Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2012

Ročník XVI, číslo 1/2012

Brno 2012

Obsah

1. **Stanovení obsahu fluoru v krmivech**
Eva Fojtlová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 1

2. **Stanovení specií arsenu v krmivech**
Eva Niedobová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 9

3. **Vývoj kalibrační rovnice pro oves pluchatý metodou FT-NIR spektroskopie**
David Čižmár, Radvana Šulová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 28

4. **Optimalizace a širší využití metody Mehlich 3 v systému agrochemického zkoušení půd, Část 1. Optimalizace stanovení P a S metodou Mehlich 3**
Jiří Zbíral, Elena Obdržálková, Michaela Smatanová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 35

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení obsahu fluoru v krmivech

Eva Fojtlová

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

1 Úvod

Maximální obsah fluoru jako nežádoucí látky je pro jednotlivé typy krmiv dán směrnicí EU 2002/32/EC, respektive směrnicí 2005/87/EC. Uvedené maximální obsahy fluoru se vztahují k analytickému postupu, v němž extrakce 1M kyselinou chlorovodíkovou trvá 20 min při laboratorní teplotě. Mohou se použít i jiné extrakční postupy, u nichž je možné prokázat, že použitý extrakční postup má stejnou extrakční účinnost.

2 Materiál a metody

V rámci evropské unie byla navržena metoda na stanovení obsahu fluoru v krmivech.

Fluor se ze vzorku krmiva extrahuje 1M kyselinou chlorovodíkovou po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Obsah fluoridu v extraktu se měří pomocí iontově selektivní elektrody (ISE).

Měření pomocí ISE je poměrně jednoduchá a rychlá metoda. Aby měření bylo dostatečně přesné a správné, musí roztok vzorku splňovat určité požadavky. Nejdůležitější parametry, které ovlivňují funkci ISE, jsou pH, iontová síla, druh a koncentrace rušivých složek a teplota měřeného roztoku.

pH se musí udržovat v určité oblasti; v případě fluoridové ISE se doporučuje pH 5 až 7. Pokud klesne pH pod 5, část fluoridových iontů vytváří málo disociované částice HF a HF_2^-, na které ISE nereaguje. Při pH nad 7 se začíná projevovat interference iontu OH^-, která zvláště v případě měření velmi nízkých koncentrací může způsobit nezanedbatelnou chybu.

Iontová síla roztoků, jejichž výsledky se mají srovnávat, se musí při všech měřeních udržovat na konstantní hodnotě. Pro fluoridovou ISE jsou interferujícími látkami zejména Al^{3+}, Fe^{3+}, La^{3+}, které tvoří s fluoridy komplexy. Pokud se interferující látky vyskytují v takových koncentracích, které způsobují významnou chybu stanovení, musejí se buď odstranit, nebo maskovat. Většinou se dává přednost maskování. Obvykle se roztok maskovacího činidla připraví tak, aby současně sloužil k nastavení optimálního pH a intové síly.

Při měření se musí udržovat konstantní teplota v rozmezí ± 0,5 ^{o}C.

Pro dosažení vysoké přesnosti je nutné, aby se teploty měřených roztoků od sebe nelišily o více než ± 0,1 ^{o}C. Pokud se měří při zvýšené teplotě (25 – 35) ^{o}C, odezva ISE je rychlejší a přesnější.

Výhodné je měřit v míchaných roztocích, odezva je rychlejší, sníží se i hodnota meze stanovitelnosti a dosahuje se lepší reprodukovatelnosti. Rychlost míchání musí být konstantní.

Pro získání reprodukovatelných výsledků se elektrody musejí před měřením aktivovat podle návodu výrobce. Většinou se elektrody namáčejí v roztoku iontu, na který jsou citlivé a to při koncentraci přibližně uprostřed použitelného měřicího rozsahu (většinou kolem 10^{-3} M).

Pro měření neznámého obsahu fluoridu ve vzorku se použila metoda standardního přídavku.

Při použití této metody se měří potenciál roztoku vzorku před přidáním a po přidání daného objemu standardního roztoku fluoridu o známé koncentraci.

Při vlastním měření se postupuje tak, že se nejprve pomocí řady pracovních kalibračních roztoků elektroda kalibruje. Sestrojí se kalibrační křivka, která vyjadřuje závislost potenciálu na logaritmu koncentrace. Pro další měření se využívá pouze lineární část křivky.

S ohledem na její rozsah je nutno volit navážku vzorku.

Vzorky o neznámé koncentraci se měří bezprostředně po kalibraci elektrody. Z naměřených hodnot a za použití hodnoty směrnice kalibrační přímky se vypočítá koncentrace fluoridů ve vzorku.

Metoda byla ověřena na souboru vzorků, které byly analyzovány v rámci validační studie pořádané orgány EU. Soubor vzorků obsahoval 3 vzorky kompletních krmných směsí pro prasata, telata a slepice, 3 vzorky doplňkových krmných směsí pro prasata, selata a slepice a 3 vzorky minerálních krmiv. Obsah fluoru se pohyboval v rozpětí řádově jednotek až několika stovek mg/kg. Vzorky byly pomleté a homogenizované, další úprava vzorků nebyla potřebná.

V případě, že vzorky nejsou upravené, doporučuje se vzorky krmných směsí pomlet na velikost částic 1 mm popřípadě menší. Pro mletí minerálních směsí se doporučuje síto s velikostí ok 0,1 mm.

Vzorek se v případě potřeby předsouší minimálně 16 h při (70 ± 5) ^{o}C, tak aby se obsah vlhkosti ve vzorku snížil na hodnotu (8 – 12) %.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak

1. Voda, (demineralizovaná, destilovaná nebo deionizovaná).
2. Základní standardní roztok fluoridů, NaF o koncentraci 1000 mg/l. Dodává se komerčně.
3. Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná.
4. Kyselina chloristá, $HClO_4$, koncentrovaná.
5. Kyselina octová, ledová, 99%.
6. Octan sodný, trihydrát.
7. Citronan trojsodný, dihydrát.
8. Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok c(HCl)= 1 mol/l.

   Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije asi 500 ml vody (1) a přidá se 83,2 ml kyseliny chlorovodíkové (3). Po vytemperování se doplní vodou (1) po značku a promíchá.
9. Octan sodný, CH_3COONa, roztok c(CH_3COONa) = 3 mol/l.

   Příprava: 408 g octanu sodného (6) se rozpustí v 750 ml vody (1.). Roztok se vytemperuje na laboratorní teplotu a potom se pomocí kyseliny octové (5) nastaví hodnota pH na 7. Převede se kvantitativně do 1000ml odměrné baňky, doplní vodou (1) po značku a promíchá.
10. Pufr.

    Příprava: 222 g citronanu sodného (7) se rozpustí v 250 ml vody (1), přidá se 28 ml kyseliny chloristé (4), převede se kvantitativně do 1000ml odměrné baňky, doplní vodou po značku a promíchá.

11. Kalibrační roztok fluoridů, c = 100 mg/l.

    Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml základního standardního roztoku fluoridů (2), doplní vodou (1) po značku a promíchá.

12. Kalibrační roztok fluoridů, c = 10 mg/l.

    Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml kalibračního roztoku fluoridů (11), doplní vodou (1) po značku a promíchá.

4 Přístroje a pomůcky

1. Analytické váhy s přesností 0,1 mg.
2. Magnetická míchačka a magnetické míchadlo s teflonovým povrchem.
3. Odměrné baňky, kádinky, filtry. Upřednostňuje se použití plastu místo skla, aby se předešlo nežádoucím reakcím fluoridů s křemíkem ze skla.
4. Fluoridová selektivní elektroda, Orion Research Inc. Model 94-09BN.
5. pH elektroda.
6. Ion-pH-metr, přesnost měření ± 0,1 mV.
7. Laboratorní odstředivka.

5 Pracovní postup

5.1 Mineralizace

Do 200ml kádinky se naváží vzorek s přesností 0,0001 g. Množství vzorku se volí s ohledem na předpokládaný obsah fluoridů tak, aby koncentrace v extraktu odpovídala rozsahu lineární části kalibrační křivky. Navážka vzorku se pohybuje od 0,2 g pro fosfáty až do 2 g pro kompletní krmné směsi.

Ke vzorku se přidá 20 ml roztoku HCl (8) a obsah kádinky se míchá magnetickým míchadlem po dobu 20 min. Do kádinky se přidá 50 ml roztoku octanu sodného (9) a 50 ml pufru (10). Obsah kádinky se kvantitativně převede do 200ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku. Poté se roztok filtruje přes filtr střední hustoty nebo odstřeďuje. Odstřeďují se takové vzorky, které se špatně filtrují (např. bentonit). Roztok se do doby měření uchovává v uzavřené nádobě.

5.2 Kalibrace

Připraví se řada pracovních kalibračních roztoků. Do 100ml odměrných baněk se pipetuje (1; 3; 10) ml kalibračního roztoku fluoridů (12) a do dalších dvou 100ml odměrných baněk se pipetuje (3; 10) ml kalibračního roztoku fluoridů (11). Do každé z baněk se přidá 10 ml HCl (8), 25 ml roztoku octanu sodného (9) a 25 ml pufru (10). Doplní se vodou (1) po značku a dobře se promíchá.

Před měřením se elektroda oživí podle pokynů výrobce. Měření se zahájí v roztoku o nejnižší koncentraci. Postupně se změří všechny pracovní kalibrační roztoky od nejnižší koncentrace k nejvyšší. Při měření se roztok promíchává magnetickým míchadlem, rychlost míchání musí být konstantní. Hodnota na přístroji se odečte po ustálení signálu (maximální změna 0,5 mV/min). Po vyjmutí elektrody z měřeného roztoku se elektroda opláchne vodou (1) a opatrně osuší. Také magnetické míchadlo se mezi jednotlivými měřeními opláchne a osuší.

Z naměřených dat se sestrojí kalibrační křivka.

5.3 Měření vzorků

Vzorky se měří ihned po kalibraci (podle bodu 5.2). Do 100ml kádinky se nalije 50 ml vzorku a vloží se do ní elektroda. Zatímco se obsah promíchává magnetickým míchadlem konstantní rychlostí, po ustálení se odečte hodnota potenciálu E_1 (mV) a zaznamená se. Potom se přidá 5 ml pracovního kalibračního roztoku o vhodné koncentraci tak, aby se zvýšil signál o (5 – 39) mV. Po ustálení se odečte hodnota potenciálu E_2 (mV) a zaznamená se. Elektroda se vyjme z roztoku, opláchne a opatrně osuší, stejně tak magnetické míchadlo.

6 Výpočet a vyjadřování výsledků

Koncentrace fluoridů v roztoku (mg/l)

$$X_s = X_A \, 0{,}1/(1{,}1 \times 10^{\,E1-E2/S})$$

X_s koncentrace fluoridů v roztoku (mg/l),

X_A koncentrace fluoridů v přidávaném pracovním kalibračním roztoku (mg/l),

$E_1–E_2$ absolutní hodnota rozdílu potenciálů po přidání 5 ml pracovního kalibračního roztoku (mV),

S směrnice kalibrační přímky.

Obsah fluoridů ve vzorku (mg/kg)

$X_F = X_s \times V_S / M$

X_F obsah fluoridů ve vzorku (mg/kg),

X_s koncentrace fluoridů v roztoku (mg/l),

V_S celkový objem extraktu (l),

M navážka vzorku (kg).

7 Diskuse a výsledky

V tabulce 1. jsou uvedeny výsledky měření vzorků. Jednalo se o tři vzorky kompletních krmných směsí, tři vzorky doplňkových krmných směsí a tři vzorky minerálního krmiva. Měření se provádělo ve čtyřech paralelkách.

Tabulka 1. Výsledky měření.

Vzorek		**Obsah fluoridu (mg/kg)**			
Typ vzorku	**Označení**				
Kompletní krmná směs	**P1**	23,3	23,3	22,2	22,4
	P2	12,1	10,8	9,6	9,0
	P3	17,9	18,7	17,5	17,5
Doplňková krmná směs	**C1**	93,7	93,7	96,7	96,7
	C2	235	235	232	232
	C3	64,6	64,6	65	60,6
Minerální krmivo	**M1**	94,6	101	92,6	87,0
	M2	816	816	805	838
	M3	470	470	452	453

Získané výsledky byly pomocí programu Effi validation statisticky zpracovány.
Výsledky statistického zpracování jsou uvedeny v tabulce 2 a 3.

Tabulka 2. Statistické vyhodnocení – nejistota.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - krmiva - stanovení Fluoru - ISE - 4.3.2008 - 1
VALIDACE: Nejistoty
PARAMETR: Nejistoty: z přesnosti - vícenásobná měření k dispozici
VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 1

VYHODNOCENÍ:

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	202,14167
St. nejistota	5,88409
Rel. st. nejistota (%)	2,91087
Faktor pokrytí	2
Rozšířená st. nejistota	11,76818
Rel. rozšířená nejistota	5,82175

Závěr: Rozšířená st. nejistota je 11,76818. Relativní rozšířená nejistota je 5,82 %.

Tabulka 3. Statistické vyhodnocení – opakovatelnost.

EffiChem
your validation software

ANALYTICKÁ METODA: - krmiva - stanovení Fluoru - ISE - 4.3.2008 - 1
VALIDACE: Plná validace
PARAMETR: Opakovatelnost: po úrovních z vícenásobného měření
VALIDOVANÁ VLASTNOST: List 1

Jednotky: mg/kg

DATA:

Úroveň	Popis	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Měření 5	Měření 6	Měření 7	Měření 8	Měření 9	Měření 10
1	P1	23,3	23,3	22,2	20,4						
2	P2	12,1	10,8	9,6	9						
3	P3	17,9	18,7	17,5	17,5						
4	M1	94,6	101	92,6	87						
5	M2	816	816	805	838						
6	M3	470	470	452	463						
7	C1	93,7	93,7	96,7	96,7						
8	C2	235	235	232	232						
9	C3	64,6	64,6	65	60,6						

VYHODNOCENÍ:

Úroveň	Popis	Průměr	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
1	P1	22,3	1,3687	6,13766	4
2	P2	10,375	1,37204	13,2245	4
3	P3	17,9	0,56569	3,16025	4
4	M1	93,8	5,77812	6,16004	4
5	M2	818,75	13,84136	1,69055	4
6	M3	463,75	8,5	1,83288	4
7	C1	95,2	1,73205	1,81938	4
8	C2	233,5	1,73205	0,74178	4
9	C3	63,7	2,07525	3,25785	4

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 5,88409 jednotek, tj. 5,59 %.

Pro stanovení meze detekce není použitelná žádná metoda uvedena v EFFI validation, proto byla přejata hodnota z návrhu výše uvedené normy (1,5 mg/kg). Tato hodnota koresponduje s detekčním limitem používané fluoridové elektrody.

Správnost metody byla ověřena účastí ve validační studii.

Výsledky laboratoře byly hodnoceny jako správné. Z score uvádí tabulka č. 4.

Tabulka č. 4. Z score výsledků laboratoře ve validační studii.

Typ vzorku	Z score
Kompletní krmné směsi	+1,15 až +1,63
Doplňkové krmné směsi	– 0,58 až – 0,88
Minerální krmivo	– 0,05 až + 0,54

8 Závěr

Metoda na stanovení fluoridů v krmivech byla zavedena do praxe.

9 Literatura

1. Jiří Koryta,Karel Štulík Iontově selektivní elektrody, 1984.
2. Pracovní materiál CEN/TC 327/WG 4 Animal feeding stuffs – Determination of fluoride content after hydrochloric acid treatment by ISE method, 2005.
3. Thermo scientific User Guide fluoride ion selective electrode.
4. Pracovní materiál CEN/TC 327/WG 4 Validation of analytical method to determine fluoride (F) in animal feeding stuffs, 2009.

Stanovení specií arsenu v krmivech

Eva Niedobová

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

1 Souhrn

Byla vyvinuta metoda pro stanovení anorganického arsenu v krmivech. V práci bylo použito 11 vzorků krmiv organického původu a 11 vzorků minerálních směsí. U všech vzorků byly testovány dva typy extrakce – extrakce v temperované třepací vodní lázni a mikrovlnná extrakce – s následnou analýzou extraktu metodou HPLC-ICP-MS.

2 Úvod

Arsen je klasifikován jako nežádoucí látka v krmivech, a proto jsou jeho obsahy úředně kontrolovány a sledovány. Maximální přípustné limity pro arsen uvádí nařízení komise 2009/141/EC. Toto nařízení navíc upřesňuje, že v případě některých druhů krmiv a krmných surovin by měla být na vyžádání provedena další analýza, kterou by mělo být prokázáno, že obsah anorganického arsenu je pod 2 mg/kg (tabulka č. 1).

Tabulka č. 1. Maximální povolené limity pro arsen dle 2009/141/EC pro vybrané druhy krmiv a krmných surovin (1).

Typ krmiva	Celkový arsen (mg/kg)	Anorganický arsen (mg/kg)
Zbytky po lisování palmového oleje	4	< 2
Krmiva získaná při zpracování ryb, případně jiných mořských živočichů	25	< 2
Moučka z mořských řas a krmiva pocházející z mořských řas	40	< 2
Kompletní krmiva pro ryby a kompletní krmiva pro kožešinová zvířata	10	< 2

Důvod pro zavedení maximálních povolených obsahů anorganického arsenu je toxicita jeho specií. Toxicitu vzorku totiž nelze posuzovat podle celkového obsahu arsenu, nýbrž podle obsahu jeho jednotlivých specií.

Anorganické formy arsenu, tzn. arsenitan a arseničnan jsou vysoce toxické na rozdíl od organicky vázaných forem arsenu, jako jsou např. arsenocholin a arsenobetain. Tabulka 2 uvádí některé nejčastěji se vyskytující formy arsenu včetně jejich akutní toxicity.

Tabulka 2. Sloučeniny arsenu a jejich akutní toxicita (LD_{50}) (2).

Sloučenina arsenu	Zkratka	LD_{50} (mg/kg)
Arsenitan	As^{III}	15 – 42
Arseničnan	As^{V}	20 – 800
Monometylarsonát	MMA	700 – 1800
Dimetylarsinát	DMA	1200 – 2600
Trimetylarsin oxid	TMAO	10600
Tetramethylarsoniový ion	TETRA	890
Arsenocholin	AC	6500
Arsenobetain	AB	> 10000

Obecně platí, že při stanovení specií je nejdůležitějším krokem příprava vzorku. Nepoužívají se postupy pro totální rozklad vzorku, ale pouze „jemnější“ extrakční techniky, u kterých ovšem může být různá výtěžnost a pokud jsou vzorky pro speciační analýzu rozdílné, může být různá účinnost i vzhledem k rozdílným typům vzorků. Pro stanovení spécií arsenu je popsáno mnoho postupů přípravy, počínaje extrakcí do směsi voda, metanol/voda, hydroxid sodný/peroxid vodíku, aceton atd., konče extrakcí do zředěných kyselin. Extrakce mohou probíhat s využitím mikrovlnných extraktorů, UV záření, vodní lázně, třepaček apod. (3, 4, 6, 7, 9, 10, 11).

Z instrumentace, kterou lze ve speciační analýze využít, se nejčastěji používá spojení HPLC-ICP-MS (4). V tomto případě ICP-MS slouží jako prvkově specifický detektor, což je výhodné z hlediska přehlednosti naměřených chromatogramů, které zobrazují pouze píky obsahující sledovaný izotop např. As(75). Separace probíhá na chromatografické koloně, která se vybírá podle typu stanovovaných specií, nejčastěji se jedná o aniontové nebo

kationtové kolony. Z dalších metod je možné použít LC-MS (nejčastěji s ESI) (8), a dále pak méně specifické metody jako je například HG-AAS, HG-AFS apod. (5).

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1. Peroxid vodíku, suprapur.
2. Kyselina chlorovodíková, suprapur.
3. Demineralizovaná voda, ultračistá.
4. Hydroxid sodný.
5. Dihydrogen fosforečnan sodný.
6. Chelaton 3 dihydrát.
7. Arsenitan sodný.
8. Arseničnan sodný heptahydrát.
9. Rubidium, c = 1 g/l.

4 Přístroje a pomůcky

1. Analytické váhy.
2. Temperovaná třepací lázeň.
3. Mikrovlnné rozkladné zařízení.
4. Centrifuga.
5. Plastové uzavíratelné nádobky.
6. Skleněné vialky.
7. Membránové filtry, velikost pórů 0,45 μm.
8. HPLC Agilent 1200.
9. ICP-MS spektrometr Agilent 7500ce.
10. Zařízení na přípravu ultračisté vody.
11. Automatické pipety.

5 Pracovní postup

5.1 Příprava vzorku

Při přípravě vzorků pro speciační analýzu je nutné zamezit změnám v oxidačních stavech analytu, aby nedocházelo ke změnám jednotlivých spécií, případně pouze k částečným změnám podle potřeb stanovení. Toho lze dosáhnout použitím „mírných“ extrakčních technik, nejčastěji extrakce ve zředěných kyselinách v neoxidačním prostředí, enzymatické extrakce apod. Pro stanovení anorganických forem arsenu byla zvolena zředěná kyselina chlorovodíková.

5.1.1 Extrakce v temperované třepací vodní lázni

Postup extrakce vychází z EN 15517 normy pro stanovení anorganického arsenu v mořských řasách atomovou absorpční spektrometrií s generováním hydridů po kyselé extrakci (12).

0,2000 g vzorku se naváží do plastových uzavíratelných nádobek. Přidá se 10 ml 0,07M HCl, nádobky se uzavřou a umístí do třepací temperovací lázně. Teplota lázně se nastaví na 37 ºC a vzorky se třepou 1 h. Dále se vzorky temperují 1 h při 37 ºC bez třepání. Poté se extrakty odstředí a přefiltrují přes membránové filtry. Přefiltrované extrakty se uchovají v chladničce při 6 ºC.

5.1.2 Mikrovlnná extrakce

0,2000 g vzorku se naváží do teflonových nádobek, přidá se 10 ml směsi (0,06 M HCl a 3% H_2O_2) a nádobky se uzavřou a umístí do mikrovlnné pece. Teplotní program se nastaví na 90 ºC na 25 min. Poté se extrakty odstředí a přefiltrují přes membránové filtry. Přefiltrované extrakty se uchovají v chladničce při 6 ºC.

5.2 Měření HPLC-ICP-MS

Vzorky získané extrakcí se analyzují chromatograficky ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (HPLC-ICP-MS). Separace na aniontové koloně Agilent G3154-65001, jako mobilní fáze roztok 2 mM dihydrogenuhličitanu draselného a 0,2 mM Chelatonu 3, pH se upraví hydroxidem sodným na hodnotu 6.

Tabulka 3. Chromatografické parametry.

Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Teplota kolony	25 ºC
Nástřik	50 µl
Doba analýzy	720 s

Arsen jako monoizotopický prvek se měří na hmotě 75 ve dvou módech: normálním módu a v heliovém módu s využitím kolizní/reakční cely. Zároveň s izotopem arsenu byl sledován i izotop chlóru na hmotě 37 pro sledování případné eluce chloridů a izotop rubidia na hmotě 85 pro zjištění mrtvého objemu chromatografického systému.

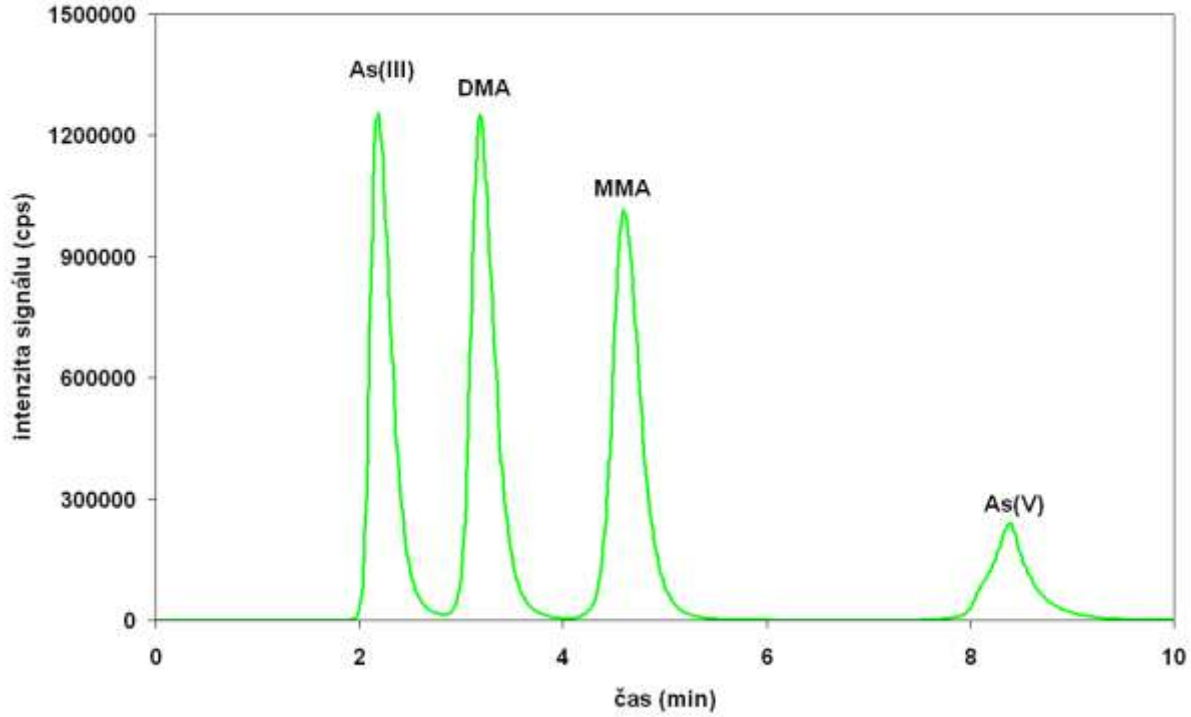
Tabulka 4 Pracovní podmínky ICP-MS spektrometru.

RF power	1500 W	1500 W
Sampl. Depth	6 mm	6 mm
Carrier Gas	0,8 l/min	0,8 l/min
Makeup Gas	0,2 l/min	0,2 l/min
Nebulizer pump	0,5 rps	0,5 rps
S/C Temp	2 °C	2 °C
Extract 1	(1– 5) V	(1– 5) V
Extract 2	–150 V až –120 V	–150 V až –120 V
Omega Bias-ce	–18 V až – 24 V	–18 V až –24 V
Omega Lens-ce	(0,4 – 1,2) V	(0,4 – 1,2) V
Cell Entrance	– 22 V	– 22 V
QP Focus	3 V	3 V
Cell Exit	– 22 V	– 22 V
OctP Bias	– 6 V	–19 V
QP Bias	– 3 V	–15 V
Helium	–	5,4 mL/min
Data Acquisition	Time resolved analysis	Time resolved analysis
Acquisition Time	660 s	660 s

Kalibrační roztoky se připravují vždy čerstvé před vlastním měřením. Obsahují (20; 50; 100) µg/l směsi As(III) a As(V). Stejně jako vzorky, tak i standardy obsahují vždy extrakční činidlo a mobilní fázi. Všechny vzorky se před měřením ředí 10 × roztokem mobilní fáze, aby se snížil obsah matričních prvků.

6 Výsledky a diskuse

Separace trojmocného a pětimocného arsenu za výše uvedených podmínek je vyhovující a není dále nutné metodu optimalizovat, viz. obrázek 1.

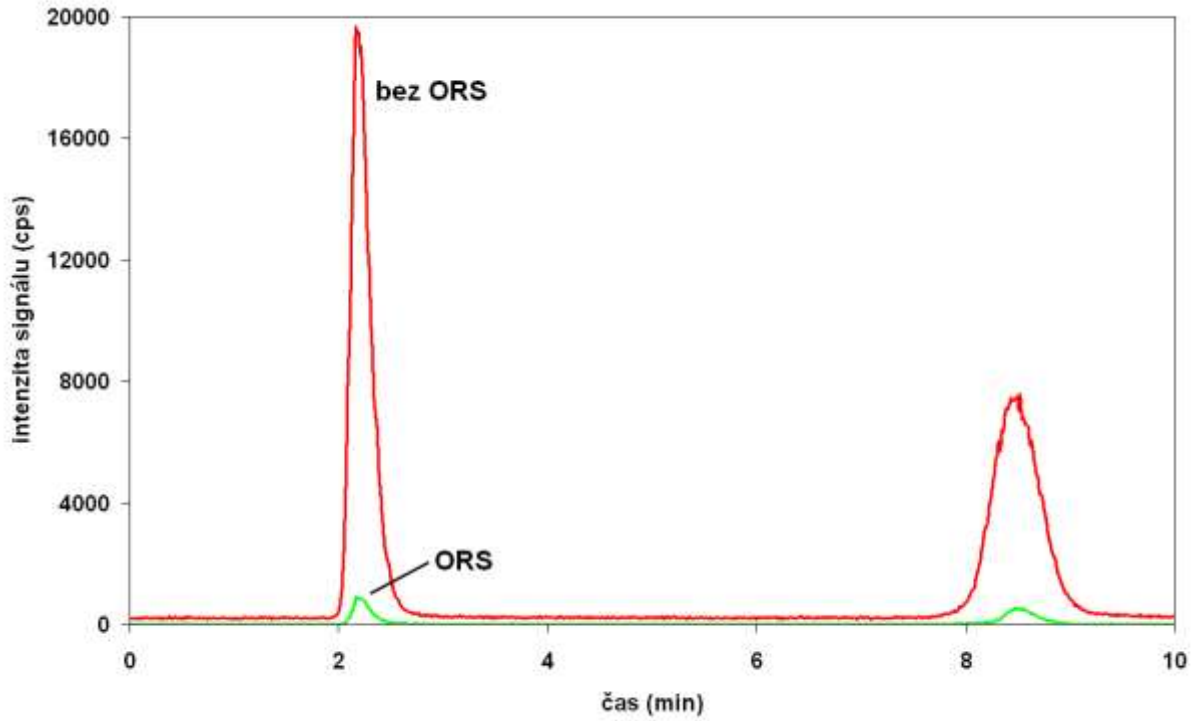


Obrázek 1 Chromatogram standardů As(III), DMA, MMA a As(V) o koncentraci 2000 µg/l.

Dále byly srovnány citlivosti a vlivy případných interferentů, zejména možná koeluce chloridů. Proměřením vzorků s přídavkem chloridů se neprokázal jejich vliv na separaci ani výtěžnost analytů. Chromatogramy na obrázku 2 dokumentují různé citlivosti při použití kolizní cely a při měření v normálním módu bez kolizní cely. Při srovnání poměrů signál/pozadí je zřejmé, že vhodnější je měření bez použití kolizní cely.

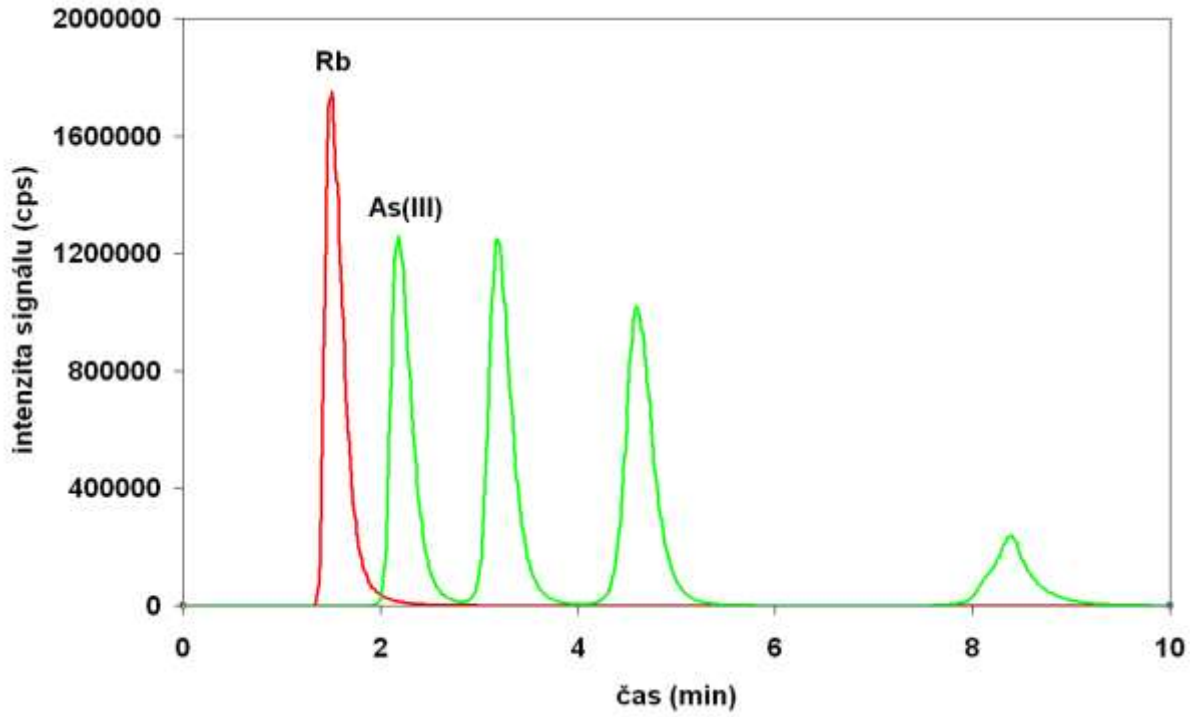
Tabulka 5 Hodnoty poměru signálu/pozadí pro měření s použitím kolizní cely a bez použití kolizní cely.

Měřicí mód	As(III)	As(V)
ORS	71	30
Bez ORS	90	71



Obrázek 2 Srovnání chromatogramů s použitím kolizní cely (ORS) a bez použití kolizní cely (bez ORS).

Jako poslední parametr pro posouzení vhodnosti separačních podmínek byl stanoven mrtvý objem kolony + chromatografického systému. Ten se stanoví nástřikem rubidia, které jako kation není kolonou zachyceno a separováno. Na obrázku 3 jsou chromatogramy rubidia a standardů arsenu. Je patrné, že trojmocný arsen jako anion eluuje až po rubidiu.



Obrázek 3. Určení mrtvého objemu kolony + chromatografického systému.

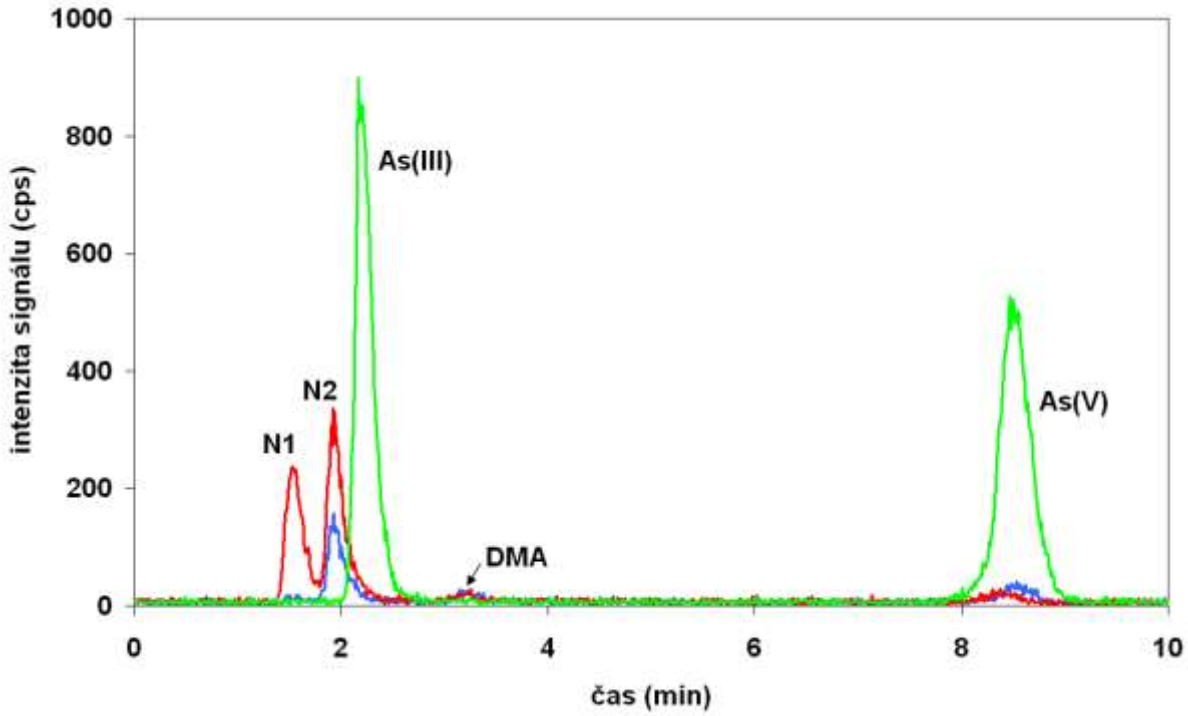
Pro extrakce byly vybrány vzorky, které byly analyzovány v rámci úřední kontroly na celkový obsah arsenu. Jednalo se jak o vzorky organického původu (zejména rybí moučky) a dále vzorky minerálního původu. V tabulce 6 jsou uvedeny celkové obsahy arsenu spolu s nejistotou stanovení.

Tabulka 6 Celkové obsahy arsenu ve vzorcích krmiv organického a minerálního původu.

Číslo	Typ vzorku	Celkový As mg/kg	N mg/kg
232	Rybí moučka	8,02	0,80
447	Rybí moučka	5,68	0,57
448	Rybí moučka	3,39	0,34
612	Rybí moučka	3,06	0,31
686	Rybí moučka	1,02	0,10
781	Rybí moučka	7,39	0,74
951	Rybí moučka	5,32	0,53
1036	MPZ Maďarsko	2,45	0,25
1037	MPZ Maďarsko	2,37	0,24
1092	Rybí moučka	0,92	0,09
1178	Rybí moučka	3,15	0,32
624	ZnO	25,58	2,56
707	Minerální krmivo pro prasata	1,95	0,20
714	Minerální krmivo pro prasata	1,44	0,14
744	Minerální krmivo pro prasata	3,01	0,30
755	Minerální krmivo pro drůbež	3,15	0,32
780	$CaCO_3$	9,81	0,98
820	Minerální krmivo pro skot	3,13	0,31
939	MgO	6,16	0,62
1098	Minerální krmivo pro drůbež	4,67	0,47
1240	Minerální krmivo pro prasata	3,17	0,32
1259	Minerální krmivo pro skot	2,74	0,27

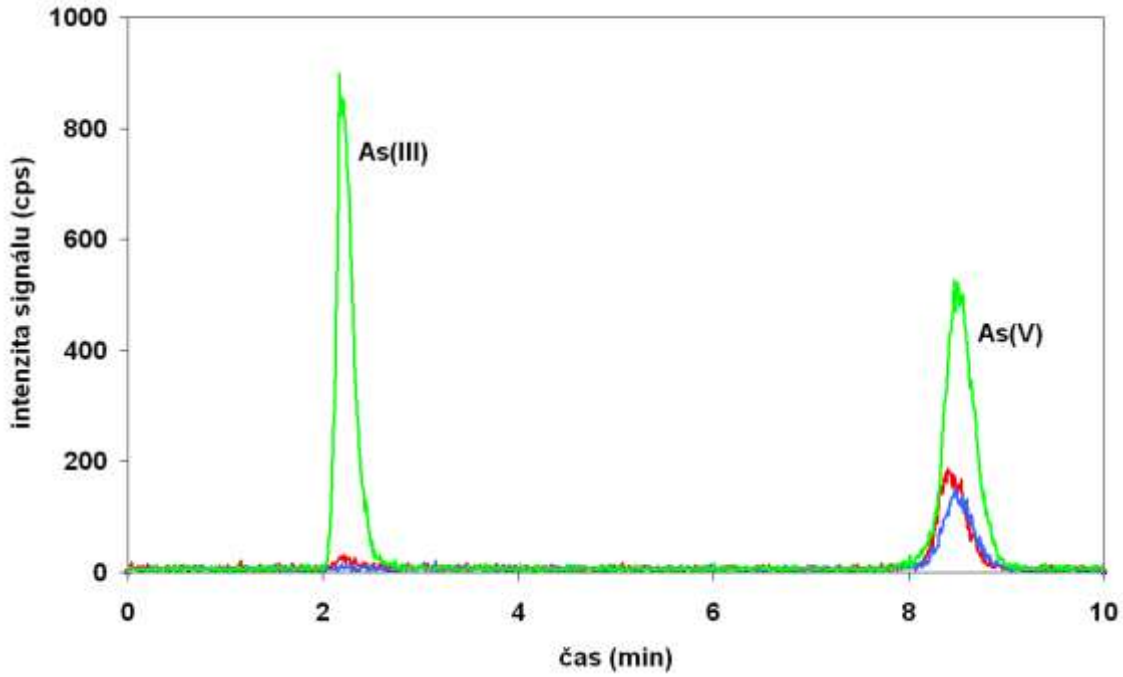
6.1 Extrakce v temperované třepací vodní lázni

Výsledky získané měřením extraktů vzorků krmiv organického původu ukázaly, že v rybích moučkách se arsen vyskytuje ve formě organicky vázaného arsenu (obrázek 4), kromě vzorku 1098, v němž bylo nalezeno menší množství pětimocného arsenu. U zbylých dvou vzorků z MPZ (Maďarsko), které byly uměle namíchány, se arsen vyskytoval pouze v anorganických formách (obrázek 5). Výsledky analýzy vzorků krmiv organického původu jsou uvedeny v tabulce 7 spolu se směrodatnou odchylkou stanovení (SD).



Obrázek 4. Extrakty rybích mouček (třepací vodní lázeň).

Píky označené N1 a N2 eluují v mrtvém objemu kolony a jedná se zřejmě o arsenocholin (N1) a arsenobetain (N2). Vzhledem k tomu, že tyto analyty jsou považovány za „netoxické“ a tudíž nepodléhají úřední kontrole, pro stanovení těchto organických forem arsenu nebyla separace optimalizována.

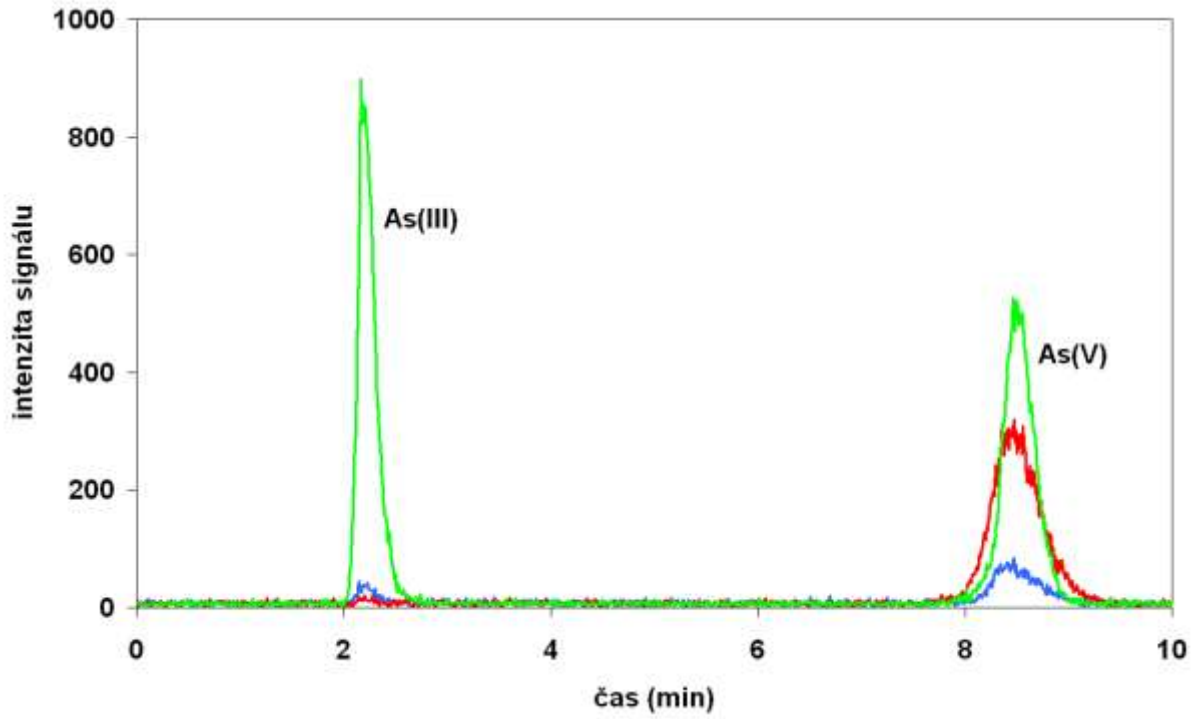


Obrázek 5. Extrakt uměle namíchaných vzorků (MPZ Maďarsko, třepací vodní lázeň).

Tabulka 7. Obsahy anorganických forem arsenu v krmivech organického původu (třepací vodní lázeň).

Číslo	Typ vzorku	As(III) mg/kg	As(V) mg/kg	As(III+V) mg/kg	SD mg/kg
232	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
447	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
448	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
612	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
686	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
781	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
951	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
1036	MPZ Maďarsko	0,10	2,24	2,34	0,14
1037	MPZ Maďarsko	< 0,01	2,09	2,09	0,13
1092	Rybí moučka	< 0,01	0,14	0,14	0,03
1178	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–

U vzorků minerálního původu se předpokládaly obsahy pouze anorganických forem arsenu. Viz. obrázek 6.



Obrázek 6. Extrakty minerálních krmiv (třepací vodní lázeň).

Tabulka 8 uvádí obsahy trojmocného a pětimocného arsenu, které byly zjištěny analýzou extraktů vzorků minerálního původu.

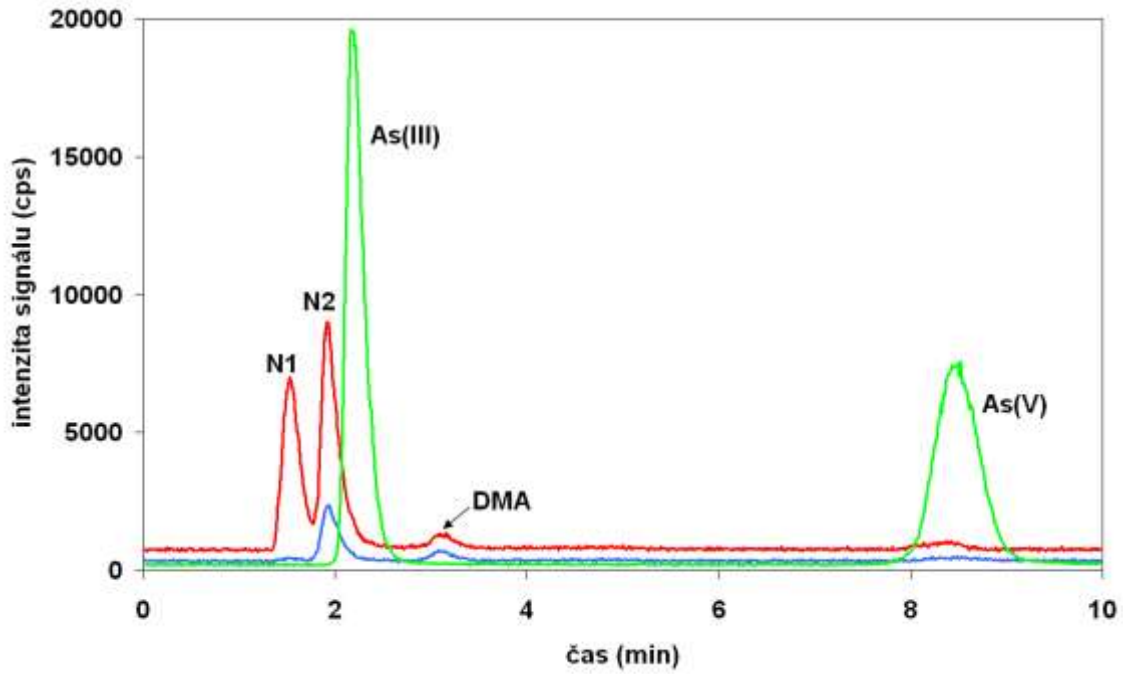
Tabulka 8. Obsahy anorganických forem arsenu v krmivech minerálního původu (třepací vodní lázeň).

Číslo	Typ vzorku	As(III) mg/kg	As(V) mg/kg	As(III+V) mg/kg	SD mg/kg
624	ZnO	< 0,01	0,19	0,19	0,05
707	Minerální krmivo pro prasata	0,17	0,64	0,81	0,02
714	Minerální krmivo pro prasata	0,16	0,15	0,31	0,01
744	Minerální krmivo pro prasata	0,11	0,97	1,07	0,07
755	Minerální krmivo pro drůbež	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
780	$CaCO_3$	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
820	Minerální krmivo pro skot	< 0,01	1,67	1,67	0,02
939	MgO	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
1098	Minerální krmivo pro drůbež	0,40	1,58	1,98	0,02
1240	Minerální krmivo pro prasata	0,18	1,06	1,23	0,03
1259	Minerální krmivo pro skot	< 0,01	0,46	0,46	0,04

Pro ověření správnosti metody včetně extrakce je potřeba analyzovat vhodný certifikovaný referenční materiál (CRM). Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný CRM s deklarovaným obsahem anorganického arsenu, extrahovaly a měřily se vzorky se známým přídavkem (1 μg) trojmocného a pětimocného arsenu. U obou analytů a matric se výtěžnosti přídavku pohybovaly v rozmezí (91 – 95) %.

6.2 Mikrovlnná extrakce

Jako druhá možnost extrakce byla zkoušena mikrovlnná extrakce s extrahovadlem 0,06 M HCl a 3% H_2O_2, která vychází z připravované normy pro stanovení anorganického arsenu v krmivech. Vzhledem k tomu, že je v extrahovadle i peroxid vodíku, lze předpokládat případnou oxidaci trojmocného arsenu na pětimocný. U krmiv organického původu (obr. 7) jsou výsledky víceméně shodné s výsledky získanými extrakcí v třepací vodní lázni, viz tabulka 9.



Obrázek 7. Extrakty krmiv organického původu (mikrovlná extrakce).

Tabulka 9. Obsahy anorganických forem arsenu v krmivech organického původu (mikrovlnná extrakce).

Číslo	Typ vzorku	As(III) mg/kg	As(V) mg/kg	As(III+V) mg/kg	SD mg/kg
232	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
447	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
448	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
612	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
686	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
781	Rybí moučka	< 0,01	0,65	0,65	0,10
951	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
1036	MPZ Maďarsko	< 0,01	2,56	2,56	0,02
1037	MPZ Maďarsko	< 0,01	2,05	2,05	0,08
1092	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
1178	Rybí moučka	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–

U krmiv minerálního původu bylo dosaženo vyšších výsledků a stejně jako v případě krmiv organického původu, byl všechen anorganický arsen pouze ve formě pětimocného (Tabulka 10).

Tabulka 10. Obsahy anorganických forem arsenu v krmivech minerálního původu (mikrovlná extrakce).

Číslo	Typ vzorku	As(III) mg/kg	As(V) mg/kg	As(III+V) mg/kg	SD mg/kg
624	ZnO	< 0,01	0,30	0,30	0,07
707	Minerální krmivo pro prasata	< 0,01	1,25	1,25	0,12
714	Minerální krmivo pro prasata	< 0,01	0,94	0,94	0,01
744	Minerální krmivo pro prasata	< 0,01	1,52	1,52	0,01
755	Minerální krmivo pro drůbež	< 0,01	0,57	0,57	0,04
780	$CaCO_3$	< 0,01	0,29	0,29	0,05
820	Minerální krmivo pro skot	< 0,01	2,67	2,67	0,10
939	MgO	< 0,01	< 0,01	< 0,01	–
1098	Minerální krmivo pro drůbež	< 0,01	3,29	3,29	0,01
1240	Minerální krmivo pro prasata	< 0,01	1,33	1,33	0,09
1259	Minerální krmivo pro skot	< 0,01	0,16	0,16	0,06

6.3 Srovnání extrakčních postupů

V následující tabulce jsou prezentovány procentuální obsahy anorganického arsenu z celkového obsahu arsenu spolu se směrodatnými odchylkami, jak pro vodní třepací lázeň, tak pro mikrovlnou extrakci.

Tabulka 11. Procentuální zastoupení anorganického arsenu ve vzorcích krmiv.

Číslo	Typ vzorku	Třepací lázeň		Mikrovlná extrakce	
		As(III+V)	SD	As(III+V)	SD
781	Rybí moučka	–	–	8,7	1,4
1036	MPZ Maďarsko	95,5	7,6	104,3	5,25
1037	MPZ Maďarsko	88,1	7,0	86,7	7,1
1092	Rybí moučka	15,0	3,6	–	–
624	ZnO	0,7	0,2	1,2	0,3
707	Minerální krmivo pro prasata	41,6	2,3	64,2	7,1
714	Minerální krmivo pro prasata	21,5	1,2	64,9	3,3
744	Minerální krmivo pro prasata	35,7	3,3	50,6	2,5
755	Minerální krmivo pro drůbež	–	–	18,2	1,6
780	$CaCO_3$	–	–	2,9	0,5
820	Minerální krmivo pro skot	53,4	3,1	85,6	5,3
1098	Minerální krmivo pro drůbež	42,4	2,2	70,4	3,6
1240	Minerální krmivo pro prasata	38,9	2,1	42,1	3,5
1259	Minerální krmivo pro skot	17,0	1,7	5,9	2,3

Pokud jde o stanovení jednotlivých anorganických forem arsenu, je vhodná extrakce na třepací vodní lázni, kde se nepoužívá peroxid vodíku, díky kterému dochází k oxidaci trojmocného arsenu na pětimocný.

Z výsledků je dále patrné, že při extrakci z krmiv organického původu, které obsahují anorganický arsen, je výtěžnost téměř 100%. Srovnáním obou extrakčních postupů je patrné, že u vzorků krmiv minerálního původu je mikrovlnná extrakce v prostředí kyseliny chlorovodíkové a peroxidu vodíku účinnější nebo stejně účinná jako extrakce na vodní třepací lázni v prostředí kyseliny chlorovodíkové. U jednotlivých vzorků minerálních krmiv se výtěžnosti podstatně liší. Můžeme pouze konstatovat, že obě extrakční metody jsou nedostačující pro vyextrahování 100 % anorganických forem arsenu.

6.4 Validační parametry

Z naměřených dat byly vypočítány validační parametry (instrumentální mez detekce a stanovitelnosti, opakovatelnost a nejistota) v programu Effivalidation 3.0 pro jednotlivé formy anorganického arsenu a extrakční postupy.

Tabulka č. 12. Základní validační parametry metody pro stanovení anorganických forem arsenu.

Parametr	Třepací vodní lázeň		MW
	As(III)	As(V)	As(V)
Mez detekce	0,004 mg/kg	0,004 mg/kg	0,002 mg/kg
Mez stanovitelnosti	0,012 mg/kg	0,013 mg/kg	0,007 mg/kg
Opakovatelnost	6 %	6 %	5 %
Nejistota	12 %	12 %	11 %

Z tabulky je patrné, že za daných podmínek není významný rozdíl ve validačních parametrech mezi extrakcí v třepací vodní lázni a mikrovlnné exktrakci.

7 Závěr

Vyvinutá HPLC-ICP-MS metoda ke stanovení anorganického arsenu v krmivech organického původu byla validována a ověřena na reálných vzorcích. Byly testovány dva typy extrakce: extrakce v třepací vodní lázni a mikrovlnná exktrakce. Výtěžnost extrakcí je v rozmezí (86 – 104) %. Uvedenou metodou se může stanovit i obsah methylovaných aniontů (MMA a DMA). Další organické formy arsenu jako jsou arsenocholin a arsenobetain za uvedených experimentálních podmínek nelze stanovit, protože eluují v mrtvém objemu chromatografického systému. Vzhledem k nízké toxicitě však tyto analyty nejsou předmětem úřední kontroly. U vzorků minerálního původu bylo zjištěno, že zvolený postup extrakce je nedostačující a účinnost extrakce s ohledem na matrici je (1 – 85) %, přičemž nízké hodnoty výtěžnosti (v jednotkách procent) jsou dosahovány u „čistých“ anorganických solí a oxidů. Minerální krmiva nepodléhají úřední kontrole na obsah anorganického arsenu, protože se předpokládá, že veškerý arsen je v minerálních krmivech přítomen jako anorganický. Experimenty v rámci této práce byly proto prováděny pouze ze zájmu, zda by bylo možné

rozlišit jednotlivé formy anorganického arsenu – tedy zda je ve vzorku arsen přítomen jako pětimocný, přídně jako trojmocný a nebo obě formy.

Lze tedy konstatovat, že vyvinutá metoda je vhodná pro stanovení anorganických forem arsenu v krmivech organického původu s využitím obou testovaných extrakčních technik.

Národní referenční laboratoř pro stanovení těžkých kovů v krmivech se již pravidelně účastní testů způsobilosti, pořádanými EU-RL Geel na stanovení anorganického arsenu v potravinách a krmivech.

8 Literatura

1. Commission directive 2009/141/EC.
2. J. J. Sloth, K. Julshamn, A. K. Lundbye, Total arsenic and inorganic arsenic content in Norwegian fish feed products. Aquaculture Nutrition 11, 2005, 61-66.
3. E. Sanz, R. Munoz-Olivas, C. Cámara, Evaluation of focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. Journal of Chromatography A 1097, 2005, 1-8.
4. A.A. Ammann, Arsenic Speciation Analysis by Ion Chromatography – A Critical Review of Principles and Applications. American Journal of Aanalytical Chemistry 2, 2011.
5. A. Gonzáles, A. Lorens, M.L. Cervera, S. Armenta, M. de la Guardia, Non-chromatographic speciation of inorganic arsenic in mushrooms by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. Food Chemistry 115, 2009, 360-364.
6. X. Cao, Ch. Hao, G. Wang, H. Yang, D. Chen, X. Wang, Sequential extraction combined with HPLC-ICP-MS for As speciation in dry seafood products. Food Chemistry 113, 2009, 720-726.
7. I. B. Rodriguez, G. Raber, W. Goessler, Arsenic speciation in fish sauce samples determined by HPLC coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. Food Chemistry 112, 2009, 1084-1087.
8. T.D. Ninh, Y. Nagashima, K. Shiomi, Quantification of seven arsenic compounds in seafood products by liquid chromatography/electrospray ionization-single quadrupole mass spectrometry (LC/ESI-MS). 23(12, 2006, 1299-1307.
9. J. T. van Elteren, Z. Šlejkovec, M. Kahn, W. Goessler, A systematic study on the extractability of arsenic species from algal certified reference material IAEA-140/TM (Fucus sp., Sea Plant Homogenate) using methanol/water extractant mixtures. Aanalytica Chimica Acta 585, 2007, 24-31.
10. E. H. Larsen, J. Engman, J. J. Sloth, M. Hansen, L. Lorhem, Deetermination of inorganic arsenic in white fish using microwave-assisted alkaline alcoholic sample dissolution and HPLC-ICP-MS. Anal. Bioanal. Chem. 381, 2005, 339-346.
11. Z. Šlejkovec, E. Kápolna, I. Ipolyi, J. T. van Elteren, Arsenosugars and other arsenic compounds in littoral zone algae from the Adriatic Sea. Chemosphere 63, 2006, 1098-1105.
12. Potraviny – Stanovení stopových prvků – Stanovení anorganického arsenu v mořských řasách atomovou absorpční spektrometrií s generováním hydridů (HGAAS) po kyselé extrakci. ČSN EN 15517, 2008.

Vývoj kalibrační rovnice pro oves pluchatý 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

Cílem práce bylo vytvořit a optimalizovat kalibrační model pro stanovení obsahu dusíkatých látek (N-látek) metodou NIR spektroskopie (FT-NIR) a zároveň vyhodnotit možnosti využití této moderní analytické metody k predikci sledovaného parametru v ovsu pluchatém.
Metodou FT-NIR spektroskopie byl vytvořen a optimalizován kalibrační model pro stanovení obsahu N-látek v ovsu pluchatém. Všechny vzorky pocházely z laboratoře odrůdového zkušebnictví, u nichž byl znám koncentrační obsah sledovaného parametru získaného laboratorní referenční metodou (LRM). Příslušný kalibrační model pak byl následně ověřen pomocí Studentova t testu na porovnání dvou analytických metod. Získané výsledky ukázaly, že metoda FT-NIR spektroskopie je vhodná pro stanovení obsahu N-látek v ovsu pluchatém.

2 Úvod

Oves setý *(Avena sativa, L.)* patří k nejmladším kulturním obilovinám. V kultuře se u nás pěstují dvě formy ovsa setého – oves pluchatý (obr 1.) a oves nahý (obr 2.) s bezpluchou obilkou. Obě formy se u nás pěstují jako jařiny.

U ovsa pluchatého je obilka pevně sevřena obaly kvítků – pluchou a pluškou – a při sklizni se z těchto obalů neuvolňuje. Podíl pluch tvoří přibližně (22 – 24) % hmotnosti zrna. Pro potravinářské účely je nutné zrno loupat. Oves nahý (bezpluchý) je určen pro zpracování v potravinářském průmyslu, protože odpadá odstraňování pluch z obilek. Pro potravinářské účely je nutné povrchové broušení obilek, u kterých se odstraňují dlouhé křemičité chloupky.

Oves setý se využívá v potravinářském průmyslu především pro výrobu vloček a potravin zdravé výživy, ale převažuje jeho využití pro krmné účely. Oves je typickým krmivem pro koně a plemeníky. Pozitivně působí na povzbuzení pohlavního pudu a u samic je popisován laktogenní účinek. Nahý nebo loupaný je vhodným krmivem i pro mláďata, neboť pozitivně působí na sliznici trávicího traktu. Tyto příznivé účinky se připisují slizovitým látkám, které tvoří polysacharidy, především β-glukany.

Oves setý vytváří rovněž velké množství nadzemní biomasy, která se také sklízí a má hlavní využití na zelené krmení nebo na senáž (konzervovaná píce).

Z chemického hlediska ovesné zrno obsahuje přibližně (8 – 14) % bílkovin, které mají vyšší biologickou hodnotu než bílkoviny jiných obilovin. Většinu tvoří protoplasmatické bílkoviny, které mají vyšší obsah lyzinu, methioninu a threoninu. Zásobní bílkoviny gliadin (prolamin) a avenin (glutenin) jsou zastoupeny jen v malém množství. Obsah BNLV (bezdusíkatých látek výtažkových) je asi 57 % a převážnou většinu tvoří škrob. Oves obsahuje také vyšší množství tuku (asi 5 %), který je tvořen hlavně nenasycenými mastnými kyselinami, kyselinou olejovou a linolovou. Vláknina je obsažena převážně v buňkách pluchy a plušky, které se při sklizni neodstraňují. Obsah hrubé vlákniny je nejvyšší ze všech obilovin (asi 12 %), což zhoršuje stravitelnost ovsa. Pro mladá zvířata je proto vhodnější oves loupaný nebo nahý. Oves nahý má jen asi 1,5 % hrubé vlákniny. V ovsu jsou obsaženy ve vyšším množství minerální látky, hlavně draslík, fosfor a vápník. Obsah vitamínů skupiny B je rovněž vyšší než v jiných obilovinách.



Obr 1. Zrna ovsa setého – pluchatá forma [1]



Obr 2. Zrna ovsa setého – nahá forma [1]

3 Materiál a metody

3.1 Princip stanovení dusíkatých látek (N-látek)

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 velmi stručně popsána klasická laboratorní metoda mokré chemie, pomocí které byly získány referenční hodnoty použité pro kalibraci NIR spektrometru. Výsledek referenčních hodnot v kalibraci je uveden jako průměr ze dvou paralelních stanovení.

Stanovení obsahu dusíkatých látek (N-látek)

Stanovení obsahu dusíkatých látek (hrubého proteinu) vychází z normy ČSN EN ISO 20483 [3]. Tato norma je platná pro stanovení obsahu dusíkatých látek v obilovinách a luštěninách.

Dusíkaté látky se stanoví metodou podle Kjeldahla 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).

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. V rámci ČR je ÚKZÚZ ojedinělým pracovištěm zaměřeným na tento typ laboratorního testování. Požadavek na dostatečné množství vzorků pro vytvoření robustních kalibračních modelů byl spolehlivě splněn. V případě ovsa pluchatého bylo proměřeno celkem 100 vzorků pro kalibraci parametru N-látek. Vzorky použité pro kalibraci NIR spektrometru pocházely z regionálních pracovišť ÚKZÚZ a byly nashromážděny za 2 roky.

Všechny vzorky ovsa pluchatého pro stanovení sledovaného parametru se před měřením pomelou na laboratorním mlýnku VM-7 (Minirazant) a následně prosejí přes síto 1 mm. NIR spektra takto připravených vzorků se nasnímají v křemenných kyvetách o průměru 3 cm v režimu reflektance. NIR měření probíhá v blízké infračervené spektrální oblasti přístrojem Nicolet Antaris s Fourierovou transformací. Spektrální reflektance udávaná jako průměr ze 120 scanů spektra byla zobrazena jako logaritmus inverzní reflektance (log 1/R) v 0,5nm intervalech v rozsahu vlnových délek (1000 – 2500) nm. Každý vzorek se změří dvakrát, pro další vývoj kalibračního modelu se použije průměrné spektrum.

Pro správný vývoj NIR kalibračního modelu je důležité, aby koncentrační rozsah kalibrovaného parametru byl co možná nejvyšší. Koncentrační rozsah N-látek ve vzorcích ovsa setého je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Složení vzorků ovsa pluchatého použitých pro kalibraci přístroje Nicolet Antaris měřených v reflektanci, počet vzorků = 100.

	N-látky (%/s)
Minimum	9,00
Maximum	14,82
Průměr	11,80

Legenda: %/s – procentuální obsah sledovaného parametru přepočtený na obsah sušiny

Důležitým předpokladem vytvoření úspěšného kalibračního modelu je, aby laboratorní referenční metoda používaná pro kalibraci NIR spektrometru byla dostatečně přesná.

Výsledky referenčních hodnot obou parametrů získaných klasickými metodami mokré chemie se prezentují jako průměr paralelních stanovení.

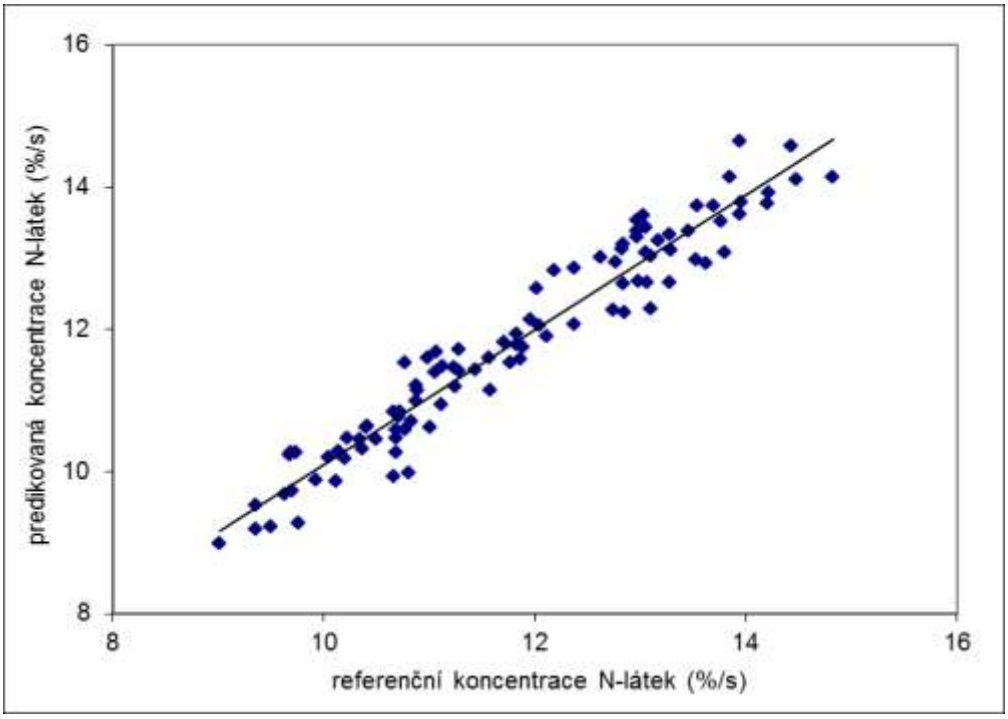
V prvním kroku před vlastní regresní tvorbou kalibračního modelu se na jednotlivé soubory kalibračních spekter (vzorků) aplikuje matematická korekce spekter SNV, která eliminuje vliv velikosti částic. Tento krok je velmi důležitý u vzorků, které před vlastní NIR analýzou prošly úpravou sítováním nebo 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 sledovaného parametru v ovsu pluchatém 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 byl rovněž proveden výběr vhodných vlnových délek, takových, 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

Vytvořená kalibrační závislost pro N-látky v ovsu pluchatém je zobrazena na obr. 3.



Obr. 3: **Kalibrační závislost pro parametr N-látky (%/s).**

Souhrnný přehled získaných kvalitativních parametrů kalibračního modelu stanoveného regresní metodou PLS pro parametr N-látky v ovsu pluchatém uvádí tabulka 2.

Tabulka 2. Kvalitativní parametry kalibračního modelu vzorků ovsa pluchatého

Parametr	**RMSECV**	**R**
N-látky (%/s)	0,37	0,97

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

Z tabulky 2 je zřejmé, že pro stanovení obsahu N-látek metodou FT-NIR spektroskopie byl vytvořen a optimalizován kalibrační model s vysokou hodnotou korelačního koeficientu (R). Na základě tohoto zjištění lze konstatovat, že metoda NIR spektroskopie je vhodná pro stanovení N-látek ve vzorcích ovsa pluchatého.

Predikční schopnosti takto vytvořeného kalibračního modelu pro stanovení N-látek ve vzorcích ovsa pluchatého byly ověřovány na nezávislých vzorcích, které nebyly zahrnuty do vývoje kalibračního modelu. 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* [4]. Vypočtené hodnoty *t* testu byly porovnány s kritickou hodnotou t_α. Získané výsledky uvádí tabulka 3.

Tabulka 3. Kvalitativní parametry porovnání 2 analytických metod.

Parametr	**k**	$\bar{x}_A$ **(LRM)**	$\bar{x}_B$ **(NIR)**	**α**	**t**	$\mathbf{t_{\alpha(0,05)}}$
N-látky (%/s)	15	10,974	10,938	0,05	0,42	2,145

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) hodnota Studentova testu *t*

Z tabulky 3 je zřejmé, že vypočtená hodnota *t* pro N-látky je 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 N-látek ve vzorcích ovsa pluchatého.

5 Závěr

Na dostatečně obsáhlém souboru vzorků ovsa pluchatého byl optimalizován kalibrační model pro stanovení obsahu dusíkatých látek (N-látek) metodou FT-NIR spektroskopie.

Z prezentovaného grafu kalibrační závislosti a hodnot kvalitativních parametrů vytvořeného kalibračního modelu (RMSECV, R) je zřejmé, že hodnoty N-látek stanovené laboratorní referenční metodou a predikované metodou NIR spektroskopie spolu vysoce korelují (R = 0,97).

Zároveň byla ověřena predikční schopnost kalibračního modelu a tedy i porovnání 2 analytických metod. Prezentované výsledky potvrdily vhodnost metody NIR spektroskopie a lze ji doporučit pro predikování obsahu N-látek v ovsu pluchatém.

6 Literatura

1. http://www.vfu.cz
2. http://www.etext.czu.cz
3. ČSN EN ISO 20483, Obiloviny a luštěniny – Stanovení obsahu dusíku a výpočet obsahu dusíkatých látek – Kjeldahlova metoda, 4/2007.
4. Eckschlager, K., Horsák, I., Kodejš, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. SNTL/ ALFA Praha, 1980.

Optimalizace a širší využití metody Mehlich 3 v systému agrochemického zkoušení půd

Část 1. Optimalizace stanovení P a S metodou Mehlich 3

Jiří Zbíral, Elena Obdržálková, *Michaela Smatanová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno, *Sekce úřední kontroly, Oddělení biologických testací, Hroznová 2, 656 06 Brno
jiri.zbiral@ukzuz.cz

1 Souhrn

Cílem práce bylo ověření možnosti využití metody stanovení prvků metodou ICP-OES v extraktu podle Mehlicha 3 a širší využití výsledků měření, které tato metoda umožňuje. Jde především o stanovení síry, stanovení mikroelementů měď, zinek, mangan, železo a bor a o stanovení indexu uvolnitelnosti fosforu (PM3 index) z extrahovaných obsahů hliníku a železa. Současně byly prověřeny další možnosti pro korekci výsledků stanovení fosforu v karbonátových půdách. Tato práce navazuje na již dříve publikované práce, ale její součástí je tentokrát i návrh kriterií pro hodnocení obsahů síry, stanovení fosforu metodou ICP-OES a mikroelementů v extraktu podle Mehlicha 3.

První část práce se zabývá problematikou stanovení fosforu a síry a možnost využití PM3 indexu. Ve druhé části budou uvedeny návrhy kriterií pro využití metody M3 pro stanovení mikroelementů.

2 Úvod

Metoda Mehlich 3 (1) se již celou řadu let využívá v systému AZP v ČR (2, 3) a obdobných systémech zkoušení půd v mnoha dalších zemích. Jedná se o univerzální extrakční činidlo (4) a s rozvojem multielementárních analytických metod, především ICP-OES, byla provedena

celá řada studií pro rozšíření potenciálu této metody (5) i pro stanovení mikroelementů včetně boru, odhadu kationtové výměnné kapacity, různých indexů pro potřebu výživy rostlin nebo ochranu životního prostředí a dokonce i pro stanovení některých těžkých kovů (6, 7, 8). Podrobně o této problematice pojednává sborník prací vydaný ÚKZÚZ (9).

Fosfor je intenzivně studovaným prvkem v oblasti výživy rostlin. Je to dáno nejen jeho významem ve výživě rostlin, ale i velmi komplikovanými přeměnami, kterými tento prvek v půdě prochází. Současná kriteria jsou založena na spektrofotometrické metodě, která stanoví pouze fosfor ve formě fosforečnanové. Metoda ICP-OES (10, 11) pak stanoví celkový fosfor přítomný v půdním extraktu.

Je vhodné hnojit fosforem tak, aby vedle uspokojení potřeb rostlin byly před kontaminací tímto prvkem ochráněny povrchové i podzemní vody. Celá řada studií se věnuje úpravám hnojení na základě určitých indexů. Tyto indexy zohledňují schopnost půdy vázat fosfor. Většinou je tento index molárním (nebo jiným) poměrem mezi extrahovaným fosforem a železem resp. fosforem a součtem železa a hliníku. Pro tento index se s výhodou používá metoda Mehlich 3 se současným stanovením fosforu, železa, hliníku a dalších prvků metodou ICP-OES (12, 13, 14).

Dalším problémem při stanovení fosforu v půdách je skutečnost, že u karbonátových půd dochází k rychlé neutralizaci kyselých extrakčních roztoků a k významnému snížení jejich extrakční schopnosti. Nízké hodnoty stanoveného přijatelného fosforu pak neodpovídají jeho skutečné přijatelnosti rostlinami. Řešením je buď korekce výsledků nebo snížení navážky půdy pro extrakci tak, aby nedošlo k nežádoucí změně pH extrakčního činidla.

Na základě měření změny pH extrakčního činidla v průběhu extrakce navrhli Deller (15) a Zorn (16) způsob korekce stanoveného obsahu fosforu v extrakčním činidle CAL. Obdobný postup navrhl i Zbíral (17) pro různé extrakční postupy. V případě metody Mehlich 3 se tato korekce v systému AZP ČR již řadu let využívá. Nicméně zlepšení korekce je žádoucí, protože pro některé karbonátové půdy se zdá být korekce nedostatečná a výsledky stanovení fosforu jsou příliš nízké.

I když potřeba síry a fosforu pro rostliny je přibližně shodná, stále se věnuje mnohem větší pozornost fosforu. Důvodem je jednak významná imobilizace fosforu v půdě a jednak skutečnost, že až do nedávné doby byl přísun síry ve formě atmosférických spadů více než dostatečný. Zájem o síru v ČR již řadu let narůstá úměrně se snižováním obsahu síry v atmosférických spadech a s rozšiřováním pěstování plodin s vyššími nároky na tuto živinu (18). Stanovení síry metodou ICP-OES je velmi vhodné (19). Stanoví se sice celkový obsah síry v extraktu a není možné rozlišit její jednotlivé formy jako např. při použití kapilární

elektroforézy (20), ale pro potřeby výživy rostlin je celkový obsah síry v extraktu zpravidla vyhovující (21).

3 Materiál a metody

3.1 Vzorky půd

První soubor vzorků (A, 1181 vzorků), který byl použit pro publikaci (9), byl získán z běžných zemědělských půd a z půd Bazálního monitoringu zemědělských půd. Vzorky byly odebrány z ploch na území celé ČR. V tomto souboru bylo zvýšené procento ploch s obsahem karbonátů (484 vzorků). Popisná statistika tohoto souboru je uvedena v tabulce 1.

Druhý soubor (B, 1167 vzorků) byl získán výběrem podniků vzorkovaných v roce 2011 v rámci AZP ČR s tím, že část vzorků byla z oblastí s vyšším obsahem karbonátů a část půd byla z oblastí, kde hrozí nedostatek síry. Popisná statistika tohoto souboru je uvedena v tabulce 2.

Různé extrakční metody pro stanovení síry byly porovnány na výběru 744 vzorků ze souboru A.

Vzorky byly vysušeny na vzduchu a upraveny speciální půdní prosévačkou (bez drcení skeletu) na jemnost < 2 mm.

Tabulka 1. Popisná statistika souboru vzorků A pro všechny půdní druhy (1181 vzorků). Údaje (mg/kg), karbonáty (%), pH bezrozměrné. Hodnoty v extraktu podle Mehlicha 3.

Parametr	AP	MED	MAX	MIN	LQ	UQ
P_ICP	120	100	834	0	60	154
P_ICPkor	136	111	1252	0	73	167
P_SPEF	107	91	643	0	56	134
P_SPEFkor	122	103	833	0	68	148
K	342	275	1627	39	192	406
Mg	205	183	1247	31	123	254
Ca	5800	3422	42510	221	2192	7829
S	30,2	22,9	1427	2,7	17,5	29,2
Cu	4,71	3,59	67,10	0,26	2,62	4,99
Zn	6,50	5,39	92,5	0,53	3,76	7,44
Mn	142	137	403	12	99	182
Fe	300	326	889	32	148	423
Al	687	733	1664	1,9	489	894
pHvým	6,80	7,05	7,90	3,80	6,22	7,47
pHextr	3,35	3,18	5,83	2,60	2,99	3,68
CO_3	8,6	4,3	55,6	0	1,35	12,9

Legenda: AP – aritmetický průměr, MED – medián, MAX maximální hodnota, MIN – minimální hodnota, LQ-dolní kvartil, UQ – horní kvartil

Parametry: ICP – měřeno metodou ICP-OES, SPEF – měřeno metodou UV-VIS spektrofotometrie, pHextr – měření pH extraktu po extrakci, kor – hodnota korigovaná

Tabulka 2. Popisná statistika souboru vzorků B pro všechny půdní druhy (1167 vzorků). Údaje (mg/kg), karbonáty (%), pH bezrozměrné. Hodnoty v extraktu podle Mehlicha 3.

Parametr	AP	MED	MAX	MIN	LQ	UQ
P_ICP	94	72	845	0,3	38	136
P_ICPkor	104	83	845	2,9	49	142
P_SPEF	87	68	678	1	35	123
P_SPEFkor	96	79	678	5	46	130
K	232	203	2614	32	145	291
Mg	239	162	1473	15	97	318
Ca	6028	3412	43730	99	1460	8005
S	15,5	9,8	1745	2,3	7,3	13,9
Mn	181	112	3092	8	73	179
Fe	281	301	982	22	122	398
Al	631	597	1955	1	273	944
pHvým.	6,41	6,80	7,80	4,00	5,30	7,50
pHextr	3,34	3,10	5,60	2,50	2,80	3,70
CO_3	4,6	0	48,2	0	0	6,9

Legenda: AP – aritmetický průměr, MED – medián, MAX maximální hodnota, MIN – minimální hodnota, LQ-dolní kvartil, UQ – horní kvartil

Parametry: ICP – měřeno metodou ICP-OES, SPEF – měřeno metodou UV-VIS spektrofotometrie, pHextr – měření pH extraktu po extrakci, kor – hodnota korigovaná

4 Přístroje a zařízení

1. Rotační třepačka.
2. Dávkovací zařízení na 100 ml.
3. Dilutor A310 (Gilson, Francie), Microlab 600, Hamilton (Bonaduz, Švýcarsko).

4. Spektrofotometr U 1100 (Hitachi, Japonsko), Cary 50 (Varian, Mulgrave, Austrálie), oba s průtokovou kyvetou o optické délce 10 mm.
5. pH-metr.
6. Optický emisní spektrometr s induktivně vázaným plazmatem JY-138 ULTRACE (Jobin-Yvon, Francie) a Iris Intrepid (Thermo, USA).

5 Chemikálie a roztoky

Byly používány chemikálie a demineralizovaná voda s kontrolovaným obsahem stanovovaných složek. Kalibrační standardní roztoky fosforu a síry byly připraveny ředěním certifikovaného základního standardního roztoku o koncentraci 1 mg/ml (Analytika, Praha). Přístroj pro měření pH byl kalibrován na certifikované pufry

6 Výsledky a diskuse

6.1 Stanovení fosforu a určení kriterií pro hodnocení metodou Mehlich 3

Z porovnání výsledků stanovení v obou tabulkách (tabulka 1 a 2) je zřejmé, že rozdíl mezi stanovením fosforu metodou spektrofotometrickou a ICP-OES je v obou souborech shodný. Jak již bylo konstatováno v publikaci (9), jsou výsledky stanovení metodou ICP-OES asi o 10 % vyšší než výsledky metody spektrofotometrické. Obr. 1. uvádí histogram poměrů mezi metodou ICP-OES a metodou spektrofotometrickou.

Z histogramu na obr. 2 je zřejmé, že nejčastější absolutní rozdíl mezi oběma metodami je pouze 5 mg P/kg. Na obr. 3 je znázorněna regresní závislost mezi metodou spektrofotometrickou a metodou ICP-OES. Interval spolehlivosti absolutního členu regresní závislosti obsahoval nulu, a proto byla vypočítána regrese pouze pro tvar Y = bX. Koeficient b byl na hladině významnosti 95 % v rozmezí 1,077 – 1,091. To odpovídá průměrnému rozdílu mezi metodami na úrovni 8,4 %. Z průběhu závislosti i hodnoty determinačního koeficientu vyplývá, že vztah mezi oběma metodami je velmi těsný a přepočet kriterií je tedy možný. Návrh kriterií po přepočtu uvádí tabulka 3.

Tabulka 3. Návrh kriterií pro stanovení fosforu metodou ICP-AES

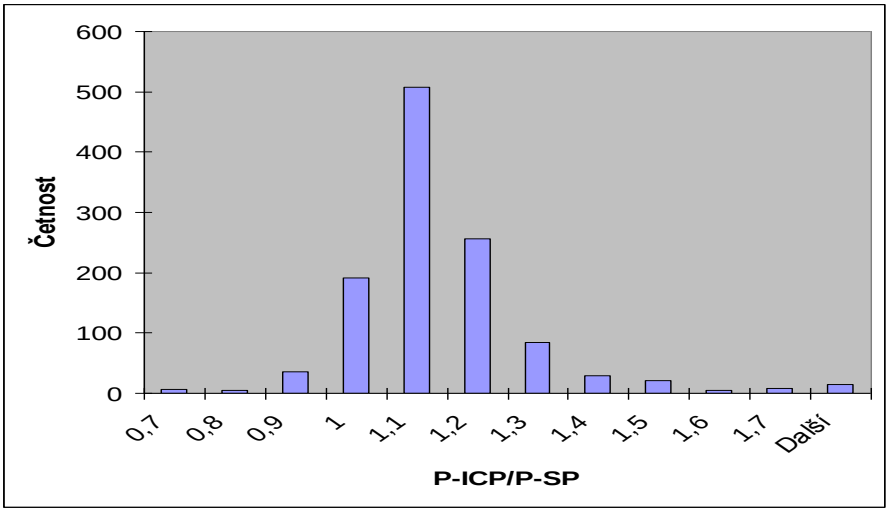
Obsah	**P - SP** (mg/kg)			**P - ICP-OES** (mg/kg)		
	Kultura			**Kultura**		
	OP	**TTP**	**SK**	**OP**	**TTP**	**SK**
Nízký	do 50	do 25	do 55	do 55	do 25	do 60
Vyhovující	51 – 80	26 – 50	56 – 100	56 – 85	26 – 55	61 – 110
Dobrý	81 – 115	51 – 90	101 – 170	86 – 125	56 – 100	111 – 185
Vysoký	116 – 185	91 – 150	171 – 245	126 – 200	101 – 165	186 – 265
Velmi vysoký	nad 185	nad 150	nad 245	nad 200	nad 165	nad 265

Legenda: OP – orná půda, TTP – trvalé travní porosty, SK – speciální kultury (vinice, sady), P – SP – fosfor stanovení spektrofotometricky, P – ICP-OES – fosfor stanovený metodou ICP-OES

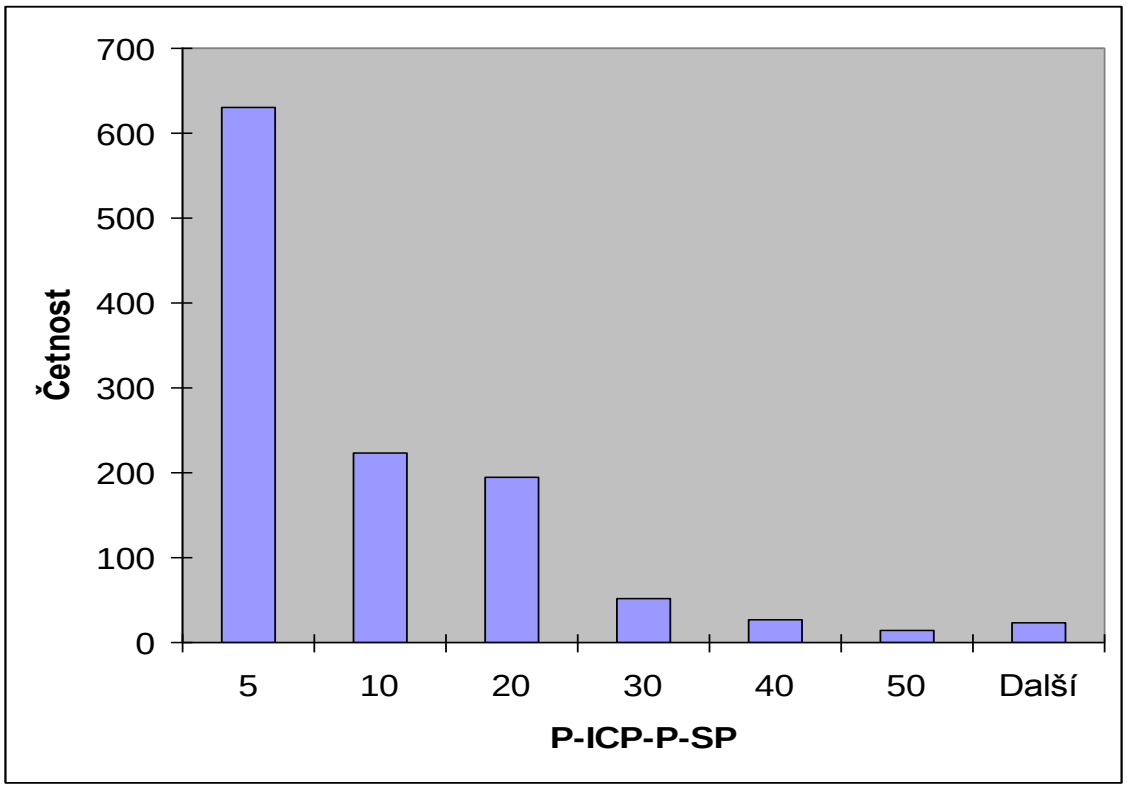
Navržená kritéria byla testována na souboru vzorků B. Nejprve byla vyhodnocena spektrofotometrická metoda (tedy podle stávající metodiky), potom byly vyhodnoceny výsledky stanovení fosforu metodou ICP-OES podle návrhu kriterií v tabulce 3 a pro ověření ještě vyhodnocení stanovení metodou IP-OES podle nezměněných kriterií určených pro spektrofotometrické stanovení. Výsledky porovnání uvádí tabulka 4. Z počtů vzorků zastoupených v jednotlivých kategoriích je zřejmé, že zavedení navrhovaných hodnot umožní přechod na metodu stanovení fosforu metodou ICP-OES bez významné změny hodnocení půdní úrodnosti. Oproti tomu ponechání shodných kriterií pro obě metody by znamenalo významný posun mezi kategoriemi směrem k vyšší zásobenosti půd fosforem, které by neodpovídalo skutečnosti.

Tabulka 4. Porovnání vyhodnocení výsledků pro soubor vzorků B.

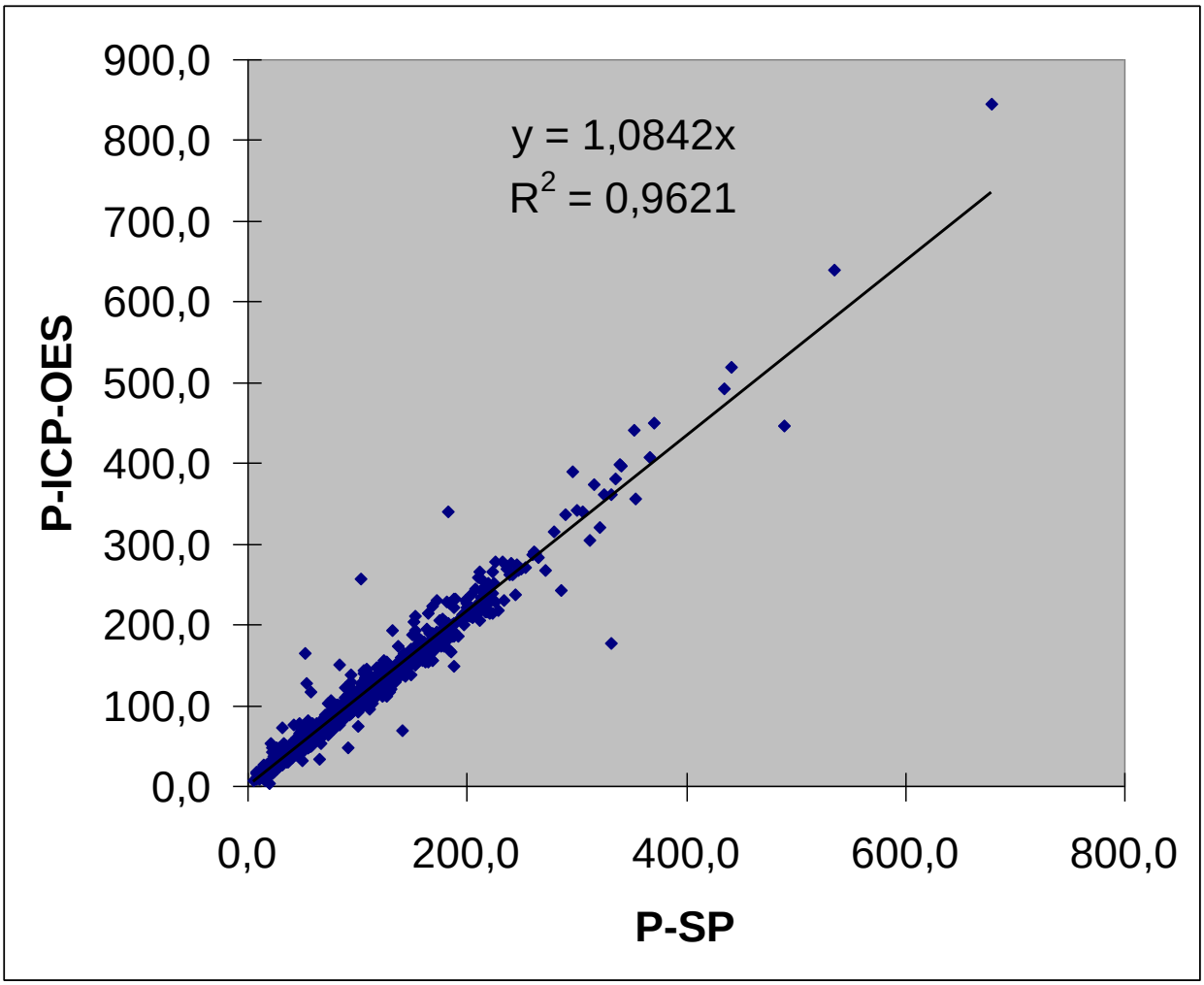
Hodnocení	Četnost zastoupení v jednotlivých kategoriích		
	P - SP	P-ICP-OES návrh kriterií	P-ICP-OES původní kriteria
Nízký	338	355	299
Vyhovující	256	233	257
Dobrý	247	220	207
Vysoký	219	248	259
Velmi vysoký	107	111	145



Obr. 1. Histogram poměru hodnot obsahu fosforu stanovených metodou ICP-OES a metodou spektrofotometrickou.



Obr. 2. Histogram rozdílů mezi obsahem fosforu stanoveným metodou ICP-OES a metodou spektrofotometrickou.

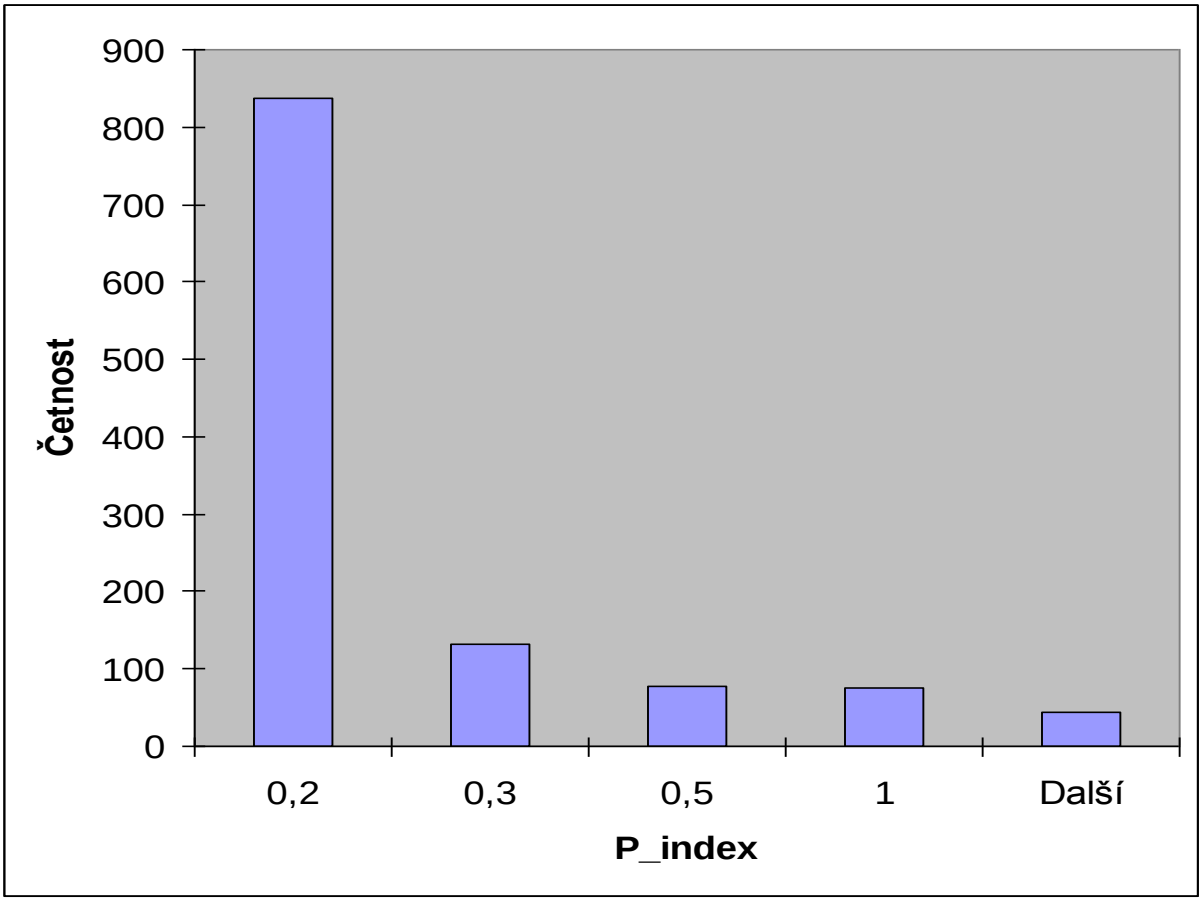


Obr. 3. Regresní závislost mezi stanovením fosforu metodou spektrofotometrickou a metodou ICP-OES.

6.2 Stanovení PM3 indexu a jeho využití

Z literárních pramenů byl vybrán PM3 index vypočítaný jako molární poměr fosforu a součtu železa a hliníku extrahovaného metodou Mehlich 3 (14). Výpočet z měřených hodnot byl podle vztahu: (P/30,974)/((Al/26,982) + (Fe/55,847)). Index roste s rostoucím obsahem fosforu a s klesajícím obsahem železa a hliníku. Kritická hodnota indexu, kdy je již třeba zvažovat vliv hnojení fosforem na životní prostředí, je 0,2. Pro výpočty byla použita hodnota fosforu po korekci na neutralizaci extrakčního činidla. Na obrázku 4 je zobrazen histogram rozdělení hodnot PM3 indexu pro vzorky souboru B. Většina vzorků (837) má PM3 index nižší než kritická hladina, dalších 132 pak překračuje tuto kritickou hladinu jen mírně

a možnost negativního ovlivnění hnojením fosforem je jen nízká. U 198 vzorků z celkových 1168 vzorků pak je třeba věnovat hnojení fosforem zvýšenou pozornost.



Obr. 4. Histogram pro P_index, vzorky souboru B.

6.3 Korekce stanovení fosforu na karbonátových půdách změnou navážky

Ze souboru vzorků B bylo vybráno 402 karbonátových půd a stanovení se provedlo pro standardní navážku 10 g a dále pro navážky 2 g, 1 g a 0,5 g. Objem extrakčního činidla se neměnil. Popisná statistika porovnávaného souboru půd je uvedena v tabulce 5. V tabulce 6 jsou uvedeny měřené hodnoty pro průměr celého souboru. Z výsledků vyplývá, že extrahovatelnost fosforu významně roste se snížením navážky a pro navážku 1 g již ve většině případů nedojde k nárůstu pH extrakčního činidla nad hodnotu 3,3, při které je nutné provádět početní korekci. Problémem však je, že změna poměru půdy a extrakčního činidla významně ovlivní i extrahovatelnost všech dalších prvků. Nejvíce železa, hliníku, hořčíku a vápníku,

méně draslíku, manganu a síry, ale i v těchto případech je zvýšení významné. Na obrázku 5 je uvedeno zvýšení průměrů hodnot vztažených na navážku 10 g, která byla použita jako základ. Ze získaných výsledků jednoznačně vyplývá, že pro tento účel nelze navážku změnit a současná korekce založená na měření pH extrakčního činidla po extrakci zůstává velmi dobrým přiblížením správné hodnotě. V systému AZP se používá dvojitý systém korekce pro fosfor na karbonátových půdách. První je založený na měření pH extrakčního činidla po extrakci podle experimentálně odvozené rovnice a druhý vychází z následné korekce podle pH extrakčního činidla. Tímto druhým krokem dojde ke snížení korigované hodnoty, které je však pravděpodobně chybné, protože vlastní snížení přístupnosti fosforu pro rostliny již dobře modeluje extrakční činidlo a žádná další korekce tedy není nutná. Doporučením pro zlepšení korekce fosforu měřeného metodou Mehlich 3 je tedy ponechání pouze první, experimentálně ověřené části korekce, založené na výpočtu v závislosti na pH extrakčního činidla po extrakci.

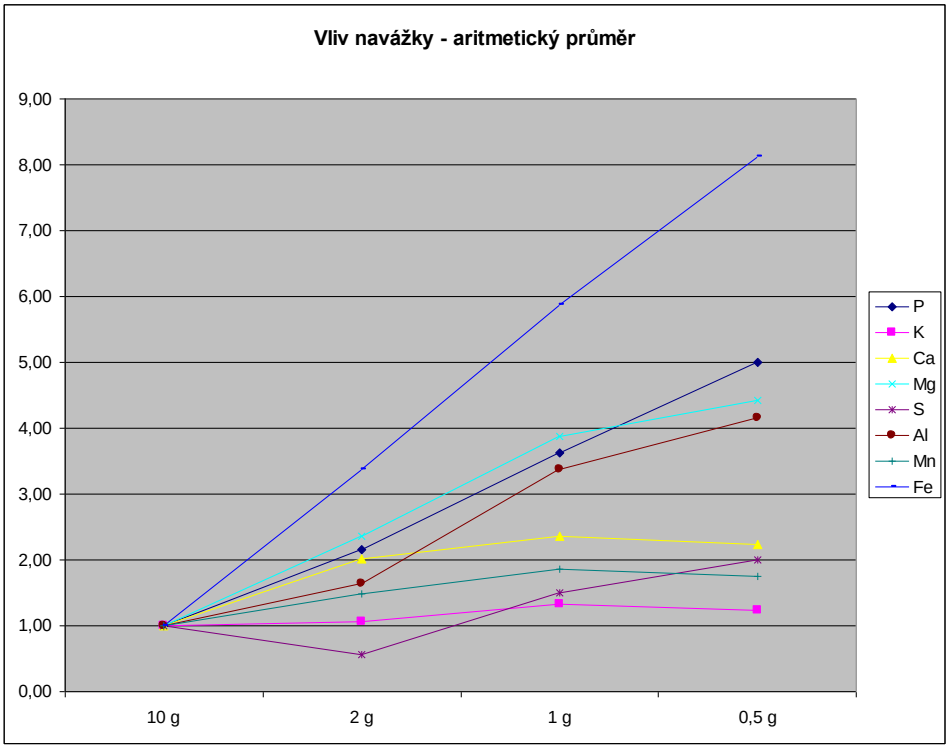
Tabulka 5. Popisná statistika souboru 402 vzorků karbonátových půd ze souboru B Údaje (mg/kg), karbonáty (%), pH bezrozměrné. Hodnoty v extraktu podle Mehlicha 3 měřené metodou ICP-OES.

Parametr	AP	MED	MAX	MIN	LQ	UQ
P	46	38	259	0,3	25	58
Pkor	69	56	361	2,9	66	135
K	286	252	1447	72	181	355
Mg	453	392	1473	112	302	547
Ca	11990	8810	43730	3370	6860	12790
S	18	10	1740	4	8	14
Mn	177	179	485	22	127	222
Fe	110	96	495	22	69	133
Al	233	200	889	0,6	56	347
pHvým.	7,6	7,6	7,8	6,4	7,5	7,7
pHextr	4,0	3,8	5,6	3,2	3,7	4,2
CO_3	11,6	10,9	48,2	0,2	4,8	16,9

Legenda: AP – aritmetický průměr, MED – medián, MAX maximální hodnota, MIN – minimální hodnota, LQ-dolní kvartil, UQ – horní kvartil, pHextr – měření pH extraktu po extrakci, Pkor – hodnota P korigovaná výpočtem

Tabulka 6. Vliv navážky půdy na extrakci metodou Mehlich 3. Hodnoty aritmetických průměrů souboru měřených metodou ICP-OES. Údaje (mg/kg), pH bezrozměrné.

Navážka	10 g	2 g	1 g	0,5 g
P	46	99	167	230
K	286	305	382	354
Ca	11990	24140	28280	26750
Mg	453	1071	1757	2000
S	18	10	27	36
Al	234	384	789	973
Mn	177	263	329	309
Fe	110	372	646	893
pHextr	3,98	3,45	3,2	2,82



Obr. 5. Vliv navážky na extrahovatelnost jednotlivých prvků. Relativní zvýšení vztažené k navážce 10 g.

6.4 Stanovení síry v extraktu podle Mehlicha 3 metodou ICP-OES

V předchozí studii bylo ze souboru A vybráno 721 vzorků, v nichž byla stanovena síra různými metodami. Z výsledků vyplynulo, že i přes poněkud volnější vztah mezi extrakcí vodou a extrakcí metodou Mehlich 3 jsou výsledky z hlediska úrovně hodnot prakticky shodné. Pro vyhodnocení výsledků stanovení síry v extraktu podle Mehlicha 3 byla proto vzata předběžná kriteria (Smatanová, Richter), která uvádí tabulka 7. Ta vycházejí především z publikace (23). Tam autoři citují výsledky stanovení kritických hodnot pro různá extrakční činidla. Pro extrakční činidlo Bray-Kurtz, které je složením blízké extrakčnímu činidlu Mehlich 3 uvádějí kritickou hodnotu 10 mg S/kg.

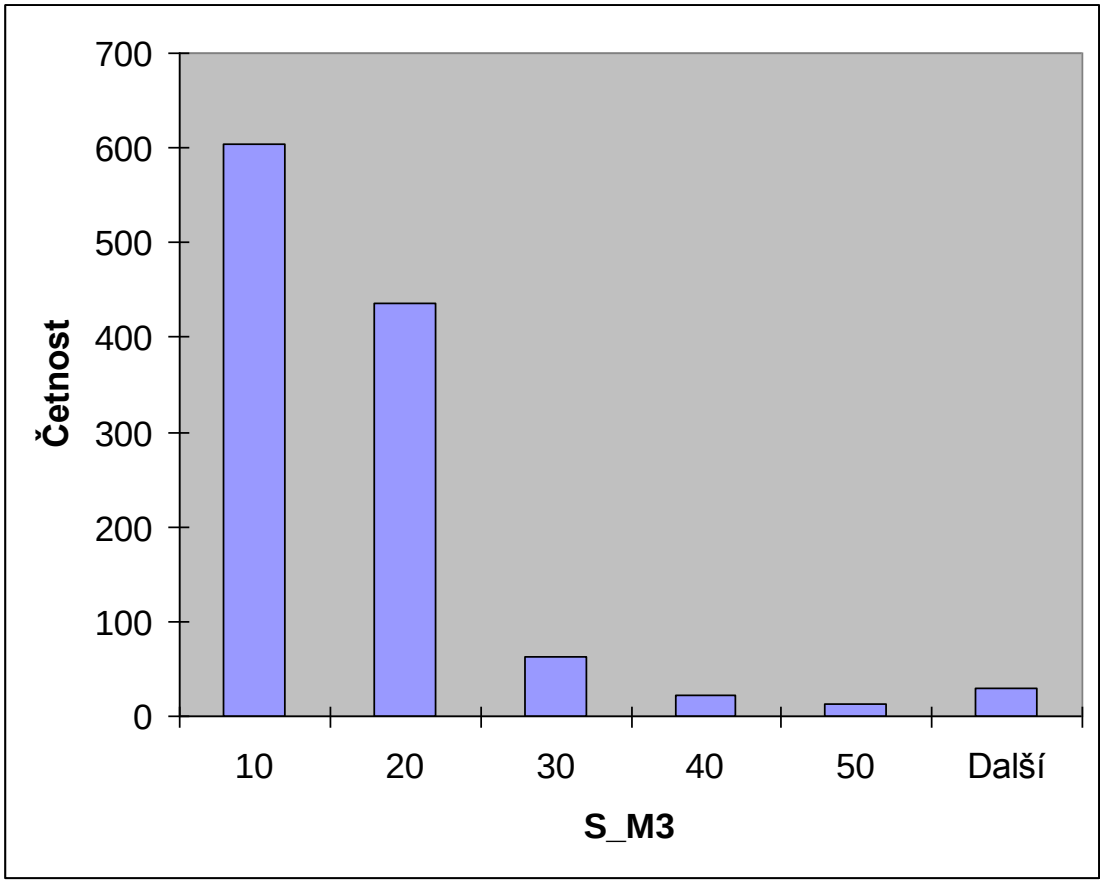
Tabulka 7. Návrh kriterií pro vodné extrakty půd a pro extrakt podle Mehlicha 3. Stanovení celkového obsahu síry v extraktu metodou ICP-OES.

S (mg/kg)	Hodnocení
do 10	Velmi kritický
11 – 20	Nízký
21 – 30	Vyhovující
31 – 40	Dobrý
41 – 50	Vysoký
nad 50	Velmi vysoký

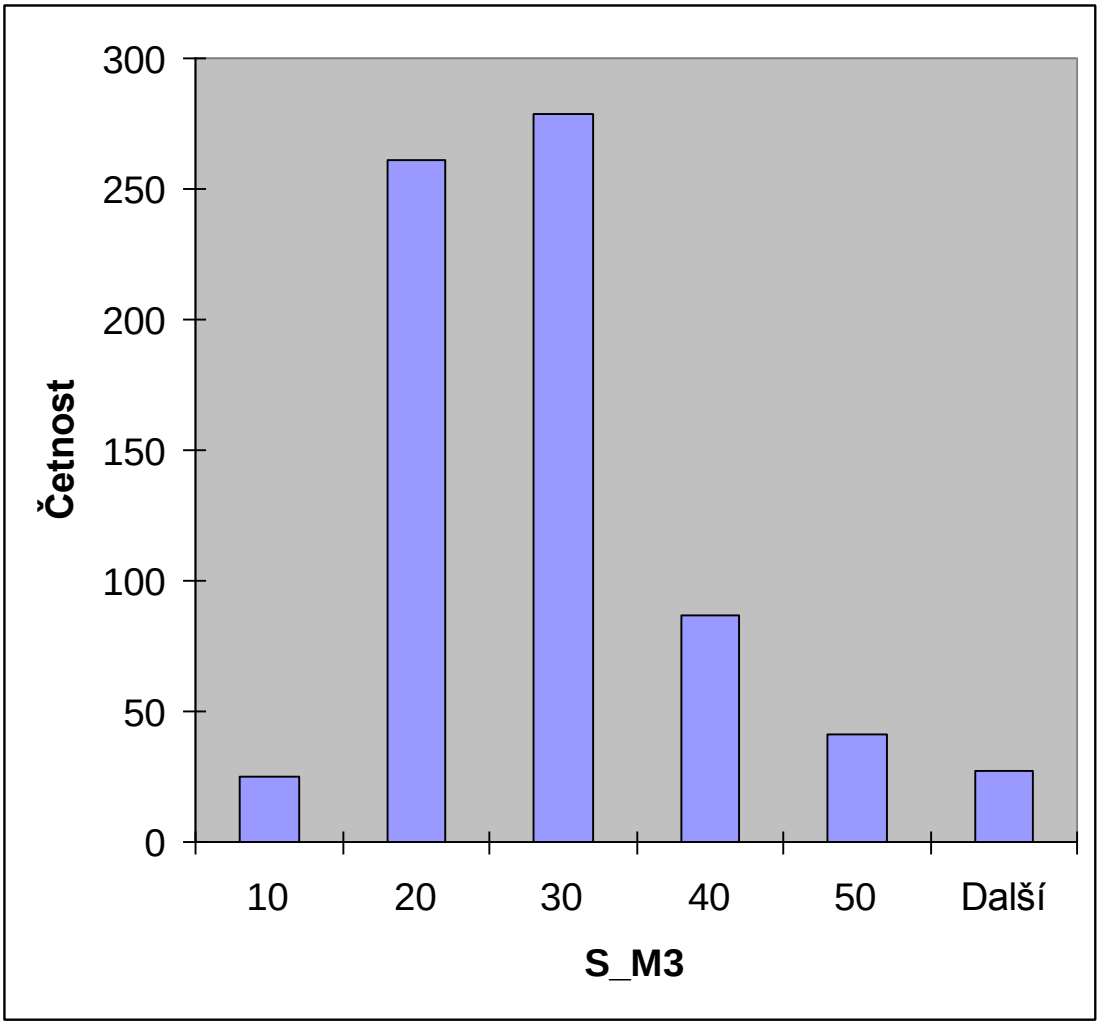
Podle uvedených kriterií byly vyhodnoceny výsledky podsouboru A (720 vzorků) a souboru B (1167 vzorků). První soubor reprezentoval přibližné zastoupení půd ČR (s určitým zvýšením počtu karbonátových půd), druhý soubor reprezentoval kromě zvýšeného zastoupení karbonátových půd i půdy potenciálně ohrožené nedostatkem síry. Na obr. 6 a 7 jsou uvedeny histogramy pro oba soubory. Je zřejmé, že vyhodnocení velmi dobře ukazuje na půdy ohrožené nedostatkem síry a je možné tato kriteria přijmout jako pracovní variantu pro další zpřesnění. V tabulce 8 je uvedeno zastoupení v jednotlivých kategoriích pro oba soubory vzorků.

Tabulka 7. Vyhodnocení obou souborů vzorků podle návrhu kriterií. Uvedena četnost zařazení vzorků do jednotlivých kategorií. Je uvedena četnost výskytu, čísla v závorkách uvádějí procento výskytu.

Hodnocení	Soubor A	Soubor B
Velmi kritický	25 (3)	604 (52)
Nízký	261 (36)	435 (37)
Vyhovující	279 (39)	63 (5)
Dobrý	87 (12)	23 (2)
Vysoký	41 (6)	13 (1)
Velmi vysoký	27 (4)	29 (3)



Obr. 6. Histogram zásobenosti půd sírou podle návrhu kriterií pro metodu Mehlich 3, soubor A (1167 vzorků, půdy s nízkým obsahem síry).



Obr. 7. Histogram zásobenosti půd sírou podle návrhu kriterií pro metodu Mehlich 3, soubor B (720 vzorků, půdy).

7 Závěr

Na základě získaných výsledků byla navržena kriteria pro stanovení fosforu a síry v extraktu podle Mehlicha 3 metodou ICP-OES. Možnost korekce výsledků stanovení fosforu na karbonátových půdách snížením navážky se ukázala jako nevhodná, protože změna poměru extrakčního činidla a půdy zásadním způsobem ovlivní i extrahovatelnost dalších prvků. Proto bylo navrženo ponechat první krok korekce na základě experimentálně zjištěné rovnice a zrušit následné snížení již korigované hodnoty v druhém kroku. Byla navržena možnost stanovení P-indexu na základě měření fosforu, železa a hliníku v extraktu podle Mehlicha 3 s vyhodnocením uváděným v literatuře. Uvedené úpravy zlepší výsledky stanovení fosforu na karbonátových půdách a významně zvýší využití potenciálu metody

Mehlich 3. V další části VÚ bude proveden návrh kriterií pro stanovení mikroelementů v extraktech půd metodou Mehlich 3, které umožní ještě více využít možnosti této metody při minimálním nárůstu finanční náročnosti stanovení.

8 Literatura

1. Mehlich, A.1984. Mehlich 3 soil test extractant a modification of Mehlich 2 extractant. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 15. 1409-1416.
2. Zbíral, J., Němec, P. 2000. Integrating of Mehlich 3 extractant into the Czech Soil Testing Scheme. Commun. Soil. Sci. Plant Anal. , 31(11-14), 2171- 2182.
3. K. Trávník, J. Zbíral, P. Němec, 1999. Agrochemické zkoušení půd – Mehlich III. ÚKZÚZ Brno, 100 stran. ISBN 80-86051-36-6.
4. Jones, J.B.Jr. 1990. Universal Soil Extractants: Their Composition and Use. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 21(13-16), 1091-1101.
5. Zbíral, J., 2000. Analýza půdních extraktů podle Mehlicha III metodou ICP-AES. Analysis of Mehlich III soil extracts by ICP-AES. Rostl. Výr. ,46 (4), 141-146.
6. Zbíral, J., Němec, P. 2009. Comparison of some soil extractants for determination of boron. Commun. Soil. Sci. Plant Anal. , 40(1), 96- 105.
7. Zbíral, J., Němec, P. 1999. Porovnání extrakčních postupů podle Mehlicha II a Mehlicha III pro stanovení přístupného fosforu, draslíku, hořčíku a vápníku v půdách ČR. Comparison of Mehlich II and Mehlich III extraction for determination of available phosphorus, potassium, magnesium and calcium in soils of the Czech Republic. Rostl. Výr. ,45 (1), 1-7.
8. Zbíral, J., Němec, P. 1998. Porovnání některých metod pro stanovení mědi, zinku, manganu a železa v půdách. Comparison of some methods for determination of copper, zinc, manganese and iron in soils. Rostl. Výr. ,44 (10), 443-447.
9. J. Zbíral a kol.2001. Porovnání extrakčních postupů pro stanovení základních živin v půdách ČR. (Comparison of extractants for determination of nutrients in soils of the Czech Republic).ÚKZÚZ Brno. ISBN 80 – 86051 – 69 – 2. 205 stran.
10. J. Zbíral, I. Honsa a kolektiv autorů 2010. Analýza půd I. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ. ÚKZÚZ Brno, Národní referenční laboratoř. 3. přepracované a rozšířené vydání. ISBN 978-80-7401-031-6.
11. Pittman, J. J., Zhang, H., Schroder, J. L. 2005. Differences of Phosphorus in Mehlich 3 Extracts Determined by Colorimetric and Spectroscopic Methods. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 36:1641-1659.
12. Guérin, J., Parent, L. E., Abdelhafid, R. 2007. Agri-environmental threshold using Mehlich III soil phosphorus saturation endex for vegetables in histosols. J. Environ. Qual. 36(4), 975-982.
13. Pellerin, A., Parent, L. E., Fortin, J., Tremblay, C., Khiari, L. and Giroux, M. 2006. Environmental Mehlich-III soil phosphorus saturation indices for Quebec acid to neutral mineral soils varying in texture and genesis. Can. J. Soil Sci. 86: 711-723.
14. Rayment George E. and David J. Lyons. Soil Chemical Methods – Australasia. Chapter 9K1a, str. 199. CSIRO 2011.
15. Deller, B. 1981. Zur Bestimmung der Phosphorvorräte carbonathaltiger Böden mittels CAL – Extraktion. Mitteilungen des VDLUFA, Darmstadt, Heft 1, 20 – 21.

16. Zorn, W, Krause, O. 1999. Untersuchungen zur Charakterisierung des pflanzenverfügbaren Phosphats in Thüringer Carbonatböden. J. Plant Nutr. Soil Sci. 162. 463-469.
17. Zbíral, J.. 2000. Determination of phosphorus in calcareous soils by Mehlich 3, Mehlich 2, CAL, and Egner extractants. Commun. Soil. Sci. Plant Anal. , 31(19-20), 3037- 3048.
18. Richter, R., Hřivna, L. 1998. Úloha síry při pěstování ozimé řepky. Úroda. 9: 16-17.
19. Vendrell, P.F., Frank, K., Denning, J. 1990. Determination of Soil Sulfur by Inductively Coupled Plasma spectroscopy. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 21(13-16): 1695-1703.
20. Zbíral, J. 1998. Determination of some inorganic anions in soil extracts and atmospheric deposition using capillary electrophoresis. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 29(11-14): 1585-1592.
21. Zbíral, J. 1999. Comparison of some extracting methods for determination of sulphur in soils of the Czech Republic. Rostl. Výr. 45(1), 1-7.
22. Smatanová, M., Richter, R. – nepublikované výsledky.
23. Scheffer/Schachtschabel und Mitarb.: Lehrbuch der Bodenkunde. 13. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1992, str. 274-276.

Bulletin Národní referenční laboratoře XVI 2012/1

Ročník:	XVI, č. 1
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2012
Odpovědný redaktor:	Ing. Iva Strížová
Počet stran:	53

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196