Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2024

Ročník XXVIII, číslo 2/2024

Brno 2024

Obsah

1 **Stanovení reaktivity v uhličitanových nebo v uhličitanových a křemičitanových materiálech určených k vápnění půd**
Václav Rypl, Alena Žalmanová, Jaroslava Jirsová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdNRL Plzeň,
Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň
1

2 **Zjištění závislosti mezi stanovením fosforu spektrofotometricky a stanovením metodou ICP OES ve výluhu Mehlich 3 v matrici minerálního horizontu lesních půd**
Bibiána Kotzianová, *Václav Rypl
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Opava, *OdNRL Plzeň,
Jaselská 552/16, 746 01 Opava 12

3 **Zavedení stanovení vybraných parametrů v hrachu polním metodou MIRs**
David Čižmár, Radvana Šulová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,
Hroznová 2, 603 00 Brno 29

4 **Zavedení stanovení obsahu popela v kukuřici silážní metodou NIR spektroskopie**
Lenka Latková, David Čižmár, *Jiří Mikula
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno, *ONRL Opava
Hroznová 2, 603 00 Brno 39

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení reaktivity v uhličitanových nebo v uhličitanových a křemičitanových materiálech určených k vápnění půd

Václav Rypl, Alena Žalmanová, Jaroslava Jirsová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdNRL Plzeň, Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň
vaclav.rypl@ukzuz.cz

1 Úvod

V souladu s Nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/1009 ze dne 5. června 2019 je třeba u materiálů pro vápnění uvádět parametr reaktivita. Aby bylo možné reaktivitu vápenatých hnojiv kontrolovat, je třeba zavést vhodnou zkušební metodu. Pro stanovení reaktivity byl vybrán postup ČSN EN 13971. Jedná se o potenciometrickou titraci kyselinou chlorovodíkovou, a to manuálním postupem.

2 Materiál a metody

2.1 Chemikálie

2.1.1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

2.1.2 Kyselina chlorovodíková, HCl, 35%, ρ(HCl) = 1,19 g/ml.

2.1.3 Kyselina chlorovodíková, standardní odměrný roztok, c(HCl) = 5,0 mol/l.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s asi 400 ml vody (2.1.1) se přidá 442 ml kyseliny chlorovodíkové (2.1.2). Po ochlazení se obsah baňky doplní po značku a pečlivě promíchá. Faktor odměrného roztoku se provede titrací 5 g navážky hydrogenuhličitanu draselného (2.1.9).

2.1.4 Kyselina chlorovodíková, zředěná, hmotnostní zlomek w(HCl) = 25 %.
Příprava: Do 100ml odměrné baňky s 20 ml vody (2.1.1) se opatrně postupně přidá 50 ml kyseliny chlorovodíkové (2.1.2). Po ochlazení se uzavře baňka zátkou. Roztok se používá pro čištění elektrody.

2.1.5 Uhličitan vápenatý, $CaCO_3$, srážený, hmotnostní zlomek $w(CaCO_3) \geq 99$ %.

2.1.6 Silikonové odpěňovací činidlo.

2.1.7 Standardní tlumivý roztok, pH = 2,0, komerčně dodávaný ověřený roztok.

2.1.8 Standardní tlumivý roztok, pH = 4,0, komerčně dodávaný ověřený roztok.

2.1.9 Hydrogenuhličitan draselný, $KHCO_3$, vysušený 1 h při teplotě (90 ± 2) °C.

2.1.10 Kyselina dusičná, HNO_3, 63 %, $\rho(HNO_3) = 1{,}385$ g/ml.

2.1.11 Kyselina dusičná, HNO_3, zředěná, $c(HNO_3) = 2$ mol/l.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s asi 500 ml vody (2.1.1.) se opatrně postupně přidá 138 ml kyseliny dusičné (2.1.10). Po ochlazení se obsah baňky doplní po značku a pečlivě promíchá.

2.2 Přístroje a pomůcky

2.2.1 Analytické váhy s přesností 0,001 g.

2.2.2 pH metr s kombinovanou elektrodou a teplotním čidlem.

2.2.3 25ml automatická skleněná byreta s kohoutem.

2.2.4 Nízká skleněná kádinka, 250 ml, vnitřní průměr 65 mm.

2.2.5 Magnetická míchačka.

2.2.6 Magnetické míchadlo, průměr (9 ± 1) mm s délkou (50 ± 1) mm, s centrální kružnicí.

2.2.7 Stopky.

2.2.8 Filtrační papír, odolný proti kyselinám, střední rychlost filtrace.

2.3 Vzorky

Pro stanovení reaktivity byly použity pevné vzorky vápenatých hnojiv analyzovaných v laboratoři OdNRL Plzeň v roce 2022 a 2023. Přehled hnojiv je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka 1. Přehled použitých hnojiv.

Číslo/rok	Název hnojiva	Hnojivo ve formě
357/2023	Kalcis Mag 5	granulované
358/2023	Dolomitické vápenaté hnojivo	jemnozrnné
359/2023	Dolomitický vápenec mletý, druh B	jemnozrnné
360/2023	Krystalický vápenec	jemnozrnné
361/2023	Agrocarb 40 – VA	jemnozrnné
362/2023	Antigran	granulované
363/2023	Vápenaté hnojivo	granulované
364/2023	Vápenec, druh B	jemnozrnné
365/2023	Agrokalk, druh B	jemnozrnné
366/2023	Vápenec jemně mletý, druh B	jemnozrnné
367/2023	Vápno vzdušné, bílé, jemně mleté, druh B	jemnozrnné
368/2023	Vápenec jemně mletý, druh A	jemnozrnné
369/2023	Vápenec mletý, tříděný	jemnozrnné
370/2023	Dolomitický vápenec mletý	jemnozrnné
371/2023	Vápenec mletý	jemnozrnné

3 Metody

Pro stanovení reaktivity byl vybrán postup podle ČSN EN 13971. Jedná se o potenciometrickou titraci kyselinou chlorovodíkovou, a to manuálním postupem.

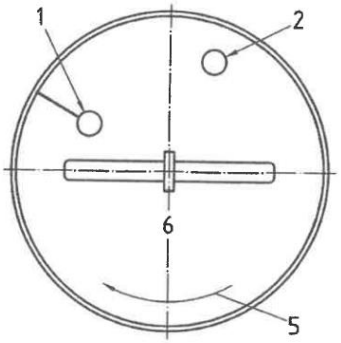
3.1 Kalibrace pH metru

pH metr se před použitím kalibruje přesně na hodnoty pH dvou standardních tlumivých roztoků (2.1.7 a 2.1.8). Elektroda pH metru musí reagovat rychle. Při zpomalení reakce se elektroda pečlivě očistí pomocí zředěného roztoku kyseliny chlorovodíkové (2.1.4).

3.2 Sestavení přístroje pro titraci

Magnetická míchačka, pH metr a automatická skleněná byreta se sestaví podle obrázku č.1. Kádinka s míchadlem a 100 ml vody se umístí na magnetickou míchačku, na které byly nastaveny otáčky (500 – 600) ot/min tak, aby se kapilára byrety ani elektroda nedotýkaly stěn kádinky, viz obrázek č. 2.

Obrázek č. 1. Uspořádání zkušebního přístroje – půdorys.

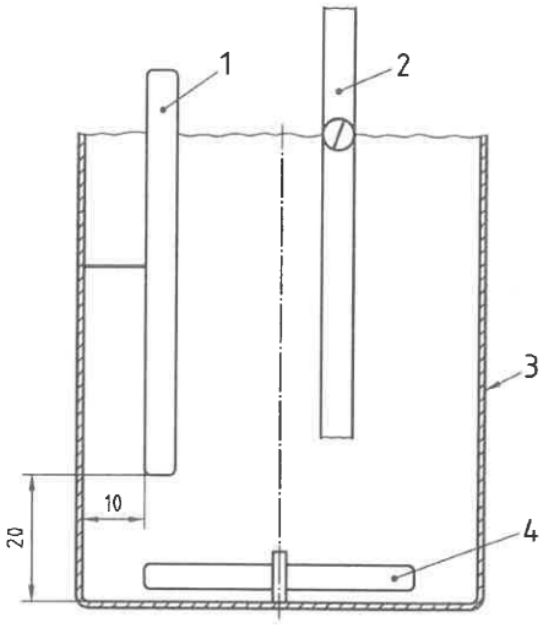


Legenda

1 elektroda
2 byreta
5 směr míchání
6 magnetická míchačka

Obrázek č. 2. Zkušební přístroj, boční pohled.

Rozměry v milimetrech



Legenda

1 elektroda
2 byreta
3 skleněná kádinka o objemu 250 ml (průměr 65 mm)
4 magnetické míchadlo

3.3 Přesné nastavení pracovních podmínek

Do 250ml kádinky s navážkou (5,00 ± 0,01) g uhličitanu vápenatého (2.1.5) předem vysušeného do konstantní hmotnosti při (105 ± 2) °C a kapkou silikonového činidla (2.1.6) se přidá 100 ml vody (2.1.1). Kádinka se suspenzí se umístí na magnetickou míchačku. Po zapnutí míchačky se vloží do roztoku elektroda a kapilára byrety. Vzápětí se spustí stopky a ihned se zahájí titrace kyselinou chlorovodíkovou (2.1.3), která se přidává nejprve v rychlé sekvenci do dosažení pH 2,5, poté se přidává kyselina chlorovodíková po kapkách až do rozpuštění zbývajícího uhličitanu vápenatého. Teoretická spotřeba kyseliny chlorovodíkové (2.1.3) na 5,00 g uhličitanu vápenatého (2.1.5) je (20,0 ± 0,2) ml. V průběhu titrace se dbá na to, aby hodnota pH roztoku neklesla pod 2,0 o více než 0,2 jednotky pH, a to ani na krátkou dobu. Po uplynutí 10 minut je uhličitanový anion obsažený v $CaCO_3$ úplně převeden na CO_2 a hodnota pH se ustálí na hodnotě 2,0. Zaznamená se spotřeba kyseliny chlorovodíkové (2.1.3) na titraci k výpočtu reaktivity $CaCO_3$ (2.1.5).

3.3.1 Stanovení – titrace uhličitanových materiálů

Do 250ml kádinky se naváží (5,00 ± 0,01) g vysušeného vzorku. Přidá se 100 ml vody (2.1.1) a kapka silikonového činidla (2.1.6). Kádinka se ihned umístí na magnetickou míchačku, zapne se míchání, spustí se stopky a zahájí titrace. V první fázi se přidává kyselina chlorovodíková (2.1.3) rychleji až do dosažení hodnoty pH 2,5. Poté se kyselina chlorovodíková přidává po kapkách a pH roztoku se udržuje na hodnotě 2,0. Při titraci se dbá na to, aby hodnota pH neklesla pod hodnotu pH 2,0 o více než 0,2 jednotky, a to ani na krátkou dobu. Přesně po deseti minutách se titrace ukončí a zaznamená se množství spotřebované kyseliny chlorovodíkové (2.1.3) pro výpočet reaktivity A(titr.).

3.3.2 Stanovení – titrace křemičitanových (silikátových) materiálů

Pokud by byly analyzovány vzorky ze skupiny křemičitanových vápenatých materiálů provedla by se titrace podle bodu 3.3.1 a ihned po jejím ukončení se suspenze zfiltruje přes suchý filtr do PE lahvičky bez předchozího oplachu elektrody. Ze získaného filtrátu se odebere 1 ml vzorku do 100ml odměrné baňky, jejíž objem se doplní po značku kyselinou dusičnou (2.1.11). Ve stonásobně naředěném roztoku se stanovil obsah vápníku a hořčíku metodou ICP-OES. Naměřené hodnoty Ca a Mg se použily pro výpočet reaktivity B(ICP). Pro výpočet se použije celkový objem 100 ml přidávané vody (2.1.1) společně s objemem kyseliny chlorovodíkové (2.1.3) spotřebované na titraci vzorku.

3.3.3 Stanovení neutralizační hodnoty

Neutralizační hodnota zkušebního vzorku se stanoví v souladu s normou EN 12945 nebo podle JPP ÚKZÚZ, postup č. 20222.1.

3.4 Vyjadřování výsledků

3.4.1 Výsledky - Uhličitanové materiály k vápnění půd

Reaktivita A(titr.) zkoušeného materiálu se vyjadřuje v hmotnostních procentech podle vztahu:

$$A_{titr} = \frac{C \times 14{,}0 \times 100}{m_t \times N_d}$$

kde

C je spotřeba 5,0 mol/l HCl na titraci, (ml),

m_t hmotnost navážky vysušeného zkušebního vzorku, (g),

N_d neutralizační hodnota zkušebního vzorku, vyjádřená v sušině CaO, (%),

14,0 desetina hmotnosti CaO v mg neutralizovaná 1 ml 5,0 mol/l HCl.

3.4.2 Výsledky - Křemičitanové materiály k vápnění půd

Reaktivita B(ICP) zkoušeného materiálu se vyjadřuje v hmotnostních procentech podle vztahu:

$$B_{ICP} = \frac{(D + E) \times F_{MgO} \times 100}{N_d}$$

kde

D je CaO rozpuštěný během 10 minut podle vztahu v (%):

$$D = \frac{\rho CaO \times V_c \times F_D}{m_t \times 10}$$

E MgO rozpuštěný během 10 minut podle vztahu v (%):

$$E = \frac{\rho MgO \times V_c \times F_D}{m_t \times 10}$$

F_{MgO} 1,391 je konverzní faktor pro vyjádření MgO v CaO,

N_d neutralizační hodnota zkušebního vzorku, vyjádřená v sušině (%),

Vc 100 ml vody + spotřeba 5,0 mol/l kyseliny chlorovodíkové (ml)

m_t hmotnost navážky vysušeného zkušebního vzorku, (mg),

ρCaO koncentrace vápníku ve finálním zředění, (mg/l),

ρMgO koncentrace hořčíku ve finálním zředění, (mg/l),

F_D faktor ředění.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Úprava vzorků

Vzorky vápenatých materiálů byly upraveny a homogenizovány podle normy EN 1482-2 a PP ÚKZÚZ, postup č. 20241.1. Příprava vzorků k analýze. Vzorky byly vysušeny podle normy EN 12048 a JPP ÚKZÚZ, postup č. 20001.1. Stanovení obsahu vlhkosti gravimetricky a dopočet sušiny. Výsledek sušiny je pouze informativního charakteru. Vysušený vzorek se použil pro stanovení reaktivity bez dalších úprav např. mletím. Vzorek po úpravě mletím se použil pro stanovení neutralizační konstanty.

4.2 Postup

Přesné postupy pro stanovení reaktivity vymezují normy ČSN EN 13971 a ČSN EN 16357. Pro stanovení reaktivity byla vybrána norma ČSN EN 13971. Jedná se o potenciometrickou titraci kyselinou chlorovodíkovou manuálním postupem. Norma ale popisuje způsob i za použití automatického titračního přístroje. Je určena pro všechny materiály určené pro vápnění půd. ČSN EN 16357 se využívá pouze pro stanovení reaktivity potenciometrickou automatickou titrací s použitím kyseliny citronové. Tento způsob stanovení se může použít pouze pro vápenaté materiály s maximálním rozměrem částic do 6,3 mm. Za předpokladu, že počet analyzovaných vápenatých materiálů nepřesáhne počet 20 vzorků ročně, je výhodné využít manuální způsob.

Pro vlastní stanovení byly vždy použity tři navážky pro každý vzorek. První navážka byla použita k orientačnímu určení spotřeby kyseliny chlorovodíkové, k výpočtu reaktivity se pak použijí výsledky ze zbylých dvou navážek vzorku.

4.3 Vyhodnocení výsledků stanovení hodnot reaktivity vypočtené dvěma způsoby

V normě ČSN EN 14069 jsou rozděleny materiály k vápnění půd podle typových názvů hnojivých matriálů. Uhličitanové materiály a křemičitanové materiály lze odlišit podle názvů a způsobu výroby.

Tabulka 2. Porovnání hodnoty reaktivity vypočtené dvěma způsoby.

Číslo vzorku/rok	Průměrná Reaktivita % A (titr)	Průměrná Reaktivita % B (ICP)
357/2023	88,1	92,4
358/2023	67,2	69,9
359/2023	66,9	69,2
360/2023	83,7	84,0
361/2023	64,7	64,0
362/2023	98,9	103,9
363/2023	62,6	65,7
364/2023	98,5	104,2
365/2023	85,1	89,6
366/2023	99,4	105,0
367/2023	99,7	103,6
368/2023	87,1	91,3
369/2023	60,5	63,5
370/2023	78,4	81,8
371/2023	59,9	63,7
$CaCO_3$	100,0	105,5

V sadě vzorků použitých k validaci metody nebyl žádný zástupce křemičitanových materiálů. Vzhledem k tomu, že typickým zástupcem křemičitanových materiálů je tzv. konvertorové vápno, které je odpadním produktem zpracování kovů, a tento materiál se v České republice k vápnění nepoužívá, mohou se tedy výsledky Reaktivita B považovat jen za indikativní. Výsledky stanovení reaktivity v křemičitanových materiálech tak nemohly být použity pro určení validačních parametrů. Pro použití jako kontrolní metody se tedy bude používat metoda Reaktivita A a jako referenční materiál pro ověřování správnosti metody je vhodné využívat uhličitan vápenatý.

4.4 Opakovatelnost, nejistota, mez stanovitelnosti, správnost

Opakovatelnost

Opakovatelnost byla vypočítána pomocí modulu Validace, který je součástí Labsystému LS7.

Opakovatelnost: 1,35984 % hm

Opakovatelnost %: 1,72

Kvalifikovaným odhadem byla opakovatelnost stanovení reaktivity určena na 5 % hm.

Nejistota

Nejistota byla vypočítána pomocí programu Validace, který je součástí Labsystému LS7.

Rozšířená nejistota: 2,71968 % hm

Relativní nejistota %: 1,72

Relativní rozšířená nejistota %: 3,44

Koeficient rozšíření: 2

Kvalifikovaným odhadem byla rozšířená nejistota stanovení reaktivity určena na 8 % hm.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti byla odhadnuta kvalifikovaným odhadem jako přibližně trojnásobek minimální spotřeby při titraci pomocí 5M HCl (2.1.3). Jako mez stanovitelnosti lze považovat hodnotu 0,5 ml spotřeby 5M HCl (2.1.3) při titraci. Protože je výsledná hodnota reaktivity závislá na hodnotě neutralizační hodnoty, nelze jednoznačně vypočítat mez stanovitelnosti reaktivity pro všechny možnosti. Uvádíme tedy pouze možné příklady. Za předpokladu, že neutralizační hodnota je 14 %, činí pak hodnota meze stanovitelnosti reaktivity 10 %. Za předpokladu, že neutralizační hodnota je 56 %, činí pak hodnota meze stanovitelnosti reaktivity 2,5 %. Oba uvedené příklady platí pro minimální spotřebu 5M HCl (2.1.3) 0,5 ml.

Správnost

Správnost byla vyhodnocena pomocí čisté chemikálie $CaCO_3$ (2.1.5). Očekávaná hodnota reaktivity je 100 %. Z regulačního diagramu H-PL: IRM $CaCO_3$ – Reaktivita (%) byly odečteny hodnoty průměru 99,953 %, horní varovné meze 100,8 % a dolní varovné meze 99,03 %. Na základě dosažených výsledků lze potvrdit, že metoda dává správné výsledky.

5 Závěr

Stanovení reaktivity potenciometrickou titrací vzorků kyselinou chlorovodíkovou je možné použít jako rutinní postup v laboratoři. Metoda je dostačující, vyžaduje základní laboratorní vybavení, ale je pracná. Pokud množství vzorků, u kterých bude požadováno stanovení reaktivity, bude převyšovat 20 vzorků ročně, bude výhodné využít metodu automatické titrace pro stanovení reaktivity. To ovšem vyžaduje investici do vybavení laboratoře odpovídající instrumentací.

6 Literatura

1 NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) 2019/1009 ze dne 5. června 2019, kterým se stanoví pravidla pro dodávání hnojivých výrobků EU na trh a kterým se mění nařízení (ES) č. 1069/2009 a (ES) č. 1107/2009 a zrušuje nařízení (ES) č. 2003/2003.

2 EN 1482-2 – Hnojiva a materiály k vápnění půd - Vzorkování a příprava vzorku - Část 2: Příprava vzorku.

3 JPP ÚKZÚZ, postup č. 20241.1 – Příprava vzorků k analýze.

4 ČSN EN 12048 (65 4813) Hnojiva a materiály k vápnění půd – Stanovení obsahu vody – Gravimetrická metoda po sušení při (105 ± 2) °C.

5 JPP ÚKZÚZ, postup č. 20001 – Stanovení obsahu vlhkosti gravimetricky a dopočet sušiny.

6 ČSN EN 12945 (65 4845) Materiály k vápnění půd – Stanovení neutralizační hodnoty – Titrační metody.

7 JPP ÚKZÚZ, postup č. 20222.1 – Stanovení neutralizační hodnoty.

8 ČSN EN 14069 – Materiály k vápnění půd – Rozdělení, specifikace a označování.

9 ČSN EN 16357 (654802) - Uhličitanové materiály k vápnění půd - Stanovení reaktivity - Automatická titrace s kyselinou citronovou.

10 ČSN EN 13971 (654844) - Uhličitanové a křemičitanové materiály k vápnění půd - Stanovení reaktivity - Potenciometrická titrace kyselinou chlorovodíkovou.

11 JPP ÚKZÚZ, postup č. 20062.1 – Extrakce prvků lučavkou královskou.

12 JPP ÚKZÚZ, postup č. 20070.3 – Stanovení obsahu Al, As, B, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, V a Zn metodou ICP-OES.

13 ČSN EN 12944-3 (65 4800) – Hnojiva a materiály k vápnění půd – Slovník – Část 3: Termíny vztahující se k materiálům pro vápnění půd.

14 ČSN 72 1210 – VÁPENEC – Všeobecná ustanovení.

15 ČSN 72 1217 – VÁPENEC, DOLOMIT - Jakost

Zjištění závislosti mezi stanovením fosforu spektrofotometricky a stanovením metodou ICP OES ve výluhu Mehlich 3 v matrici minerálního horizontu lesních půd

Bibiána Kotzianová, *Václav Rypl

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Opava, *OdNRL Plzeň
Jaselská 552/16, 746 01 Opava
bibiana.kotzianova@ukzuz.cz

1 Úvod

Cílem práce bylo porovnat spektrofotometrické stanovení fosforu s ICP-OES metodou ve výluhu Mehlich 3 v organominerálním a minerálním horizontu lesních půd. Navazuje tak na práci optimalizace stanovení fosforu metodou ICP-OES a stanovení indexu uvolněnosti fosforu v zemědělských půdách (Zbíral, Obdržálková, Smatanová. 2012).

Pro potřeby hodnocení obsahu fosforu v lesních půdách se jako jeden z půdních testů používá extrakční metoda Mehlich 3 (vyhláška č. 275/1998 Sb., o agrochemickém zkoušení zemědělských půd a zjišťování půdních vlastností lesních pozemků, ve znění pozdějších předpisů).

Posuzováním analýzy půdních extraktů v zemědělských půdách podle Mehlicha 3 metodou ICP-OES se zabývá řada prací (Adesanwo, 2013, Zbíral, 2012), vzhledem k tomu, že se jedná o multielementární analýzu, která přináší vyšší efektivitu práce, snížení ekonomických nákladů a ekologické zátěže. Kritéria hodnocení fosforu v lesních půdách byla založena na hodnocení spektrofotometrického stanovení. Tato metoda stanovuje fosfor pouze v anorganické fosforečnanové formě, zatímco metodou ICP OES se stanovuje extrahovatelný fosfor, který je přítomný ve výluhu, tedy jako suma anorganického a organicky vázaného fosforu.

2 Materiál a metody

Pro analýzy a porovnání analytických koncovek byly použity vzorky z průzkumu lesních půd a půdy z programu kontroly účinnosti vápnění z odběrových roků 2022 a 2023.

2.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků pro tyto účely se řídí Metodickým pokynem č. 05/PL: Odběr vzorků pro účely průzkumu výživy lesa a Metodickým pokynem č. 06/PL: Odběr vzorků pro účely kontroly účinnosti vápnění. Vzorky minerální půdy se odebírají jako směsné a jsou značeny jako organominerální horizont 07 a minerální horizont 08.

2.2 Úprava vzorků

Vzorky lesních půd se v laboratoři zpracovávají dle Jednotných pracovních postupů. Celý objem vzorku se před samotným sušením při laboratorní teplotě s cirkulujícím vzduchem přeseje sítem s průměrem ok 5 mm a oddělí se od rostlinných zbytků a kamínků. Vysušené vzorky se upraví mletím na mlýnu Fritsch Pulverisette 8 se sítem 2 mm, následně se vzorek homogenizuje a kvartací se připraví laboratorní vzorek určený k analýze.

2.3 Chemikálie

Potřebné chemikálie jsou uvedeny v těchto Jednotných pracovních postupech

1. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ- Analýza půd I., postup 30068.1 – Příprava půdního extraktu podle Mehlicha 3, v aktuálním revidovaným znění,

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

3. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – Analýza půd I., postup 30072.1 – Stanovení fosforu v extraktu podle Mehlicha 3 spektrofotometricky.

2.4 Přístroje a pomůcky

1 ICP OES - Spectro Arcos.

2 Spectrofotometr Cary 50.

3 Analytické váhy.

4 Rotační třepačka, (35 ± 5) ot/min.

5 Dávkovací zařízení na 50ml.

6 Centrifuga – Rotanta 460, rcf 3500 × g.

2.5 Pracovní postup

Na analytických vahách se do uzavíratelné plastové nádobky o objemu (200 – 400) ml naváží 5 g vzorku půdy a přidá se 50 ml extrakčního činidla Mehlich 3 (podle JPP Analýza půd I., postup 30068.1). Vzorek se extrahuje 10 minut na rotační třepačce a následně odstředí 5 minut při rcf 3500 × g.

V extraktu lesních půd se změří fosfor metodou ICP OES (podle JPP Analýza půd I., postup 30074.1) na čáře P I 178,287 nm. Měření fosforu probíhá v rámci multianalýzy s jinými prvky. Ze stejného extraktu se stanoví fosfor spektrofotometricky jako fosfomolybdenová modř (podle JPP Analýza půd I., postup 30072.1). Intenzita modrého zbarvení se změří při vlnové délce 750 nm.

2.6 Statistické zpracování

Pro porovnání dvou metod byl vybrán soubor 300 vzorků lesních půd.

Výsledky analýz byly porovnány regresní analýzou, byl zjištěn korelační koeficient a stanovena rovnice přepočtu na základě lineární regresní analýzy. Výsledky analýz byly zpracovány pomocí laboratorního software Labsystém 7 – modul Validace a MS Excel. Všechny statistické výpočty byly provedeny na hladině významnosti 0,05.

Do statistického výběru byly zařazeny k porovnání jen vzorky s koncentrací fosforu >3,5 mg/kg půdy, kterou má laboratoř určenou jako mez stanovitelnosti u obou metod. U obou metod jsou nastaveny pro fosfor ve výluhu Mehlich 3 parametry nejistoty

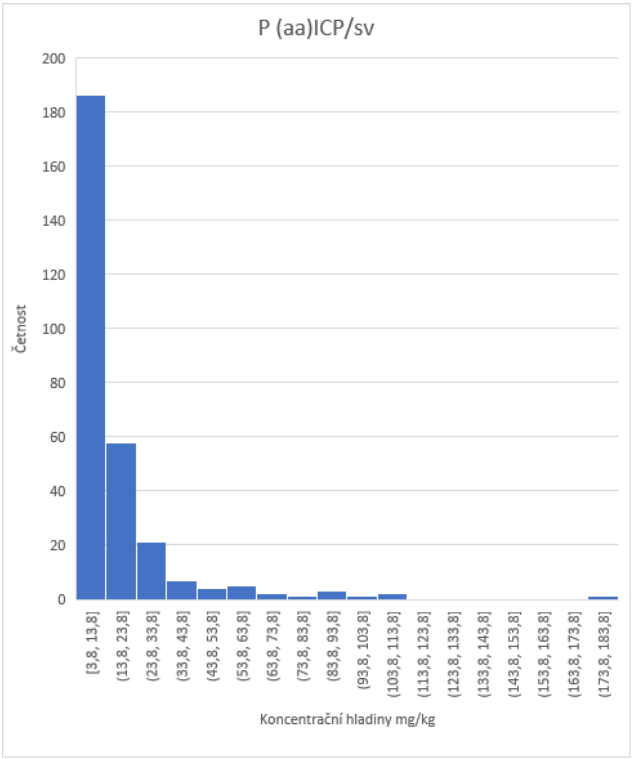
po koncentračních hladinách (< 10 mg/kg půdy - 50 %, rozmezí 10 - 50 mg/kg půdy - 15 %, > 50 mg/kg půdy - 8 %).

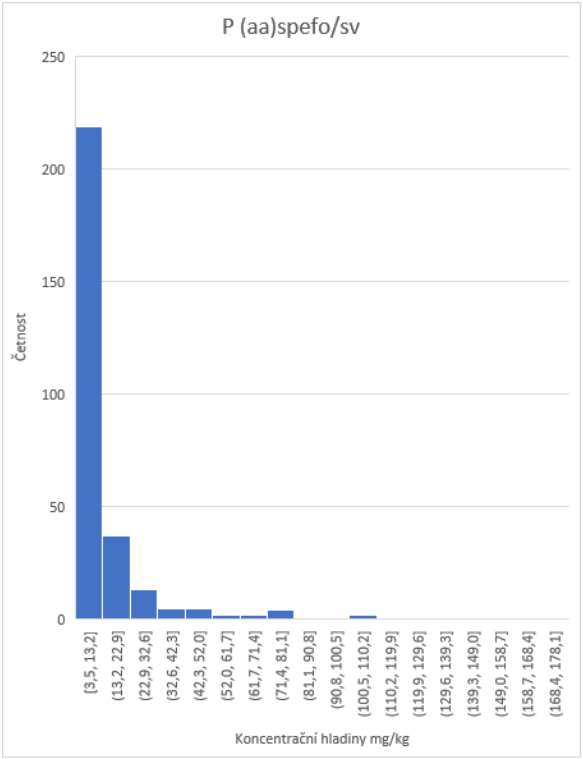
3 Výsledky a diskuse

Účelem porovnání dvou metod bylo zjistit, jaký je rozdíl mezi výsledky koncentrace fosforu ve výluhu Mehlich 3 získaných spektrofotometricky s výsledky získaných metodou ICP OES, resp. jestli jsou totožné. Naměřené hodnoty byly zpracovány pomocí software MS Excel a Labsystém 7 – modul Validace – Správnost – Porovnání dvou metod. Naměřené hodnoty byly porovnány numericky i graficky, postupem zpracování dat pomocí regresní analýzy. Vyhodnocením grafu reziduí a ověřením předpokladů o datech, který zahrnuje testy normality a homogenity, se následně identifikovaly odlehlé body a ze souboru byly vyloučeny.

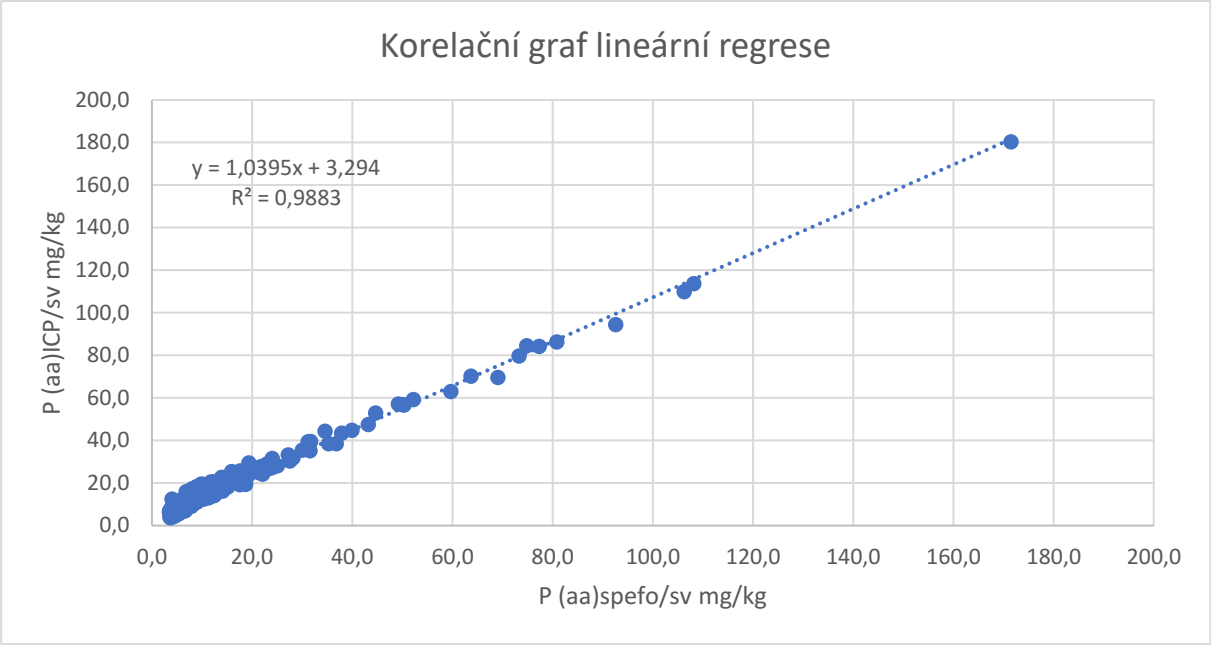
3.1 Zhodnocení původního souboru dat

Zhodnocením histogramů měření pro P(aa)spefo/sv a P(aa)ICP/sv (Obr. 1.), korelačního grafu (Obrázek 2.), popisné statistiky (Tabulka 1) a odhadované instrumentální chyby, byl soubor dat rozdělen do dvou koncentračních hladin, < 20 mg/kg půdy a > 20 mg/kg půdy.





Obrázek 1. Histogram P(aa)ICP/sv a P(aa)spefo/sv.



Obrázek 2. Korelační graf lineární regrese závislosti P(aa)ICP/sv v mg/kg na P(aa)spefo/sv v mg/kg.

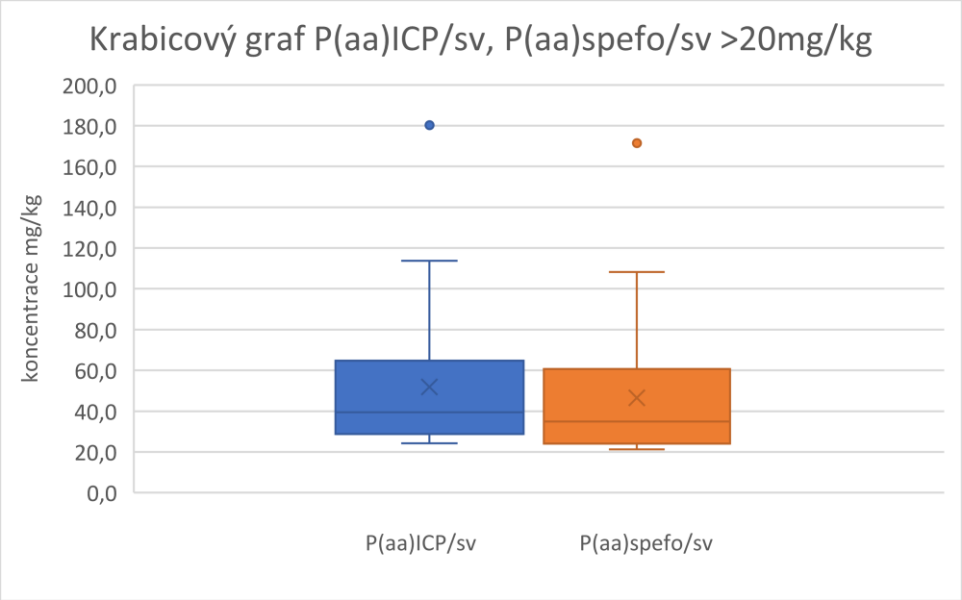
Tabulka 1. Popisná charakteristika souborů po odstranění odlehlých bodů (Analýza dat – Excel).

P(aa)ICP/sv mg/kg	
Střední hodnota	17,2
Chyba střední hodnoty	1,12
Medián	11,45
Modus	11,73
Směrodatná odchylka	19,18
Rozptyl výběru	367,83
Špičatost	23,56
Šikmost	4,14
Rozdíl max-min	176,5
Minimum	3,8
Maximum	180,3
Součet	4993,6
Počet	291
Hladina spolehlivosti (95,0%)	2,21

P(aa)spefo/sv mg/kg	
Střední hodnota	13,3
Chyba střední hodnoty	1,08
Medián	7,37
Modus	4,65
Směrodatná odchylka	18,34
Rozptyl výběru	336,42
Špičatost	25,54
Šikmost	4,40
Rozdíl max-min	168,0
Minimum	3,5
Maximum	171,5
Součet	3881,6
Počet	291
Hladina spolehlivosti (95,0%)	2,12

3.2 Vyhodnocení koncentrační hladiny fosforu >20 mg/kg půdy ve výluhu Mehlich 3

Porovnáním výsledků obou stanovení je prokázána linearita, potvrzena výpočtem v statistickém programu Labsystém 7 - Validace. Shoda metod nebyla prokázána. Na Obrázku 3 je krabicový graf výsledků stanovení fosforu spektrofotometricky a metodou ICP-OES.



Obrázek 3. Krabicový graf porovnání výsledků P(aa)ICP/sv a P(aa)spefo/sv na koncentrační hladině fosforu >20 mg/kg půdy.

Tabulka 2. Popisná charakteristika souborů P(aa)ICP/sv a P(aa)spefo/sv na koncentrační hladině fosforu >20 mg/kg půdy (Analýza dat – Excel).

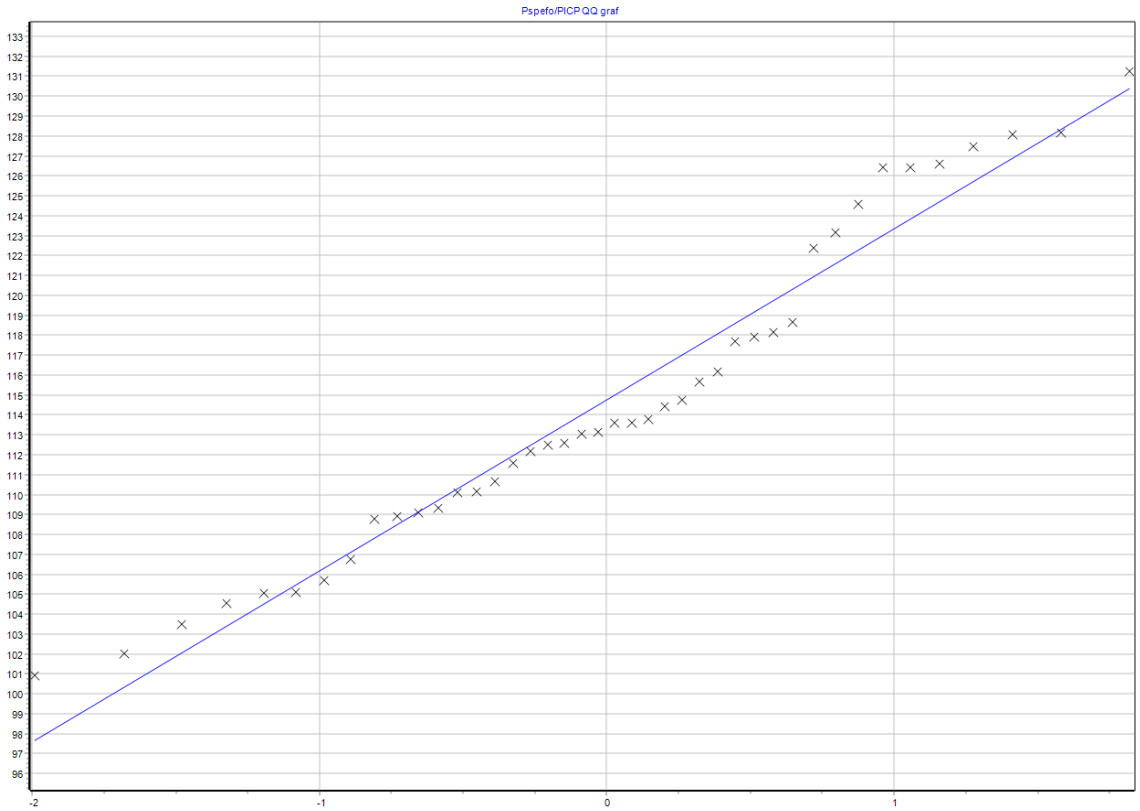
P(aa)ICP/sv mg/kg		*P(aa)spefo /sv mg/kg*	
Střední hodnota	51,9	Střední hodnota	46,6
Chyba střední hodnoty	4,87	Chyba střední hodnoty	4,79
Medián	39,47	Medián	34,94
Směr. odchylka	31,57	Směr. odchylka	31,08
Rozptyl výběru	996,40	Rozptyl výběru	965,66
Špičatost	5,61	Špičatost	5,36
Šikmost	2,06	Šikmost	2,06
Rozdíl max-min	156,1	Rozdíl max-min	150,2
Minimum	24,2	Minimum	21,3
Maximum	180,3	Maximum	171,5
Součet	2180,0	Součet	1956,8
Počet	42	Počet	42
Hladina spolehlivosti (95,0%)	9,84	Hladina spolehlivosti (95,0%)	9,68

Na základě splnění podmínky linearity jsou data vyhodnocena pomocí lineární regrese. Další vypočítané charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 3 a na Obrázku 4 Q-Q graf a na Obrázku 5 Graf reziduí.

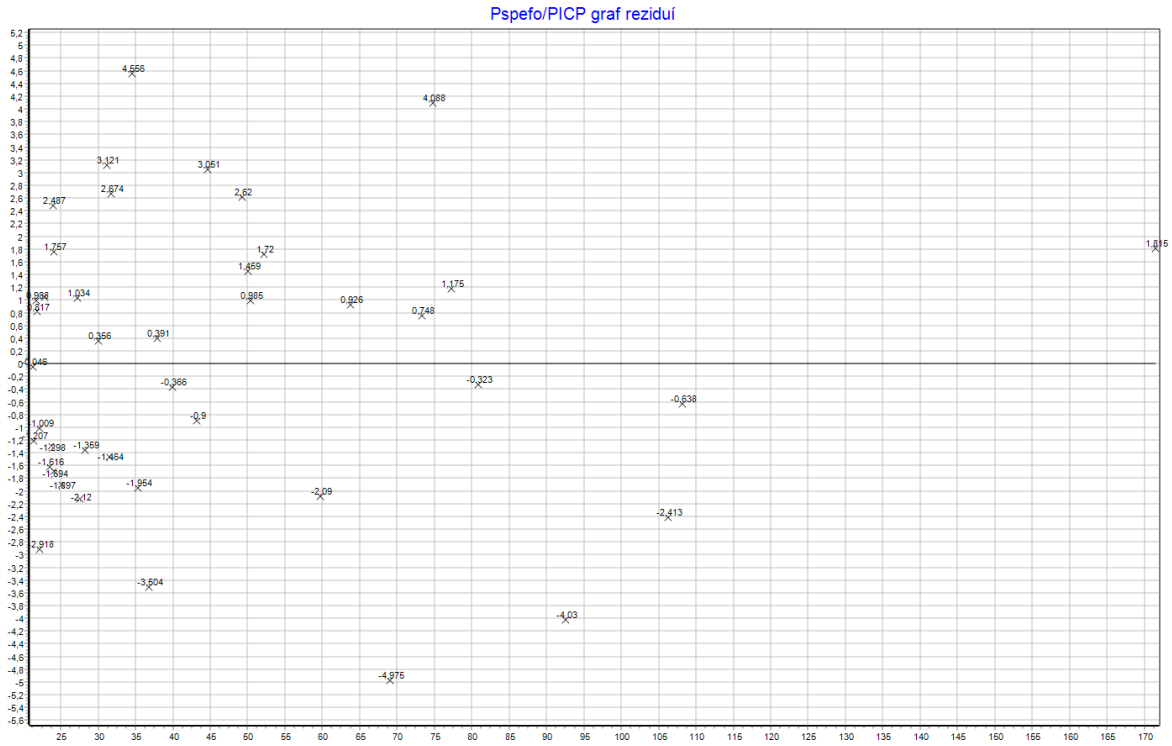
Tabulka 3. Výsledky porovnání dvou metod stanovení fosforu ve výluhu Mehlich 3 v koncentrační hladině >20 mg/kg půdy.

Název	**Výsledek**
Ověření předpokladů použití metody nejmenších čtverců	
Test významnosti kvadratického koeficientu	Nelineární kalibrační funkce nevede k významně lepší těsnosti. Tk = 0,08514, Tab. hodn. = 4,085
Linearita na základě těsnosti proložení	OK, QC ≤5 a korel.koeficient >0,99
QC koeficient	4,2
Ověření předpokladů o datech	
Test odlehlých hodnot – Jack Knife	OK
Test homogenity – Grubbsův	OK
Test homogenity – Dean Dixonův	OK
Test normality – Jarque Berrau	OK, Tk = 0,3909, Tab. hodn. = 5,991
Test nezávislosti prvků významností autokorel. koef. 1. řádu	OK, Tk = 0,6978, Tab. hodn. = 2,016

Popisné charakteristiky	
Počet měření	42
Test shody sad měření párovým t-testem	Nevyhovuje, Tk = 15,51, Tab. hodn. = 2,019
Koeficient b0	4,69176
Koeficient b1	1,01337
Reziduální suma čtverců RSC	195,01
Reziduální rozptyl	4,87524
Reziduální směrodatná odchylka	2,208
Linearita	Vyhovuje
Rovnice	$y = 4{,}69176 + 1{,}01337 \times x$
Variační koeficient %	4,68
Test významnosti absolutního koeficientu	Významný, Tk = 7,578, Tab. hodn. = 2,021
Test hypotézy koef. b1=1	Potvrzena, Tk = 1,205, Tab. hodn. = 2,021
Vychýlení (bias)%	16,6
Výtěžnost	
Průměr	114,64
Rozptyl	63,8695
Směrodatná odchylka	7,99184
RSD (%)	6,97
Validační charakteristiky	
Test shody sad měření párovým t-testem	Nevyhovuje, Tk = 15,51, Tab. hodn. = 2,019
Linearita	Vyhovuje
Test významnosti absolutního koeficientu	Významný, Tk = 7,578, Tab. hodn. = 2,021
Test hypotézy koef. b1 = 1	Potvrzena, Tk = 1,205, Tab. hodn. = 2,021



Obrázek 4. Q-Q graf, koncentrační hladina P(aa)ICP/sv a P(aa)spefo/sv >20 mg/kg půdy (Labystém 7, Validace, Správnost - Porovnání dvou metod).

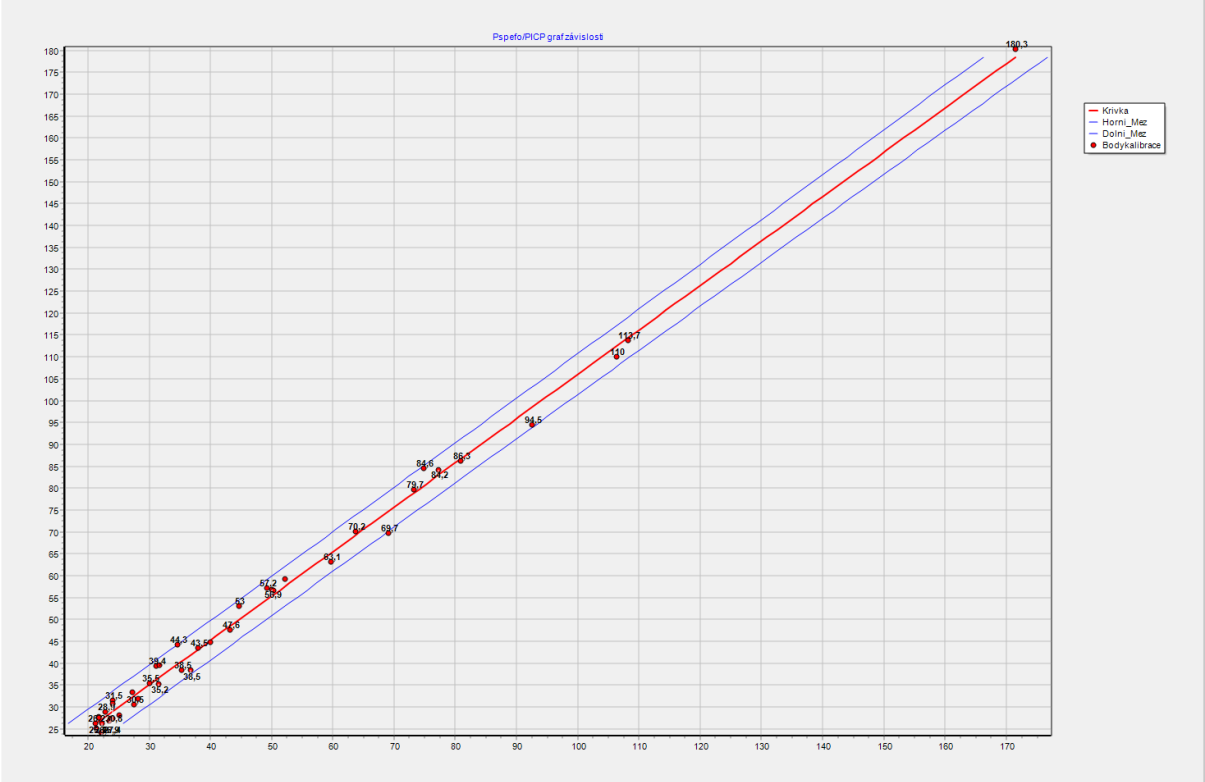


Obrázek 5. Graf reziduí, koncentrační hladina P(aa)ICP/sv a P(aa)spefo/sv > 20 mg/kg půdy (Labystém 7, Validace, Správnost – Porovnání dvou metod).

Na Obrázku 6 je graf regresní závislosti mezi metodou spektrofotometrickou a metodou ICP-OES. Vypočítaná regresní rovnice pro koncentrační hladinu fosforu >20mg/kg půdy je **y = 1,0134 × x + 4,6918, R^2 = 0,9952**, kde y odpovídá P(aa)ICP/sv mg/kg a x odpovídá P(aa)spefo/sv mg/kg.

Průměrný rozdíl mezi metodami pro koncentrace fosforu >20 mg/kg půdy je 15 %. Regresní vztah dobře popisuje vztah obou proměnných.

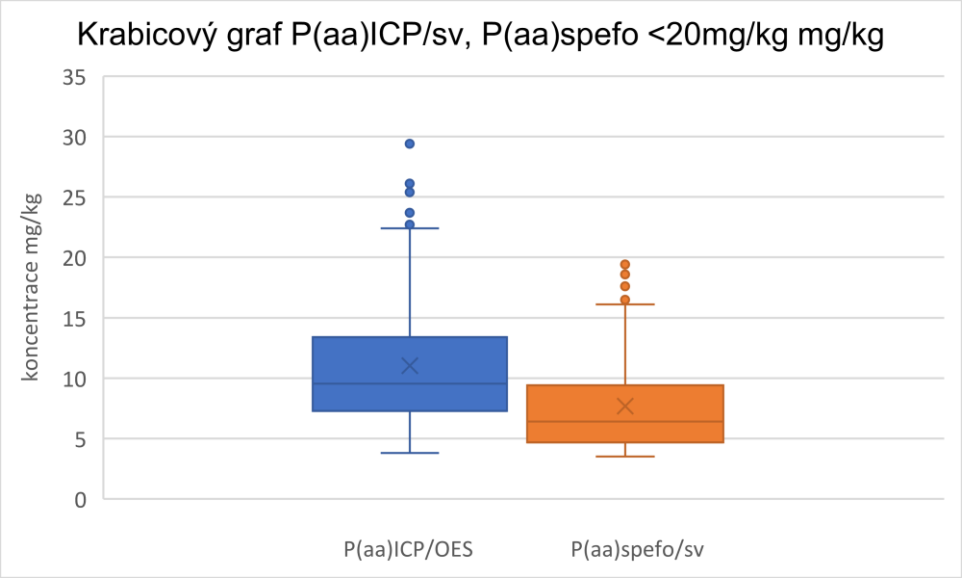
Uvedený výsledek potvrzuje rozdíl publikovaný jinými autory, kteří se zabývají analýzami v zemědělských půdách (Draxler, 2012, Adesanwo, 2013, Zbíral, 2016).



Obrázek 6. Graf regrese, závislost mezi P(aa)ICP/sv – osa y (mg/kg) a P(aa)spefo/sv – osa x (mg/kg), koncentrační hladina >20 mg/kg (Labystém 7 – Validace – Správnost – Porovnání dvou metod), y = 1,0134 × x + 4,6918, R^2 = 0,9952.

3.3 Vyhodnocení koncentrační hladiny <20 mg fosforu/kg půdy ve výluhu Mehlich 3

Pomocí statistického programu Validace v Labsystému 7 jsou porovnány i výsledky z koncentrační hladiny fosforu < 20 mg/kg půdy. Na Obrázku 7 je krabicový graf výsledků grafického porovnání obou metod. Statistické výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4. Použitím výpočtů pro Správnost – porovnání dvou metod nevyšel předpoklad použití metody nejmenších čtverců, linearita na základě těsnosti proložení nebyla potvrzena, hodnota koeficientu je QC > 5.



Obrázek 7. Krabicový graf porovnání výsledků P(aa)ICP/sv a P(aa)spefo/sv na koncentrační hladině <20 mg/kg půdy.

Tabulka 4. Popisná charakteristika souborů P(aa)ICP/sv a P(aa)spefo/sv na koncentrační hladině <20 mg/kg půdy (Analýza dat – Excel).

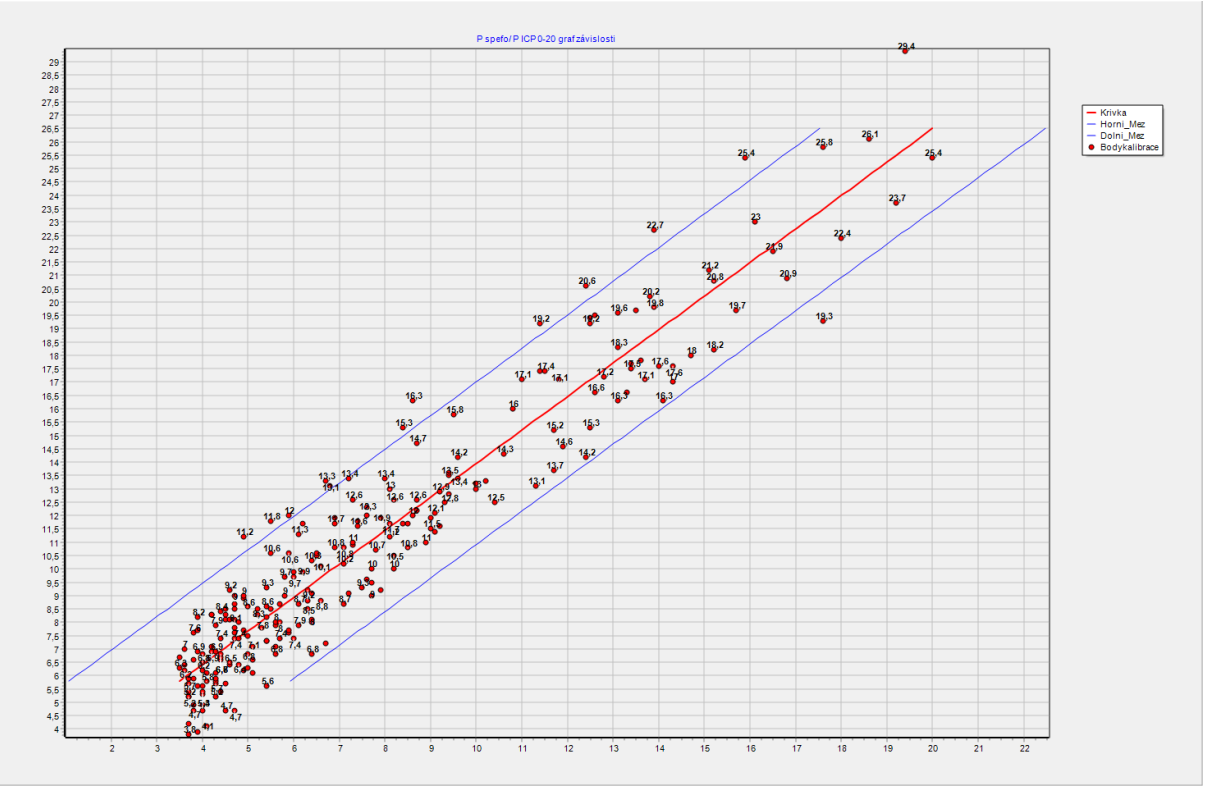
P(aa)ICP/sv mg/kg	
Střední hodnota	11,0
Chyba střední hodnoty	0,33
Medián	9,55
Modus	6,80
Směr. odchylka	5,07
Rozptyl výběru	25,75
Špičatost	0,68
Šikmost	1,06
Rozdíl max-min	25,6
Minimum	3,8
Maximum	29,4
Součet	2627,1
Počet	238
Hladina spolehlivosti (95,0%)	0,65

P(aa)spefo/sv mg/kg	
Střední hodnota	7,7
Chyba střední hodnoty	0,25
Medián	6,40
Modus	4,70
Směr. odchylka	3,85
Rozptyl výběru	14,86
Špičatost	0,56
Šikmost	1,15
Rozdíl max-min	16,5
Minimum	3,5
Maximum	20
Součet	1827,7
Počet	238
Hladina spolehlivosti (95,0%)	0,49

Tabulka 5. Výsledky porovnání dvou metod stanovení fosforu ve výluhu Mehlich 3 v koncentrační hladině < 20 mg/kg půdy.

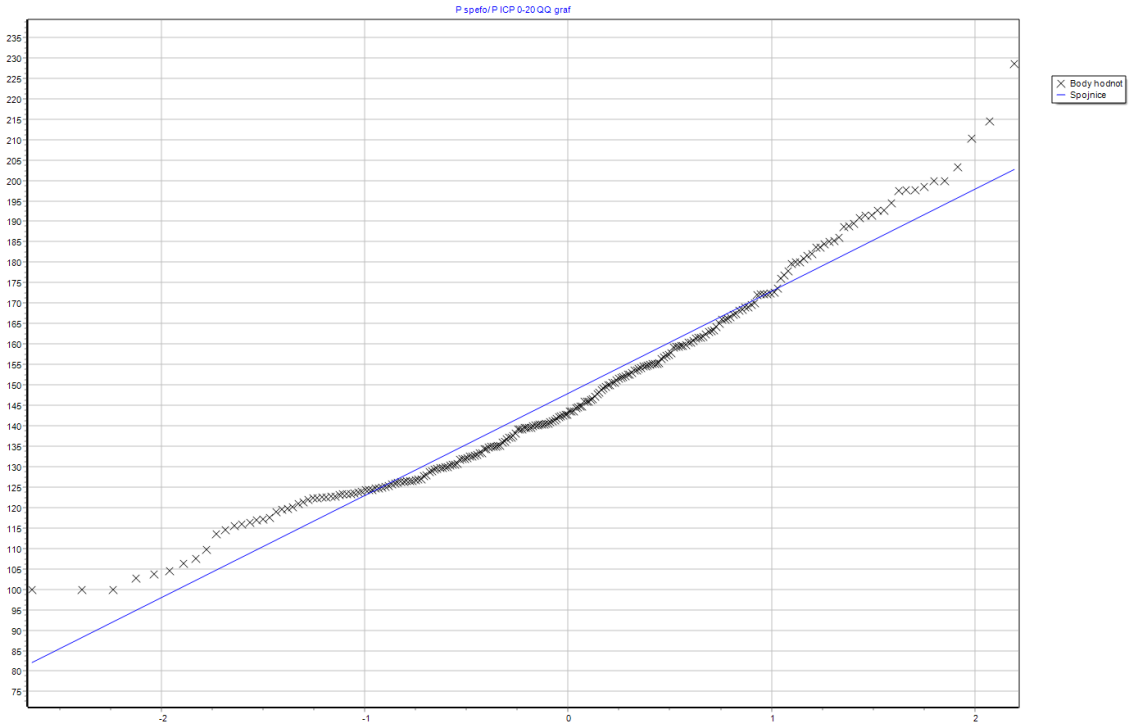
Název	**Výsledek**
Ověření předpokladů použití metody nejmenších čtverců	
Test významnosti kvadratického koeficientu	Nelineární kalibrační funkce nevede k významně lepší těsnosti. Tk = -13,28 Tab. hodn. = 3,86
Linearita na základě těsnosti proložení	NE, QC >5
QC koeficient	13,9
Ověření předpokladů o datech	
Test odlehlých hodnot – Jack Knife	OK
Test homogenity – Grubbsův	OK
Test homogenity – Dean Dixonův	OK
Test normality – Jarque Berrau	Nevyhovuje, Tk = 7,18, Tab. hodn. = 5,991
Test nezávislosti prvků významností autokorel. koef. 1. řádu	Nevyhovuje, Tk = 2,97, Tab. hodn. = 1,97
Popisné charakteristiky	
Počet měření	238
Test shody sad měření párovým t-testem	Nevyhovuje, Tk= 28,42, Tab. hodn. = 1,97
Koeficient b0	1,40319
Koeficient b1	1,25466
Reziduální suma čtverců RSC	559,224
Reziduální rozptyl	2,36959
Reziduální směrodatná odchylka	1,5394
Linearita	nevyhovuje
Rovnice	y = 1,4032 + 1,2547 × x
Variační koeficient %	16
Test významnosti absolutního koeficientu	Významný, Tk = 6,298, Tab. hodn. = 1,97
Test hypotézy koef. b1=1	nepotvrzena, Tk = 9,817, Tab. hodn. = 1,97
Vychýlení (bias)%	53,4
Výtěžnost	
Průměr	147,57
Rozptyl	591,113
Směrodatná odchylka	24,3128
RSD (%)	16,5
Validační charakteristiky	
Test shody sad měření párovým t-testem	Nevyhovuje, Tk = 28,42, Tab. hodn. = 1,97
Linearita	nevyhovuje
Test významnosti absolutního koeficientu	Významný, Tk = 6,298, Tab. hodn. = 1,97
Test hypotézy koef. b1 = 1	nepotvrzena, Tk= 9,817, Tab. hodn. = 1,97

Na Obrázku 8 je znázorněn graf regresní závislosti P(aa)ICP/sv a P(aa)spefo/sv na koncentrační hladině <20 mg/kg půdy s regresní rovnicí **y = 1,2547 × x + 1,4032 s R^2 = 0,9084**, kde y odpovídá P(aa)ICP/sv mg/kg a x odpovídá P(aa)spefo/sv mg/kg.



Obrázek 8. Graf regrese, závislost mezi P(aa)ICP/sv – osa y (mg/kg) a P(aa)spefo/sv – osa x (mg/kg), koncentrační hladina <20 mg/kg (Labystém 7 – Validace – Správnost – Porovnání dvou metod), y = 1,2547 × x + 1,4032, R^2 = 0,9084.

Z Q-Q grafu na koncentrační hladině P(aa)ICP/sv a P(aa)spefo/sv <20 mg/kg půdy (Obrázek 9) je patrné, že body nejsou rovnoměrně distribuovány kolem přímky, což poukazuje na to, že použitelnost lineárního modelu je limitovaná.



Obrázek 9. Q-Q graf koncentrační hladina P(aa)ICP/sv a P(aa)spefo/sv < 20 mg/kg půdy (Labystém 7, Validace, Správnost - Porovnání dvou metod).

Vzhledem k výše uvedeným charakteristikám je možné konstatovat, že regresní model nepopisuje dobře vztah obou proměnných. Průměrný rozdíl mezi výsledky porovnávanými metodami pro koncentraci fosforu < 20 mg/kg půdy je 48 %.

Vzhledem k tomu, že rozdíl mezi metodami způsobený instrumentální chybou je v řádu desítek procent, chyba způsobena použitím méně vhodného regresního modelu je málo významná v porovnání s chybou instrumentální. Tato instrumentální chyba souvisí s blízkostí meze stanovitelnosti metody.

4 Závěr

Ze statistického porovnání výsledků souboru lesních půd vyplývá, že metodou ICP-OES se získávají vyšší výsledky koncentrace fosforu ve výluhu Mehlich 3 než metodou spektrofotometrickou. Tato skutečnost potvrzuje výsledky při zkoumání orné půdy (Zbíral, Obdržálková, Smatanová, 2012). Rozdíl je způsoben tím, že spektrofotometricky je stanovena pouze fosforečnanová forma, kdežto metodou ICP-OES se stanoví celkový obsah fosforu.

Statistický soubor byl na základě naměřených hodnot fosforu rozdělen do dvou koncentračních hladin: <20 mg/kg půdy a >20 mg/kg půdy.

Pro koncentrační hladinu fosforu v Melichu 3 menší než 20 mg/kg půdy je navržen regresní vztah

$$\mathbf{y = 1{,}2547 \times x + 1{,}4032}$$

Pro koncentrační hladinu fosforu v Mehlichu 3 větší než 20 mg/kg půdy platí

$$\mathbf{y = 1{,}0134 \times x + 4{,}6918}$$

Pro přepočet stanovení fosforu naměřeného metodou ICP OES se použijí oba modely, kdy model pro koncentrační hladinu fosforu v Melichu 3 větší než 20 mg/kg půdy je použitelný bez výhrad. Model pro koncentrační hladinu fosforu v Mehlichu 3 menší než 20 mg/kg půdy je dostačující jen pro potřeby monitoringu.

5 Literatura

1 Zbíral, J. a kolektiv autorů, Jednotné pracovní postupy, Analýza půd I., ÚKZÚZ Brno, 2016, v aktuálním znění.

2 Zbíral J., Obdržálková, E., Smatanová, M.: Optimalizace a širší využití metody Mehlich 3 v systému agrochemického zkoušení půd, Část1. Optimalizace stanovení P a S metodou Mehlich 3., Bulletin Národní referenční laboratoře XVI 2012/1, ISSN 1801-9196.

3 Referenční příručka Labsystém 7 (7.1.32), CROSS Zlín a.s., 2024.

4 Zbíral, J., Němec, P., Comaparison of Mehlich 2, Mehlich 3, CAL, Egner, Olsen, and 0,01M $CaCl_2$ extractants for determination of phosphorus in soils,Communications in soil science and plant analysis, Vol.33, Nos. 15-18, 2002, pp.3405-3417.

5 Adesanwo, O.O, Ige, D.V., Thibault. L., Flaten, D, Akinremi, W.: Comparison of Colorimetric and ICP Methods of phosphorus determination in soil extracts, Communications in soil science and plant analysis, 44, 2013, 3061-3075

Zavedení stanovení vybraných parametrů v hrachu polním metodou MIRs

David Čižmár, Radvana Šulová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno
david.cizmar@ukzuz.cz

1 Souhrn

Metodou MIR spektroskopie byly vytvořeny a optimalizovány kalibrační modely pro stanovení obsahu N-látek v sušině, škrobu v sušině a TIA (trypsin inhibitor aktivity) v hrachu setém. Všechny vzorky pocházely z laboratoře odrůdového zkušebnictví, u nichž byl znám koncentrační obsah sledovaných parametrů získaných pomocí laboratorních referenční metod (LRM). Příslušné kalibrační modely pak byly následně ověřeny na porovnání dvou analytických metod. Výsledky ukázaly, že metoda MIR spektroskopie je vhodná pro stanovení obsahu N-látek, škrobu a TIA v hrachu setém.

2 Úvod

Luštěniny spolu s obilovinami jsou významnou surovinou v našem jídelníčku pro svou vysokou nutriční hodnotu.

Mezi nejvýznamnější luštěniny patří hrách, čočka, fazole a sója. Méně známé jsou u nás cizrna, bob, vikev, hrachor [1].

Nejstarší luštěniny jako jsou hrách a čočka se pěstovaly na blízkém Východě již zhruba před devíti tisíci lety. Do střední Evropy se pak následně rozšířily asi v 6. až 5. tisíciletí př. n. l., přibližně ve stejném období jako obilí. Ve středověku byl hrách typické jídlo Čechů, na rozdíl od jiných zemi a počítal se k tzv. "vaření", což byly kromě hrachu ještě kroupy, krupice, jáhly, pohanka, čočka, rýže, kapusta, zelí, řepa mrkev, řeřicha a další.

Čočka je známa ve Střední Evropě již od pravěku. Na pěstování je mnohem náročnější plodinou

než hrách, a proto byla pravěká střední Evropa severní hranicí jejího výskytu.

Ve východní Asii a hlavně v Číně a Japonsku se pěstuje odedávna sója. Je zde nejdůležitějším zdrojem bílkovin, nahrazujícím kravské mléko a maso.

Luštěniny obsahují nejvíce bílkovin z rostlinných potravin. Jsou důležitou a hodnotnou potravinou. V naší zemi je spotřeba luštěnin velmi nízká, často bývají nahrazovány masem, tedy živočišnými bílkovinami. Dá se říci, že u dospělého člověka pokryje denní potřebu aminokyselin 100 gramů luštěnin. Luštěniny obsahují hodnotný tuk s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin a minimum nasycených mastných kyselin. Tuk luštěnin působí proti arterosklerózе (zvláště u sóji a fazolí). Další významnou složkou luštěnin jsou sacharidy a vláknina. Všechny luštěniny obsahují značné množství vitamínů skupiny B, vitamín A, C a niacin. Jsou bohaté na minerální látky, jako je draslík, fosfor, hořčík, železo, zinek a mangan. Obsahují také stopové prvky jako je kobalt, jód, fluor, molybden a vanad. Luštěniny však obsahují i látky, které jsou pro člověka nevhodné. Mezi takové látky patří například lectinový hemaglutinin, který lze z luštěnin odstranit varem. Obsahují také purinové látky, které se metabolizují na kyselinu močovou, proto by jejich konzumaci měli omezit lidé se sníženou vylučovací schopností ledvin. Dále jsou to látky, inhibitory enzymů (antienzymy), které za určitých okolností tlumí činnost enzymů. Z výživového hlediska jsou nejvýznamnější inhibitory trávicích enzymů. Zejména pak inhibitory proteas, dříve někdy taky nazývané antiproteasy, které pomáhají štěpit bílkoviny na látky jednodušší, na jednotlivé aminokyseliny. Velmi sledovaným inhibitorem v praxi je inhibitor trypsinu. Málo významnou skupinou inhibitorů jsou inhibitory sacharas [2].

Inhibitory trypsinu

Biologická hodnota bílkovin hrachu, sóji a dalších luštěnin je snižována obsahem inhibitorů trypsinu (TIA – trypsin inhibitor aktivity = mg trypsinu, které jsou inaktivovány 1 g vzorku). Inhibitory trypsinu (chymotrypsinu) jsou již dlouho známé jako negativní faktory výživy zvířat (blokují trávicí enzymy v zažívacím traktu, způsobují hypertrofii pankreasu).

Obsah inhibitoru trypsinu je na stejné úrovni u hrachu a bobu, v semenech sóji je jejich zastoupení v průměru desetinásobně vyšší (5 × až 20 ×). Obsah inhibitoru trypsinu však může být značně odlišný u jednotlivých odrůd a forem pěstovaných luštěnin. Typickým příkladem je hrách, u kterého dřeňové hrachy mají TIA menší v porovnání s hrachem setým polním a jarní formy hrachu mají rovněž nižší TIA v porovnání s hrachy ozimými. V tabulce 1 je uveden obsah inhibitoru trypsinu u hrachu [3].

Tabulka 1. Obsah inhibitoru trypsinu u hrachu [3].

Forma	Hrách setý	Dřeňový hrách	Hrách setý TIA mg^{-1} sušiny
	U.g^{-1*}		
Jarní	4200 - 5500	2700 - 3700	1,7 - 5,5 - 9
Ozimý	9400 - 11700	5700 - 9400	6 - 16

Legenda: jednotka inhibitoru trypsinu v jednom gramu.

Hrách setý (Pisum sativum) (obr.1) [1], lidově hrášek, je hospodářsky významná rostlina z čeledi bobovitých (Fabaceae). Hrách je jednoletý, popínavý, se sbíhavými a prorostlými listy. Plody jsou lusky, obsahují dužnatá semena zvaná hrášky. Kvete od května do října. Původem je z východního Středomoří. Jinak se pěstuje na polích, kde občas zplaňuje. Tato rostlina není příliš náročná na půdu.

Hrách je důležitá luštěnina, pěstuje se hlavně kvůli chutným plodům, které obsahují vitamíny (hlavně skupiny B). Ve větším množství obsahuje také minerální látky, zvláště fosfor a draslík, ale i vápník a hořčík.



Obrázek 1. Hrách setý.

Cílem této práce je převedení klasické metody stanovení N látek, škrobu a antinutričních látek (TIA) na stanovení všech vyjmenovaných parametrů metodou MIR spektroskopie. Nové stanovení umožní lepší průchod vzorků hrachu laboratoří během podzimních měsíců. Stanovení antinutričních látek klasickou metodou je časově velmi náročné. Důležité je i uvolnění NIRs v podzimních měsících pro další stanovení a vyhodnotit možnosti využití této moderní analytické metody na predikci vybraných parametrů v hrachu setém.

3 Materiál a metody

3.1. Princip stanovení sušiny, dusíkatých látek (N-látek), škrobu, TIA

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

V následující části jsou velmi stručně popsány klasické laboratorní metody mokré chemie, pomocí kterých byly získány referenční hodnoty použité pro kalibraci MIR spektrometru. Výsledek referenčních hodnot v kalibraci je uváděn jako průměr ze dvou paralelních stanovení.

Stanovení obsahu vlhkosti

Stanovení obsahu vlhkosti vychází z normy ČSN 46 7092-3. Tato norma je platná pro stanovení vlhkosti v krmivech [4].

Obsah vlhkosti se stanoví vážkově jako úbytek po vysušení vzorku při 103 ºC.

Stanovení obsahu dusíkatých látek (N-látek)

Stanovení obsahu dusíkatých látek (hrubého proteinu) vychází z normy ČSN EN ISO 20483 [5]. Tato norma je platná pro stanovení obsahu dusíkatých látek v obilovinách a luštěninách. Dusíkaté látky se stanoví metodou podle Kjeldahla a to titračně alkalimetricky (acidimetricky) po mineralizaci vzorku horkou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru převedením na síran amonný, vytěsněním amoniaku hydroxidem sodným a jeho předestilováním do kyseliny sírové (borité).

Stanovení obsahu škrobu

Stanovení obsahu škrobu vychází z normy ČSN EN ISO 10520 [6], která platí pro stanovení obsahu škrobu v potravinách.

Obsah škrobu se stanoví polarimetricky po hydrolýze vzorku kyselinou chlorovodíkovou a odstranění bílkovin Caressovými činidly, polarimetricky změřením optické otáčivosti a provedením korekce na opticky aktivní látky rozpustné ve směsi ethylakohol-voda.

Stanovení trypsin inhibitoru

Stanovení trypsin inhibitorů vychází z americké standardní normy AOCS BA 12-75 2893 [7]. Trypsin inhibitory se stanoví extrakčně s přidáním syntetického substrátu BAPNA (Na-benzoyl-DL-arginin a nitroanilid chlorid), který je trypsinem hydrolyzován za vzniku p-nitroanilinu. Množství uvolněného p-nitroanilinu je měřeno nepřímo spektrofotometricky při 410 nm.

3.2 Stanovení metodou MIR spektroskopie

Pro vytvoření přesného MIR kalibračního modelu je obecně základním požadavkem dostatečný počet analyzovaných vzorků. Rozsah analyzovaných vzorků odrůdového zkušebnictví klasickými laboratorními metodami (LRM) je mimořádný. ÚKZÚZ je v rámci ČR zcela ojedinělým pracovištěm zaměřeným na tento typ laboratorního testování, proto byl požadavek na množství vzorků pro vytvoření dostatečně robustních kalibračních modelů spolehlivě splněn. Bylo proměřeno celkem asi 234 vzorků hrachu setého. Pro kalibraci parametru sušiny, N-látek a škrobu asi 70 vzorků, na parametr TIA asi 150 vzorků. Vzorky použité na kalibraci MIR spektrometru pocházely z regionálních pracovišť ÚKZÚZ a byly nashromážděny za období asi 2 let.

Všechny vzorky hrachu pro stanovení všech parametrů byly před měřením pomlety na laboratorním mlýnku Retsch ZM 200 a následně prosáty přes síto 0,25 mm. MIR spektra takto připravených vzorků byla nasnímána na přístroji Bruker Invenio S, který umožňuje měření v NIR a také MIR spektrální oblasti simultánně v režimu reflektance. Tato oblast je definována vlnovými délkami v rozsahu (600 – 8 000) cm^{-1}. Každý vzorek byl měřen v rozsahů 64 scanů s rozlišením 4 cm^{-1}.

Pro správný vývoj MIR kalibračního modelu je důležité, aby koncentrační rozsah kalibrovaného parametru byl co možná nejvyšší. Koncentrační rozsahy pro stanovované parametry ve vzorcích hrachu setého jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Složení vzorků hrachu setého použitých pro kalibraci přístroje MIR Bruker Invenio S.

	Sušina (%)	N-látky (%/s)	Škrob (%/s)	TIA (mg/g)
N_K (počet vzorků)	230	70	70	150
Minimum	88,14	17,4	48,2	2,4
Maximum	92,41	28,1	54,4	7,1
Průměr	90,88	23,4	51,7	4,3

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

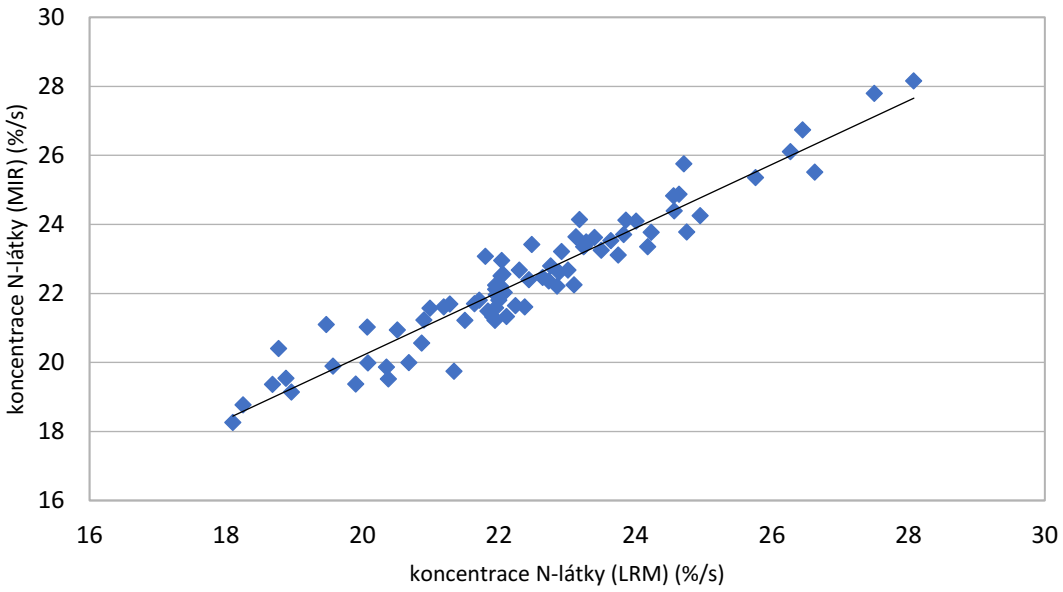
Na všechny MIR spektra pro všechny sledované parametry byla provedena analýza hlavních komponent, která je vhodná pro detekci a určení odlehlých měření vzorků (spekter). Metodou hlavních komponent (PCA) byla identifikována odlehlá měření, ale současně bylo ověřeno, zda tímto vylučováním nebyly označeny důležité kalibrační vzorky (extrémní body, které mohou odpovídat např. nové plodinové odrůdě nebo koncentrační abnormalitě), čímž by byla snížena robustnost vytvářeného kalibračního modelu.

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

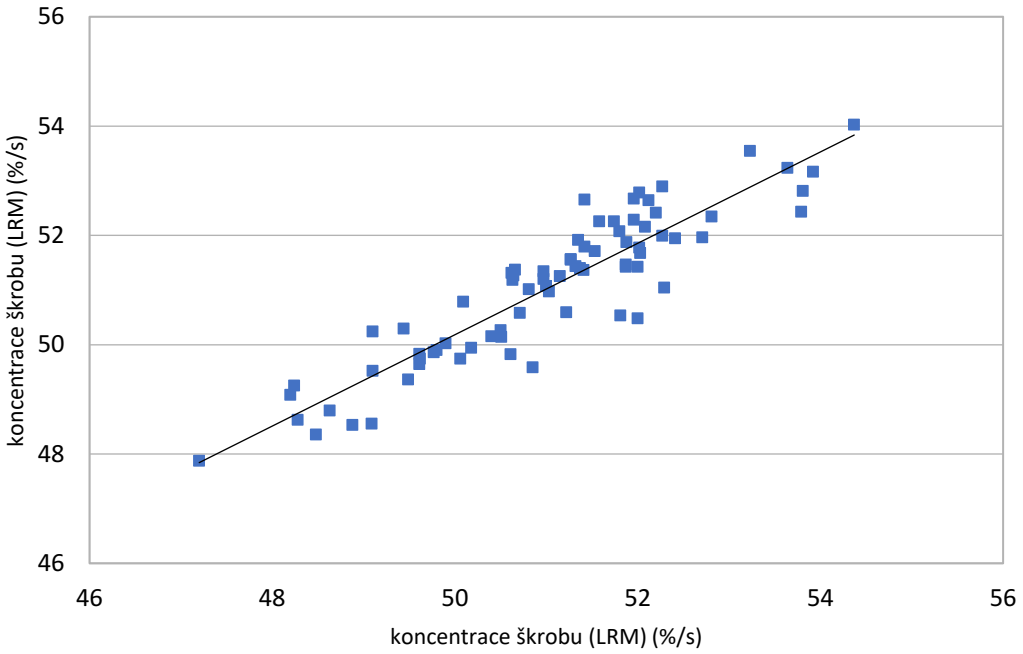
V průběhu tvorby kalibračního modelu byly rovněž vybrány vhodné vlnové délky, a to takové, u kterých se absorpcí záření v MIR spektru projevila zřejmá korelace s laboratorní referenční hodnotou. Výsledkem optimalizace kalibračního modelu je získaný graf referenčních versus MIR predikovaných koncentrací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

4 Výsledky a diskuse

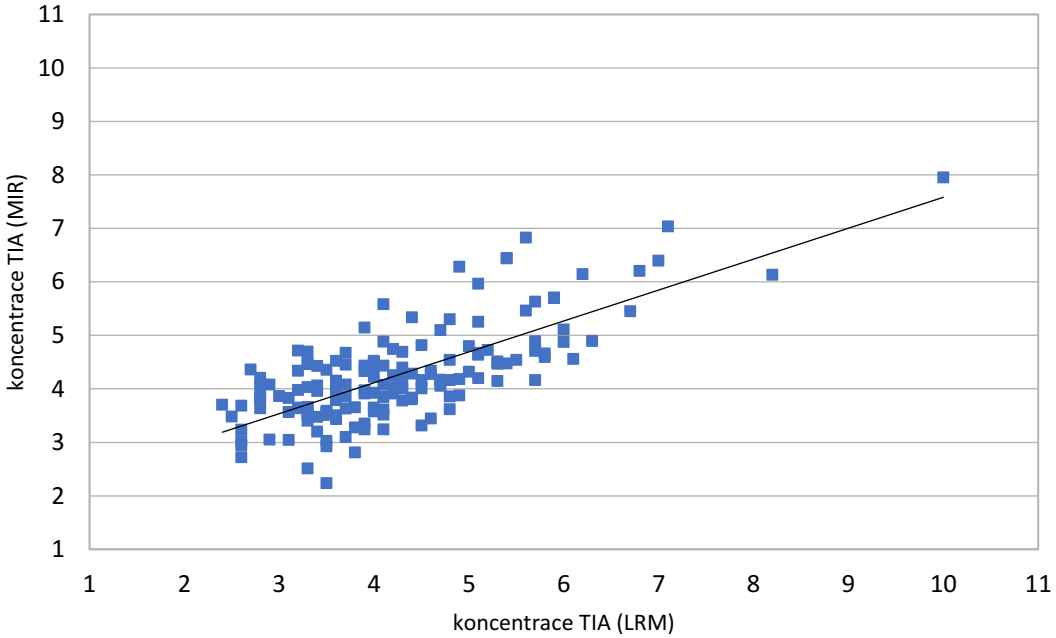
Vytvořené kalibrační závislosti pro N-látky, škrob a TIA v hrachu setém jsou zobrazeny na obrázcích 2 až 4.



Obrázek 2. Kalibrační závislost pro parametr N-látky.



Obrázek 3. Kalibrační závislost pro parametr škrob (%/s).



Obrázek 4. Kalibrační závislost pro parametr TIA.

Souhrnný přehled získaných kvalitativních parametrů kalibračních modelů stanovených regresní metodou PLS pro vybrané parametry v hrachu setém je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3. Kvalitativní parametry kalibračních modelů vzorků hrachu setého.

Parametr	RMSEC	R	RMSECV	R
N-látky (%/s)	0,41	0,98	0,59	0,96
Škrob (%/s)	0,30	0,98	0,50	0,94
TIA (mg/g)	0,71	0,81	0,77	0,79

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

Z tabulky 3 je zřejmé, že pro stanovení obsahu N-látek a škrobu byly získány nejvyšší hodnoty korelačního koeficientu. TIA lze metodou MIR stanovit s nižší hodnotou korelačního koeficientu (0,81), protože parametr je charakterizován enzymovou aktivitou a rovněž koncentrační rozsah hodnot TIA je menší než u N látek a škrobu.

Predikční schopnosti těchto vytvořených kalibračních modelů pro jednotlivá stanovení ve vzorcích hrachu setého byly ověřovány na nezávislých vzorcích, které nebyly zahrnuty do vývoje kalibračních modelů. Následným porovnáním výsledků získaných LRM a metodou MIR spektroskopie na testování shodnosti výsledků se ověřovala nulová hypotéza, že rozdíl $|\bar{x}_A - \bar{x}_B|$ není statisticky významný na zvolené hladině významnosti α = 0,05. Pro testování shodnosti byl použit Studentův test *t* [8]. Vypočtené hodnoty *t* testu byly porovnány s kritickou hodnotou t_α. Získané výsledky pro jednotlivé parametry jsou prezentovány v tabulce 4.

Tabulka 4. Kvalitativní parametry porovnání dvou analytických metod.

Parametr	**k**	$\bar{x}_A$ **(LRM)**	$\bar{x}_B$ **(MIR)**	**α**	**t**	$\mathbf{t_{\alpha(0,05)}}$
N-látky (%/s)	41	22,60	22,66	0,05	1,348	2,021
Škrob (%/s)	30	50,98	51,01	0,05	0,649	2,045
TIA (mg/g)	31	4,46	4,51	0,05	0,804	2,042

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

Z tabulky 4 je zřejmé, že vypočtené hodnoty t pro N-látky, škrob a TIA jsou nižší oproti tabulkové (kritické) hodnotě tα. Z toho vyplývá, že metoda MIR spektroskopie v porovnání s laboratorní referenční metodou poskytuje statisticky shodné výsledky pro stanovení vybraných parametrů ve vzorcích hrachu setého.

5 Závěr

Na dostatečně obsáhlém souboru vzorků hrachu setého byly optimalizovány kalibrační modely metodou MIR spektroskopie pro stanovení vybraných nutričních parametrů jako jsou N-látky, škrob a TIA.

Z prezentovaných výsledků ve formě grafů kalibračních závislostí a tabulek s hodnotami kvalitativních parametrů vytvořených kalibračních modelů (RMSECV, R) je zřejmé,

že nejvyšších hodnot R bylo dosaženo pro stanovení základních nutričních parametrů jako jsou N-látky a škrob (0,96; 0,94). Nižší hodnoty R byly dosaženy pro stanovení parametru TIA. Tato skutečnost byla pravděpodobně způsobena tím, že se jedná o velmi obtížně stanovitelný parametr, jehož aktivita je závislá na enzymové aktivitě v samotné plodině.

Byly ověřeny predikční schopnosti kalibračních modelů, a byly tedy i porovnány dvě analytické metody pro parametry N-látky, škrob a TIA. Z prezentovaných výsledků parametrů N-látky, škrob a TIA je zřejmé, že metoda MIR spektroskopie je vhodná pro zamýšlený účel použití a lze ji doporučit pro predikování těchto sledovaných parametrů v hrachu setém.

6 Literatura

1 http://cs.wikipedia.org

2 VELÍŠEK b, J. Chemie potravin 3. 2. upravené vydání Tábor: nakladatelství OSSIS, 2002, 368 s. ISBN 80-86659-02-X.

3 HOSNEDL, V., VAŠÁK, J., MEČIAR, L. a kol. Rostlinná výroba – II (Luskoviny, olejniny). 1. vydání Praha: Agronomická fakulta ČZU, katedra rostlinné výroby, 1998, 180 s. ISBN 80-213-0153-8.

4 ČSN 46 7092-3, Metody zkoušení krmiv – Část 3: Stanovení obsahu vlhkosti, 12/1998.

5 ČSN EN ISO 20483, Obiloviny a luštěniny – Stanovení obsahu dusíku a výpočet obsahu dusíkatých látek – Kjeldahlova metoda, 4/2007.

6 ČSN EN ISO 10520, Přírodní škrob – Stanovení obsahu škrobu – Ewersova polarimetrická metoda, 6/1999.

7 Novotný F.: Metodiky chemických rozborů pro hodnocení kvality odrůd III, ÚKZÚZ Brno, 2006.

8 Eckschlager, K., Horsák, I., Kodejš, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. SNTL/ ALFA Praha, 1980.

Zavedení stanovení obsahu popela v kukuřici silážní metodou NIR spektroskopie

Lenka Latková, David Čižmár, *Jiří Mikula
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Brno, *ONRL Opava, Hroznová 2, 603 00 Brno
lenka.latkova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Metodou FT-NIR spektroskopie byl vytvořen a optimalizován kalibrační model pro stanovení obsahu popela ve vzorcích kukuřice silážní. Vzorky pro vytvoření kalibračního modelu byly vybrány ze sklizní let 2020, 2021 a 2022, ve kterých byl znám obsah popela, získaný pomocí laboratorní referenční metody (LRM). Příslušný kalibrační model pak byl následně ověřen porovnáním dvou analytických metod. Výsledky ukázaly, že metoda FT-NIR spektroskopie je vhodná pro stanovení obsahu popela ve vzorcích kukuřice silážní.

2 Úvod

Široce pěstovaná polní plodina je pouze kukuřice setá pravá (Zea mays subsp. mays), ostatní divoké poddruhy se nazývají pojmem teosinte. Je to robustní jednoletá tráva, dorůstající nejčastěji do výšky 1 m až 3 m. Kukuřice je schopná růst velmi rychle a produkovat enormní množství biomasy. Pěstuje se na všech kontinentech kromě Antarktidy.

V 16. století bývala v Evropě označována např. jako turecká pšenice, turecké obilí či indické jáhly. Turecká proto, že se o ní předpokládalo, že byla dovezená z Řecka a Asie. V moravských nářečích se používá označení turkyň. Kukuřice setá pravá má původ ve Střední Americe nebo podle některých studií v Jižní Americe. Do Evropy se kukuřice dostala v průběhu 16. a 17. století.

Kukuřice je náročná na vodu – vytváří mohutný kořenový systém sahající do hloubek 1 m až 4 m, pokud to dovoluje půdní profil.

Preferuje hluboké a propustné půdy, půdy neutrální s vyšším obsahem organického materiálu a živin. Sklízí se buď na semeno nebo na siláž. Hektarové výnosy u kukuřice na siláž jsou okolo 30 t. Aby rostlina mohla poskytnou vysoké výnosy, je důležité zajistit pro ni co nejlepší podmínky. Průběh počasí je jedním z limitujících faktorů, který ovlivňuje výši produkce i kvalitu píce.

V rozvinutých zemích se kukuřice pěstuje převážně jako krmivo pro dobytek, ať už ve formě zrna či siláže, nebo pro zpracovatelský průmysl. Její přímá spotřeba jako potraviny je okrajová, přestože roste význam sladké kukuřice jako zeleniny. V potravinářském průmyslu se využívá kukuřice jako zdroj oleje, škrobu, glukózy, fruktózového sirupu a bioetanu.

V České republice je kukuřice setá považována za významnou krmnou, potravinářskou a také průmyslovou plodinu pěstovanou na orné půdě. V současné době se přibližně 70 procent kukuřice seté pěstuje na siláž, která představuje hlavní energetickou složku objemných krmiv pro hospodářská zvířata. Zbylých 30 procent je kukuřice na zrno.

Silážní kukuřice se stala hlavní součásti krmné dávky dojnic, jako hlavní donor energie. Čím větší podíl energie z objemných krmiv se vnese do krmné dávky, tím méně jsou potřeba další energetické zdroje (drahá jadrná krmiva) pro dosažení efektivní produkce mléka.

U hybridů pro výrobu siláže je kromě obsahu zrna (obsah škrobu v siláži) významná také kvalita píce, resp. stravitelnost vlákniny a jejich frakcí (NDF, ADF), která zásadním způsobem ovlivňuje příjem sušiny u dojnic.

Cílem této práce bylo vytvořit a optimalizovat kalibrační model pro stanovení obsahu popela metodou NIR spektroskopie v kukuřici silážní. Obsah popela se používá při výpočtech, které slouží k hodnocení kvality kukuřice na siláž.

3 Materiál a metody

3.1. Princip stanovení popela

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

V následující části je uvedená klasická laboratorní metoda mokré chemie, pomocí které byly získány referenční hodnoty použité pro kalibraci NIR spektrometru.

Stanovení obsahu popela

Stanovení obsahu popela vychází z JPP ÚKZÚZ 10004.1, metoda z Nařízení Komise (ES) č.152/2009, ve znění pozdějších předpisů.

3.2. Stanovení metodou NIR spektroskopie

Pro vytvoření přesného NIR kalibračního modelu je obecně základním požadavkem dostatečný počet analyzovaných vzorků. Rozsah analyzovaných vzorků odrůdového zkušebnictví klasickými laboratorními metodami (LRM) je mimořádný. Požadavek na dostatečné množství vzorků pro vytvoření robustních kalibračních modelů byl spolehlivě splněn. Pro kalibraci popela v kukuřicích na siláž bylo použito 151 vzorků ze sklizní let 2020, 2021 a 2022. Vzorky použité na kalibraci NIR spektrometru pocházely z různých regionálních pracovišť ÚKZÚZ.
Pro kalibraci byla použitá NIR spektra, která byla nasnímána při analýzách kukuřic na siláž ve výše uvedených letech. NIR spektra byla nasnímána v křemenných kyvetách o průměru 3 cm v režimu reflektance. NIR měření byla prováděna v blízké infračervené spektrální oblasti přístrojem Nicolet Antaris s Fourierovou transformací. Spektrální reflektance, udávaná jako průměr ze 120 spekter, byla zobrazena jako logaritmus inverzní reflektance (log 1/R) ve 0,5 nm intervalech v rozsahu vlnových délek 1000 nm až 2500 nm.

Pro správný vývoj NIR kalibračního modelu je důležité, aby koncentrační rozsah kalibrovaného parametru byl co možná nejvyšší. Koncentrační rozsahy pro stanovovaný parametr ve vzorcích kukuřic na siláž jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Složení vzorků kukuřice na siláž použitých pro kalibraci přístroje Nicolet Antaris měřených v reflektanci.

	Popel (%/s)
N_K (počet vzorků)	151
Minimum	2,675
Maximum	7,744
Průměr	4,708

Důležitým předpokladem vytvoření úspěšného kalibračního modelu je dále skutečnost, že laboratorní referenční metoda používaná pro kalibraci NIR spektrometru je dostatečně přesná.

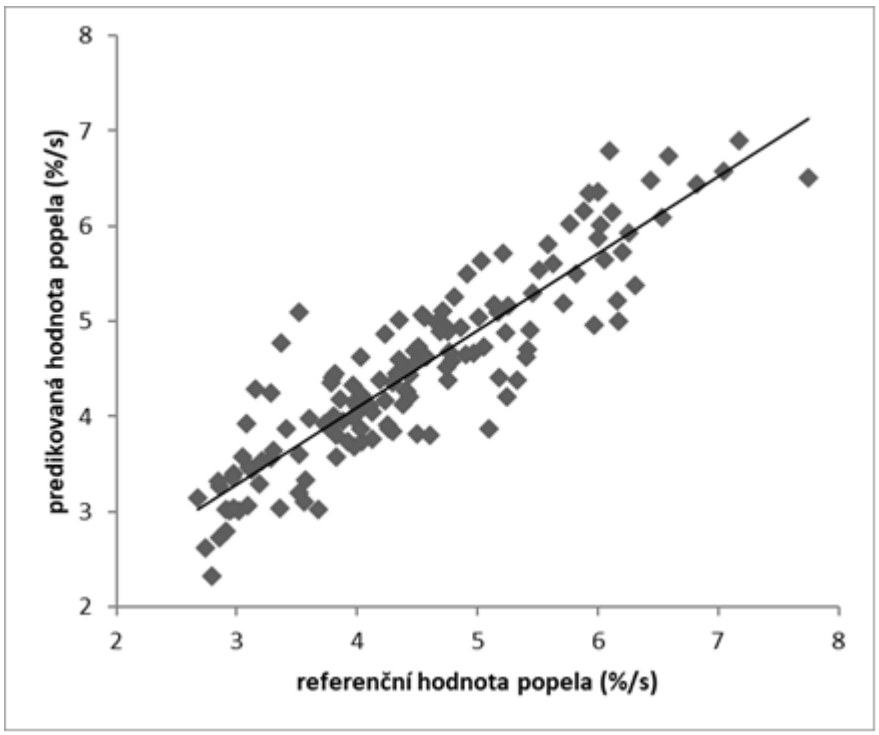
V prvním kroku před vlastní regresní tvorbou kalibračního modelu byla na jednotlivé soubory kalibračních spekter (vzorků) aplikována matematická korekce spekter SNV, která eliminuje vliv velikosti částic. Tento krok je velmi důležitý u vzorků, které před vlastní NIR analýzou prošly úpravou sítováním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

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

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

4 Výsledky a diskuse

Na základě výsledků LRM byl vytvořen kalibrační a optimalizován kalibrační model pro stanovovaný parametr popel metodou NIR spektroskopie ve vzorcích kukuřic na siláž. Kalibrační závislosti jsou zobrazeny graficky na obrázku 1.



Obrázek 1. Kalibrační závislost pro parametr popel (%/s).

Přehled získaných kvalitativních parametrů kalibračního modelu stanovených regresní metodou PLS pro vybraný parametr v kukuřici na siláž je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2. Kvalitativní parametry kalibračního modelu vzorků kukuřičných siláží.

Parametr	**RMSECV**	**R**
popel (%/s)	0,54	0,8699

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

Z tabulky 2 je zřejmé, že pro stanovení parametru obsahu popela byla získána vysoká hodnota korelačního koeficientu.

Predikční schopnosti tohoto vytvořeného kalibračního modelu pro stanovení popela ve vzorcích kukuřic na siláž byly ověřovány na souboru nezávislých vzorků, které nebyly zahrnuty do vývoje kalibračních modelů. Vyhodnocení následného porovnání výsledků získaných LRM a metodou NIR spektroskopie je uvedeno v tabulce 3 z validace analytických metod – porovnání metod v LS7 a v tabulce 4 je vyhodnocení dvouvýběrového párového t-testu.

Tabulka 3. Protokol validace analytických metod Labsystém 7.

Statistické vyhodnocení
Počet měření 30
Průměr měření 4,39 %
Průměr ref. měření 4,43 %
Linearita Vyhovuje
Koeficient b0 -0,146661
Koeficient b1 1,04421
Test vyznamnosti absolutniho koeficientu nevyznamny Tk = 0,5272 Tab.hodn. = 2,048
Test hypotézy koef. b1=1 potvrzena Tk = 0,7126 Tab. hodn. = 2,048
Výtěžnost 101,03
Test shody sad měřeni studentovym t-testem Vyhovuje Tk = 0,828 Tab. hodn. = 2,045

Tabulka 4. Vyhodnocení dvouvýběrového párového t-testu.

	Soubor 1	Soubor 2
Střední hodnota	4,3871	4,4344
Rozptyl	0,892223266	1,069018938
Pozorování	30	30
Pears. korelace	0,953965394	
Hyp. rozdíl stř. hodnot	0	
Rozdíl	29	
t Stat	-0,827990495	
P(T<=t) (1)	0,207219093	
t krit (1)	1,699127027	
P(T<=t) (2)	0,414438187	
t krit (2)	2,045229642	

Z tabulek 3 a 4 vyplývá, že metoda NIR spektroskopie v porovnání s laboratorní referenční metodou poskytuje statisticky shodné výsledky pro stanovení popela ve vzorcích kukuřic na siláž.

5 Závěr

Na dostatečně obsáhlém souboru vzorků kukuřice na siláž byl optimalizován kalibrační model pro stanovení popela metodou FT-NIR spektroskopie.

Z prezentovaného grafu kalibračních závislostí a hodnot kvalitativních parametrů (RMSECV, R) vytvořeného kalibračního modelu je zřejmé, že hodnoty popela stanovené laboratorní referenční metodou a predikované metodou NIR spektroskopie spolu korelují (R = 0,8699).

Zároveň byly porovnány dvě analytické metody. Prezentované výsledky potvrdily vhodnost metody NIR spektroskopie a lze ji tak ji doporučit pro predikování popela ve vzorcích kukuřice na siláž.

6 Literatura

1 Wikipedie – Kukuřice setá

2 Výnosy a kvalita píce kukuřice na siláž v různých půdně-klimatických podmínkách ČR v roce 2020. Ing. Eva Kunzová, CSc., Ing. Ladislav Menšík, Ph.D., Ing. Pavel Nerušil, Ph.D., Ing. Lukáš Hlisnikovský, Ph.D.; Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. Praha-Ruzyně.

3 JPP ÚKZÚZ 10004.1, metoda z Nařízení Komise (ES) č.152/2009, ve znění pozdějších předpisů.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXVIII, 2024/2

Ročník:	XXVIII, č. 2
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2024
Odpovědný redaktor:	Ing. Iva Strížová
Počet stran:	45

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196