Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř

Bulletin 2011

Ročník XV, číslo 3/2011

Brno 2011

Obsah

1. **Stanovení bacitracinu, tylosinu,carbadoxu, olachindoxu a virginiamycinu metodou LC/MS/MS** 1

Petra Koucká
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Praha, Za Opravnou 4, 150 06 Praha

2. **Vývoj kalibrační rovnice pro vybrané parametry v luštěninách metodou FT-NIR spektroskopie** 27

David Čižmár, Radvana Šulová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

3. **5 Oxidačně redukční procesy v půdách** 39

Ivo Honsa
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Bílokostelecká 208, 463 31 Chrastava

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Plné znění Bulletinů NRL (včetně grafů a obrázků) najdete i na našich webových stránkách v části věnované Národní referenční laboratoři (http://www.ukzuz.cz).

Stanovení bacitracinu, tylosinu, carbadoxu, olachindoxu a virginiamycinu metodou LC/MS/MS

Petra Koucká, Barbora Houdková, Alena Breburdová, Jana Povýšilová, Iva Křivánková

Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Praha, Za Opravnou 4,
150 06 Praha 5–Motol

1 Cíl práce

Bacitracin, tylosin, carbadox, olachindox a virginiamycin byly dříve používané jako zootechnické doplňkové látky. Tyto antibakteriální látky byly v chovech zvířat používány pro tři hlavní účely: k terapii, profylaxi – prevenci vzniku onemocnění a k podpoře růstu. Tylosin, virginiamycin a bacitracin patří mezi látky s antibiotickými vlastnostmi.

Tylosin je makrolidové antibiotikum, které je produkováno *Streptomyces fradiae,* bacitracin a virginiamycin patří mezi peptidová antibiotika. Bacitracin je produkován kmeny *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis*, virginiamycin *Streptomyces virginiae*. Bacitracin se pro lepší stabilitu většinou používá ve formě soli zinku. Carbadox a olachindox jsou látky, které se používaly hlavně k podpoře růstu.

Jestliže jsou tyto látky podávány při výživě zvířat, je výskyt reziduí těchto látek v poživatelných tkáních, mléce nebo vejcích velmi pravděpodobný. Zbytky antibakteriálních léčiv v potravinách mohou vést k alergickým reakcím. Největší hrozbou je ale vývoj rezistentních kmenů bakterií, na které by neúčinkovala antibiotika používaná v humánní medicíně.

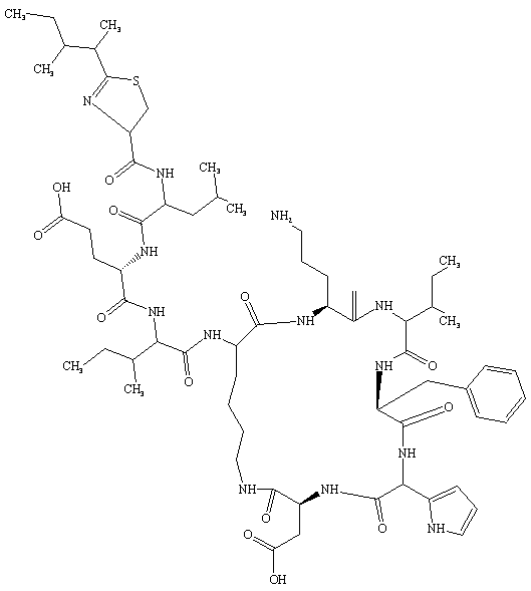
Z těchto důvodů Evropská komise rozhodla zakázat používání Zn–bacitracinu, tylosinu, virginiamycinu a olachindoxu v krmivech.

Cílem práce bylo odzkoušet multi–metodu za použití kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a porovnat tuto metodu se stanovením carbadoxu a olachindoxu metodou HPLC.

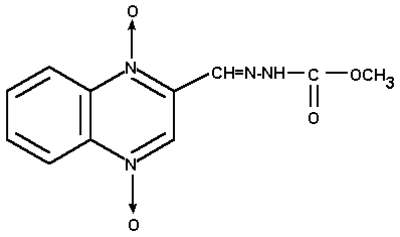
2 Účel a rozsah

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení bacitracinu, tylosinu a virginiamycinu metodou LC/MS/MS a carbadoxu a olachindoxu metodami LC/MS/MS a HPLC v krmivech.

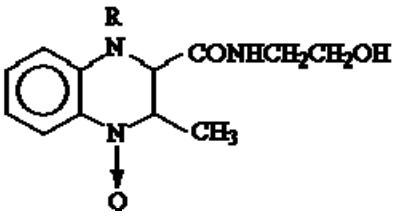
Zn-Bacitracin



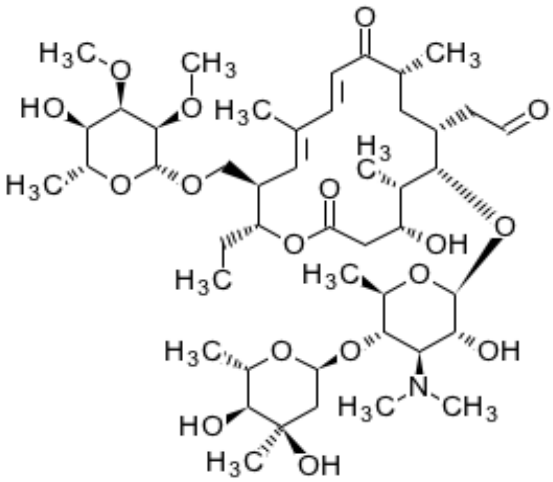
Carbadox



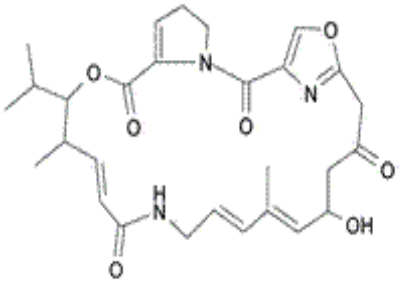
Olachindox



Tylosin



Virginiamycin



3 Princip

Ze vzorků krmiv se směsí rozpouštědel vyextrahují bacitracin, tylosin, carbadox, olachindox a virginiamycin. Obsah těchto analytů se stanoví kapalinovou chromatografií za použití UV detektoru nebo hmotnostního detektoru.

4 Chemikálie

1. Metanol, HPLC grade.
2. Acetonitril, HPLC grade.
3. Redestilovaná voda (18,2 MΩ/cm).
4. Kyselina mravenčí p.a. for mass spectrometry, 98%, Mr = 46,03 g/mol.
5. Zn-Bacitracin (CAS: 1405-89-6).
6. Carbadox (CAS 6804-07-5).
7. Olachindox (CAS 23696-28-8).

8. Tylosin fosfát (CAS 1401-69-0).

9. Virginiamycin (CAS: 21411-53-0).

10. Methanol, roztok, c(CH_3OH) = 70%.

    Příprava: Smíchá se 700 ml metanolu (1) a 300 ml vody (3). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.

11. Extrakční činidlo – směs metanolu a kyseliny mravenčí 97 : 3 (v/v).

    Příprava: Smíchá se 970 ml roztoku metanolu (10) a 30 ml kyseliny mravenčí (4). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.

12. Acetonitril, 50% roztok.

    Příprava: Smíchá se 500 ml acetonitrilu (2) a 500 ml vody (3). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.

13. Kyselina octová, CH_3COOH, w = 100%.

14. Oxid hlinitý, neutrální, stupeň aktivity I.

15. Roztok metanolu a acetonitrilu 1 : 1 (v/v).

    Příprava: Smíchá se 500 ml metanolu (1) a 500 ml acetonitrilu (2). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.

16. Kyselina octová, CH_3COOH, w = 10%.

    Příprava: Smíchá se 10 ml kyseliny octové (13) a 100 ml vody (3).

17. Octan sodný, p.a. čistota, minimálně 99%.

18. Octanový tlumivý roztok, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0.

    Příprava: 0,82 g octanu sodného (17) se rozpustí v 700 ml vody (3) a kyselinou octovou (16) se upraví pH na 6,0. Roztok se převede do 1000ml odměrné baňky, doplní se vodou (3) po značku a promíchá.

19. Mobilní fáze pro stanovení bacitracinu, tylosinu, carbadoxu, olachindoxu a virginiamycinu metodou LC/MS/MS.

    Eluent A – směs ultračisté vody a kyseliny mravenčí.

    Příprava: Smíchá se 1000 ml vody (3) a 3 ml kyseliny mravenčí (4). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.

Eluent B – směs acetonitrilu a kyseliny mravenčí.

Příprava: Smíchá se 1000 ml acetonitrilu (2) a 3 ml kyseliny mravenčí (4). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.

20. Mobilní fáze pro stanovení olachindoxu metodou HPLC.

Příprava: Smíchá se 900 ml vody (3) a 100 ml metanolu (1). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.

21. Mobilní fáze pro stanovení carbadoxu metodou HPLC.

Příprava: 825 ml octanového tlumivého roztoku (18) se smíchá se 175 ml acetonitrilu (2). Roztok se přefiltruje přes membránový filtr 0,22 μm a odplyní se v ultrazvukové lázni po dobu 10 min.

22. Kyselina mravenčí, roztok, c(HCOOH) = 1 mol/l.

Příprava: 0,962 ml kyseliny mravenčí (4) se smísí s vodou (3) a v 25ml odměrné baňce se doplní po značku a promíchá.

23. Roztok kyseliny mravenčí, c(HCOOH) = 5 mmol/l.

Příprava: 0,05 ml roztoku kyseliny mravenčí (22) se smísí s vodou (3) a v 10ml odměrné baňce se doplní po značku a promíchá.

24. Směs vody se směsí metanolu a acetonitrilu 3 : 7 (v/v).

Příprava: Smíchá se 300 ml vody (3) a 700 ml roztoku metanolu a acetonitrilu (15). Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni.

5 Přístroje a pomůcky

1. Analytické váhy s přesností na 0,0001 g.
2. Ultrazvuková lázeň.
3. Mechanické míchací zařízení (třepačka).
4. Magnetické míchací zařízení.
5. Kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem Quattro Premier (LC/MS/MS).
6. Kapalinový chromatograf s UV detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou (Agilent 1100).
7. Laboratorní odstředivka.

8. Kolona pro kapalinovou chromatografii Zorbax Eclipse XDB C18, 4,6 mm × 250 mm, 5μm.
9. Kolona pro kapalinovou chromatografii Nova Pak^{R} C18, 3,9 mm × 300 mm.
10. Kolona pro kapalinovou chromatografii Zorbax Eclipse XDB C18, 4,6 mm × 150 mm, 5μm.
11. Odpařovací jednotka.
12. SPE kolony Oasis HLB.
13. Membránové filtry 0,22 μm a 0,45 μm.
14. Skleněná kolona.
15. Filtrační papír.
16. Centrifugační zkumavka.

6 Postup

6.1 Postup – metoda LC/MS/MS

6.1.1 Příprava vzorku

Byly vyzkoušeny dva možné postupy přípravy vzorku, které se lišily především ve způsobu přečištění extraktu.

Postup A

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 1 g vzorku s přesností na 0,0001 g. K navážce se přidá 25 ml extrakčního činidla (11), baňka se uzavře zátkou a ponechá se třepat 30 min na třepačce při (150 – 180) kmitech/min. Takto získaný extrakt se odstředí 15 min na odstředivce při 3900 ot/min a teplotě 15 °C, vytemperuje na laboratorní teplotu a naředí dle deklarace roztokem acetonitrilu (12).

Postup B

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 5 g vzorku s přesností na 0,0001 g. K navážce se přidá 10 ml vody (3), baňka se uzavře zátkou a důkladně se manuálně protřepe. Poté se přidá 10 ml metanolu (1), baňka se uzavře a třepe 20 min na třepačce při (150 – 180) kmitech/min. Takto získaný extrakt se odstředí 10 min na odstředivce při 3500 ot/min a teplotě 15 °C. 0,5 ml tohoto extraktu se smíchá se 3,5 ml vody (3). SPE kolona Oasis HLB

se promyje postupně 3 ml metanolu (1) a 5 ml vody (3) a nanese se získaný extrakt. Kolona se opět promyje 3 ml vody (3) a následně se do čisté nádobky jímá směs stanovovaných analytů vymytých 3 ml metanolu (1). Takto získaný roztok se odpaří do sucha pod proudem dusíku při 40 °C a odparek se rozpustí v 1 ml kyseliny mravenčí (23).

6.1.2 Příprava kalibračních roztoků

6.1.2.1 Základní standardní roztok Zn-bacitracinu (1000 µg/ml).

Naváží se 10 mg Zn-bacitracinu (5), převede do 10ml odměrné baňky a rozpustí v metanolu (1). Poté se baňka doplní metanolem (1) po značku a promíchá.

6.1.2.2 Základní standardní roztok carbadoxu (200 µg/ml).

Naváží se 10 mg carbadoxu (6), převede se do 50ml odměrné baňky a rozpustí v metanolu (1). Poté se baňka doplní metanolem (1) po značku a promíchá.

6.1.2.3 Základní standardní roztok olachindoxu (1000 µg/ml).

Naváží se 10 mg olachindoxu (7), převede se do 10ml odměrné baňky a rozpustí v methanolu (1). Poté se baňka doplní methanolem (1) po značku a promíchá.

6.1.2.4 Základní standardní roztok tylosinu (1000 µg/ml).

Naváží 10 mg tylosinu (8), převede se do 10ml odměrné baňky a rozpustí v metanolu (1). Poté se baňka doplní metanolem (1) po značku a promíchá.

6.1.2.5 Základní standardní roztok virginiamycinu (1000 µg/ml).

Naváží se 10 mg virginiamycinu (9), převede se do 10ml odměrné baňky a rozpustí v metanolu (1). Poté se baňka doplní metanolem (1) po značku a promíchá.

6.1.2.6 Zásobní směsný roztok Zn – bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosinu a virginiamycinu (100 µg/ml).

Do 10ml odměrné baňky se odpipetuje 1 ml základního standardního roztoku Zn-bacitracinu (6.1.2.1), 5 ml základního standardního roztoku carbadoxu (6.1.2.2), 1 ml základního standardního roztoku olachindoxu (6.1.2.3), 1 ml základního standardního roztoku tylosinu (6.1.2.4) a 1 ml základního standardního roztoku virginiamycinu (6.1.2.5). Poté se baňka doplní acetonitrilem (2) po značku a promíchá.

6.1.2.7 Pracovní směsný roztok Zn-bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosinu a virginiamycinu (10 µg/ml).

Do 10ml odměrné baňky se odpipetuje 1 ml zásobního směsného roztoku (6.1.2.6). Poté se baňka doplní acetonitrilem (2) po značku a promíchá.

6.1.2.8 Kalibrační roztoky

Z pracovního směsného roztoku (6.1.2.7) se postupně odpipetuje (20; 40; 100; 200; 300) µl do sady 25ml odměrných baněk a doplní se po značku acetonitrilem (2). Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentracím (0,008; 0,016; 0,040; 0,080; 0,120) µg/ml Zn-bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosinu a virginiamycinu. Kalibrační roztoky se postupně nanášejí na chromatografickou kolonu. Z průměrných hodnot ploch píků odpovídajících jednotlivým kalibračním roztokům se sestrojí kalibrační křivka.

6.1.3 Chromatografické podmínky LC/MS/MS stanovení

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za separačních podmínek chromatografického systému, viz. tab. 1.

Tabulka č. 1. Chromatografické podmínky stanovení.

Kolona	Zorbax XDB C18, 5 µm, 150 mm × 4,6 mm
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Mobilní fáze	gradient eluentu A a B (19) dle tabulky 2
Celková doba analýzy	29 min
Průtok mobilní fáze	0,3 ml/min
Objem nástřiku	20 µl

Tab. č. 2. Gradientový program pro analýzu stanovení Zn-bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosinu a virginiamycinu v krmivech a premixech.

Čas (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	95	5
3	73	27
10	73	27
13,4	0	100
20	0	100
22	95	5
29	95	5

Tab č. 3. Retenční časy Zn-bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosinu a virginiamycinu za uvedených podmínek.

	Retenční čas (min)
Zn-bacitracin	14,3
Carbadox	11,1
Olachindox	9,6
Tylosin	17,8
Virginiamycin	19,2

MS podmínky

Pro identifikaci jednotlivých analytů byl použit MRM (multiple reaction monitoring) mód, sledováním dvou produktových iontů pocházejících z jednoho prekurzorového iontu. Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daného dceřiného iontu maximální, uvádí tabulka č. 4. Nastavení MRM parametrů jednotlivých přechodů jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 4. Parametry MS detektoru.

Ionizační mód	ESI+
Capilary voltage	2,8 kV
Cone voltage	35 V
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	350 °C
Desolvation gas flow	700 l/h
Cone gas flow	100 l/h
CID gas	argon, p = 2,4 mbar

Tabulka č. 5. MRM parametry pro analýzu Zn-bacitracinu, carbadoxu, olachindoxu, tylosinu a virginiamycinu v krmivech a premixech.

	Prekurzorový iont (m/z)	Produktový iont (m/z)	Cone voltage (V)	Kolizní energie (eV)
Zn-bacitracin A	474,9	356,2	20	26
		669,3	20	18
Carbadox	263,1	229,0	28	17
		230,9	28	15
Olachindox	264,2	221,2	28	18
		229,4	28	22
Tylosin A	916,5	174,2	45	55
		772,5	45	40
Virginiamycin M_1	526,3	337,1	30	30
		355,2	30	27

6.2 Postup – stanovení olachindoxu metodou HPLC

6.2.1 Příprava vzorku

Do 1000ml kónické baňky se naváží přibližně 50 g vzorku s přesností na 0,01 g. K navážce se přidá 100 ml metanolu (1) a baňka se umístí na 5 min do ultrazvukové lázně. Přidá se 410 ml vody (3) a ponechá se v ultrazvukové lázni dalších 15 min. Baňka se vyjme z ultrazvukové lázně a dále se míchá 30 min na míchacím zařízení. Poté se extrakt přefiltruje přes složený filtr. 10,0 ml filtrátu se přenese do 20ml odměrné baňky, doplní se vodou (3) po značku a promíchá. Poměrná část se přefiltruje přes membránový filtr.

6.2.2 Příprava kalibračních roztoků

6.2.2.1 Základní standardní roztok olachindoxu (250 μg/ml).

Do 200ml odměrné baňky se naváží 50 mg olachindoxu (7) s přesností na 0,1 mg a přidá se asi 190 ml vody (3). Baňka se vloží na 20 min do ultrazvukové lázně. Po vyjmutí z ultrazvukové lázně se roztok ochladí na laboratorní teplotu, doplní vodou (3) po značku a promíchá. Baňka se obalí hliníkovou fólií a uchová v chladničce.

6.2.2.2 Pracovní standardní roztok olachindoxu (25 μg/ml).

10 ml základního standardního roztoku (6.2.2.1) se převede do 100ml odměrné baňky, doplní po značku mobilní fází (20) a promíchá. Baňka se obalí hliníkovou fólií a uschová v chladničce.

6.2.2.3 Kalibrační roztoky.

Do sady 50ml odměrných baněk se pipetuje (1; 2; 5; 10; 15; 20) ml pracovního standardního roztoku olachindoxu (6.2.2.2), doplní se mobilní fází (20) po značku a promíchá. Tyto roztoky odpovídají (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0) μg/ml olachindoxu. Kalibrační roztoky se postupně nanášejí na chromatografickou kolonu. Z průměrných hodnot ploch píků odpovídajících jednotlivým kalibračním roztokům se sestrojí kalibrační křivka.

6.2.3 Chromatografické podmínky HPLC stanovení olachindoxu

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému, viz. tab. č. 6.

Tabulka č. 6. Chromatografické podmínky stanovení olachindoxu metodou HPLC.

Kolona	Zorbax XDB C18, 5 µm, 250 mm × 4,6 mm
Teplota kolony	28 °C
Mobilní fáze	viz (20)
Průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
Objem nástřiku	20 µl
Celková doba analýzy	10 min
Retenční čas	7,5 min
Detekční vlnová délka	380 nm

6.3 Postup – stanovení carbadoxu metodou HPLC

6.3.1 Příprava vzorku

6.3.1.1 Krmiva

Do 200ml kónické baňky se naváží 10 g vzorku s přesností na 0,01 g. K navážce se přidá 15 ml vody (3), promíchá se a nechá se 5 min stát. Poté se přidá 35 ml směsi metanolu a acetonitrilu (15), baňka se uzavře a 30 min se protřepává nebo míchá na magnetickém míchacím zařízení. Roztok se přefiltruje přes filtrační papír. Tento roztok se přečistí na koloně, do které se naváží 4 g oxidu hlinitého (14). Na takto připravenou skleněnou kolonu se nanese 15 ml přefiltrovaného extraktu a první 2 ml eluátu se odstraní. Následujících 5 ml se zachycuje, alikvotní část se přefiltruje přes filtr 0,45 µm.

6.3.1.2 Premixy (0,1 – 2,0) %

Do 200ml kónické baňky se naváží 1 g nemletého vzorku s přesností 0,001 g. Přidá se 15 ml vody (3), promíchá se a nechá se 5 min stát. Poté se přidá 35 ml směsi metanolu a acetonitrilu (15), baňka se uzavře a 30 min se protřepává nebo míchá na magnetickém míchacím zařízení. Roztok se filtruje přes filtrační papír. Alikvotní část filtrátu se odpipetuje do 50ml odměrné baňky. Přidá se 15 ml vody (3), doplní se po značku směsí metanolu a acetonitrilu (15)

a promíchá. Koncentrace carbadoxu v konečném roztoku je přibližně 10 µg/ml. Alikvotní část se přefiltruje přes filtr 0,45 µm.

6.3.1.3 Přípravky (> 2,0 %)

Do 250ml kónické baňky se naváží 0,2 g nemletého vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 45 ml vody (3), promíchá se a nechá se 5 min stát. Poté se přidá 105 ml směsi metanolu a acetonitrilu (15), baňka se uzavře a homogenizuje. Baňka se vloží na 15 min do ultrazvukové lázně a potom se 15 min třepe (3) nebo míchá na magnetickém míchacím zařízení (4). Roztok se přefiltruje přes filtrační papír. Alikvotní část filtrátu se zředí směsí vody, metanolu a acetonitrilu (24) tak, aby se získala koncentrace carbadoxu (10 – 15) µg/ml. Alikvotní část se přefiltruje přes filtr 0,45 µm.

6.3.2 Příprava kalibračních roztoků

6.3.2.1 Základní standardní roztok carbadoxu (100 µg/ ml)

Do 250ml odměrné baňky se naváží 25 mg carbadoxu (6) s přesností na 0,1 mg a rozpustí se ve směsi metanolu a acetonitrilu (15) v ultrazvukové lázni. Po působení ultrazvuku se roztok ochladí na laboratorní teplotu, doplní se směsí metanolu a acetonitrilu (15) po značku a promíchá. Baňka se obalí hliníkovou fólií a uschová v chladničce.

6.3.2.2 Kalibrační roztoky

Do sady 100ml odměrných baněk se odpipetuje (2; 5; 10; 20) ml základního standardního roztoku carbadoxu (6.3.2.1). Přidá se po 30 ml vody, doplní se po značku směsí metanolu a acetonitrilu (15) a promíchá. Tyto roztoky obsahují (2,0; 5,0; 10,0; 20,0) µg carbadoxu v 1 ml.

6.3.3 Chromatografické podmínky HPLC stanovení carbadoxu

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému, viz. tab. č. 7.

Tabulka č. 7. Chromatografické podmínky stanovení carbadoxu metodou HPLC.

Kolona	Nova Pak^{R} C18, 300 mm × 3,9 mm (5.9)
Teplota kolony	28 °C
Mobilní fáze	viz 4.21
Průtok mobilní fáze	1,0 ml/min
Objem nástřiku	20 µl
Celková doba analýzy	10 min
Retenční čas	4,1 min
Detekční vlnová délka	365 nm

7 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah nepovolené látky (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{c \times V \times R}{m}$$

c je koncentrace nepovolené látky ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu (mg/l),

V objem extrakční směsi (ml),

m hmotnost zkušebního vzorku (g),

R ředění resp. zakoncentrování.

8 Interpretace validačních parametrů

8.1 Interpretace validačních parametrů

Pro vyhodnocení validačních parametrů byl použit software Effivalidation 3,0.

Opakovatelnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty, které způsobují náhodné chyby. Opakovatelnost byla stanovena ze čtyř navážek krmiva a čtyř navážek premixů při užití metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a tří navážek krmiv a tří navážek premixů při měření pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí.

Tabulka č. 8. Opakovatelnost metody – naměřené údaje – LC/MS/MS.

Měření / **Analyt**	**Hladina**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Bacitracin (mg/kg)	1	1,6949	1,5766	1,7325	1,6501	1,4152	1,5130	1,7370	1,5842
	2	4,3671	4,9679	4,3124	4,8218	4,6921	4,6673	4,5535	3,8390
	3	8,9619	8,6260	9,3782	8,9777	8,6597	8,5266	8,7113	8,4193
Carbadox (mg/kg)	1	1,2895	1,2619	1,2359	1,3141	1,1867	1,2562	1,3486	1,2883
	2	3,7975	4,1262	3,8934	3,7272	4,0898	4,0906	3,7760	3,8668
	3	7,5286	7,4957	7,3832	7,5099	7,0945	7,5196	7,7191	7,7537
Olachindox (mg/kg)	1	1,7709	1,3147	1,4792	1,7892	1,6726	1,6144	1,4703	1,6647
	2	3,0912	3,1192	3,4680	2,7821	2,7885	2,4050	2,3844	2,1047
	3	5,4776	5,3758	5,1115	4,3652	4,4297	4,4000	5,6287	5,9859
Tylosin (mg/kg)	1	0,6640	0,6139	0,6206	0,6266	0,5911	0,5654	0,6225	0,5583
	2	2,5828	2,3446	2,2924	2,0933	1,7323	1,8118	1,9915	2,1139
	3	4,0022	4,2284	4,2706	3,8967	3,9630	3,6067	3,4963	4,2562
Virginiamycin (mg/kg)	1	1,8124	1,8414	1,7512	1,6560	1,6594	1,5450	1,7198	1,7424
	2	3,3269	3,7586	3,9511	3,6092	4,2045	3,8568	3,9393	3,8760
	3	8,5590	9,1264	8,4895	8,7962	8,8653	8,6726	8,6919	8,4491

Tabulka č. 9. Opakovatelnost metody – statistické parametry – LC/MS/MS.

n = 8.

Analyt	Hladina	Průměr (mg/kg)	Opakovatelnost (mg/kg)	Rel. opakovatelnost (%)
Bacitracin	1	1,61294	0,11277	6,99
	2	4,52786	0,35365	7,81
	3	8,78259	0,30873	3,52
Carbadox	1	1,27640	0,05667	4,44
	2	3,92094	0,15897	4,05
	3	7,49679	0,21277	2,84
Olachindox	1	1,59700	0,16362	10,25
	2	2,76789	0,45313	16,37
	3	5,09680	0,62818	12,32
Tylosin	1	0,60780	0,03476	5,72
	2	2,12033	0,28206	13,30
	3	3,96501	0,29318	7,39
Virginiamycin	1	1,71595	0,09488	5,53
	2	3,81530	0,26047	6,83
	3	8,70625	0,22234	2,55

Tabulka č. 10. Opakovatelnost analytické metody – LC/MS/MS.

Analyt	Opakovatelnost (mg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
Bacitracin	0,27875	6,38
Carbadox	0,15680	3,84
Olachindox	0,45706	13,23
Tylosin	0,23574	9,39
Virginiamycin	0,20517	5,28

Tabulka č. 11. Opakovatelnost metody, Carbadox – naměřené údaje – HPLC/UV.

Měření / **Analyt**	**Hladina**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Carbadox (mg/kg)	1	4,9852	5,1295	4,8965	4,7252	4,9824	5,1479
	2	15,5685	15,5053	15,5037	15,6814	15,4967	14,5248
	3	49,6674	49,5297	50,4884	51,0763	50,5817	51,8912
	4	101,9582	100,6601	99,2334	98,8092	99,2304	98,5555

Tabulka č. 12. Opakovatelnost metody, Carbadox – statistické parametry –HPLC/UV. n = 6.

Analyt	**Hladina**	**Průměr (mg/kg)**	**Opakovatelnost (mg/kg)**	**Rel. opakovatelnost (%)**
Carbadox	1	4,989	0,15847	3,18
	2	15,380	0,42482	2,76
	3	50,539	0,88385	1,75
	4	99,741	1,30788	1,31

Tabulka č. 13. Opakovatelnost analytické metody, Carbadox – HPLC/UV.

Analyt	**Opakovatelnost (mg/kg)**	**Relativní opakovatelnost (%)**
Carbadox	0,82118	2,37

Tabulka č. 14. Opakovatelnost metody, Olachindox – naměřené údaje – HPLC/UV.

Měření / **Analyt**	**Hladina**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Olachindox (mg/kg)	1	4,98664	5,13295	4,92109	4,98998	5,11979	5,01046
	2	14,38344	14,09957	14,33770	13,43459	13,61778	13,46079
	3	45,95132	45,43716	46,25404	46,92181	45,20045	44,98008
	4	96,26677	97,33697	98,11157	94,1845	94,45698	94,93394

Tabulka č. 15. Opakovatelnost metody, Olachindox – statistické parametry –HPLC/UV. n = 6.

Analyt	Hladina	Průměr (mg/kg)	Opakovatelnost (mg/kg)	Rel. opakovatelnost (%)
Olachindox	1	5,027	0,08286	1,65
	2	13,889	0,43671	3,14
	3	45,791	0,72806	1,59
	4	95,881	1,61621	1,69

Tabulka č. 16. Opakovatelnost analytické metody, Olachindox – HPLC/UV.

Analyt	Opakovatelnost (mg/kg)	Relativní opakovatelnost (%)
Olachindox	0,91376	2,12

8.1.1 Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s deklarovanou referenční hodnotou. Správnost byla zjišťována testem výtěžnosti, kdy k přesně známé navážce vzorku, který neobsahuje stanovovanou látku, byl přidán roztok čistého standardu v množství odpovídajícím (1,0; 2,5; 5,0) mg/kg obsahu analytu v původním vzorku krmiva za použití metody LC/MS/MS. Při metodě HPLC/UV byl k navážce vzorku přidán přídavek odpovídající (5,03; 15,09; 50,31; 100,62) mg/kg obsahu carbadoxu a (4,87; 14,61; 48,71; 99,08) mg/kg obsahu olachindoxu. Z naměřených dat byla zpětně vypočtena výtěžnost celé metody. T-test prokázal normální rozdělení dat uvedených v tabulce a nebyla prokázána při použití Cochranova, Dixonova a Grubsova testu přítomnost odlehlých bodů.

Tabulka č. 17. Správnost – naměřené hodnoty – LC/MS/MS.

Analyt	Hladina	Předloženo (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)					
Bacitracin	1	1	1,0898	0,9549	1,0306	0,9584	1,0111	1,0262
	2	2,5	2,5018	2,4793	2,4757	2,5214	2,5544	2,4818
	3	5	5,1339	5,1291	5,1211	5,0633	5,0086	4,9346
Carbadox	1	1	1,0604	1,0980	1,0724	1,0456	0,9682	0,9593
	2	2,5	2,4812	2,4567	2,4897	2,5819	2,5661	2,4778
	3	5	5,1718	5,1120	5,1144	5,0363	5,2152	4,9239
Olachindox	1	1	1,0166	0,9937	1,0362	1,0958	1,0594	0,9887
	2	2,5	2,5889	2,4734	2,6968	2,2967	2,6074	2,5994
	3	5	5,0279	5,1515	4,9410	4,8774	5,3562	5,0354
Tylosin	1	1	1,0278	0,9631	0,9503	1,0268	0,9637	0,9594
	2	2,5	2,4254	2,4124	2,4401	2,5734	2,5396	2,5533
	3	5	4,9591	5,1381	4,7960	4,7507	4,5528	4,6596
Virginiamycin	1	1	0,9300	0,9690	0,9644	0,9292	1,0108	1,0982
	2	2,5	2,3201	2,4219	2,4095	2,3646	2,5911	2,2610
	3	5	5,2568	5,2678	5,0543	5,0200	4,5953	4,6899

Tabulka č. 18. Správnost – statistické parametry – LC/MS/MS.

n = 6.

Analyt	Hladina	Předloženo (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg/kg)	t-vyp	t- krit	Hypotéza
Bacitracin	1	1	1,0112	101,18	0,05047	0,574	2,571	přijata
	2	2,5	2,5024	100,10	0,03078	0,191	2,571	přijata
	3	5	5,0651	101,30	0,08024	1,987	2,571	přijata
Carbadox	1	1	1,0334	103,40	0,05712	1,457	2,571	přijata
	2	2,5	2,5089	100,36	0,05182	0,421	2,571	přijata
	3	5	5,0956	101,91	0,10366	2,259	2,571	přijata
Olachindox	1	1	1,0317	103,17	0,04103	1,894	2,571	přijata
	2	2,5	2,5438	101,75	0,14041	0,764	2,571	přijata
	3	5	5,0649	101,30	0,17035	0,933	2,571	přijata
Tylosin	1	1	0,9819	98,19	0,03553	1,252	2,571	přijata
	2	2,5	2,4907	99,63	0,07226	0,315	2,571	přijata
	3	5	4,8094	96,19	0,21089	2,214	2,571	přijata
Virginiamycin	1	1	0,9836	98,36	0,06370	0,631	2,571	přijata
	2	2,5	2,3947	95,79	0,11303	2,282	2,571	přijata
	3	5	4,9807	99,61	0,28239	0,168	2,571	přijata

Tabulka č. 19. Správnost, Carbadox – naměřené hodnoty – HPLC/UV.

Analyt	Hladina	Předloženo (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)					
Carbadox	1	5,03	4,9852	5,1395	4,8965	4,7252	4,9824	5,1479
	2	15,09	15,5685	15,5053	15,5037	15,6814	15,4967	14,5248
	3	50,31	49,6674	49,5267	50,4884	51,0763	50,5817	51,8912
	4	100,62	101,9582	100,6601	99,2334	98,8092	99,2304	98,5555

Tabulka č. 20. Správnost, Carbadox – statistické parametry – HPLC/UV.

n = 6.

Analyt	Hladina	Předloženo (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg/kg)	t-vyp	t- krit	Hypotéza
Carbadox	1	5,03	4,97945	99,00	0,15847	0,781	2,571	přijata
	2	15,09	15,38007	101,92	0,42482	1,673	2,571	přijata
	3	50,31	50,53863	100,45	0,88385	0,634	2,571	přijata
	4	100,62	99,74117	99,13	1,30788	1,646	2,571	přijata

Tabulka č. 21. Správnost, Olachindox – naměřené hodnoty – HPLC/UV.

Analyt	Hladina	Předloženo (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)		
Olachindox	1	4,87	4,9866	5,1330	4,9211
	2	14,61	14,3834	14,0996	14,3377
	3	48,71	47,5289	48,2587	47,9871
	4	99,08	96,2668	97,3370	98,1116

Tabulka č. 22. Správnost, Olachindox – statistické parametry – HPLC/UV.
n = 3.

Analyt	Hladina	Předloženo (mg/kg)	Nalezeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Přesnost (mg/kg)	t-vyp	t- krit	Hypotéza
Olachindox	1	4,8708	5,01356	102,93	0,10847	2,280	4,303	přijata
	2	14,6124	14,27357	97,68	0,15241	3,851	4,303	přijata
	3	48,7080	47,92490	98,39	0,36885	3,677	4,303	přijata
	4	99,0792	97,23844	98,14	0,92634	3,442	4,303	přijata

8.1.2 Linearita metody

Linearita kalibrační křivky byla ověřena v rozsahu koncentrací (0,008 – 0,120) µg/ml v 5 kalibračních hladinách (0,008; 0,016; 0,040; 0,080; 0,120 µg/ml) pro metodu LC/MS/MS. Stanovení linearity kalibrační křivky carbadoxu metodou HPLC/UV bylo ověřeno v rozsahu koncentrací (2,0 – 20,0) µg/ml ve 4 kalibračních hladinách (2,0; 5,0; 10,0; 20,0 µg/ml). Pro stanovení linearity křivky olachindoxu metodou HPLC/UV bylo užito 6 kalibračních hladin (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0) µg/ml v rozsahu koncentrací (0,5 – 10,0) µg/ml. Požadavek na linearitu křivky je dán korelačním koeficientem a vyhodnocením kalibrační křivky pomocí QC testu.

Tabulka č. 23. Linearita – naměřené hodnoty – LC/MS/MS.

c (µg/ml) Analyt		0,008	0,016	0,040	0,080	0,120
Bacitracin	plocha 1	92,8	178,2	429,4	956,3	1304,7
	plocha 2	90,1	182,0	455,4	888,2	1313,9
	plocha 3	109,8	178,1	386,5	896,9	1369,9
Carbadox	plocha 1	541,4	1089,3	2870,6	5784,0	8898,4
	plocha 2	486,1	1033,3	2640,3	6039,0	8937,4
	plocha 3	536,8	1140,4	2612,0	6220,3	9242,8
Olachindox	plocha 1	151,4	361,8	965,4	2079,0	3057,4
	plocha 2	153,3	320,3	996,0	2094,8	2994,4
	plocha 3	107,9	295,8	928,2	2261,5	3055,6
Tylosin	plocha 1	937,5	1817,9	4659,8	11652,8	16155,7
	plocha 2	935,2	1876,5	5268,3	11498,6	16184,7
	plocha 3	938,0	1776,9	5502,6	11527,0	16618,1
Virginiamycin	plocha 1	1078,2	2325,1	5530,8	11648,7	16485,9
	plocha 2	1143,3	2337,5	5437,7	11346,4	16664,0
	plocha 3	1121,4	2219,7	5309,8	11179,4	16871,4

Tabulka č. 24. Linaerita – statistické parametry – LC/MS/MS.

Analyt	Vypočítaný korelační koeficient	Testovaný korelační koeficient	Vypočítaný QC	Testovaný QC	Hypotéza
Bacitracin	0,99949	0,99000	2,83	5,00	přijata
Carbadox	0,99956	0,99000	2,74	5,00	přijata
Olachindox	0,99872	0,99000	4,74	5,00	přijata
Tylosin	0,99954	0,99000	2,72	5,00	přijata
Virginiamycin	0,99933	0,99000	3,31	5,00	přijata

Tabulka č. 25. Linearita, Carbadox – naměřené hodnoty – HPLC/UV.

c (µg/ml) Analyt		2,0	5,0	10,0	20,0
Carbadox	Plocha 1	158,9	352,9	639,3	1347,0
	Plocha 2	158,8	352,1	641,6	1348,5
	Plocha 3	159,9	351,3	639,3	1351,0

Tabulka č. 26. Linaerita, Carbadox – statistické parametry – HPLC/UV.

Analyt	Vypočítaný korelační koeficient	Testovaný korelační koeficient	Vypočítaný QC	Testovaný QC	Hypotéza
Carbadox	1,00000	0,99000	0,11	5,00	přijata

Tabulka č. 27. Linearita, Olachindox – naměřené hodnoty – HPLC/UV.

c (µg/ml) Analyt		0,5	1,0	2,5	5,0	7,5	10,0
Olachindox	plocha 1	20,24	41,50	83,77	169,42	255,02	339,97
	plocha 2	20,08	40,91	81,88	168,27	256,52	339,15
	plocha 3	20,03	40,60	81,96	168,12	254,25	338,61

Tabulka č. 28. Linaerita, Olachindox – statistické parametry – HPLC/UV.

Analyt	Vypočítaný korelační koeficient	Testovaný korelační koeficient	Vypočítaný QC	Testovaný QC	Hypotéza
Olachindox	0,99998	0,99000	0,48	5,00	přijata

Na základě hodnot korelačního a QC koeficientu byla prokázána linearita metody.

8.1.3 Citlivost

Citlivost metody je definována jako rozdíl v koncentraci analytu, který odpovídá nejmenšímu rozdílu, jenž může být ještě detekován při odezvě instrumentace metody. Je dána změnou signálu, vyvolanou jednotkovou změnou validované vlastnosti, tj. směrnicí kalibrační přímky.

Tabulka č. 29. Citlivost – LC/MS/MS.

Analyt	Citlivost metody (plocha/mg)
Bacitracin	11137,9
Carbadox	76543,1
Olachindox	26406,1
Tylosin	956831,8
Virginiamycin	140231,6

Tabulka č. 30. Citlivost, Carbadox – HPLC/UV.

Analyt	Citlivost metody (plocha/mg)
Carbadox	67,1

Tabulka č. 31. Citlivost, Olachindox – HPLC/UV.

Analyt	Citlivost metody (plocha/mg)
Olachindox	32,9

8.1.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) je úroveň, nad kterou lze odezvu vzorku odlišit od odezvy slepého pokusu. Mez stanovitelnosti (LOQ) je úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení.

Tabulka č. 32. Mez detekce a mez stanovitelnosti – LC/MS/MS.

Analyt	Mez detekce (mg/kg)	Mez stanovitelnosti (mg/kg)
Bacitracin	0,1	0,2
Carbadox	0,1	0,2
Olachindox	0,1	0,2
Tylosin	0,1	0,2
Virginiamycin	0,1	0,2

Tabulka č. 33. Mez detekce a mez stanovitelnosti, Carbadox – HPLC/UV.

Analyt	Mez detekce (mg/kg)	Mez stanovitelnosti (mg/kg)
Carbadox	1,0	5,0

Tabulka č. 34. Mez detekce a mez stanovitelnosti, Olachindox – HPLC/UV.

Analyt	Mez detekce (mg/kg)	Mez stanovitelnosti (mg/kg)
Olachindox	1,0	5,0

9 Závěr

V rámci práce na téma Stanovení bacitracinu, tylosinu, carbadoxu, olachindoxu a virginiamycinu metodou LC-MS/MS byly stanoveny tyto validační parametry: opakovatelnost, správnost, linearita, citlivost, mez detekce a mez stanovitelnosti. Při přípravě vzorku byly zkoušeny dva postupy přečištění extraktu. Jako vnodnější se ukázal postup A. Součástí práce bylo i porovnání metody LC-MS/MS, která je vysoce selektivní, citlivá a vhodná pro stanovení minimálních obsahů nepovolených doplňkových látek ve vzorku s klasickou metodou za použití UV detektoru. I tato metoda prokázala způsobilost k používání, je vhodná pro ověřování případného výskytu nepovolené doplňkové látky.

10 Literatura

1. Van Poucke, C.; De Keyser, K.; Baltusnikiene, A.; McEvoy, J.D.G.; Van Peteghem, C. Liquid chromatographic – tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed. Analytica Chimica Acta, **2003,** *483,* 99-109.
2. Van Rhijn, H.; Zuidema, T. Tylosin, Spiramycin, Virginiamycin, Carbadox and Olaquindox – Confirmatory analysis by LC-MS/MS. Simbag feed, Final method description, **2000.**
3. Nařízení komise (ES) č. 152/2009, Příloha VIII, postup B, 113-116.
4. Nařízení komise (ES) č. 152/2009, Příloha VIII, postup D, 120-125.
5. Centner V. Uživatelská příručka EffiValidation 3.0, EffiChem, 1999-2005.
6. Dibner, J. J.; Richards, J. D. Antibiotic Growth in Agriculture: History and Mode of Action. Poultry Science Association, Inc, **2005,** *84,* 634-643.
7. http://www.ukzuz.cz/Folders/Articles/108374-2-seznam+zkouseni+krmiv.aspx

Vývoj kalibrační rovnice pro vybrané parametry v luštěninách metodou FT-NIR spektroskopie

David Čižmár, Radvana Šulová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
david.cizmar@ukzuz.cz

1 Souhrn

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

2 Úvod

Luštěniny jsou spolu s obilovinami 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 9 tisíci lety. Do střední Evropy se pak následně rozšířily 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, nahrazující 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 100 gramů luštěnin pokryje denní potřebu aminokyselin u dospělého člověka. Luštěniny obsahují hodnotný tuk s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin a minimum nasycených mastných kyselin. Tuk luštěnin působí proti arteroskleróze (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 obsahují však i látky, které jsou pro člověka nevhodné. Mezi takové látky patří například lectinový hemaglutinin, který lze z luštěnin ovšem 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. 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 v hrachu [3].

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

Forma	Hrách setý	Dřeňový hrách	Hrách setý
	U.g $^{-1*}$		TIA mg $^{-1}$ sušiny
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 především 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 č. 1. Hrách setý [1].



Cílem této práce bylo vytvořit a optimalizovat kalibrační modely pro stanovení sušiny, dusíkatých látek (N-látek), škrobu, trypsin inhibitor aktivity (TIA), vařivosti a bobtnavosti metodu NIR spektroskopie a zároveň 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, bobtnací schopnosti a vařivosti

Vytvoření NIR kalibračního modelu pro daný parametr spočívá ve vztažení informace získané absorpcí v NIR oblasti s hodnotou stanovenou laboratorní referenční metodou (LRM) do vzájemného poměru a získání regresní závislosti.
V následující části jsou velmi stručně popsány klasické laboratorní metody mokré chemie, pomocí kterých byly získány referenční hodnoty použité pro kalibraci NIR spektrometru. Výsledek referenčních hodnot v kalibraci 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.

Stanovení bobtnací schopnosti [7]

Bobtnavost hrachů na zrno je výrazem schopnosti měnit konzistenci. Rychlost bobtnání, vyjadřuje množství přijaté vody za 6 h bobtnání při teplotě 20 ºC.

Stanovení vařivosti – finometricky [7]

Uvedeným postupem je možno porovnat bobtnavost jednotlivých odrůd hrachu a posoudit jejich vhodnost k vaření.

Vzorek se nechá bobtnat 24 h a poté se uvaří za podmínek definovaných v metodě. Měřením na finometru se stanoví síla, která je potřebná k tomu, aby systém trnů finometru prošel takto připraveným vzorkem.

3.2. Stanovení metodou NIR spektroskopie

Pro vytvoření přesného NIR kalibračního modelu je obecně základním požadavkem dostatečný počet analyzovaných vzorků. Rozsah analyzovaných vzorků odrůdového zkušebnictví klasickými laboratorními metodami (LRM) je mimořádný, ÚKZÚZ je v rámci ČR zcela ojedinělým pracovištěm zaměřeným na tento typ laboratorního testování, proto byl požadavek na množství vzorků pro vytvoření dostatečně robustních kalibračních modelů spolehlivě splněn. V případě hrachu setého bylo proměřeno přibližně 230 vzorků pro kalibraci parametru sušiny a N-látek, 90 vzorků na parametr škrob, 22 vzorků na parametr TIA a 30 vzorků na parametry bobtnací schopnost a vařivost. Vzorky použité na kalibraci NIR spektrometru pocházely ze všech regionálních pracovišť ÚKZÚZ a byly nashromážděny za období asi 2 let.

Všechny vzorky hrachu pro stanovení všech parametrů kromě parametru vařivost a bobtnací schopnost byly před měřením pomlety na laboratorním mlýnku VM-7 (Minirazant) a následně prosety přes síto 1 mm. NIR spektra takto připravených vzorků byla nasnímána v křemenných kyvetách o průměru 3 cm v režimu reflektance. Vzorky hrachu pro stanovení vařivosti a bobtnací schopnosti byly nasnímány v křemenných kyvetách o průměru 12 cm. 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) v 0,5nm intervalech v rozsahu vlnových délek (1000 – 2500) nm. Každý vzorek byl změřen dvakrát, pro další vývoj kalibračního modelu pak bylo použito průměrné spektrum.

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

Tabulka č. 2. Složení vzorků hrachu setého použitých pro kalibraci přístroje Nicolet Antaris měřených v reflektanci.

	Sušina (%)	N-látky (%/s)	Škrob (%/s)	TIA (mg/g)	Bobtnavost (%)	Vařivost (F º)
N_K (počet vzorků)	230	230	90	22	30	30
Minimum	88,14	20,10	48,30	2,80	50	3,0
Maximum	92,41	27,88	55,17	5,80	75	18,5
Průměr	90,88	23,61	52,47	4,12	61	9,6

Důležitým předpokladem vytvoření úspěšného kalibračního modelu je dostatečná přesnost laboratorní referenční metody používané pro kalibraci NIR spektrometru. Výsledky referenčních hodnot obou parametrů získaných klasickými metodami mokré chemie jsou prezentovány jako průměr paralelních stanovení.

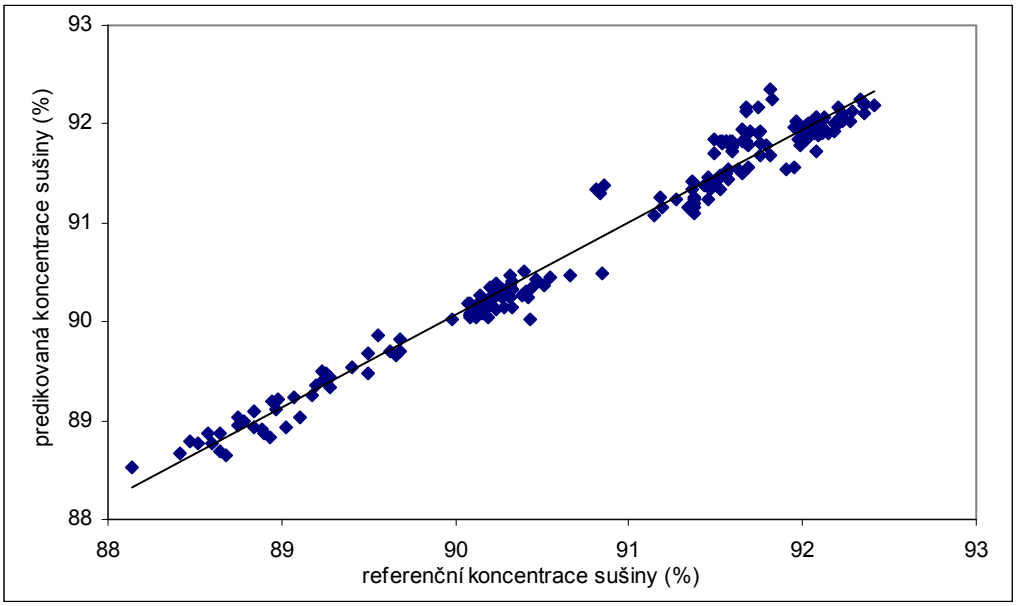
V prvním kroku před vlastní regresní tvorbou kalibračního modelu byla na jednotlivé soubory kalibračních spekter (vzorků) aplikována matematická korekce spekter SNV, která eliminuje vliv velikosti částic. Tento krok je velmi důležitý u vzorků, které před vlastní NIR analýzou prošly úpravou sítováním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

Takto 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, 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.

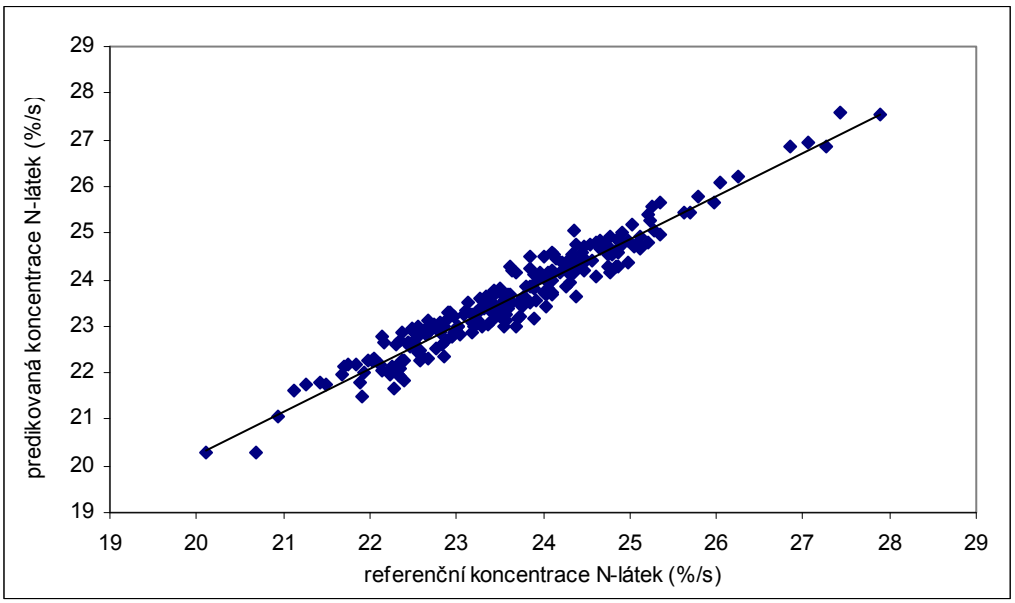
4 Výsledky a diskuse

Vytvořené kalibrační závislosti pro sušinu, N-látky, škrob, TIA, bobtnací schopnost a vařivost v hrachu setém jsou zobrazeny na obr. č. 2 až 7.

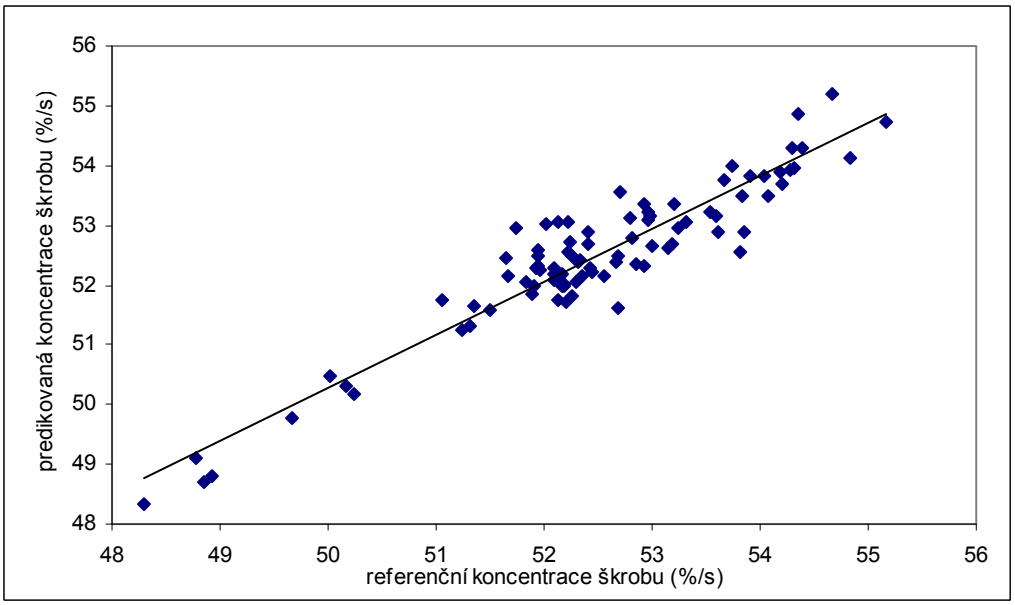
Obrázek č. 2. Kalibrační závislost pro parametr sušina (%).



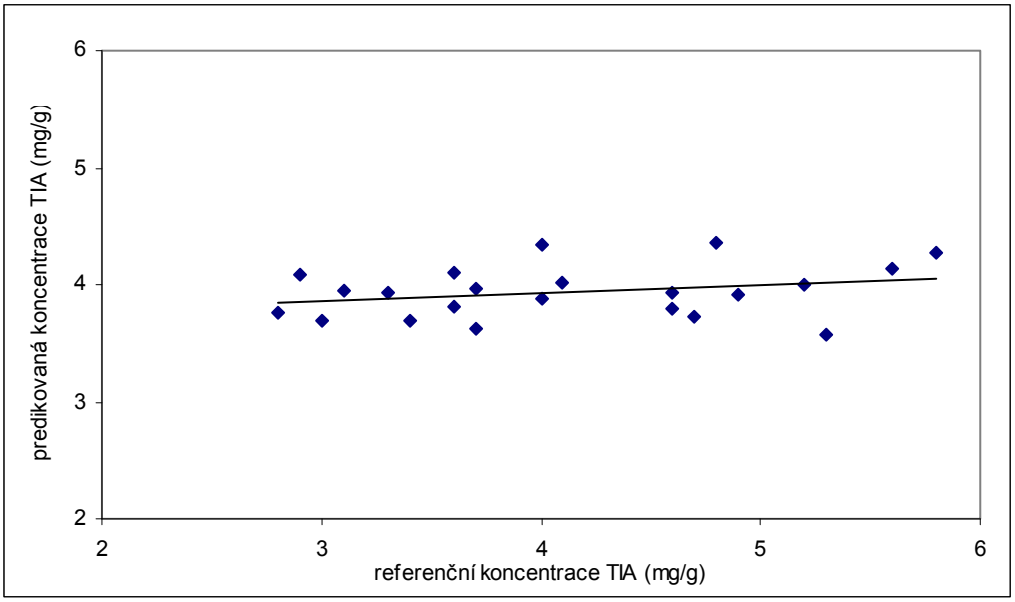
Obrázek č. 3. Kalibrační závislost pro parametr N-látky (%/s).



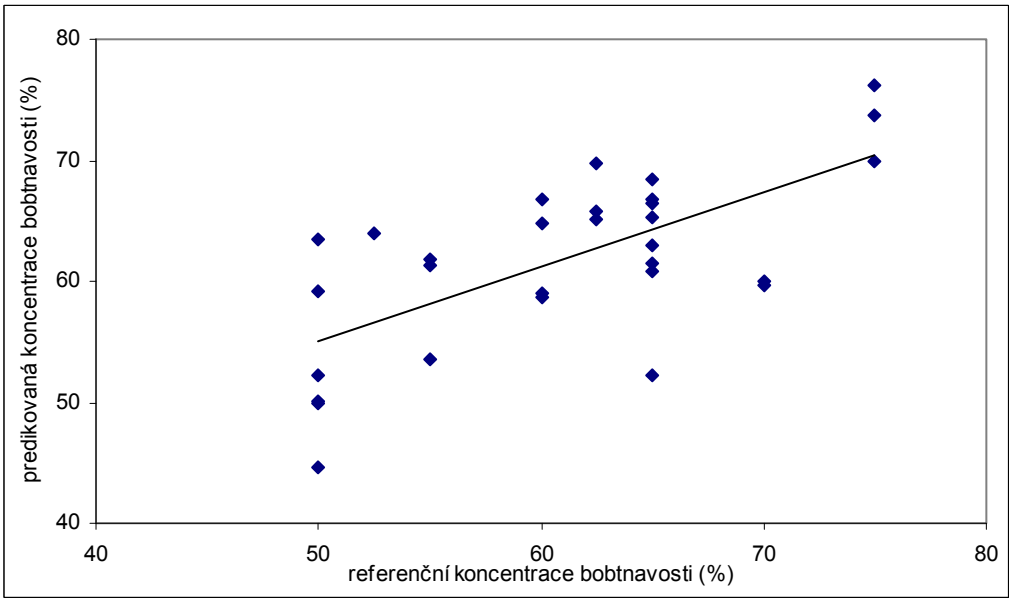
Obrázek č. 4. Kalibrační závislost pro parametr škrob (%/s).



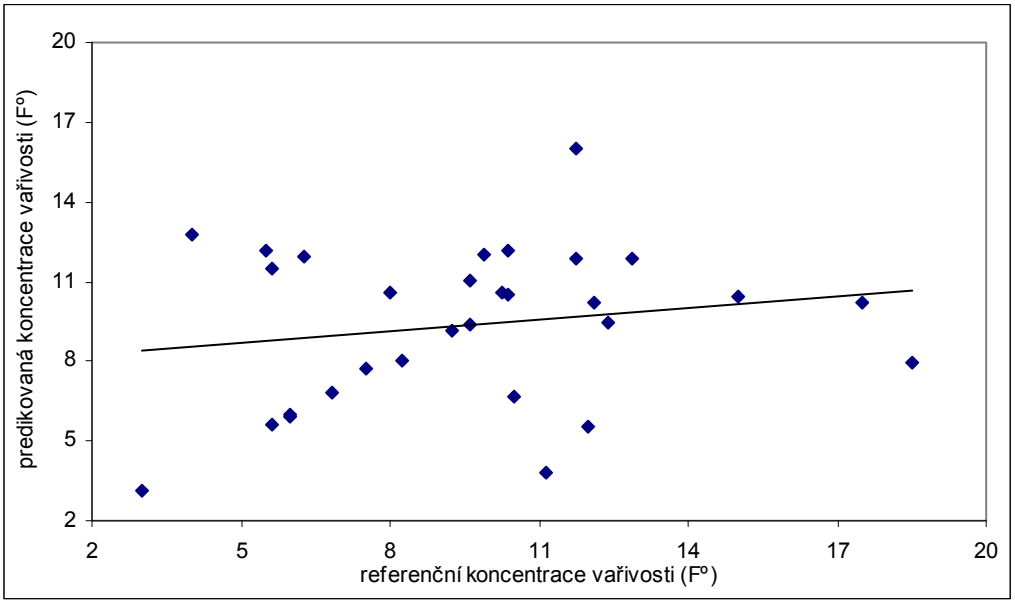
Obrázek č. 5. Kalibrační závislost pro parametr TIA (mg/g).



Obrázek č. 6. Kalibrační závislost pro parametr bobtnací schopnost (%).



Obrázek č. 7. Kalibrační závislost pro parametr vařivost (Fº).



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

Tabulka č. 3. Kvalitativní parametry kalibračních modelů vzorků hrachu setého.

Parametr	**RMSECV**	**R**
Sušina (%)	0,20	0,99
N-látky (%/s)	0,34	0,97
Škrob (%/s)	0,80	0,94
TIA (mg/g)	0,90	0,26
Bobtnací schopnost (%)	6,30	0,67
Vařivost (Fº)	2,20	0,18

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

Z tabulky č. 3 je zřejmé, že pro stanovení obsahu sušiny, N-látek a škrobu byly získány nejvyšší hodnoty korelačního koeficientu. Pro bobtnací schopnost a především pro TIA a vařivost byly získány velmi nízké hodnoty korelačního koeficientu.

TIA nelze metodou NIR stanovit, protože tento parametr je charakterizován enzymovou aktivitou. Bobtnací schopnost a vařivost rovněž nelze metodou NIR stanovit. Metoda NIR spektroskopie není vhodná pro stanovení minoritních složek.
Z těchto získaných výsledků vyplývá, že TIA, bobtnací schopnost a vařivost lze stanovit pouze klasickou metodou (LRM). Proto se s těmito parametry dále nepočítá při porovnávání výsledků dvou analytických metod.

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 NIR spektroskopie na testování shodnosti výsledků se ověřovala nulová hypotéza, že rozdíl $|\bar{x}_A - \bar{x}_B|$ není statisticky významný na zvolené hladině významnosti $\alpha = 0{,}05$. Pro testování shodnosti byl použit Studentův test *t* [8]. Vypočtené hodnoty *t* testu byly porovnány s kritickou hodnotou t_α. Získané výsledky pro jednotlivé parametry prezentuje tabulka č. 4.

Tabulka č. 4. Kvalitativní parametry porovnání 2 analytických metod.

Parametr	**k**	$\bar{x}_A$ **(LRM)**	$\bar{x}_B$ **(NIR)**	**α**	**t**	$\mathbf{t_{\alpha(0,05)}}$
Sušina (%)	16	88,797	89,139	0,05	0,2881	2,1314
N-látky (%/s)	16	22,5	22,642	0,05	2,0179	2,1314
Škrob (%/s)	13	50,774	51,496	0,05	1,5065	2,1788

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

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

5 Závěr

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

Z prezentovaných grafů kalibračních závislostí a hodnot kvalitativních parametrů vytvořených kalibračních modelů (RMSECV, R) je zřejmé, že nejvyšších hodnot R bylo dosaženo pro stanovení základních nutričních parametrů, jako jsou sušina, N-látky a škrob (0,99; 0,97; 0,94). Nejnižší hodnoty R byly získány pro stanovení parametrů TIA, bobtnací schopnosti a vařivosti (0,26; 0,67; 0,18). Tato skutečnost byla pravděpodobně způsobena tím, že metoda NIR spektroskopie není příliš vhodná pro stanovení velmi nízkých koncentrací složek, které v tomto případě jsou založené na aktivitě enzymů, v případě vařivosti a bobtnavosti se jedná o možnost vázat vodu vzorkem hrachu a následně měnit jeho konzistenci.

Predikční schopnosti kalibračních modelů a tedy i porovnání 2 analytických metod byly ověřeny již pouze pro parametry sušina, N-látky a škrob. Z prezentovaných výsledků parametrů sušina, N-látky a škrob je zřejmé, že metoda NIR spektroskopie je vhodná 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.

5 Oxidačně redukční procesy v půdách

Ivo Honsa
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Bílokostelecká 208, 463 31 Chrastava

Oxidačně-redukční reakce (redox-reakce) prvků Fe, Mn, C, N a S se podílejí na množství chemických a biologických procesů v půdách. U některých vodních organismů se uplatňuje např. i V.

5.1 Všeobecně

Některé základní pojmy vyplývající z teorie oxidačně-redukčních rovnováh:

jako <u>oxidace</u> se označuje odevzdání nebo ztráta elektronů popř. snížení elektronové hustoty u organických sloučenin,

jako <u>redukce</u> pak příjem elektronů.

U reakcí podle rovnic (1) – (4), probíhají-li zleva doprava, jde o oxidaci, v opačném směru o redukci: E^0 (V)

$$\overset{-2}{H_2S_{aq}} \leftrightarrow \overset{0}{S^0} + 2\,H^+ + 2\,e^-; \quad +0{,}142 \qquad (1)$$

$$\overset{+2}{Fe^{2+}} + 3\,H_2O \leftrightarrow \overset{+3}{Fe}(OH)_3 + 3\,H^+ + e^-; \quad +1{,}058 \qquad (2)$$

$$\overset{+2}{Mn^{2+}} + 2\,H_2O \leftrightarrow \overset{+4}{Mn}O_2 + 4\,H^+ + 2\,e^-; \quad +1{,}225 \qquad (3)$$

$$2\overset{-2}{H_2O} \leftrightarrow \overset{0}{O_2} + 4\,H^+ + 4\,e^-; \quad +1{,}229 \qquad (4)$$

Rovnice představují tzv. <u>poloreakce</u> oxidačně-redukčních (redox, též konjugovaných) párů (např. H_2S – S^0). Na pravé straně je oxidovaná forma (Ox) a počet (n) uvolněných elektronů, na levé straně je redukovaná forma: Red = Ox + n e^-.

Spojením dvou poloreakcí (např. rovn. 1 + 2 popř. 2 + 4) vzniká úplná reakční rovnice např. pro redukci Fe $(OH)_3$ působením H_2S nebo oxidaci Fe^{2+} vlivem O_2:

$$2\overset{+3}{Fe}(OH)_3 + \overset{-2}{H_2S} + 4\,H^+ = 2\overset{+2}{Fe^{2+}} + \overset{0}{S_2} + 6\,H_2O \qquad (5)$$

$$4\overset{+2}{Fe^{2+}} + \overset{0}{0_2} + 10\,H_2O = 4\overset{+3}{Fe}(OH)_3^{-2} + 8H^+ \qquad (6)$$

Z rovnic (5) a (6) vyplývá, že oxidace jedné látky je vždy spojena s redukcí látky jiné. Proto má tento proces označení oxidačně-redukční (redox) reakce.

Jako měřítko pro poměr koncentrací (správněji aktivit) oxidovaných a redukovaných látek v soustavě se používá redoxpotenciál E [V]. Ten se měří v roztoku obsahujícím oba oxidační stupně jedné látky jako elektrický potenciál (napětí) mezi elektrodou z inertního kovu přenášející elektrony (zpravidla platinovou) a vztažnou elektrodou (obvykle kalomelovou). Použití referenční elektrody je nutné, protože redox potenciály jsou měřitelné jen jako rozdíly potenciálů. Mezinárodně uznaná vztažná elektroda je standardní vodíková elektroda, jejíž potenciál se usančně považuje za rovný nule. Měření redox-potenciálů vztažená na kalomelovou elektrodu musí tedy být přepočtena na vztažný systém standardní vodíkové elektrody přičtením hodnoty + 0,244 V (pro 25 °C). Redox-potenciál vztažený na tuto elektrodu se označuje E_h.

Kvantitativní vztah mezi redoxpotenciálem a aktivitou reakčních partnerů vyjadřuje Nernstova-Petersova rovnice

$$E_h = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \qquad (7)$$

E^o standardní potenciál inertní elektrody v roztoku, kde $a_{ox} = a_{red} = 1$,

R plynová konstanta,

T absolutní teplota,

n počet zúčastněných elektronů,

F Faradayova konstanta,

a_{ox} aktivita oxidovaného stupně,

a_{red} aktivita redukovaného stupně, obě poslední hodnoty (mol/l).

Po dosazení číselných hodnot konstant a přepočtu na dekadické logaritmy se pro 25 °C obdrží vztah

$$E_h = E^o + \frac{0{,}059}{n} \log \frac{a_{ox}}{a_{red}} \qquad (8)$$

Namísto redoxpotenciálu se stále více používá –log aktivity elektronů

pe = –log(e) . E_h[V] a pe jsou vzájemně spjaty vztahem

$$\text{pe} = \frac{E_h}{2{,}3\,RT/F}; \qquad \text{pe} = \frac{E_h}{0{,}059} \quad \text{při 25 °C} \qquad (9)$$

Kromě toho se pro existující oxidačně-redukční podmínky jako měřítko používá hodnota rH. Tato hodnota se definuje jako –log parciálního tlaku vodíku

$$rH = -log\ P_{H_2} \tag{10}$$

a odvozuje se z Nernstovy rovnice pro redox reakci

$$H_2 = 2\,H^+ + 2\,e^-: \tag{11}$$

$$rH = \frac{2E_h}{0{,}059} + 2\,pH. \tag{12}$$

Hodnota rH tak podle rovnice (12) představuje kombinaci změřených redoxpotenciálů a hodnot pH. Může dosahovat hodnot od 0 (v čistém plynném H_2) až do 41 (v čistém O_2); při rH = 27,7 jsou parciální tlaky H_2 a O_2 stejné. Hodnoty rH nižší než 20 znamenají zřetelně redukční podmínky, hodnoty nad 30 zřetelně oxidační podmínky. Namísto hodnoty rH se také občas používá kombinovaná veličina pe + pH (viz rovnice 9). Součet pe + pH odpovídá 0,5 rH.

Použití hodnoty rH je však správně jen tehdy, jestliže je měřený redoxpotenciál určen reakcí podle rovnice (11). Pro organické redoxsystémy, které jsou většinou rovněž charakteristické ekvivalentním odevzdáváním popř. příjmem elektronů ve smyslu rovnice (11), (faktor 0,059 V pro pH) a v přírodních podmínkách určují redoxpotenciály, je hodnota rH rovněž použitelná. Pro redox-systémy s poměrem odevzdávaných popř. přijímaných protonů a elektronů (viz rovnice (2) a (3)) lišícím se od 1 (jedné), a tudíž s faktorem odchylným od 0,059 V pro pH (viz rovnice (13)), není oproti tomu, přísně vzato, použití hodnoty rH možné.

Jak vyplývá z rovnice (8), oxidované látky zvyšují potenciál, redukované pak ho snižují. Je-li aktivita zúčastněných reakčních partnerů stejná ($a_{ox} = a_{red}$), odpovídá redoxpotenciál standardnímu potenciálu E^o. Ten je udán v rovnicích 1 – 4 pro uvedené redoxní páry.

Zjednodušeně řečeno je standardní potenciál číselným vyjádřením pro oxidační sílu oxidované formy resp. pro redukční sílu redukované formy daného oxidačně-redukčního páru. Udává, kterým směrem probíhá oxidačně-redukční reakce, pokud neexistují žádné kinetické zábrany.

Oxidovaná forma redoxního páru s vyšším standardním potenciálem je silnějším oxidovadlem než oxidovaná forma redoxního páru s nižším standardním potenciálem a je tedy schopná oxidovat jeho redukovanou formou. Stejně tak je redukovaná forma redoxního páru s nižším standardním potenciálem silnějším redukovadlem. Ze srovnání standardních potenciálů rovnic

(1), (2) a (4) plyne, že reakce (5) a (6) musí reálně probíhat zleva doprava. Pro reakci (6) je proto kromě toho potřebná hodnota pH nad 3 ke tvorbě Fe $(OH)_3$.

Redoxní rovnice odvozené s použitím Nernstova-Petersova vztahu (8) pro oxidačně-redukční pár Fe^{2+} - Fe $(OH)_3$ (ferrihydrit) (2) zní

$$E_h = 1{,}058 + 0{,}059\ log\ \frac{a^3_{H^+}}{a_{Fe^{2+}}}\ ,\ \text{resp. po přepočtu:}$$

$$E_h = 1{,}058 - 0{,}177\ pH\ - 0{,}059\ \log\ a_{Fe^{2+}}\ . \qquad (13)$$

Z tohoto odvození plyne, že při konstantní teplotě redoxní pár tohoto systému, kromě standardního potenciálu a aktivity iontů Fe^{2+} závisí též na hodnotě pH. Po vyřešení rovnice (13) pro log $a_{Fe^{2+}}$ (rovnice 14) je zřejmé, že aktivita Fe^{2+} za přítomnosti $Fe(OH)_3$ může být vypočtena z hodnot E_h a pH:

$$log\ a_{Fe^{2+}} = 17{,}93 - 16{,}95\ E_h\ - 3\ pH \qquad (14)$$

S klesajícími hodnotami Eh a pH roste koncentrace Fe^{2+}. Čím vyšší je hodnota pH, tím nižší musí být hodnota redoxpotenciálu, aby vyšla určitá rozpustnost Fe^{2+}. Tak např. měřitelné koncentrace Fe^{2+} (několik mg/l) v půdách při hodnotě pH = 5 byly dosaženy již při E_h = + 300 mV, při hodnotě pH 6 až 7 mezi + 300 a + 100 mV a při pH = 8 teprve při –100 mV. Z toho plyne, že koncentrace Fe^{2+} v dobře provzdušených, neutrálních až alkalických půdách je velmi malá, s klesajícími hodnotami pH až k extrémně kyselé půdní reakci (např. v podzolech pod lesem) a především v anaerobních podmínkách v hydromorfních půdách může dosáhnout vyšších hodnot. Kromě toho je rozpustnost iontů Fe^{2+} rovněž určena stabilitou vždy přítomného Fe (III)-oxidu. Tak např. je koncentrace Fe^{2+} v rovnováze s mnohem stabilnějším goethitem při stejných hodnotách E_h a pH 30 až 50 krát nižší, než při rovnováze s $Fe(OH)_3$ resp. ferrihydritem. Za přítomnosti organických komplexotvorných látek je rozpustnost Fe^{2+} naopak značně zvýšená (viz odst. 5.3 a 5.4).

Podobným způsobem mohou být odvozeny stabilitní vztahy mezi jinými sloučeninami železa a Fe-ionty a rovněž mezi různými sloučeninami a ionty jiných prvků v odvislosti od hodnot E_h a pH nebo též od hodnot pe a pH.

5.2 Daigramy stability Eh – pH

Souhrnné vyjádření vztahů stability mezi ionty a sloučeninami prvků vyskytujících se ve více oxidačních stupních je možné pomocí diagramů E_h – pH. Na obr. 5-1 a 5-2 jsou tyto vztahy jako příklady znázorněny pro železo a mangan.

Všechny půdotvorné procesy jsou svázány s přítomností vody a nacházejí se proto uvnitř pole stability H_2O, vymezeného uvolňováním H_2 v silně redukčních podmínkách a O_2 v silně oxidačních podmínkách.

Možné proměny oxidačního stupně a formy vazby železa uvnitř pole stability vody v závislosti na redoxpotenciálu, hodnotě pH a látkovém složení půdy postihují především změny amorfních a krystalických Fe (III)-oxidů na ionty Fe^{3+} a Fe^{2+} a na (II, III)-oxidy a hydroxidy. Za přítomnosti dostatku síry, fosforečnanů nebo při zvýšeném parciálním tlaku CO_2 mohou při redukčních podmínkách vznikat i sulfidy Fe (II) (FeS, FeS_2 aj.), fosforečnany ($Fe_3(PO_4)_2$. $8H_2O$, vivianit) nebo uhličitany ($FeCO_3$, siderit) a rovněž Fe (II, III) hydroxy-karbonáty.

Tím je dán velký počet možných reakcí, z nichž je na diagramu 5-1 znázorněna především přeměna goethitu (α-FeOOH) na ionty Fe^{3+} a Fe^{2+} a na magnetit (Fe_3O_4, po předchozím rozpuštění goethitu). Hranice mezi tuhými fázemi α-FeOOH a Fe_3O_4 vychází z oxidačně-redukční rovnice platné pro tuto přeměnu jako přímka, při níž obě látky existují s aktivitou 1. Pole Fe^{2+} může být vůči poli α-FeOOH (a podobně vůči poli Fe_3O_4) vymezeno v závislosti na hodnotách E_h a pH, jestliže se v příslušné oxidačně-redukční rovnici (viz rovnice 13) za $a_{Fe^{2+}}$ dosadí hodnota odpovídající aktivitám Fe^{2+} vystupujících v půdním roztoku ($a_{Fe^{2+}} = 10^{-5}$ mol/l). Tím platí pole Fe^{2+} vymezené na obr. 5-1 pro Fe^{2+} pro aktivity $Fe^{2+} \geq 10^{-5}$ mol/l.

V obr. 5-1 jsou kromě toho čárkovanými liniemi uvedena pole stability pro amorfní resp. špatně vykrystalované oxidy železa. Ve srovnání s krystalickými oxidy vykazují zřetelně nižší stabilitu. Redukční procesy probíhající v půdách postihují proto především nejdříve „amorfní“ Fe (III) hydroxidy resp. ferrihydrit ($Fe(OH)_3$ na obr. 5-1), které se redukují na ionty Fe^{2+} popř. při vyšších hodnotách pH jsou přeměňovány na „amorfní“ Fe (II, III) hydroxidy (např. $Fe_3(OH)_8$). Teprve při silnějším snížení redoxpotenciálu dochází k přeměně krystalických Fe (III)-oxidů na Fe^{2+} popř. Fe (II, III)-hydroxidy (viz hranici mezi α-FeOOH a Fe_3O_4 na obr. 5-1).

Na obr. 5-2 jsou znázorněna pole stability pro oxidy manganu a ionty Mn^{2+}. Kromě toho je pro obsah 1 % CO_2 v půdním vzduchu uvedeno vypočtené pole stability $MnCO_3$, které překrývá pole stability za těchto podmínek nestabilních sloučenin Mn_3O_4 a $Mn(OH)_2$. Srovnání s obr. 5-1 ukazuje, že ionty Mn^{2+} mají větší pole stability než Fe^{2+}. Proto jsou při poklesu oxidačně-redukčních potenciálů v půdách oxidy Mn redukovány na ionty Mn^{2+} již při vyšších potenciálech než oxidy Fe na ionty Fe^{2+}. Při opět rostoucích redox-potenciálech se pak nejdříve oxidují ionty Fe^{2+} a později ionty Mn^{2+} za současného vylučování oxidů. Mangan je proto mobilnější než železo a ve větší míře podléhá migraci a vymývání. Rozdílné oxidačně-redukční chování železa a manganu může vést ke vzniku prostorově navzájem odděleným obohaceným horizontům nebo zónám těchto prvků a k oddělenému ukládání konkrecí. Tak např. v glejích často nacházíme v horizontu Go akumulace oxidů Mn nad zónou obohacení oxidy Fe, vzniklé transportem vzestupnými pórovými roztoky v suchých obdobích z horizontu Gr do horizontu Go.

Diagramy stability E_h-pH nebo také pe-pH mohou být sestaveny pro větší počet prvků. Jejich vypovídací hodnota je omezena tím, že reálná interpretace je možná jen tehdy, jsou-li známy všechny ve skutečnosti v půdě přítomné sloučeniny daného prvku a je možné je při výpočtu diagramu zohlednit. Jestliže existují větší podíly jistého prvku v neznámých nebo málo exaktně definovaných minerálních, organických nebo organominerálních vazebných formách, nemá výpočet diagramu E_h-pH smysl. Kromě toho získané vztahy stability platí pouze pro rovnovážné podmínky, které u málo reaktivních sloučenin nebo při častém střídání vlhkých a suchých etap nemohou být vždy dosaženy.

5.3 Oxidačně-redukční systémy v půdách

S postupným sycením vodou, podmíněným působením hrazené vody, stoupáním hladiny spodní vody nebo zatopením, se takřka úplně zastaví difuze kyslíku z atmosféry do půdy, protože do pórů zaplněných vodou je asi 10 000 krát pomalejší než do pórů vyplněných vzduchem. Zbývající přítomný kyslík se během několika málo hodin, nejvýše však do dvou dnů spotřebuje aerobními mikroorganismy k oxidačnímu odbourávání organických látek. Fakultativně i obligátně anaerobní mikroorganismy pak ovládnou prostředí. Ty rovněž využívají organickou půdní substanci jako donor elektronů, při čemž namísto kyslíku jako akceptory elektronů fungují anorganické a organické sloučeniny vyšších oxidačních stupňů. Činností mikroorganismů se tak NO_3^- redukuje na N_2O a N_2, popřípadě v silně redukčních podmínkách na NH_4^+, Mn (III, IV) na Mn (II), Fe (III) na Fe (II), SO_4^{2-} na H_2S, CO_2 na CH_4

a H^+ na H_2. Rozložitelné organické substance se odbourávají na CO_2 a H_2 a též na nízkomolekulární alifatické kyseliny (octová, máselná, mléčná a.j), polyhydroxykarbonové kyseliny, aldehyhy, aminy, merkaptany, NH_4^+, H_2S, C_2H_4 a CH_4. Za redukčních podmínek probíhá odbourávání organické substance obecně mnohem pomaleji než za oxidačních podmínek.

Redukce různých látek se přitom děje v definovaném pořadí, daném oxidačně-redukčními vlastnostmi jednotlivých sloučenin. Právě před úplným spotřebováním kyslíku v půdě začíná jako první v mikrooblastech redukce dusičnanů na N_2 a nestabilní NO_2^-, NO a N_2O. Tento proces může v zemědělsky využívaných půdách po hnojení dusičnany za vlhkého počasí vést ke značným ztrátám na plynném dusíku.

Při jen o málo nižších redoxpotenciálech pak následuje přeměna Mn (III)- a Mn (IV)- oxidů na Mn^{2+}. Tím se značně zvýší mobilita a přijatelnost manganu. Teprve když O_2 a NO_3^- již nejsou dokazatelné, dochází při dalším poklesu redoxpotenciálu k redukci Fe (III)-oxidů na Fe^{2+}. Tento proces, podobně jako redukce Mn (III, IV)-oxidů může být způsoben buď přímo mikroorganismy, nebo nepřímo mikrobiologicky vytvořenými rozpustnými organickými látkami, působícími redukčně a komplexotvorně, jako jsou polyhydroxykarbonové kyseliny, některé aldehydy, merkaptany, H_2S (rovnice 5) aj. Účast organických kompexotvorných látek umožňuje redukci Mn (III, IV) a Fe (III) již při vyšších redoxpotenciálech. Mn^{2+} a zejména Fe^{2+} existují v půdním roztoku zpravidla jako rozpustné metaloorganické komplexy a jako takové mohou být v půdě transportovány. S redukcí oxidů mohou být v nich pevně vázané prvky P, Mo, Co, Cu, Zn aj. převedeny do mobilnější a zčásti přijatelnější formy. Při pěstování rýže se závlahou se tím značně zvýší zásobení rýžových rostlin živinami.

S dalším poklesem redoxpotenciálu počíná redukce SO_4^{2-} na H_2S a HS^- a za extrémně redukčních podmínek CO_2 na CH_4. Redukce SO_4^{2-}, jakož i NO_3^- a CO_2, je způsobena přímo mikroorganismy a probíhá podle schématu:

$$2\ (CH_2O) + SO_4^{2-} + H^+ = HS^- + 2\ CO_2 + 2\ H_2O \qquad (15)$$

CH_2O při tom ve zjednodušené formě představuje půdní organickou substanci. Se vznikem iontů HS^- nebo H_2S dochází ke srážení Fe^{2+} (obr. 5-3) a jiných těžkých kovů jako sulfidy. H_2S představuje pro půdní organismy a vyšší rostliny toxický plyn. Při vzniku velkých množství H_2S může na půdách nebo povrchu sedimentů docházet k jeho oxidaci na elementární síru (sirné mléko). Na obr. 5-3 je znázorněn rozdílný počátek tvorby Mn^{2+}, Fe^{2+} a sulfidů a průběh

E_h a pH u vodou nasycené půdy v závislosti na čase. Přehled o experimentálně zjištěných vztazích mezi oxidačně-redukčními potenciály a oxidačně-redukčními reakcemi v půdách je uveden v tab. 5-1. Protože redoxpotenciál je závislý na pH, jsou uvedené hodnoty s použitím faktoru 0,059 V pro pH (rovnice 8) přepočteny na pH = 7 a udány jako hodnoty E_7.

5.4 Oxidačně-redukční potenciály půd

Zatímco dobře provzdušené, silně kyselé půdy vykazují vysoké pozitivní (až + 0,8 V) redoxpotenciály, za anaerobních podmínek při neutrální až alkalické reakci se vyskytují nízké a zčásti dokonce negativná hodnoty (až –0,35 V). Oxidačně-redukční vlastnosti půd se během roku podle okolností výrazně mění, při čemž mohou být zjištěny rozdíly v potenciálech (0,1 – 0,8) V. Největší kolísání se vyskytuje v horizontech ovlivněných spodní a stojatou vodou. Nejnižší redoxpotenciály se naměří v obdobích bohatých na srážky.

Protože intenzita mikrobiologicky probíhajících oxidačně-redukčních procesů závisí především na obsahu rozložitelné organické složky v půdě, dochází v Ah-horizontech bohatých na humus již po několika málo hodinách po nasycení vodou k silnému poklesu redoxpotenciálů. Ve spodních horizontech s nízkými obsahy organické substance oproti tomu po nasycení vodou dochází jen k pomalé a celkově menší změně oxidačně-redukčních podmínek. Redukční procesy, probíhající i v humusem bohatých Ah-horizontech terestrických půd po silných srážkách, především při kyselé půdní reakci a v kombinaci s působením organických komplexotvorných látek, vedou k mokrému vybělování svrchních horizontů stagnoglejů a mají pravděpodobně význam i při podzolizaci. Železo uvolněné v Ao-horizontu redukcí a tvorbou komplexů z Fe (III)-oxidů může být přemístěno do spodiny a tam opět zoxidováno a vysráženo.

S klesajícími redoxpotenciály nastupují charakteristické změny pH půd. Ve slabě až mírně kyselých půdách rostou hodnoty pH s přibývající redukcí až do neutrální reakce (obr. 5-3), protože pro redukci oxidovaných látek se spotřebují H-ionty. Naopak oxidace redukovaných látek vede ke snížení hodnot pH (rovn. 1 až 4). V alkalických půdách v důsledku mikrobiologické produkce CO_2 a organických kyselin dochází v redukčních podmínkách zpravidla k poklesu hodnot pH až k neutrální reakci.

I když Nernstova-Petersova rovnice představuje kvantitativní vztah mezi redoxpotenciálem a zúčastněnými látkami, je vyhodnocení potenciálů naměřených v půdách většinou možné pouze na kvalitativní úrovni, protože v půdách vystupuje množství oxidačně-redukčních párů.

Změřený potenciál se pak skládá z jednotlivých potenciálů zúčastněných organických a anorganických redoxsystémů, u jejichž větší části nejsou známy ani standardní potenciály, ani koncentrace jednotlivých složek. Tak např. dosud byly málo úspěšné pokusy stanovit kvantitativní vztahy pro redoxsystémy Mn^{2+} ↔ oxidy Mn (III, IV) a Fe^{2+} ↔ oxidy Fe (III), protože na redukci oxidů se podstatně podílí redukčně a komplexotvorně působící organické látky. Rovněž oxidačně-redukční potenciály změřené v půdách jsou zčásti určovány organickými redox-systémy. Navíc mohou potenciál určovat i oxidačně-redukční reakce železa, dusíku a síry.

Měření redoxpotenciálů ve vzorcích půd nebo v půdních suspenzích v laboratoři a i v přirozeně uložených půdách v terénu je často zatíženo problémy, protože platinová elektroda nereaguje na všechny redox-páry a zejména při nízkých koncentracích oxidovaných nebo redukovaných stupňů přítomných redoxních párů reaguje jen slabě nebo vůbec ne. Kromě toho je platinová elektroda mnohými látkami blokována („otrávena“, např. H_2S) nebo deaktivována (např. vyloučenými oxidy nebo uhličitany). Pak je nutné mechanické a chemické čištění. Rovněž kalomelová elektroda, nejčastěji používaná vztažná elektroda, může být poškozena H_2S tvorbou sulfidů Hg. Ve vzorcích obsahujících sulfidy musí proto být kalomelová elektroda chráněna elektrolytovým můstkem před stykem se vzorkem. Zejména měření E_h v terénu vykazují často velké kolísání, protože jednak oxidačně-redukční podmínky v mikrooblastech půd mohou být velmi rozdílné, jednak proto, že zavlečením stop kyslíku při zasunování Pt-elektrody nebo špatným či neexistujícím kontaktem elektrod (především v suchých půdách) mohou vznikat další chyby.

Na obrázcích 5-4, 5-5, 5-6 a 5-7 (Foto: Tomáš Sýkora, 1974) jsou zachyceny výrazné profily nížinných podzolů, vyvinutých na pískovcové zvětralině, tedy na extrémně propustném substrátu jihovýchodně od Hamru na Jezeře (severní Čechy) pod lesním porostem s převládající borovicí.

Z obr. 5-4 a 5-5 vyplývá následující pořadí jednotlivých horizontů: na povrchu se nachází vrstva jehličnatého opadu O_l , která spolu s částečně rozloženým organickým materiálem O_f v přilehlém podloží vytváří horizont nadložního humusu O. Na ten navazuje humusový horinont A_h, pod kterým se nachází mocný vybělený eluviální horizont E, jehož ostrá spodní hranice je nápadně deformovaná chobotovitými útvary – záteky, které vznikají snadnějším postupem roztoků podél odumřelých kořenů dřevin. Tuto hranici sleduje iluviální horizont B, ve své svrchní části černohnědý – humusoželezitý horizont B_{sh}, naspodu s poněkud mocnějším železitým horizontem B_s, zbarveným sloučeninami Fe^{3+}. V difúzním přechodu

do půdotvorného substrátu C jsou poněkud hlouběji nahromaděny i sloučeniny Al^{3+}. Poměrně malá mocnost iluviálního horizontu svědčí o nízkém obsahu nekřemenných složek v nyní vybělené původním matečném substrátu (E).

Podzolový půdní profil vzniká půdotvorným procesem zvaným podzolizace, kde hlavním pochodem je vyluhování a také oxidace-redukce. Železo je zpravidla transportováno po předchozí redukci na Fe^{2+} v podobě metaloorganických komplexů s nízkomolekulárními huminovými látkami v silně kyselém prostředí (pH 3-3,5). Komplexy se rozpadají při oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} a vzniku hydratovaných oxidů. V našem případě huminové látky vedle roztoků migrují pórovitým profilem i v tuhém stavu jako částice velikosti kolem 0,01 až 0,1 mm. Al a Mn se chovají podobně jako Fe, Al přirozeně bez redukce a oxidace a Mn se v horizontu B vylučuje zčásti jako oxidy Mn (IV), zčásti sorbovaný na oxidech Fe.

Obr. 5-6 a 5-7 ukazují zdvojené podzolové profily, u kterých svrchní profil pravděpodobně vznikl na půdotvorném substrátu, jenž při svahových pohybech překryl starší a dokonaleji vyvinutý podzolový profil.

5.5 Literatura (příklady)

1. Brümmer G.: Geoderma 12, 207-222(1974).
2. Gotoh S., Patrick W.H.: Soil Sci. Soc. Am. J. 38, 66-71 (1974).
3. Greenland D.J., Hayes M.H.B.: The Chemistry of Soil Processes. John Wiley&Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto 1981.
4. Hauptman I., Kukal Z., Pošmourný K. (edit.) a kol.: Půda v České republice. Pro MŽP a MZ Consult, Praha 2009.
5. Kutílek M.: Vodohospodářská pedologie. SNTL a ALFA, Praha a Bratislava, 1978.
6. Kümmel R., Papp S.: Umweltchemie. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig 1988.
7. Moore W.J.: Fyzikální chemie. SNTL, Praha 1979.
8. Němeček J., Smolíková L., Kutílek M.: Pedologie a paleopedologie. Academia, Praha 1990.
9. Pelíšek J.: Atlas hlavních půdních typů ČSSR. SZN a SVPL, Praha a Bratislava, 1961.
10. Pelíšek J.: Lesnické půdoznalství. SZN, Praha 1964.
11. Rieder M., Povondra P.: Fázové rovnováhy v geologii. Karolinum, vydavatelství UK. Praha 1997.
12. Scheffer F., Schachtschabel P.: Lehrbuch der Bodenkunde, 13. Aufl. F. Enke Verlag, Stuttgart 1992.
13. Smolík L.: Pedologie. SNTL, Praha 1957.
14. Stejskal J.: Zemědělská geologie. ČSAZV ve SZN, Praha 1958.
15. Tomášek M.: Půdy České republiky, 4. vyd. Česká geologická služba, Praha 2007.

6 Epilog

Předcházející kapitoly jsou v podstatě doplněné a aktualizované texty některých přednášek, které autor měl na oblíbených každoročních školeních chemiků AVR (podle tehdejšího členění ústavu). Nedílnou součástí školení byly i nezapomenutelné večerní debaty na nejrůznější témata. Vzpomínám si, jak jednou nedlouho po premiéře životopisného filmu o českém Leonardu da Vinci, vynálezci a polyhistorovi jménem Jára da Cimrman („Jára Cimrman ležící spící“), kdosi nastolil otázku, zda se náš polozapomenutý velikán angažoval ještě i v jiných chemických oborech, než byla technologie výbušnin, jak vyplynulo ze scén natáčených na schodišti a v interiérech Severočeského muzea v Liberci. Jak známo, při vynálezu dynamitu byl jen „o vous“ předejit panem Alfredem Nobelem. Po usilovném bádání dospěl kolektiv k závěru, že Cimrman se uplatnil i v analytické chemii, jmenovitě v jeho době bouřlivě se rozvíjející odměrné analýze, a to, k velké radosti pana profesora Zýky, v oxidačně redukčních metodách. Podařilo se mu totiž připravit pomocný roztok, umožňující permanganátometrické stanovení Fe^{2+} v roztocích obsahujících kyselinu chlorovodíkovou, aniž by současně docházelo k její oxidaci na chlor. Roztok byl záhy pojmenován po autorovi a psal se v německé transkripci, tedy Zimmermannův. To ovšem neunesl závistivý německý chemik Reinhardt a začal tvrdit, že přídavek kyseliny fosforečné k roztoku $MnSO_4$ ve zředěné H_2SO_4 vymyslel právě on kvůli zlepšení barevného přechodu na konci titrace (namísto ze žluté do růžové ostřejší z bílé do růžové). V učebnicích se pak začal roztok jmenovat Zimmermann-Reinhardtův a těžko by někdo dokázal spočítat, kolik stanovení železa, hlavně v rudách, struskách a jiných hutních materiálech bylo s jeho pomocí, při absenci vhodnější metody, provedeno. Zbývá upozornit, že Reinhardt je v tomto případě příjmení a nikoliv křestní jméno, jehož jeden nositel si v dobách druhé světové války usmyslel, že s konečnou platností (Endlösung) vyřeší otázku existence Čechů v české kotlině tím, že je jednoduše zlikviduje. Díky známým událostem se mu to ovšem nepodařilo.

Kdo si myslí, že v předchozích řádcích vězí mystifikace, nemýlí se, pokud jde o hlavní osobu. Ostatně zase naopak v počátcích cimrmanovské éry byla řada lidí přesvědčena, že jde o reálnou osobu. A tak po špetce humoru na úplný závěr autor všem, kteří se pročetli až do těchto míst, podle vzoru renesančních vzdělanců přeje: „Buďte hodně zdrávi a mějte se dobře!“

Literatura

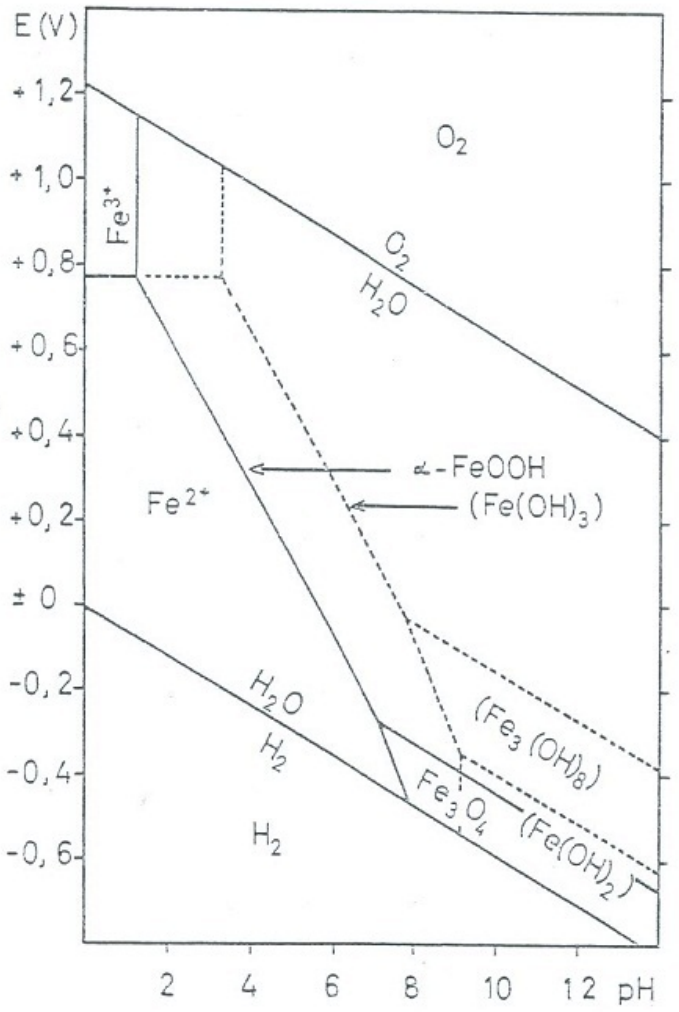
1. Biltz H., Biltz W.: Ausführung quantitativer Analysen, 2. Aufl. S. Hirzel, Leipzig 1942.
2. Čůta F.: Analytická chemie odměrná. NČSAV, Praha 1956.
3. Treadwell F.P., Treadwell W.D.: Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie, II. Band, Quantitative Analyse, 11. Auflage (9. Abdruck). Franz Deuticke, Wien 1941.

Tab.5-1.Experimentálně zjištěné redox potenciály pro různé oxidačně – redukční reakce (Gotoh S., Patrick W.H., in: Scheffer, Schachtschabel l.c., upraveno).

Oxidačně – redukční reakce	E_7 [V]
Počátek redukce NO_3^-	0,45 – 0,55
Počátek tvorby Mn^{2+}	0,35 – 0,45
Zmizení O_2	0,33
Zmizení NO_3^-	0,22
Počátek tvorby Fe^{2+}	0,15
Počátek redukce SO_4^{2-} a tvorby sulfidů	–0,05
Počátek tvorby CH_4	–0,12
Zmizení SO_4^{2-}	–0,18

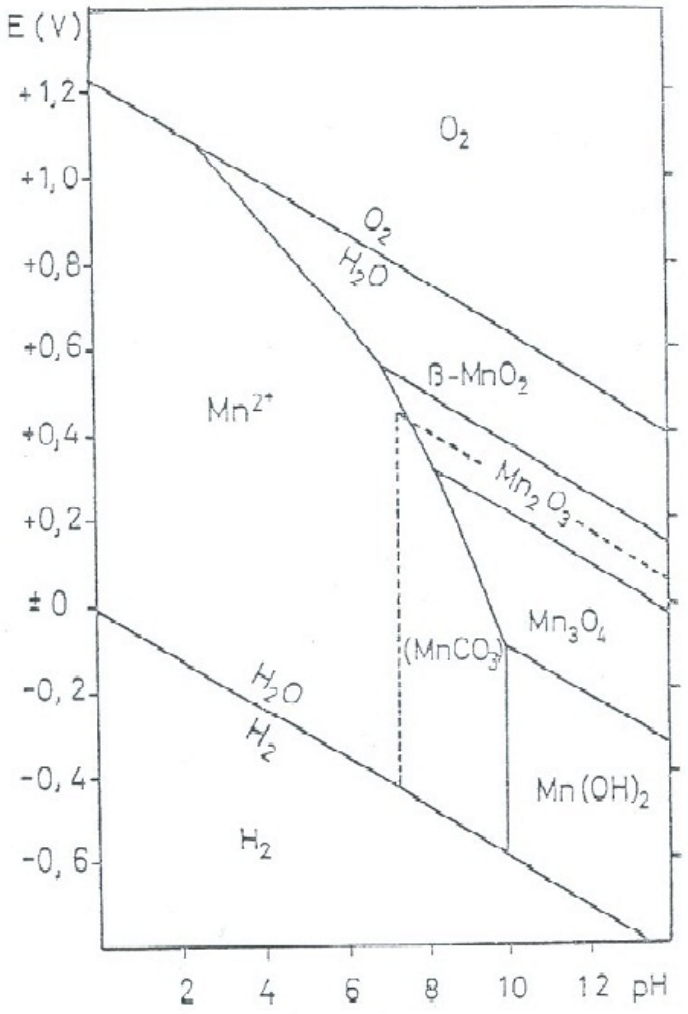
Obr. 5-1 Oblasti stability Fe^{3+}, Fe^{2+}, α-FeOOH a Fe_3O_4 (s čárkovanými liniemi $Fe(OH)_3$, $Fe_3(OH)_8$ a $Fe(OH)_2$) v závislosti na redoxpotenciálu, hodnotě pH a při aktivitách iontů 10^{-5} mol/l za standardních podmínek (10^5 Pa, 25°C).

(Podle W.L.Lindsay-e, in: Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno)



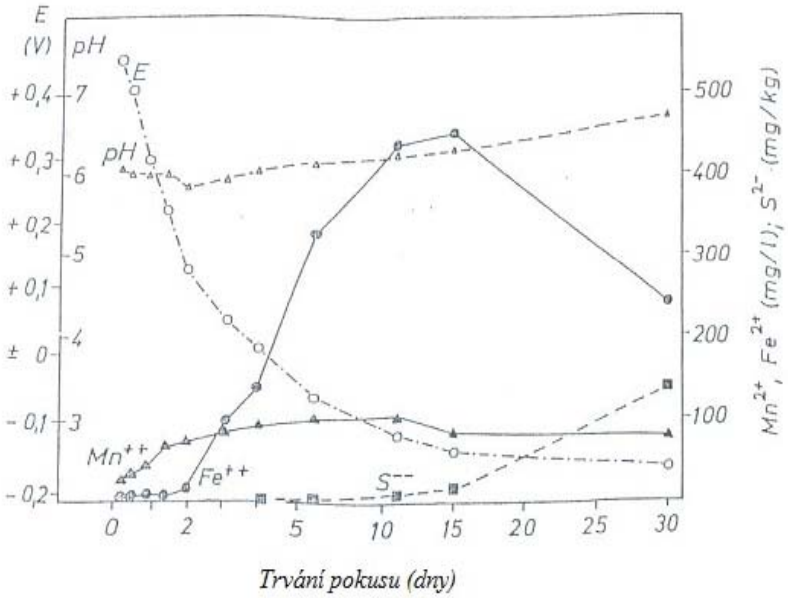
Obr. 5-2 Oblasti stability Mn^{2+}, β-MnO_2, Mn_2O_3, Mn_3O_4 a Mn $(OH)_2$ v závislosti na redoxpotenciálu, hodnotě pH a při aktivitách iontů 10^{-5} mol/l za standardních podmínek (10^5 Pa, 25°C). S čárkovanými liniemi oblastí stability pro $MnCO_3$ při obsahu CO_2 v půdním vzduchu 1% ($P_{CO_2} = 10^3$ Pa).

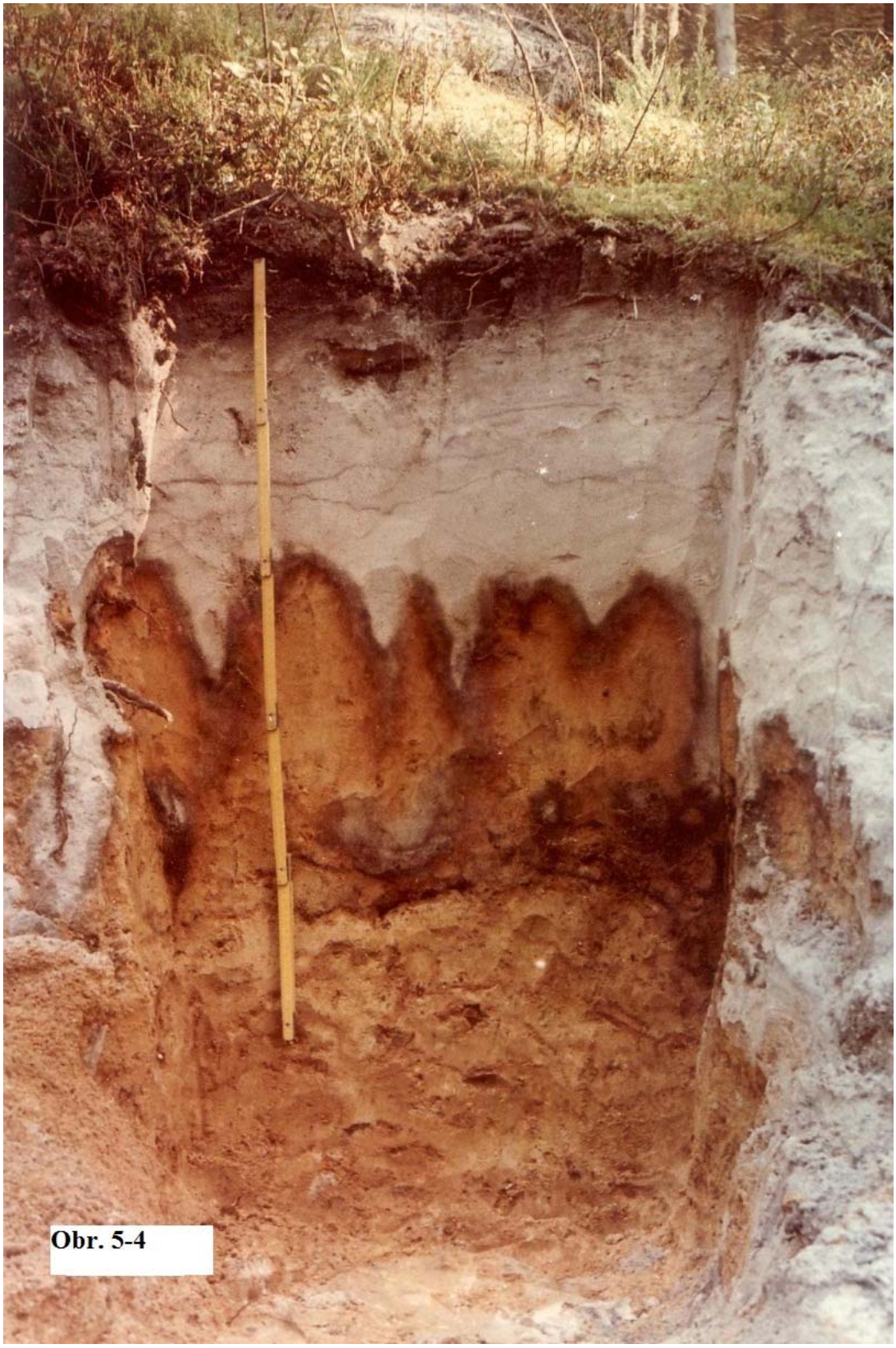
(Podle W.L.Lindsay-e, in: Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno)



Obr. 5-3 Redoxpotenciály, hodnoty pH, obsahy vodorozpustných a výměnných iontů Mn^{2+}, Fe^{2+} a monosulfidů půdy nasycené mořskou vodou v závislosti na čase.

(Podle G. Brümmera, in: Scheffer, Schachtschabel, l.c., upraveno)





Obr. 5-4



Obr. 5-5



Obr.5-6


Obr. 5-7

Poznámky:

Poznámky:

Poznámky:

Bulletin Národní referenční laboratoře XV 2011/3

Ročník:	XV, č. 3
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2011
Odpovědný redaktor:	Ing. Iva Strížová
Náklad:	140 výtisků
Počet stran:	56
Tisk:	ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
	e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196