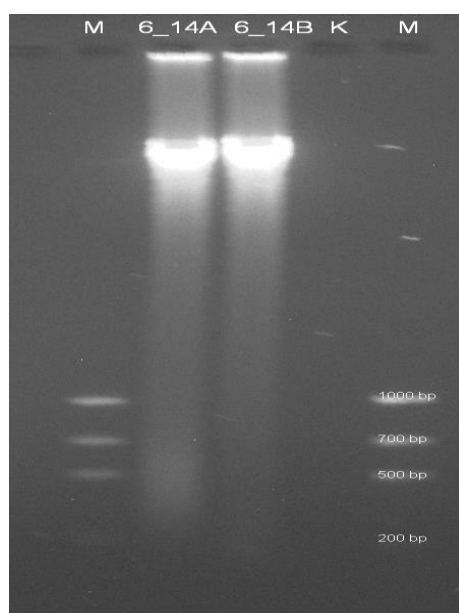
DAS40278

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

Tabulka 2. Naměřené koncentrace a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.

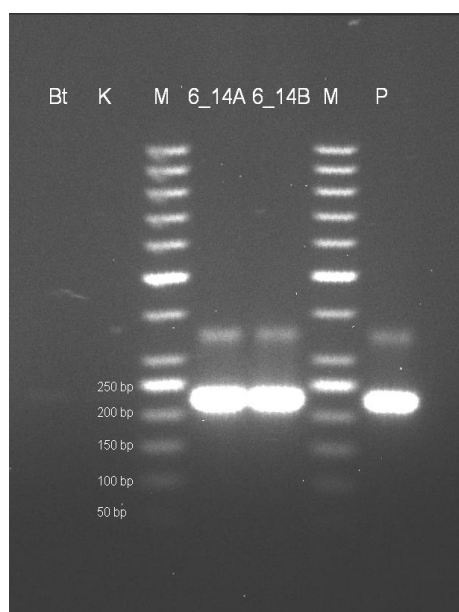
Vzorky	Koncentrace (ng/μl)	A 260/A 280	A 260/A 230
CRM 6/2014	105,20	1,89	2,18
CRM 6/2014	105,00	1,90	2,19

Určení kvality vyizolované DNA



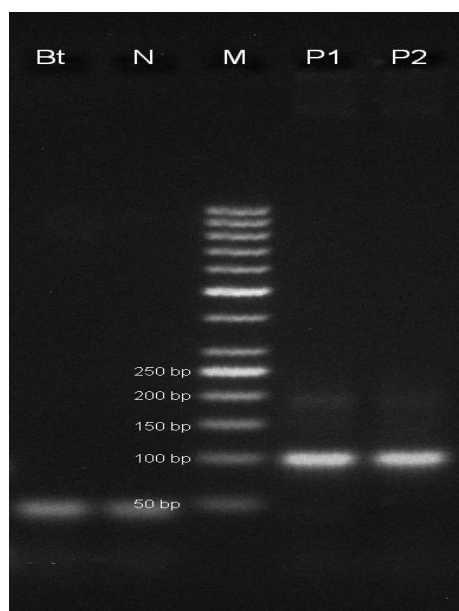
Obr. 5. Určení kvality vyizolované DNA pozitivní kontroly CRM 6/2014 (6_14), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.

Stanovení vnitřního genu kukuřice

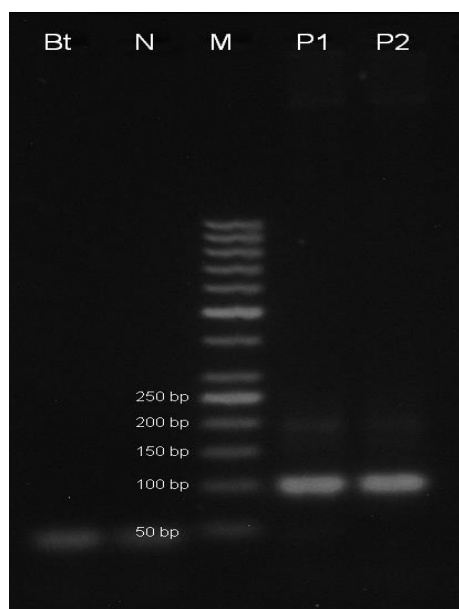


Obr. 6. Stanovení vnitřního genu kukuřice (226 bp) u pozitivní kontroly CRM 6/2014 (6_14A – koncentrace DNA 5 ng/μl, 6_14 B koncentrace DNA 10 ng/μl), Bt – beztemplátová kontrola, K – kontrola izolace, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 2/2009. Amplifikační kit REDTaq.

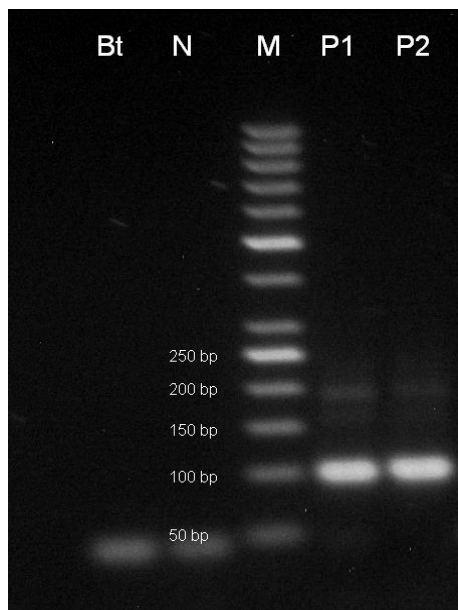
Stanovení transgenu DAS40278



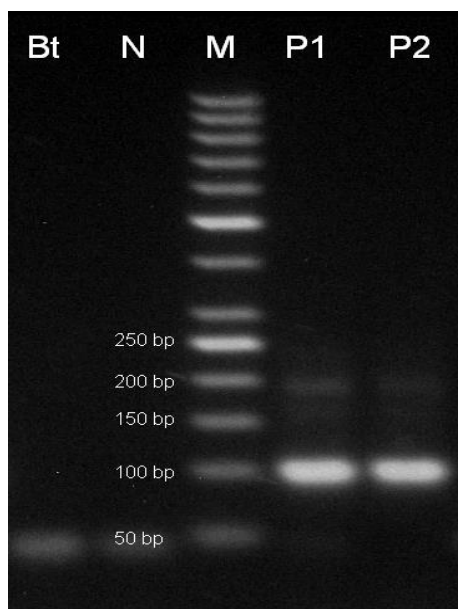
Obr. 7. Stanovení transgenu DAS40278 (98 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 6/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl (6_14A), P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl (6_14B). Amplifikační kit REDTaq.



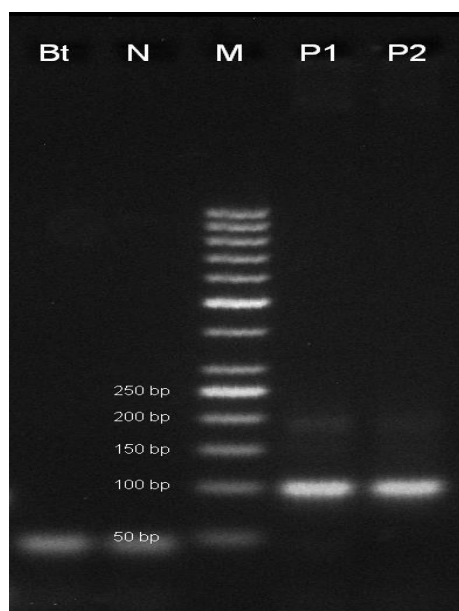
Obr. 8. Stanovení transgenu DAS40278 (98 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 6/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl (6_14A), P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl (6_14B). Amplifikační kit REDTaq.



Obr. 9. Stanovení transgenu DAS40278 (98 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 6/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl (6_14A), P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl (6_14B). Amplifikační kit REDTaq.



Obr. 10. Stanovení transgenu DAS40278 (98 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 6/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl (6_14A), P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl (6_14B). Amplifikační kit REDTaq.



Obr. 11. Stanovení transgenu DAS40278 (98 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 6/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl (6_14A), P2 – pozitivní kontrola CRM 6/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl (6_14B). Amplifikační kit REDTaq.

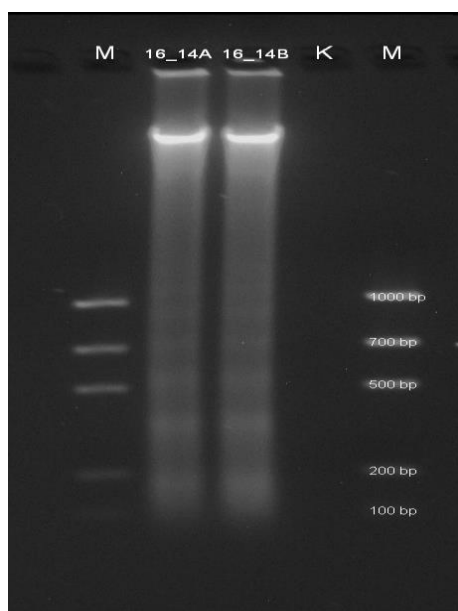
MON87460

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

Tabulka 3. Naměřené koncentrace a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.

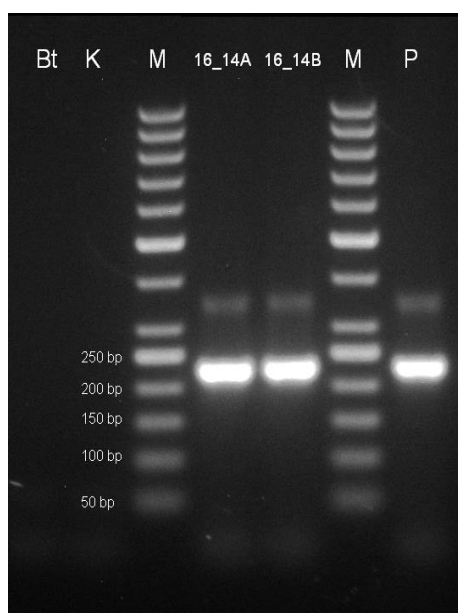
Vzorky	Koncentrace (ng/μl)	A 260/A 280	A 260/A 230
CRM 16/2014	88,50	1,86	2,16
CRM 16/2014	88,60	1,85	2,15

Určení kvality vyizolované DNA



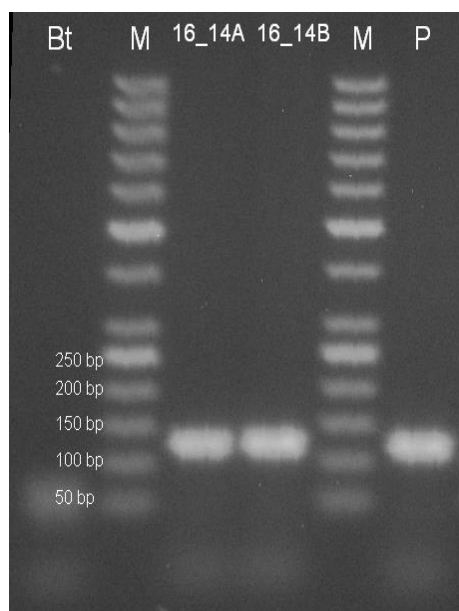
Obr. 12. Určení kvality vyizolované DNA pozitivní kontroly CRM 16/2014 (16_14), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.

Stanovení vnitřního genu kukuřice



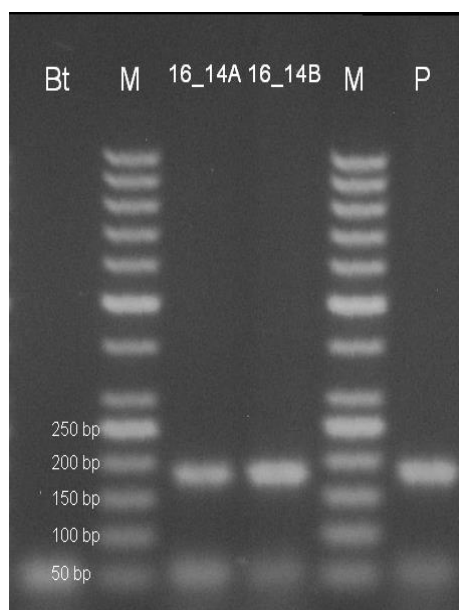
Obr. 13. Stanovení vnitřního genu kukuřice (226 bp) u pozitivní kontroly CRM 16/2014 (16_14 A – koncentrace DNA 5 ng/μl, 16_14B – koncentrace DNA 10 ng/μl), Bt – beztemplátová kontrola, K – kontrola izolace, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 2/2009. Amplifikační kit REDTaq.

Stanovení screeningového elementu promotoru 35S



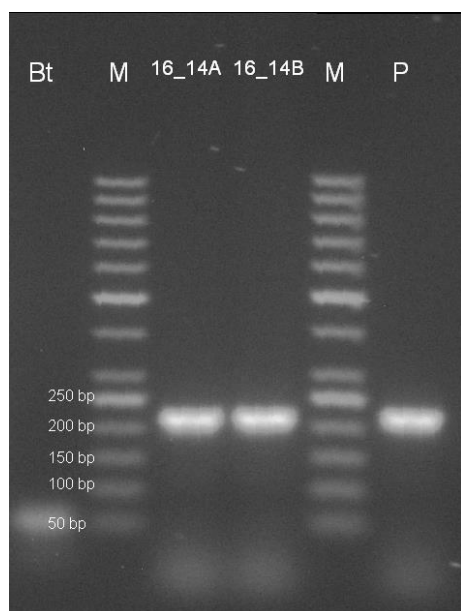
Obr. 14. Stanovení screeningového elementu promotoru 35S (123 bp) u pozitivní kontroly CRM 16/2014 (16_14 A – koncentrace DNA 5 ng/μl, 16_14B – koncentrace DNA 10 ng/μl), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 7/2013. Amplifikační kit REDTaq.

Stanovení screeningového elementu NOS



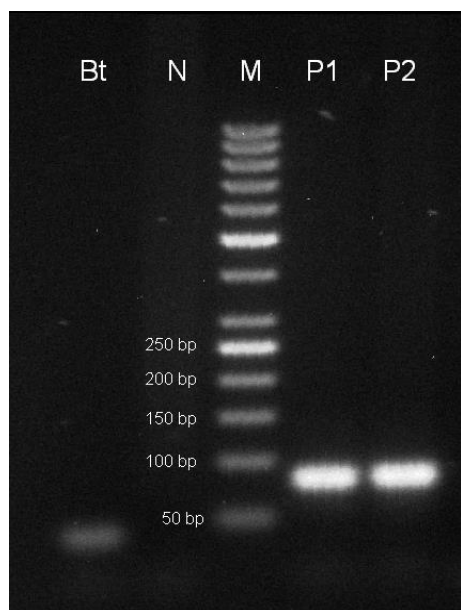
Obr. 15. Stanovení screeningového elementu terminátoru NOS (180 bp) u pozitivní kontroly CRM 16/2014 (16_14 A – koncentrace DNA 5 ng/μl, 16_14B – koncentrace DNA 10 ng/μl), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 1/2011. Amplifikační kit REDTaq.

Stanovení screeningového elementu nptII

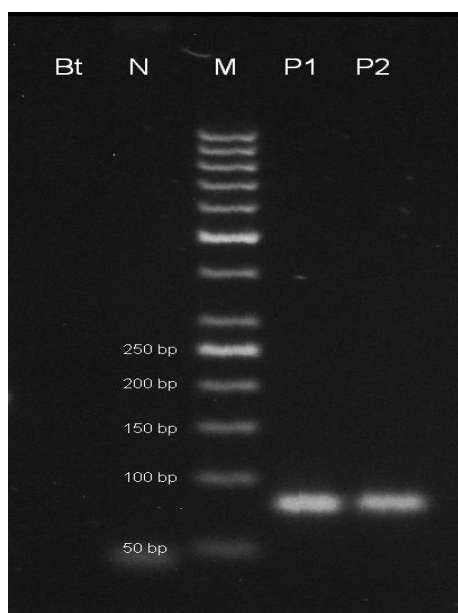


Obr. 16. Stanovení screeningového elementu nptII (215 bp) u pozitivní kontroly CRM 16/2014 (16_14 A – koncentrace DNA 5 ng/μl, 16_14B – koncentrace DNA 10 ng/μl), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 1/2011. Amplifikační kit REDTaq.

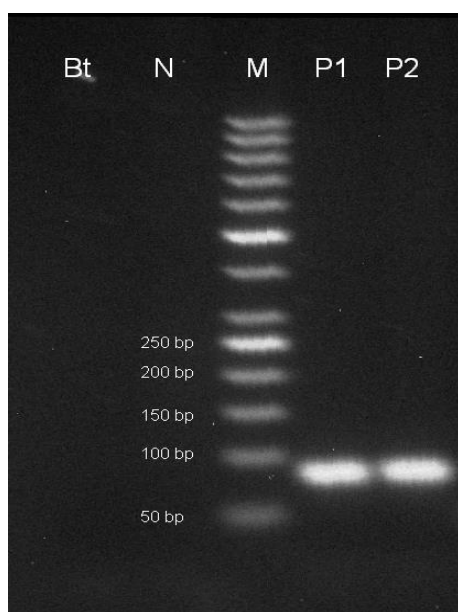
Stanovení transgenu MON87460



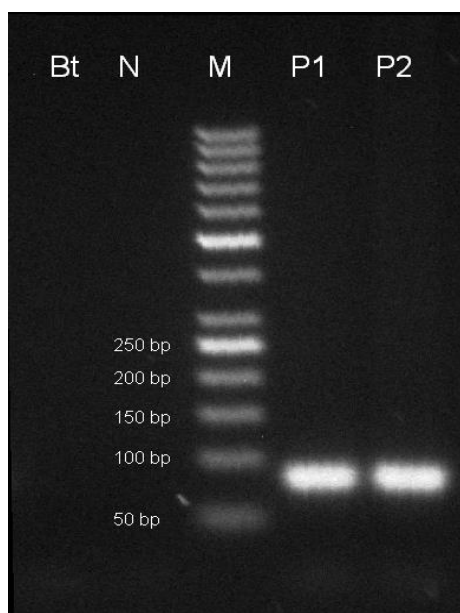
Obr. 17. Stanovení transgenu MON87460 (82 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 16/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl (16_14A), P2 – pozitivní kontrola CRM 16/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl (16_14B). Amplifikační kit REDTaq.



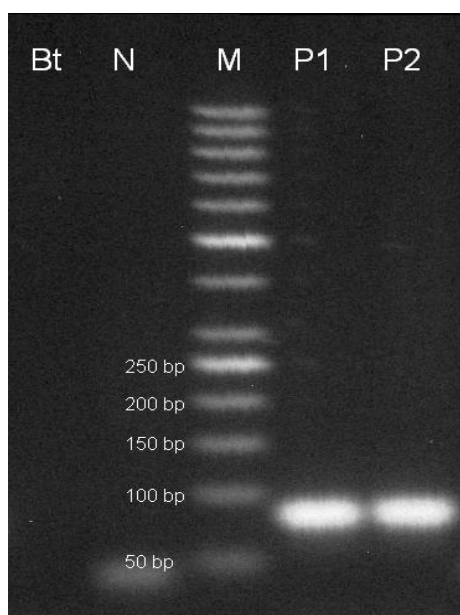
Obr. 18. Stanovení transgenu MON87460 (82 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 16/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl (16_14A), P2 – pozitivní kontrola CRM 16/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl (16_14B). Amplifikační kit REDTaq.



Obr. 19. Stanovení transgenu MON87460 (82 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 16/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl (16_14A), P2 – pozitivní kontrola CRM 16/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl (16_14B). Amplifikační kit REDTaq.



Obr. 20. Stanovení transgenu MON87460 (82 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 16/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl (16_14A), P2 – pozitivní kontrola CRM 16/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl (16_14B). Amplifikační kit REDTaq.



Obr. 21. Stanovení transgenu MON87460 (82 bp), Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 16/2014 s koncentrací DNA 5 ng/μl (16_14A), P2 – pozitivní kontrola CRM 16/2014 s koncentrací DNA 10 ng/μl (16_14B). Amplifikační kit REDTaq.

Během verifikace se postupovalo dle metody JPP (postup č. 10250.1) a metod validovaných EURL GMFF. Ve všech případech se zachovaly jednotlivé objemy a složky PCR reakce, sekvence primerů i amplifikační programy. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaný certifikovaný referenční materiál vykazuje pruhy v příslušném místě, jak u screeningu, tak při stanovení konkrétního transgenu. Některé z těchto pruhů mohou být na hranici viditelnosti (zejména v tištěné verzi, která má poněkud horší kvalitu oproti původním snímkům uloženým v počítači).

Detekovatelnost pruhů DNA je závislá na těchto faktorech:

- Koncentraci templátové DNA.
- Kvalitě templátové DNA, která závisí jak na způsobu izolace, tak na opakované rozmrazování a zmrazování alikvotů ve zkumavkách.
- Kvalitě amplifikačních primerů. Jejich kvalita je závislá na jejich ředění a opakovaném rozmrazování a zmrazování.
- Kvalitě gelu a provedení elektroforézy.

5 Závěr

Cílem vývojového úkolu bylo zavést metody pro detekci nových genetických modifikací u kukuřice, a to transgenů DAS40278 a MON87460 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OMB.

Tento úkol se podařilo splnit a laboratoř je schopna v současné době stanovit 18 geneticky modifikovaných odrůd kukuřice.

Tyto metody se zařadí do postupu zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv.

6 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postup 10250.1
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 Maize DAS40278-9 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2012
4. Event-Specific Method for the Quantification of Maize MON87460 Using Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, 2012
5. <http://en.biosafetyscanner.org>
6. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013, by Clive James, Chair, ISAAA International Service For the Acquisition of Agri-Biotech Applications, 2014

Stanovení chloristanů v hnojivech

Eva Fojtlová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

1 Úvod

Při úředních kontrolách kvality potravin v zemích Evropské unie byla zjištěna přítomnost reziduí chloristanů v potravinách. Zvýšený obsah chloristanů byl detekován zejména v zelenině a ovoci a ve výrobcích z nich vyráběných. Konzumace takových potravin může působit negativně na lidské zdraví. Jedním z možných zdrojů zvýšeného obsahu chloristanů v potravinách byl označen zvýšený výskyt chloristanů v půdách, kam mohou být zaneseny i minerálními hnojivy.

Chloristan je chemický kontaminant, který se vyskytuje v životním prostředí jak přirozeně (ložiska potaše a dusičnanů, formování v atmosféře), tak se do něj dostává vlivem průmyslové činnosti (výroba, používání a zneškodňování chloristanů, desinfekce chlornany atd.).

Jak již bylo uvedeno, chloristany se vyskytují v ložiscích dusičnanů, a proto mohou být také obsaženy v minerálních hnojivech přírodního původu. Známý případ výskytu je v ložiscích chilského ledku, který může obsahovat až 1,5 % chloristanů. Přesto, že výroba syntetických dusíkatých hnojiv vedla ke snížení používání chilského ledku jako hlavní složky minerálních hnojiv, výzkum ukázal, že hnojiva a komponenty hnojiv, která nejsou odvozena od chilského ledku, mohou také obsahovat stopy chloristanů. V roce 2013 bylo na území Německa odebráno 101 vzorků minerálních hnojiv, ve kterých byl stanoven obsah chloristanů. U 61 % vzorků nebyl obsah chloristanů detekován, respektive jeho obsah byl nižší, než byla mez stanovitelnosti použitých analytických metod (0,1 - 1 mg/kg). U zbývajících vzorků byl průměrný obsah 100 mg/kg, přičemž se koncentrace pohybovaly od meze stanovitelnosti až po 2 300 mg/kg. V roce 2014 byl proveden na evropském trhu další screening na přítomnost chloristanů v minerálních hnojivech. Bylo odebráno a analyzováno 192 vzorků a hodnoty obsahu chloristanů nepřekročily 100 mg/kg. Toto úzce souviselo s tím, že v prosinci r. 2013 přijalo Evropské sdružení výrobců krmiv doporučení, aby na evropském trhu byla obchodovatelná pouze taková hnojiva, která obsahují maximálně 100 mg chloristanů/kg.

Během provádění šetření bylo zjištěno, že neexistuje žádná validovaná analytická metoda na stanovení chloristanů v minerálních hnojivech, a tudíž vznikl požadavek na vytvoření

standardizované metody.

Cílem řešení tohoto úkolu je zavedení metody na stanovení obsahu chloristanů v minerálních hnojivech metodou iontové chromatografie za použití vodivostního detektoru (IC-CD).

2 Materiál a metody

K zavedení a ověření metody byly použity vzorky analyzované v rámci validační studie. Koncentrace chloristanů se v těchto vzorcích pohybovala v rozmezí od 0 mg/kg (respektive < MS) do 150 mg/kg. Podle provedené analýzy se jednalo o sírany, fosforečnany, dusičnany a jejich směsi.

Analýza vzorků byla prováděna na Iontovém chromatografu ICS 3000 od firmy Dionex.

Sestava tohoto chromatografu obsahuje následující moduly:

AS Autosampler AS40

DP isokratické a gradientové čerpadlo, mixer, degaser

DC termostatovaný prostor ve kterém jsou umístěny kolony, vodivostní detektor, ampérometrický detektor, supresor

EG eluent generátor (automaticky generuje mobilní fázi požadované kvality)

UV VIS detektor, typ AD 25

Vzorek hnojiva byl extrahován vodou. Z extraktu byly odstraněny nerozpuštěné částice filtrací a odstředováním. Chloristany byly separovány pomocí iontové chromatografie, kde jako stacionární fáze byl použit měnič aniontů a mobilní fáze byly vodné roztoky hydroxidu draselného, které byly připraveny pomocí eluent generátoru. K detekci byl použit vodivostní detektor v kombinaci se supresorem, který snižuje konduktivitu eluentu a zvyšuje tak citlivost měření. Chloristany byly identifikovány porovnáním jejich retenčního času s retenčním časem standardního roztoku. Kvantitativní vyhodnocování se provádělo pomocí externí kalibrace.

2.1 Chemikálie

2.1.1 Vysoce čistá demineralizovaná voda (dále jen demi voda) s měrným odporem minimálně 18,2 megaohmů, odplyněná

2.1.2 Základní standardní roztok o koncentraci 1 000 mg ClO_4^-/l .

Dodává se komerčně.

2.1.3 Pracovní roztok I. o koncentraci 100 mg ClO_4^-/l .

Příprava: 5 ml základního roztoku (2.1.2) se napipetuje do 50 ml odměrné baňky a doplní se demi vodou po značku.

2.1.4 Pracovní roztok II o koncentraci 10 mg ClO_4^-/l .

Příprava: 5 ml pracovního roztoku I (2.1.3) se napipetuje do 50 ml odměrné baňky a doplní se demi vodou po značku.

2.1.5. Pracovní roztok III o koncentraci 1 mg ClO_4^-/l .

Příprava: 5 ml pracovního roztoku I (2.1.4) se napipetuje do 50 ml odměrné baňky a doplní se demi vodou po značku.

2.2 Přístroje a pomůcky

2.2.1 Analytické váhy s přesností 0,0001 g

2.2.2 Iontový chromatograf ICS 3000 Dionex

2.2.3 Analytická kolona Dionex IonPac AS 16 (2x250 mm), předkolona Dionex IonPac AG 16(2x50 mm)

2.2.4 Laboratorní odstředivka

2.2.5 Automatické pipety

2.2.6 Zařízení pro membránovou filtraci s membránovými filtry o velikosti porů 0,45 μm

2.2.7 Jednorázové mikrofiltry s porozitou 0,22 μm

2.2.8 Zařízení pro přípravu vysoce čisté demineralizované vody-Millipore

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Úprava vzorku

Do 250 ml odměrné baňky se naváží 25 g vzorku, přidá se 150 ml demineralizované vody (2.1.1), baňka se promíchá, doplní vodou po rysku a opět promíchá. Roztok se dále ředí a to tak, aby koncentrace přítomného chloristanu byla v rozmezí kalibračního rozsahu a zároveň aby přítomnost ostatních aniontů nerušila stanovení.

Před nástřikem do iontového chromatografu se naředěvý roztok buď filtruje přes jednorázový membránový filtr (2.2.7) nebo se odstřeďuje (10 min, 10 000 g)

2.3.2 Měření na ICS 3000

Nastavení chromatografických podmínek

Nastavení se provádí podle hodnot uvedených v tabulce 1.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky

Kolona	Dionex IonPacAS16(2x250 mm)
Předkolona	Dionex IonPacAG16(2x50 mm)
Eluent	40 mM KOH
Průtok eluentu	0,300 ml/min
Detekce	Vodivostní detektor
Supresor	AERS 500, 2mm, Dionex Recycle mode
Objem nástřiku	10 ul
Teplota na koloně	30°C

Kalibrace

Připraví se kalibračních roztoky o koncentraci 0,03 – 0,05 - 0,1 – 0,3 – 0,5 – 0,7 – 1,0 mg ClO₄⁻/l. Do řady odměrných baněk o objemu 100 ml se napipetuje 3 ml pracovního roztoku III (2.1.5), 0,5 – 3 – 5 – 7 – 10 ml pracovního roztoku II (2.1.4). Baňky se doplní demi vodou po rysku a dobře se promíchají. Kalibrační roztoky se připravují v den použití.

Po nastavení chromatografických podmínek a ustálení chodu iontového chromatografu se proměří kalibrační roztoky.

Ze získaných dat se sestojí kalibrační křivka . Pro kvantitativní vyhodnocení se používá její lineární část.

Měření vzorku

Po provedení kalibrace přístroje se změří za stejných podmínek vzorek.

Chloristany se identifikují porovnáním retenčních časů v roztoku standardu a roztoku vzorku.

Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnějšího standardu.

Jestliže koncentrace aniontu v analyzovaném vzorku přesáhne koncentrační rozsah kalibrace, vzorek se naředí. Je možno postupovat také tak, že se provede kalibrace s vyšším koncentračním rozsahem, pokud to výměnná kapacita kolony dovolí, a vzorek se znovu analyzuje.

Vodní extrakty minerálních hnojiv obsahují vysoké koncentrace aniontů (chloridy, sírany, fosforečnany, dusičnany) které mohou stanovení rušit, a proto je vždy nutno hledat optimální ředění. V případech kdy vzorek nelze uspokojivě naředit, to znamená tak , aby se eliminoval vliv matrice a zároveň neklesl obsah chloristanů pod mez stanovitelnosti, je nutno pro kvantifikaci použít metodu standardního přídávku.

2.3.3 Výpočet a vyjadřování výsledků

Hmotnostní koncentrace chloristanu v roztoku se vypočte z plochy jeho píku pomocí kalibrační funkce. Pro výpočet se využívá software přístroje.

Obsah chloristanu v minerálním hnojivu se vyjadřuje v mg/kg a vypočte se podle vztahu:

$$X = C \cdot D \cdot V \cdot 1000 / m$$

X je koncentrace chloristanu v mg/kg

C je koncentrace chloristanu v roztoku v mg/l

D je ředící faktor

V je objem roztoku vzorku v l

m je hmotnost vzorku v g

2.4 Diskuse a výsledky

Výše popsaná metoda na stanovení chloristanů v hnojivech vychází z metody, která byla navržena pracovní skupinou CEN/TC 260/WG 7 v roce 2015, kdy pořádala kruhový test na toto stanovení. Před samotným KT probíhala mezi přihlášenými účastníky a organizátory diskuse k navrhované metodě, které jsme se také zúčastnili.

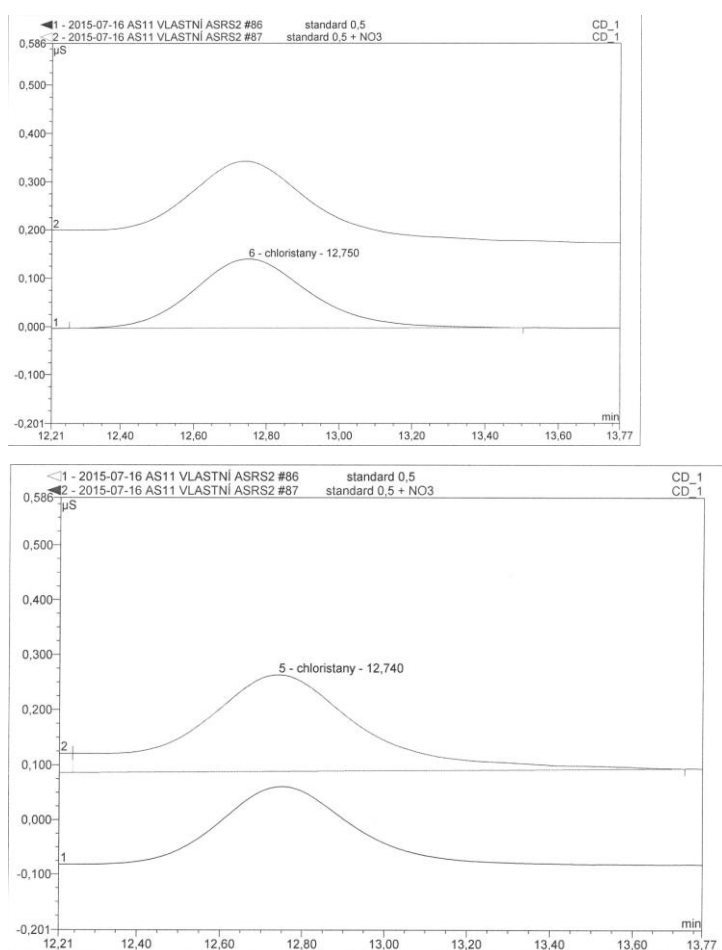
Metoda byla navržena pouze obecně, výběr analytické kolony i nastavení chromatografických podmínek bylo ponecháno na účastnících KT.

Nejvíce diskutovaným problémem byla příprava kalibračních roztoků, a to zda mají být standardy ředěny vodou nebo se má jednat o roztoky, které se budou svým složením co nejvíce podobat roztokům vzorků. Roztoky minerálních hnojiv obsahují velké koncentrace aniontů (chloridy, dusičnany, sírany, fosforečnany), které mohou stanovení chloristanů rušit.

Byly vzneseny návrhy, aby kalibrační roztoky obsahovaly srovnatelné koncentrace ostatních aniontů tak, jak jsou přítomny v samotných vzorcích. To by ovšem znamenalo provádět kalibraci pro každý jednotlivý vzorek samostatně, protože koncentrace aniontů přítomná v jednotlivých vzorcích je různá. V běžné laboratorní praxi toto nelze provádět, nehledě na to, že ve většině případů je složení vzorku pro analytika neznámé. Bylo proto navrženo, aby přítomnost aniontů ve vzorku byla v jednotlivých kalibračních roztocích jednotně simulována přidávkou 5g KNO₃/l.

V předvalidačním měření jsme měli k dispozici vzorek neznámého složení se známou koncentrací chloristanů. Analyzovali jsme tento vzorek s tím, že jsme kalibraci prováděli

jednak pomocí vodných roztoků chloristanu a jednak pomocí roztoků chloristanu s přidavkem 5g KNO₃/l. Na obr.1 jsou znázorněny chromatogramy kalibračního roztoku o koncentraci 0,5 mg CLO₄/l bez (křivka 1) a s přidavkem KNO₃ (křivka 2). Z porovnání chromatogramů to je retenčních časů a tvaru píků je patrné, že přidavek dusičnanu nemá vliv na tvar píku ani na retenční čas chloristanů. Vysoká koncentrace dusičnanu naopak způsobuje, že pík chloristanu nevychází z nulové linie, ale nachází se v klesající části píku dusičnanu. Tatáž situace nastala, pokud jsme do kalibračních roztoků místo dusičnanu přidali ve stejné koncentraci síran nebo fosforečnan. Pro všechna následující měření jsme proto připravovali kalibrační roztoky ředěné pouze vodou



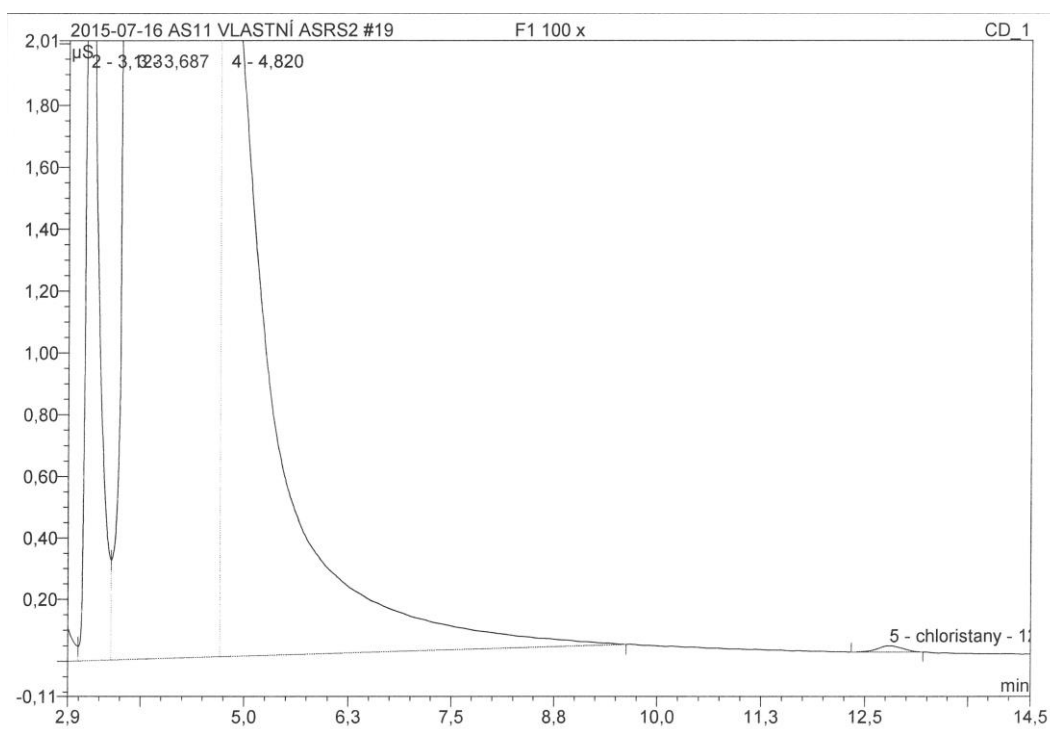
Obr. 1. Externí kalibrace –porovnání 0,5 mg CLO₄/l ve vodě a 0,5 mg CLO₄/l v roztoku 5g KNO₃/l

Výše uvedenou metodou bylo analyzováno pět vzorků, které laboratoř obdržela od organizátorů validační studie. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky, u vzorku č.5 nebyl pík chloristanu detekován.

Tabulka 2. Výsledky měření - validační studie pro CEN 260/WG 7.

Vzorek	Ředění	1.stanovení	2.stanovení	3.stanovení
		mg/kg	mg/kg	mg/kg
F1	100x	68,9	66,9	66,5
F2	200x	146	153	148
F3	50x	35,4	31,9	33,3
F4	40x	17,4	16,4	17,1
F5		< MS	< MS	< MS

Na obr. 2. je uveden příklad chromatogramu zkušebního vzorku 1.



Obr. 2. Chromatogram vzorku F1, ředění 100x.

Z naměřených dat byla pomocí Effi Validation stanovena mez stanovitelnosti a opakovatelnost .

Mez stanovitelnosti byla vypočtena ze signálu slepého pokusu a je 0,037 mg/l respektive 14,8 mg/kg pro čtyřicetinasobné ředění roztoku vzorku.

Tabulka 3: Mez stanovitelnosti

 your validation software	ANALYTICKÁ METODA: M0001 - Material - DEMO project - Method Used - 5.			
	VALIDACE: Plná validace			
	PARAMETR: Meze: ze signálu slepého pokusu v chromatografii			
	VALIDOVANÁ VLASTNOST: -			
VYHODNOCENÍ:				
Měření na mezi detekce	Měření na mezi stanovitelnosti	Validovaná vlastnost na mezi detekce	Validovaná vlastnost na mezi stanovitelnosti	
0,003	0,01	0,01103	0,03678	
Závěr: Mez det./stanovit. je 0,003 resp. 0,01. Val.vlastnosti na mezi det./stanovit. je 0,01103 resp. 0,03678.				

Opakovatelnost byla vypočtena po úrovních z vícenásobného měření

Tabulka 4. Opakovatelnost – naměřená data a vyhodnocení.

EffiChem

your validation software

ANALYTICKÁ METODA: M0001 - Material - DEMO project - Method Used - 5.

VALIDACE: Plná validace

PARAMETR: Opakovatelnost: po úrovních z vícenásobného měření

VALIDOVANÁ VLASTNOST: Analyte 1

Jednotky: mg

DATA:

Úroveň	Popis	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6	Měření 7	Měření 8	Měření 9	Měření 10
1	F1	65,6	65,9	75,3	66,5	70,1	64,9				
2	F4	17,6	15,6	19,3	15,9	17,4	17,1				
3	F3	38,5	33,3	32	37,5	35,4	33,3				
4	F2	146	153	148	149	152	154				

EffiChem

our validation software

ANALYTICKÁ METODA: M0001 - Material - DEMO project - Method Used - 5.

VALIDACE: Plná validace

PARAMETR: Opakovatelnost: po úrovních z vícenásobného měření

VALIDOVANÁ VLASTNOST: Analyte 1

VYHODNOCENÍ:

Úroveň	Popis	Průměr	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
1	F1	68,05	3,99287	5,86755	6
2	F4	17,15	1,33079	7,7597	6
3	F3	35	2,58612	7,38891	6
4	F2	150,33333	3,14113	2,08944	6

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 2,92697 jednotek, tj. 6,20 %.

Správnost metody byla ověřena účastí ve validační studii, kde byly naše výsledky označeny jako správné.

3 Závěr

V rámci řešení výzkumného úkolu byla v naší laboratoři prováděna metoda na stanovení chloristanů v minerálních hnojivech metodou iontové chromatografie.

Stanovení se provádí podle výše popsaných postupů za pomoci definovaného přístrojového vybavení a analytické kolony.

Literatura

1. Draft prEN 17246: Fertilizers – Determination of perchlorate in mineral fertilizers by ion chromatography and conductivity detection (IC-CD)
2. Product manual Dionex Ionpac AG16-HC a Dionex Ionpac AS16-HC
3. EFSA Scientific Opinion, 26.5.2015
4. Doporučení komise(EU)2015/682 o monitorování chloristanů v potravinách

Stanovení huminových látek

Alena Žalmanová, Václav Rypl, Radomila Turnvaldová

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

1 Souhrn

Byl ověřován způsob extrakce, dělení a gravimetrického stanovení huminových kyselin a fulvokyselin pro potřeby stanovení huminových látek v hnojivech podle připravované normy CD19822.

2 Úvod

Huminové látky mají nezastupitelnou úlohu ve vztahu k úrodnosti půd. Vzhledem k neustálému úbytku organické složky půd a nutnosti tento deficit eliminovat, objevují se na trhu stále častěji výrobky obohacené organickými látkami huminové povahy. Aby bylo možné rozlišit hnojiva s organickou složkou nehumínové povahy, je třeba mít ověřenou metodu, pomocí které by bylo možné stanovit pouze obsah huminových látek.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

3.1.1 Voda deionizovaná.

3.1.2 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná, $\rho(\text{HCl}) = 1,19 \text{ g.ml}^{-1}$.

3.1.3 Kyselina chlorovodíková, zředěná $c(\text{HCl}) \approx 6 \text{ mol.l}^{-1}$.

3.1.4 Kyselina chlorovodíková, zředěná $c(\text{HCl}) \approx 1 \text{ mol.l}^{-1}$.

3.1.5 Kyselina chlorovodíková, zředěná $c(\text{HCl}) \approx 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$.

3.1.6 Hydroxid sodný, NaOH, perly

3.1.7 Hydroxid sodný, roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol.l}^{-1}$.

3.1.8 Hydroxid sodný, roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$.

3.1.9 Hydrofobní pryskyřice DAX-8. Sulpeco, USA.

3.1.10 Katex AMBERLITE IR 120, H^+ forma. Sulpeco, USA.

3.1.11 Základní standard síry $c(S) = 10 \text{ g/l}$ od Analytica s.r.o

3.2 Přístroje a pomůcky

3.2.1 Analytické váhy s přesností 0,0001 g; Sartorius A 200

3.2.2 Sušárna s regulovatelnou teplotou, přesnost $\pm 3^\circ\text{C}$; KBC G-100/250

3.2.3 pH metr s kombinovanou skleněnou elektrodou a teplotním čidlem; pH-metr 526

WTW

3.2.4 Konduktometr s Pt-elektrodou; Konduktometrino-Lab Cond 7310

3.2.5 UV VIS spektrofotometr; Helios α Thermo-Spectronic

3.2.6 Peristaltické čerpadlo s regulací průtoku; ISA, Instruments s.a.

3.2.7 Muflová pec s teplotní regulací; LAC L09/11

3.2.8 Vakuová rotační odparka; LABOROTA 4003 s vývěvou ROTAVAC Senso.

3.2.9 Centrifuga, minimální relativní centrifugační síla $rcf = 3900 \times g$ včetně centrifugačních kyvet; SIGMA 2-16K

3.2.10 Elektromagnetická míchačka, magnetické míchadlo o délce (5 – 8) cm; MM 2A

Labor. přístroje Praha

3.2.11 Achátový třecí mlýnek, Pulverisette Fritsch

3.2.12 Exikátor se silikagelem.

3.2.13 Skleněné chromatografické kolony:

a) průměr 40 mm a délka 250 mm pro pryskyřici DAX-8.

b) průměr 50 mm a délka 600 mm pro katex AMBERLITE IR 120.

3.2.14 Erlenmayerovy baňky, 1000 ml, 2000 ml.

3.2.15 Keramické spalovací kelímky.

3.2.16 Parafilm.

3.2.17 ICP OES Spectro Arcos

3.3 Materiál a metody

3.3.1 Vzorky hnojiv

Pro potřeby VÚ byly použity vzorky uvedené v tabulce 1.

Tabulka č. 1 Přehled použitých hnojiv

Lims	Č. vz.	Materiál
2016	611	Ligno Aktivátor roztok
2016	612	Ligno Aktivátor prášek
2016	518	QCM1.1. huminové kyseliny - z kruhového testu
2016	673	2-DD_Humát draselný z Leonarditu (DE)
2016	674	3-CS Humát sodný (ČR)
2016	675	5-H.35,34-Humát sodný, oxidovaný lignosulfonát, (ČR)
2016	676	7-DF-Fulvokyseliny z ligninu (DE)
2016	677	9-LH-Lignohumát z lignosulfonátu (RU)
2016	678	Lignosulfát - EGT
2017	96	L1 - ISO CD 19822 study
2017	97	L2 - ISO CD 19822 study (516/2016)
2017	98	L3 - ISO CD 19822 study (517/2016)
2017	99	Fortehum, pomocný rostlinný přípravek
2017	100	HUMIX, kapalné hnojivo pro muškáty
2016	479	HARMONIE Stimulátor zakořeňování s aktivním stříbrem (DURST, AgroBio Opava)
2017	101	Fulvohumate (233/2015)
2017	102	Fulvohum Plus - Energen
2017	103	Fruktus Plus, Energen
2017	105	1 - DS Humát sodný z Leonarditu
2017	106	4 - CD - Humát draselný
2017	107	6 - ME Melasa
2017	108	8 - IM Směs humátů, TS Impuls

3.3.2 Pracovní postup

Při stanovení huminových kyselin (HA) a hydrofobních fulvokyselin (HFA) se vycházelo z připravované normy ISO/CD 19822. Před začátkem vlastního validačního testu proběhlo odzkoušení metody všemi zúčastněnými laboratořemi a na základě jejich připomínek byl postup upraven. Lze ho rozdělit do několika hlavních částí.

3.3.2.1 Příprava vzorků k analýze

Vzorky pevných hnojiv se upravují na achátovém mlýnku a použije se důkladně homogenizovaný podíl prosátý přes síto s oky 0,074 mm. Vzorky kapalných hnojiv se před použitím homogenizují promícháváním po dobu 1 minuty.

3.3.2.2 Extrakce

3.3.2.2.1 Příprava extraktu z pevného vzorku

Do 1000ml Erlenmayerovy baňky se s přesností 0,0001 g naváží ~ 2,5 g pevného vzorku a za stálého promíchávání se přidá 1000 ml roztoku NaOH (3.1.7). Suspenze se důkladně promíchává po dobu (16 – 18) h při (300 – 400) ot.min⁻¹. Zároveň se stanoví sušina pevného vzorku v navážce $5 \pm 0,0001$ g vysušeného při teplotě (65 ± 3) °C po dobu 24 hodin. Hodnota sušiny se použije pro přepočet navážky původního vzorku k analýze HA a HFA na sušinu.

3.3.2.2.2 Příprava extraktu z kapalného vzorku

Do 1000ml Erlenmayerovy baňky se s přesností 0,0001 g naváží ~ 2,5 g kapalného vzorku a za stálého promíchávání se přidá 1000 ml roztoku NaOH (3.1.7). Suspenze se důkladně promíchává po dobu 1 h při (300 – 400) ot.min⁻¹.

3.3.2.2.3 Odstranění nerozpustného podílu z extraktu

Nerozpustný podíl se z extraktů (3.3.2.2.1 a 3.3.2.2.2) odstraní odstředěním (20 – 30) min při relativní centrifugační síle $rcf = 3900 \times g$.

3.3.2.3 Separace huminových kyselin

K čistým extraktům (3.3.2.2.3) se za stálého promíchávání přidává roztok HCl (3.1.3)

až do dosažení hodnoty $\text{pH} = 1,0 \pm 0,1$. Po 1 hodině promíchávání se ověří stabilita hodnoty pH , případně se upraví pomocí roztoků NaOH (3.1.8) nebo HCl (3.1.3) na výslednou hodnotu $\text{pH} 1,0 \pm 0,05$. Roztok se pak ponechá v klidu po dobu $4 \frac{1}{2}$ hodiny, kdy vznikající sraženina huminových kyselin klesá ke dnu baňky. Čirý roztok nad usazenou sraženinou se dekantuje do čisté 1000ml Erlenmayerovy baňky. Zbytek sraženiny HA se oddělí od roztoku HFA 30 min odstředěním při $\text{rcf} = 1500 \times \text{g}$. Sraženina HA, shromážděná v předsušených při $(65 \pm 3) ^\circ\text{C}$ a předem zvážených s přesností 0,0001 g centrifugačních 50ml kyvetách, se použije ke stanovení obsahu HA gravimetricky.

3.3.2.4 Separace, protonizace a zakoncentrování fulvokyselin HFA

Fulvokyseliny obsažené v roztoku se od ostatních rozpustných organických a anorganických sloučenin oddělují selektivní adsorpcí na hydrofobní pryskyřici DAX-8. Roztok HFA se dávkuje do kolony pomocí peristaltického čerpadla rychlostí $(4 - 5) \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Jakmile celý objem roztoku HFA proteče kolonou, sloupec pryskyřice se promyje vodou. Promývání se ukončí, když se dosáhne absorbance $< 0,015$ při 350 nm nebo po průtoku dvou kolonových objemů. Následuje proces desorbce fulvokyselin (HFA) roztokem NaOH (3.1.7). Proces eluce se ukončí po dosažení absorbance $< 0,030$ při 350 nm nebo po průtoku přibližně tří kolonových objemů. Z tohoto roztoku se odebere asi 10 ml vzorku pro stanovení síry na ICP OES. Zbylý roztok se nechá protékat 2- 3 krát přes katex. Tím se odstraní sodíkové ionty a po promytí katexu 500 ml vody se získaný celkový objem roztoku fulvokyselin zakoncentruje pomocí vakuové rotační odparky při teplotě $(55 \pm 2) ^\circ\text{C}$ na přibližně 30 ml. Zakoncentrovaný objem HFA se kvantitativně převádí do předžíhaného při $(500 \pm 5) ^\circ\text{C}$ a zváženého s přesností 0,0001 g keramického kelímku pro gravimetrické stanovení obsahu HFA.

3.3.2.5 Stanovení obsahu HA a HFA gravimetricky

Centrifugační zkušavky se sraženinou HA (3.3.2.3) a keramické kelímky s roztokem HFA (3.3.2.4) se v sušárně při $(65 \pm 3) ^\circ\text{C}$ vysuší do konstantní hmotnosti. Po ochlazení v exikátoru se stanoví celková hmotnost extrahovaných frakcí HA a HFA.

3.3.2.6 Stanovení popela HA a HFA

Ve vysušených HA a HFA se stanoví obsah popela po spalování v muflové peci 2 h při $(500 \pm 5) ^\circ\text{C}$.

3.3.2.7 Stanovení obsahu síry

V extraktu HFA po eluci z DAX-8 (3.3.2.4) se stanoví síra pomocí ICP OES. Kalibrační křivka se připraví ze základního standardu (3.1.11) pomocí postupného ředění. Jednotlivé body jsou 0; 1; 5; 10; 50; 100 mg.l⁻¹ v 0,1 mol.l⁻¹ NaOH (3.1.7.)

Podmínky měření: vlnová délka 182,034 nm, plasma power 1450 W, coolant flow 14 l.min⁻¹, auxiliary flow 1 l.min⁻¹, nebulizer flow 0,75 l.min⁻¹, add. flow 0,3 l.min⁻¹, průtok vzorku 2 ml.min⁻¹.

3.3.2.8 Regenerace pryskyřice DAX-8 a katexu AMBERLITE IR 120

Po použití se sorpční schopnosti pryskyřice a katexu obnoví podle doporučení výrobce.

3.4 Výsledky a diskuse

3.4.1 Optimalizace metody

Naše laboratoř se podílela na optimalizaci této metody pro připravovaný standard CD19822. Pro tuto práci byly dodány vzorky 518, 97, 98.

V procesu optimalizace metody byly diskutovány různé navážky kapalných vzorků (3.3.2.2.2). U vzorků s nízkým obsahem hydrofobních fulvokyselin (HFA) je možné použít až 10 g vzorku.

Oproti původnímu návrhu normy byla prodloužena extrakční doba pevných vzorků z původně navržených 6 h na (16 – 18) h, nicméně extrakční doba 6 h je pro většinu vzorků dostačující.

Pro některé vzorky bylo nutné prodloužit dobu potřebnou pro odstředění z (5 – 10) min na (25 – 30) min. Po uplynutí této doby došlo k úplnému oddělení pevné a kapalné fáze.

Další problém představuje oddělení HA od HFA po okyselení roztoku (3.3.2.3). Norma doporučuje striktně dodržet dobu 4 ½ hodiny, aby nedocházelo při jejím prodlužování ke kvantitativním změnám ve frakcích HA a HFA. Při dodržení této doby se u žádného ze sledovaných vzorků nepodařilo dekantovat čirý roztok fulvokyselin (norma uvádí, že je možná dekantace až 900 ml z celkových 1000ml extraktu). Sraženinu HA musela laboratoř oddělovat odstřeďováním celého objemu extraktu, což významně prodlužovalo dobu analýzy. Alternativně je vhodnější okyselený roztok umístit v uzavřené baňce do lednice a ponechat HA koagulovat v chladu a temnu přes noc. Následující den je pak možné dekantací oddělit (600 – 850) ml čirého roztoku fulvokyselin. Zjištěné obsahy HA a HFA

se v obou případech významně neliší.

V počáteční fázi sorpce HFA na pryskyřici DAX-8 (3.3.2.4) laboratoř využívala peristaltické čerpadlo, s nastavením rychlosti průtoku ($4 - 5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$). Po několika minutách bylo možné peristaltické čerpadlo vypnout a pomocí svorky na odtokové hadičce z kolony regulovat rychlost průtoku na $(10 - 12) \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Pro kvantitativní sorpci HFA je dostačující kolonový objem $(150 - 200) \text{ ml}$ i při zvýšené rychlosti dávkování vzorku. Po ukončení sorpce se DAX-8 promyl vodou o objemu asi 300 ml , to odpovídá asi dvěma kolonovým objemům. Při překročení tohoto množství jsme pozorovali opětovné zvyšování absorpce vytékajícího roztoku, indikující desorpci HFA, což vede k nižší výtěžnosti metody.

Desorpce HFA byla prováděna roztokem NaOH (3.1.7) o objemu 500 ml , což odpovídá $2 - 3$ kolonovým objemům. Po protečení 500 ml roztoku NaOH bylo ve všech případech dosaženo absorpce vytékajícího roztoku $< 0,030$ a tím úplné desorpce HFA.

Kolonu s pryskyřicí DAX-8 je nutné po použití důkladně vypláchnout nejprve vodou a následně HCl (3.1.5). V rámci procesu promývání byla pryskyřice i zkypřena. Zkypření je nutné, aby se zamezilo vzniku kanálků v pryskyřici a tím předešlo nerovnoměrné adsorpci analytu. Používal se roztok HCl (3.1.5), který se pomocí peristaltické pumpy dávkoval rychlostí $4-5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ v opačném směru tzn. do spodní části kolony. Proces kypření probíhal zvolna, v mírném proudu kyseliny, bez výrazného oddělování vrstev pryskyřice v koloně. Pryskyřice nesmí obsahovat bubliny vzduchu a vrstva kapaliny nad hladinou pryskyřice se udržuje v rozmezí $3-4 \text{ cm}$. Kyselina HCl se z DAX-8 následně vymyla vodou.

Proces protonizace HFA na iontoměničové koloně je možné ukončit po dosažení hodnoty vodivosti $< 120 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ nebo po dosažení neutrálního pH. K tomu je možné použít pH-metr nebo pH-indikátorové papírky.

Při regeneraci katexu se jeho objem v koloně zkypřil, tak že se zcela vodou naplněná a uzavřená kolona několikrát otočila o 180° . Odpustil se přebytečný obsah vody tak, aby nad hladinou katexu zůstaly asi $3-4 \text{ mm}$ kapaliny. Katex se následně regeneroval přibližně 2000 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.1.4) a pak se promyl vodou do neutrálního pH.

3.4.2 Výsledky z mezinárodního mezilaboratorního testu

Optimalizovaná metoda byla ověřena pomocí mezilaboratorního testu.

Celkové výsledky pro vzorek 518

SD	6.38
Mean Std Error	0.70
Mean	58.63
- 1 SD	52.25
+ 1 SD	65.02
CV	10.9%
n	82

Obrázek č. 1 HA

HA

58.47	57.69
59.09	57.88
59.12	57.88
59.48	58.24

Obrázek č. 2 Hodnoty naměřené v naší laboratoři v %

SD	1.43
Mean Std Error	0.19
Mean	2.78
- 1 SD	1.36
+ 1 SD	4.21
CV	51.3%
n	57

Obrázek č. 3 HFA

HFA

4.17	3.02
4.18	2.73
4.25	3.13
4.44	3.01

Obrázek č. 4 Hodnoty naměřené v naší laboratoři v %.

HA

SD	0.62
Mean SE	0.11
m	5.91
- 1 SD	5.29
+ 1 SD	6.52
CV	10.5%
n	31

Obrázek č. 5 Celkové výsledky pro vzorek 97.

HA

6.24
6.47
6.05
6.30

Obrázek č. 6 Hodnoty naměřené v naší laboratoři v %

SD	0.29
Mean SE	0.06
m	0.69
- 1 SD	0.41
+ 1 SD	0.98
CV	42%
n	23

Obrázek č. 7 HFA

HFA

0.91
0.70
0.53
0.55

Obrázek č. 8 Hodnoty naměřené v naší laboratoři v %

HA

SD	0.70
Mean SE	0.14
m	9.20
- 1 SD	8.50
+ 1 SD	9.90
CV	8%
n	26

Obrázek č. 9 Celkové výsledky pro vzorek 98

HA

9.81
9.92
9.49
9.44

Obrázek č. 10 Hodnoty naměřené v naší laboratoři v %

SD	0.60
Mean SE	0.11
m	1.46
- 1 SD	0.86
+ 1 SD	2.05
CV	40.9%
n	28

Obrázek č. 11 HFA.

HFA

1.25
1.28
1.60
1.56

Obrázek č. 12 Hodnoty naměřené v naší laboratoři v %.

Z výsledků je patrné, že metoda poskytuje reprodukovatelné výsledky s přijatelným rozptylem. Naše výsledky se většinou pohybují v intervalu jedné směrodatné odchylky a je možné je tedy považovat za spolehlivé.

Meze stanovitelnosti pro HA i HFA jsme odhadli na 0,5 %.

HA

Opakovatelnost byla vypočtena pomocí programu EffiValidation krokem Opakovatelnost z paraleních měření. Hodnota pro opakovatelnost je 0,2107 %, což odpovídá relativní opakovatelnosti 0,9401 %. Praktickou hodnotu relativní opakovatelnosti jsme zvolili 5 %.

HA

Nejistota byla vypočtena pomocí programu EffiValidation krokem Nejistoty z přesnosti – paralelní měření k dispozici. Hodnota relativní rozšířené nejistoty je 1,843 % při faktoru pokrytí 1,96. Praktickou hodnotu relativní rozšířené nejistoty jsme zvolili 10 %.

HFA

Opakovatelnost byla vypočtena pomocí programu EffiValidation krokem Opakovatelnost z paraleních měření. Získali jsme hodnotu pro opakovatelnost 0,4622 %, což odpovídá relativní opakovatelnosti 7,846 %. Praktickou hodnotu relativní opakovatelnosti jsme zvolili 15 %.

HFA

Nejistota byla vypočtena pomocí programu EffiValidation krokem Nejistoty z přesnosti – paralelní měření k dispozici. Hodnota relativní rozšířené nejistoty je 15,38 % při faktoru pokrytí 1,96. Praktickou hodnotu relativní rozšířené nejistoty jsme zvolili 30 %.

3.4.3 Stanovení organicky vázané síry ve frakci fulvokyselin

Smyslem tohoto stanovení je rozlišení přírodních látek huminové povahy (HA, HFA) od lignosulfátů. V hnojivech takzvaně s přidavkem huminových látek se často používají odpady z papírenské výroby obsahující lignosulfáty, které interagují s pryskyřicí DAX-8 a při stanovení falešně zvyšují obsahy HFA až o 1000 %. Koncentrace síry ve frakci HFA by mohla být dobrým ukazatelem přítomnosti nebo absence přírodních HFA ve vzorku. Přípravovaný standard CD19822 tento problém detailně neřeší, jen doporučuje změřit FTIR spektrum vzorku a sledovat charakteristické píky $-\text{COOH}$ a $-\text{SO}_4$ skupin. Pravidla pro vyhodnocení takového spektra ale nejsou stanovena. Standard také neřeší problematiku směsných vzorků.

Navrhovaný postup za použití ICP OES na stanovení organicky vázané síry ve frakci fulvokyselin (HFA) rozlišení HFA od lignosulfátů umožňuje a problém zjednodušuje. Využívá faktu, že lignosulfáty jsou látky s obsahem síry kolem 5 %, zatímco HFA jsou látky s obsahem síry kolem 1 %. Tento postup bude možné použít i v případě směsných vzorků s obsahem minerálních forem síry.

Celkový objem roztoku HFA separovaných na DAX-8 po promytí vodou a eluci pomocí $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ je přibližně 500 ml. Odebráním 10 ml pro stanovení S-HFA nedojde vzhledem k celkové nejistotě stanovení HFA k významnému ovlivnění výsledků obsahů HFA a tuto chybu tedy lze zanedbat.

Tabulka 2. Přehled výsledků + RSD.

	HA	HA	HFA	HFA	S-HFA	S-HFA
Sample		rsd		rsd		rsd
	abs. %	%	abs. %	%	abs. %	%
611a	0,00		2,90	11,9	3,58	32,9
611b	0,00		2,45		5,76	
612a	1,33	23,4	11,15	5,2	4,96	6,9
612b	0,95		10,36		4,50	

518a	57,34	0,1	3,39	5,2	1,33	3,3
518b	57,40		3,15		1,27	
673a	54,89	0,2	3,24	11,4	0,97	17,0
673b	54,70		2,75		0,76	
674a	57,73	0,3	2,95	4,6	0,85	16,6
674b	57,49		2,76		0,67	
675a	11,83	0,2	2,96	12,3	5,64	3,5
675b	11,80		2,49		5,93	
676a	0,00		22,26	2,6	6,33	2,1
676b	0,00		21,47		6,14	
677a	0,00		10,78	6,7	5,15	1,1
677b	0,00		11,85		5,23	
678a	0,00		41,59	4,3	4,48	21,8
678b	0,00		39,15		6,11	
96a	17,18	1,3	2,94	1,8	2,23	2,4
96b	16,87		3,02		2,15	
97a	5,72	2,5	1,04	12,5	2,21	8,2
97b	5,92		0,87		2,48	
98a	8,91	3,7	1,76	2,0	1,64	4,9
98b	9,39		1,71		1,53	
99a	14,43	1,2	1,27	5,8	1,42	3,2
99b	14,68		1,37		1,48	
100a	0,50	14,2	0,39	7,3	2,98	4,9
100b	0,41		0,43		3,19	
479a	1,31	3,2	0,89	0,2	4,51	3,4
479b	1,25		0,89		4,30	
101a	3,67	1,6	0,28	2,4	1,51	0,0
101b	3,75		0,29		1,51	
102a	3,12	0,6	2,32	12,1	3,58	4,7
102b	3,14		1,96		3,35	
103a	0,00		9,06	0,4	6,73	11,0
103b	0,00		9,12		5,76	

105a	57,33	0,9	4,73	3,4	1,12	20,0
105b	58,03		4,50		1,49	
106a	55,08	0,6	3,71	3,2	1,01	6,8
106b	55,58		3,54		0,92	
107a	0,00		0,95	5,5	1,95	2,9
107b	0,00		1,03		1,87	
108a	7,68	0,1	1,79	3,1	3,57	0,5
108b	7,67		1,71		3,59	

Tabulka 3. Výsledky – celkový přehled.

		S-HFA	HFA	HA	HFA/(HFA+HA)	
Sample	hodnocení	průměr	průměr	průměr	poměr	původ vzorku
		%	%	%	%	
611	lignosulfát	4,7	2,7	0,0	100	lignosulfát
612	lignosulfát	4,7	10,8	1,1	90	lignosulfát
518	fulvokyseliny	1,3	3,3	57,4	5	humát
673	fulvokyseliny	0,9	3,0	54,8	5	humát
674	fulvokyseliny	0,8	2,9	57,6	5	humát
675	lignosulfát	5,8	2,7	11,8	19	lignosulfát
676	lignosulfát	6,2	21,9	0,0	100	x
677	lignosulfát	5,2	11,3	0,0	100	lignosulfát
678	lignosulfát	5,3	40,4	0,0	100	lignosulfát
96	fulvokyseliny	2,2	3,0	17,0	15	humát
97	fulvokyseliny	2,3	1,0	5,8	14	humát
98	fulvokyseliny	1,6	1,7	9,2	16	humát
99	fulvokyseliny	1,4	1,3	14,6	8	humát
100	lignosulfát	3,1	0,4	0,5	47	x
479	lignosulfát	4,4	0,9	1,3	41	x
101	fulvokyseliny	1,5	0,3	3,7	7	x
102	lignosulfát	3,5	2,1	3,1	41	lignosulfát
103	lignosulfát	6,2	9,1	0,0	100	lignosulfát

105	fulvokyseliny	1,3	4,6	57,7	7	humát
106	fulvokyseliny	1,0	3,6	55,3	6	humát
107	fulvokyseliny	1,9	1,0	0,0	100	cizí org. hmota
108	lignosulfát	3,6	1,8	7,7	19	směs humát + lignosulfát

Ve sloupci původ vzorku je zkrácená informace získaná od dodavatelů vzorků o jejich složení, lignosulfát znamená, že vzorek obsahuje nějaké množství lignosulfátu, humát znamená, že vzorek určitě obsahuje huminové látky přírodní povahy, x znamená, že informace o vzorku buď nemáme nebo nejsou dostatečně spolehlivé. Ve sloupci hodnocení je slovní vyhodnocení stanovení organicky vázané síry ve zkoumaných vzorcích, kde jako rozlišovací kritérium bylo zvoleno S-HFA > 3 %.

Takže:

- 1) Je-li obsah síry ve fulvokyselinové frakci vyšší než 3 %, pak vzorek pravděpodobně obsahuje lignosulfáty.
- 2) Je-li poměr HFA/(HFA+HA) blízký 100 %, pak vzorek pravděpodobně neobsahuje přírodní humáty.

Je tedy možné vysvětlit i vzorek 107, který je falešně hodnocen jako fulvokyselina pomocí pravidla č.1. Vzorek 107 je melasa a žádné fulvokyseliny neobsahuje. Aplikací pravidla č. 2 je už laboratoř takový vzorek schopna identifikovat jako vzorek bez obsahu přírodních humátů.

Z tabulky výsledků – celkový přehled je patrná dobrá shoda mezi známým složením vzorku a jeho hodnocením na základě navržených pravidel aplikovaných na získané výsledky.

Tabulka 4. Doplnující tabulka s informacemi o vzorcích.

Sample	Popis původu a jednotlivých složek materiálu
611	oxidované lignosulfáty + extrakt z hnědých mořských řas
612	oxidované lignosulfáty + extrakt z hnědých mořských řas
518	mezilaboratorní test - určitě humát
673	uhlí oxidované - extrakce KOH + vysušení
674	oxyhumolit - oxidované uhlí - extrakce NaOH + vysušení
675	papírenský odpad - extrakce H ₂ SO ₄ + oxidace H ₂ O ₂
676	asi lignin
677	papírenský odpad
678	čistý lignosulfát - oxidovaný (energen tj. vz 102 a 103 - je ze stejného zdroje, firma EGT)
96	mezilaboratorní test - určitě humát
97	mezilaboratorní test - určitě humát
98	mezilaboratorní test - určitě humát
99	KOH extrakce z oxyhumolitu (zvětralé hnědé uhlí)
100	
479	Obsahuje sodné soli huminových a fulvo kyselin. Dále obsahuje extrakt z mořské řasy <i>Ascophyllum nodosum</i>
101	
102	čistý lignosulfát - oxidovaný (původní surovina je vzorek 678, firma EGT) + extrakt z mořských řas
103	čistý lignosulfát - oxidovaný (původní surovina je vzorek 678, firma EGT) + extrakt z mořských řas
105	uhlí oxidované - extrakce NaOH + vysušení
106	oxyhumolit - oxidované uhlí - extrakce KOH + vysušení
107	melasa - sušina z cukrové řepy po oddělení cukru
108	oxyhumolit + leonardit + lignin (10% humáty leonardit + 10% humáty oxyhumolit + oxidovaný lignosulfát + 2,5% fulvokyselin z ligninu

Mez stanovitelnosti S-HFA byla odhadnuta na 0,2 %.

Opakovatelnost byla vypočtena pomocí programu EffiValidation krokem Opakovatelnost z paraleních měření. Hodnota pro opakovatelnost je 0,4559 %, což odpovídá relativní opakovatelnosti 14,56 %. Praktickou hodnotu relativní opakovatelnosti jsme zvolili 20 %.

Nejistota byla vypočtena pomocí programu EffiValidation krokem Nejistoty z přesnosti – paralelní měření k dispozici. Hodnota relativní rozšířené nejistoty je 28,55 % při faktoru pokrytí 1,96. Praktická hodnota relativní rozšířené nejistoty je zvolena ve výši 40 %.

4 Závěr

Metoda je použitelná pro kvantitativní stanovení huminových kyselin a hydrofóbních fulvokyselin, dále je schopna se vypořádat s interferencí lignosulfátů na stanovení hydrofóbních fulvokyselin. Je tedy schopna rozlišit vzorky hnojiv s obsahem organické hmoty povahy jiné než huminové.

Nevýhodou metody je její vysoká pracnost a náročnost na zkušenosti laboratorních pracovníků. Délka jednoho stanovení je přibližně 4 až 7 pracovních dnů v závislosti na povaze vzorku a není tedy vhodná na plošný screening.

Pro běžnou laboratorní praxi je tedy nejvhodnější jen první část stanovení tj. stanovení huminových kyselin, které lze provádět zcela rutinně v rozumném časovém horizontu i za přijatelnou cenu.

5 Literatura

1. A New Standardized Method for Quantification of Humic an Fulvic Acids i Humic Ores and Commercial Products, Richard T. Lamar, Daniel C. Olk, Lawrence Mayhew, Paul R. Bloom, Journal of AOAC International vol. 97, No. 3 **2014**, 721 – 730
2. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances, James A. Rice, Patrick MacCarthy, Org. Geochem. Vol. 17, No. 5, **1991**, 635 – 648

Bulletin Národní referenční laboratoře XXII 2018/3

Ročník: XXII, č. 3

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2018

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 52

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196