

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2026

Ročník XXX, číslo 1/2026

Brno 2026

Obsah

- 1 Zavedení stanovení pro rozlišení gamma- a lambda cyhalothrinu s využitím metody LC-MS/MS**
Kristýna Ondrová, Pavlína Landová, Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno
Hroznová 2, 603 00 Brno 1

- 2 Zavedení multiplex PCR pro identifikaci odrůd kukuřice**
Jitka Klemková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB
Hroznová 2, 603 00 Brno 18

- 3 Stanovení obsahu křemíku v hnojivech metodou ICP-OES**
Václav Rypl, Libuše Tůmová, Barbora Schimmerová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdNRL Plzeň
Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň 35

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Zavedení stanovení pro rozlišení gamma- a lambda cyhalothrinu s využitím metody LC-MS/MS

Kristýna Ondrová, Pavlína Landová, Petra Kosubová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno

kristyna.ondrova@ukzuz.gov.cz

1 Souhrn

Cyhalothrin je insekticidní látka, která patří do skupiny syntetických pyrethroidů. Jeho využití je poměrně širokospektrální. Cyhalothrin sestává ze čtyř stereoizomerů (RS, SR, RR, SS) v poměru 1 : 1 : 1 : 1. V aktuálně používaných přípravcích pro ochranu rostlin se setkáváme s lambda-cyhalothrinem (směs RS a SR izomerů v poměru 1 : 1) nebo gamma-cyhalothrinem (pouze SR izomer). Jejich aktivita je odlišná a použití je závislé na typu hospodaření. V integrované produkci není lambda-cyhalothrin povolen (1).

Izomery není možné rozlišit za použití klasické reverzní chromatografie, lze je separovat pouze na chirální koloně. S pomocí metodiky EURL byla zavedena enantioselektivní analytická metoda s využitím chirální kolony na bázi celulózy s navázaným chirálním selektorem. Měřicí technika pro stanovení byla LC-MS/MS.

Po zavedení metody byly analyzovány reálné vzorky rostlinného materiálu a postřikových kapalin s využitím extrakční techniky QuEChERS. Ověření proběhlo také v rámci kruhového testu pořádaného EURL-SRM, kde bylo analyzovanou maticí pyré z červených hroznů.

2 Teoretická část

2.1 Pyrethriny a pyrethroidy

Pyrethriny jsou přírodní účinné látky, které pocházejí z rostliny *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Kopretina starčkolistá). Zralá květenství se suší a melou na prášek. Prášek se následně extrahuje organickými rozpouštědly a extrakt se nazývá pyrethrum (2).

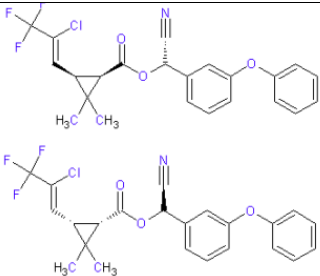
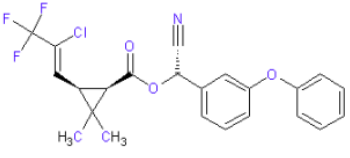
Pyrethroidy jsou syntetické deriváty pyrethrinů, jejichž historie sahá až do první poloviny 20. století. Jako insekticidy našly široké využití v různých odvětvích. Dělí se na dva hlavní typy podle toho, zda je (pyrethroidy typu II) nebo není (pyrethroidy typu I) v jejich molekulárních strukturách přítomna α -kyanoskupina. Pyrethroidy typu II jsou kvůli α -kyanoskupině toxickejší, patří sem například cypermethrin, deltamethrin, cyhalothrin, cyfluthrin a fenvalerát (2).

2.1.1 Cyhalothrin

Cyhalothrin je insekticid ze skupiny syntetických pyrethroidů typu II. Mechanismus jeho účinku spočívá v narušení nervového systému organismu. Cílový organismus je tak paralyzován a usmrcen. Jeho aplikace jsou poměrně různorodé, používá se například v zemědělství na potravinářské i nepotravinářské plodiny, nebo také na okrasné rostliny a dřeviny (3, 4).

Cyhalothrin se skládá ze čtyř stereoizomerů (RS, SR, RR, SS) v poměru 1 : 1 : 1 : 1. Lambda-cyhalothrin je směs dvou stereoizomerů (RS a SR) v poměru 1 : 1. Gamma-cyhalothrin obsahuje pouze SR izomer. Tento izomer je neaktivnější a nejtoxickejší ze všech čtyř (1). Základní informace o lambda- a gamma-cyhalothrinu jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1. Základní informace k lambda- a gamma-cyhalothrinu (1).

	Lambda-cyhalothrin	Gamma-cyhalothrin
Struktura		
CAS	91465-08-6	76703-62-3
Molekulová hmotnost	449,9 g/mol	449,9 g/mol
Sumární vzorec	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$	$C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$
Definice	Lambda-cyhalothrin (obsahuje gamma-cyhalothrin) (suma RS a SR izomerů) (F)	Obsažen v definici lambda-cyhalothrinu
Povolení	AT, BE, BG, CY, CZ, DE, DK, EE, EL, ES, FI, FR, HR, HU, IE, IT, LT, LU, LV, MT, NL, PL, PT, RO, SI, SK, UK	BE, BG, CZ, DE, DK, FR, HR, HU, IE, RO, SK

2.2 Chirální separace pesticidů

Přibližně 40 % celosvětově používaných pesticidních látek je chirálních. Tyto pesticidy mají alespoň dva izomery, které vykazují stejné fyzikální a chemické vlastnosti. Naproti tomu mají ale různou biologickou aktivitu, toxicitu nebo metabolismus. Může se stát, že jeden enantiomer může být biologicky aktivní, zatímco druhý ne, ten ale může být toxický pro necílové organismy. Používáním čistých enantiomerů se také zmírňuje dopad na životní prostředí. Ačkoli je žádoucí používat účinnější enantiomery, většina chirálních pesticidů je uváděna na trh jako racemáty kvůli komplikovanému a nákladnému výrobnímu procesu čistých enantiomerů (5, 6).

K analýze chirálních pesticidů lze využít plynovou chromatografii (GC), kapalinovou chromatografii (LC), superkritickou fluidní chromatografii (SFC) nebo kapilární elektroforézu (CE). Nejvíce se však využívá LC s hmotnostně-spektrometrickou (MS) detekcí (5).

Pro chirální analýzu se nejčastěji používají kolony na bázi silikagelu s chirálním selektorem. V případě pesticidů se jedná například o deriváty polysacharidů, cyklodextriny nebo makrocyclická antibiotika (5). Příklady využití chirálních kolon jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Příklady využití stacionárních fází při analýze pyrethroidů (1, 5).

Analyt	Matrice	Kolona	Mobilní fáze	Detekce
α-cypermethrin, tetramethrin	zelenina, ovoce, obiloviny	Chiralpak IG, SF: α -kyselý glykoprotein	ACN/H ₂ O (75/25)	UV
β-cypermethrin	půda	SF: celulóza tris(3,5-dimethylphenylkarbamát)	n-hexan/2-propanol/kyselina trifluoroctová (94,9/5/0,1)	UV
Permethrin	zelenina, ovoce	LiChroCART 250–4 ChiraDex, SF: beta-cyclodextrin)	5 mM NH ₄ Ac (A)/5 mM NH ₄ Ac v MeOH (B), gradient z 44 % na 20 % (A)	MS
Tefluthrin	zelenina, ovoce, půda	Lux Cellulose-1, SF: celulóza tris(3,5-dimethylphenylkarbamát)	5 mM HCOONH ₄ v MeOH/5 mM HCOONH ₄ v H ₂ O (83/17)	MS
Cyhalothrin	zelenina, ovoce, obiloviny, olejiny	ChiralArt Cellulose-SB, SF: celulóza tris(3,5-dimethylphenylkarbamát)	5 mM HCOONH ₄ v H ₂ O + 5% MeOH/5 mM HCOONH ₄ v MeOH (20/80)	MS

Cílem této práce bylo zavést enantioselektivní analytickou metodu pro stanovení lambda- a gamma-cyhalothrinu podle metodiky EURL s využitím chirální kolony. V integrované

produkcí je lambda-cyhalothrin zakázán, povolen je pouze gamma-cyhalothrin, pro rozlišení těchto účinných látek je nezbytné použití enantioselektivní analytické metody. Zavedená analytická metoda byla následně aplikována na tři různé obohacené matrice (ovoce, rostlina, krmivo). Poté byly analyzovány reálné vzorky rostlinného materiálu a postřikových kapalin a proběhla také účast v kruhovém testu EURL. V rámci tohoto vývojového úkolu byla následně otestována vhodnost kolony pro další pyrethroidy, konkrétně cypermethrin a fenvalerát.

3 Praktická část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Standardy a referenční materiály

Standardy pesticidů v pevném nebo kapalném skupenství s deklarovanou čistotou:

Gamma-cyhalothrin (C₂₃H₁₉ClF₃NO₃), CAS [76703-62-3] (HPC),

Lambda-cyhalothrin (C₂₃H₁₉ClF₃NO₃) CAS [91465-08-6] (Riedel de H.),

Cyhalothrin (technická směs) (C₂₃H₁₉ClF₃NO₃) CAS [68085-85-8] (Sigma-Aldrich),

Alfa-cypermethrin (C₂₂H₁₉Cl₂NO₃) CAS [67375-30-8] (Sigma-Aldrich),

Cypermethrin (C₂₂H₁₉Cl₂NO₃) CAS [52315-07-8] (Sigma-Aldrich),

Fenvalerát (C₂₅H₂₂ClNO₃) CAS [51630-58-1] (Dr.Ehrenstorfer),

Esfenvalerát (C₂₅H₂₂ClNO₃) CAS [66230-04-4] (Riedel de H.).

3.1.2 Chemikálie

Voda (ultračistá), methanol (CH₃OH, pro LC-MS), mravenčan amonný (HCOONH₄), acetonitril (CH₃CN, pro HPLC), síran hořečnatý (MgSO₄), chlorid sodný (NaCl), citrát trisodný dihydrát, citrát disodný seskvihydrát, PSA sorbent (primární sekundární amin), GCB sorbent (Graphitized Carbon Black), ODS sorbent typu C18-silikagel.

3.1.3 Laboratorní pomůcky a vybavení pro přípravu vzorku

Analytické váhy, třepačka (min. 300 kmitů/min), centrifuga (min. 4000 ot./min), centrifugační zkumavky plastové se šroubovacím víčkem (5 ml; 15 ml; 50 ml), centrifugační zkumavky Eppendorf (1,5 ml), stříkačky (2 ml), vysokorychlostní míchadlo (např. Vortex), filtrační

materiál (stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm), vialky (2 ml), běžné laboratorní vybavení a laboratorní sklo.

3.1.4 Postup přípravy

Postup přípravy byl proveden podle platných JPP (7, 8). Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační zkumavky. U vzorku s vyšším obsahem vody se naváží 10 g \pm 0,1 g, u vzorků suchých 5 g \pm 0,05 g nebo 2,5 g \pm 0,03 g, pro vzorky poskytující bohatý extrakt se naváží (1–2) g \pm 0,02 g. Ze vzorku postříkové kapaliny se pipetuje 1 ml.

Ke vzorkům s obsahem vody menším než 80 % se přidá voda tak, aby její celkový obsah ve vzorku byl přibližně 10 g. Je nutné, aby vzorek byl vodou plně smočen. Dále se do zkumavky přidá 10 ml acetonitrilu, ta se uzavře a třepe se intenzivně v třepačce 2 min. Suché vzorky se třepou 15 min.

Do zkumavky se následně přidá připravená pufrovací směs (4 g MgSO_4 ; 1 g Na Cl; 1 g citrátu trisodného dihydrátu; 0,5 g citrátu disodného seskvihydrátu) a vymražený míchací kamínek, zkumavka se uzavře, intenzivně protřepe a zchladí se ponořením do ledové tříště na 5 min. Zchlazená směs se intenzivně 2 min protřepe a následuje odstředění 5 min při minimálně 3000 ot./min a při -5 °C. Acetonitrilová vrstva supernatantu se převede do 15ml centrifugační zkumavky a uloží se v případě potřeby alespoň na 2 h do mrazicího boxu. Zkumavka se krátce odstředí (5 min při minimálně 3000 ot./min při -5 °C).

Následuje čištění pomocí disperzního SPE (D-SPE). Podíl extraktu (2 ml) se převedn do centrifugační zkumavky se směsí sorbentů. Vhodné varianty postupu jsou podrobně uvedeny v ČSN EN 15662, příklady jsou uvedeny v Tabulce 3. Směs se intenzivně 2 min protřepe a následuje odstředění 5 min při minimálně 3000 ot./min a při -5 °C.

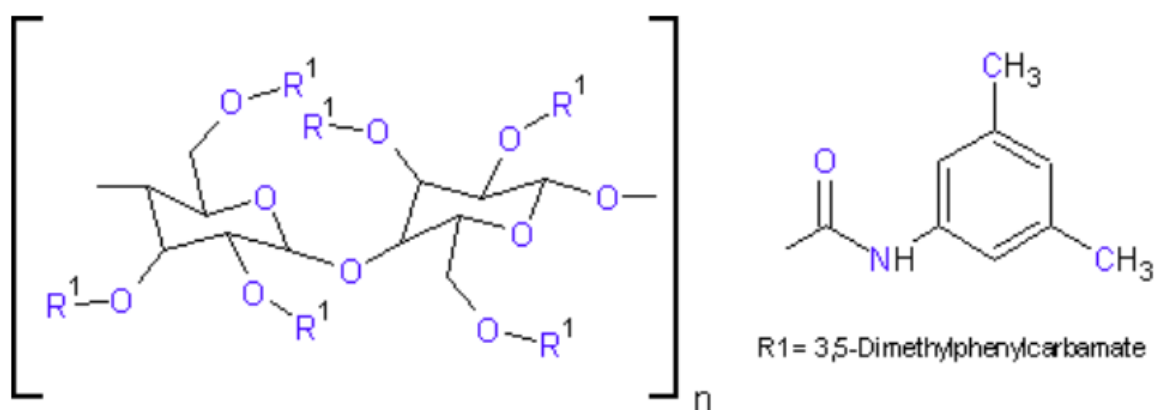
Do 1,5ml centrifugační zkumavky typu Eppendorf se přidá 10 μl 5% kyseliny mravenčí v acetonitrilu, 500 μl čištěného extraktu a 490 μl vody. Směs se promíchá a zfiltruje do 2ml chromatografické vialky k analýze.

Tabulka 3. Příklady podmínek extrakce a čištění pro různé typy matic.

Matrice	Navážka (g)	Přídavek vody (ml)	Doba třepání (min)	D-SPE
Obiloviny, rýže	5	10	15	50 mg PSA + 300 mg MgSO ₄
Oves	5	10	15	300 mg PSA + 300 mg MgSO ₄
Luštěniny, sója, kukuřice	5	10	15	50 mg PSA + 300 mg GCB + MgSO ₄
Olejniny	5	10	15	50 mg PSA + 300 mg MgSO ₄ + 50 mg ODS
Zelenina listová, kořenová	10	0	2	50 mg PSA + 300 mg GCB + MgSO ₄
Brambory, rajčata, ovoce, hrozny	10	0	2	50 mg PSA + 300 mg MgSO ₄
Rostlinný materiál (listy)	5	7	2	50 mg PSA + 300 mg GCB + MgSO ₄
Půda	2	10	10	50 mg PSA + 300 mg MgSO ₄
Postřiková kapalina	1 ml	9	2	nepoužito

3.1.5 Přístrojové vybavení a podmínky pro koncové stanovení

K analýze se použil kapalinový chromatograf UHPLC 1290 Infinity II Biocompatible (Agilent) s hmotnostním spektrometrem QTrap 4500 (Sciex), vybavený chirální kolonou ChiralArt Cellulose-SB, 100 ´ 4,6 mm; 3µm (YMC). Struktura stacionární fáze použité kolony je na Obrázku 1 níže.



Obrázek 1. Struktura stacionární fáze použité chirální kolony.

Chromatografická separace byla provedena izokratickou elucí mobilní fáze A složené z 95 % vody a 5 % methanolu modifikované 5 mM mravenčanem amonným, a mobilní fáze B složené z methanolu modifikované 5 mM mravenčanem amonným v poměru 20 : 80 (A : B) při průtoku 0,6 ml/min a teplotě kolony 35 °C. Objem nástřiku činil 5 µl, celková doba analýzy byla pak 15 min. Ionizace byla provedena elektrosprejem při teplotě iontového zdroje 500 °C a pozitivním módu ionizace s napětím na kapiláře 5500 V. Nastavené parametry plynů: CUR (N₂) – 40 psi, CAD (N₂) – medium, GS1 (ultračistý vzduch) – 50 psi, GS2 (ultračistý vzduch) – 50 psi. Analyty byly detekovány v módu sledování vybraných přechodů (MRM), uvedených v Tabulce 4.

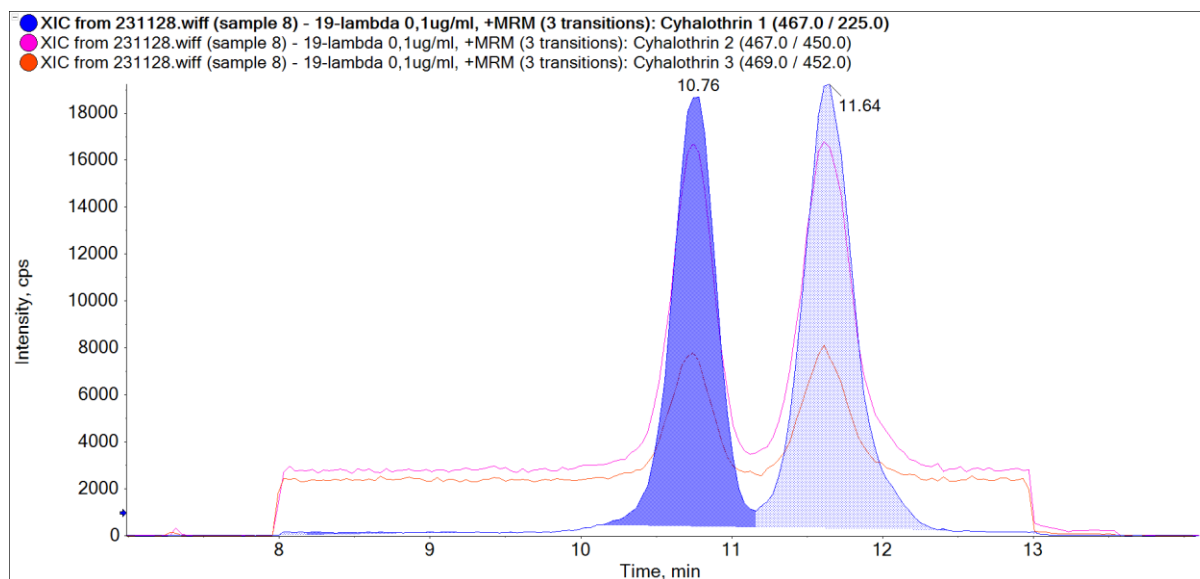
Tabulka 4. Nastavení MRM přechodů pro cyhalothrin.

MRM přechod	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Cyhalothrin 1	467	225	60	10	23	12
Cyhalothrin 2	467	450	60	10	15	6
Cyhalothrin 3	469	452	60	10	13	6

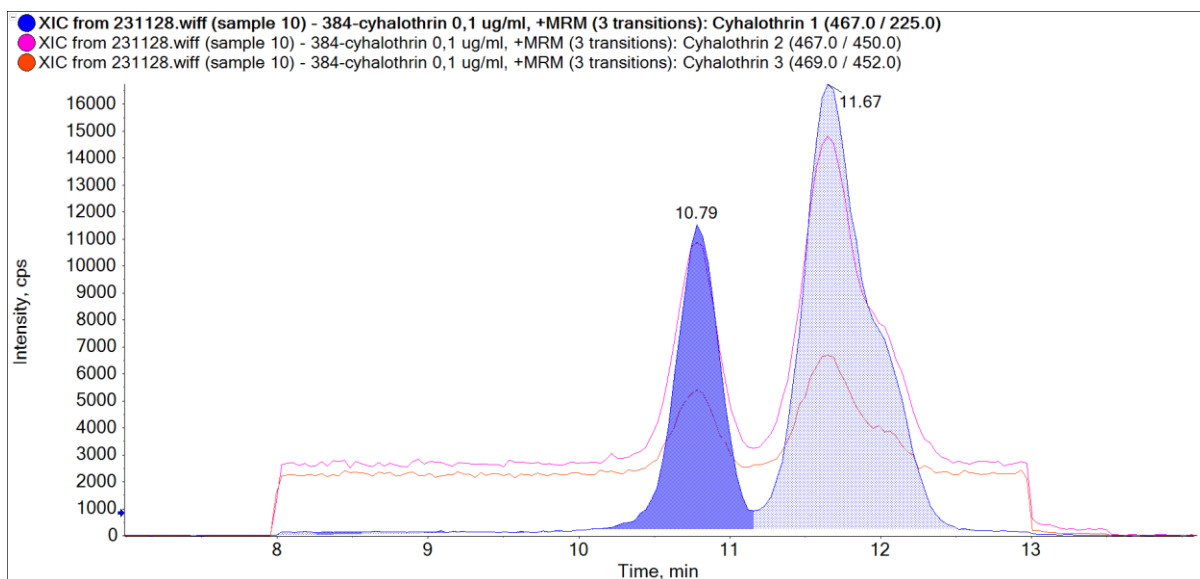
3.2 Výsledky

3.2.1 Testování metody

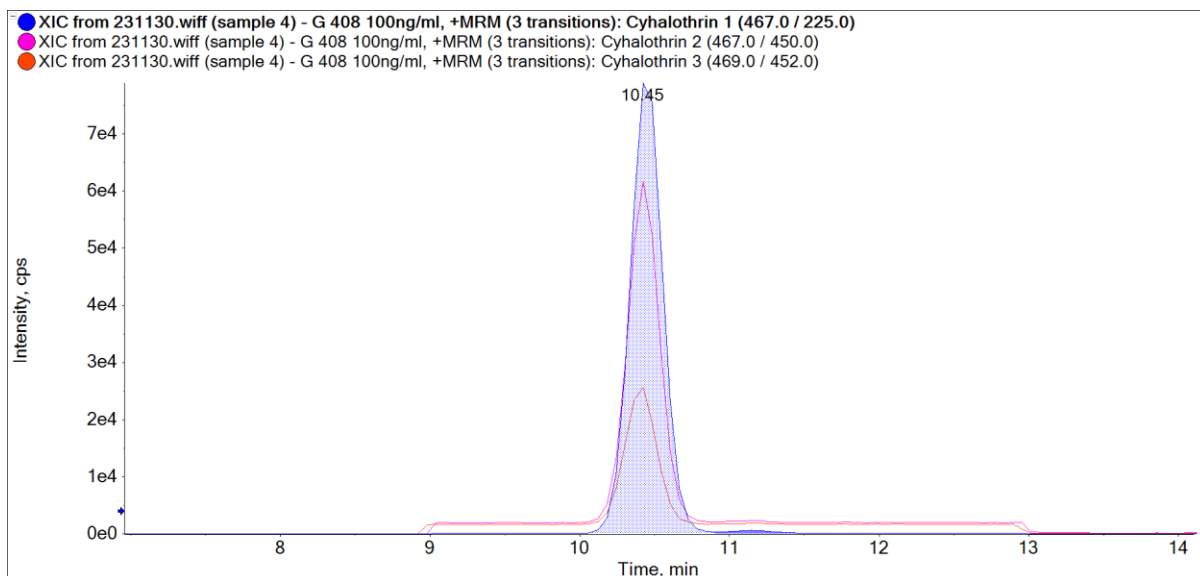
Byla zavedena metoda pro chirální separaci cyhalothrinu podle metodiky EURL. Nejprve byla ověřena její funkčnost pomocí standardů lambda-, gamma- a technického cyhalothrinu rozpuštěných a naředěných v acetonitrilu. Chromatogramy jednotlivých standardů jsou na Obrázcích 2, 3 a 4.



Obrázek 2. Chromatogram lambda-cyhalothrinu (acetonitril).



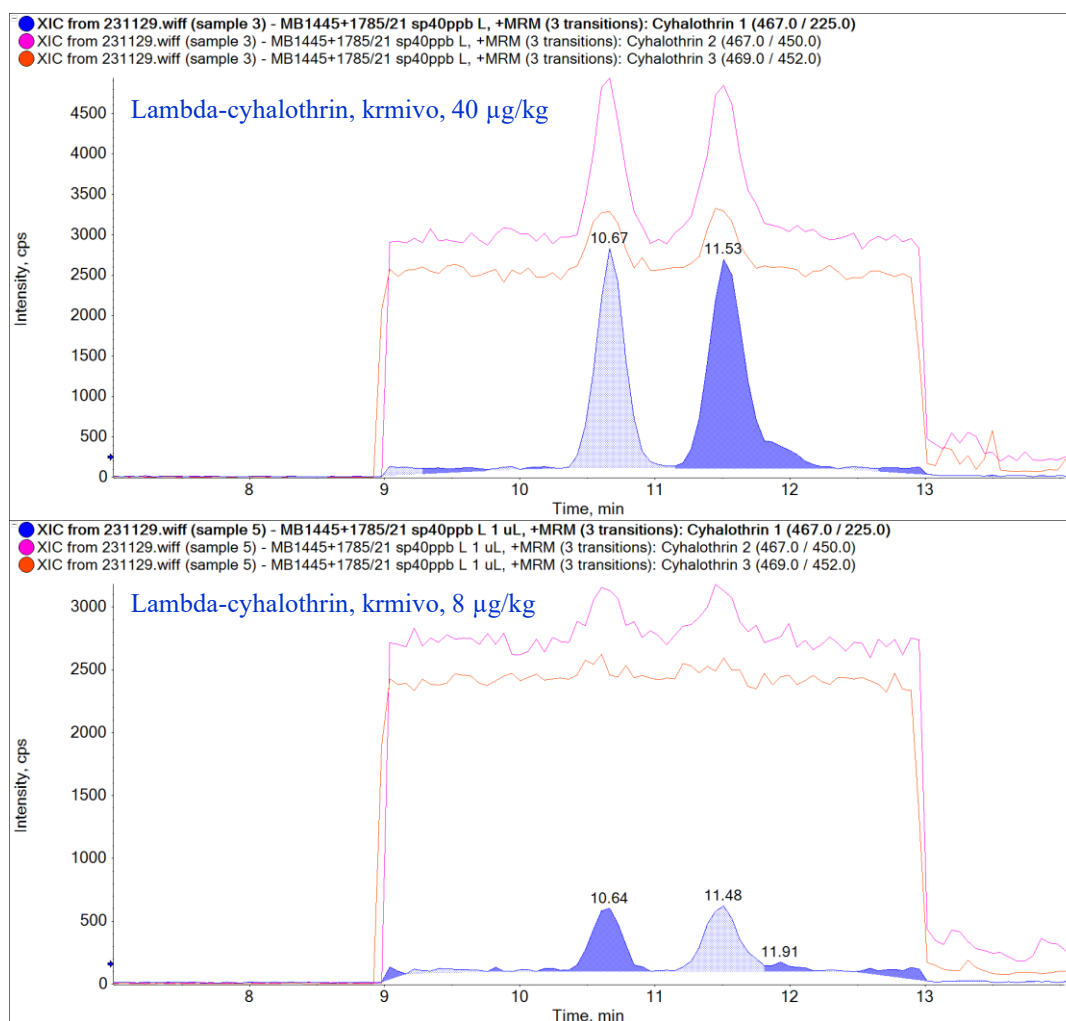
Obrázek 3. Chromatogram technického cyhalothrinu (acetonitril).



Obrázek 4. Chromatogram gamma-cyhalothrinu (acetonitril).

Díky zavedené metodě je možné účinně separovat RS a SR enantiomery cyhalothrinu. V případě technického cyhalothrinu je vidět, že se skládá ze směsi více izomerů. U lambda-cyhalothrinu by příslušné enantiomery měly být v poměru 1 : 1.

Po zavedení a ověření metody byly vybrány tři čisté matrice – matrice krmiva (směs ječmene a pšenice), ovoce (jablko) a rostlinného materiálu (listy révy). Tyto matrice byly obohaceny lamda- a gamma-cyhalothrinem na hladině 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a to za účelem ověření chování analytů v různých typech vzorků. Následně pak byl snížen objem nástřiku z 5 μl na 1 μl , detekovaná hladina tedy odpovídala 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



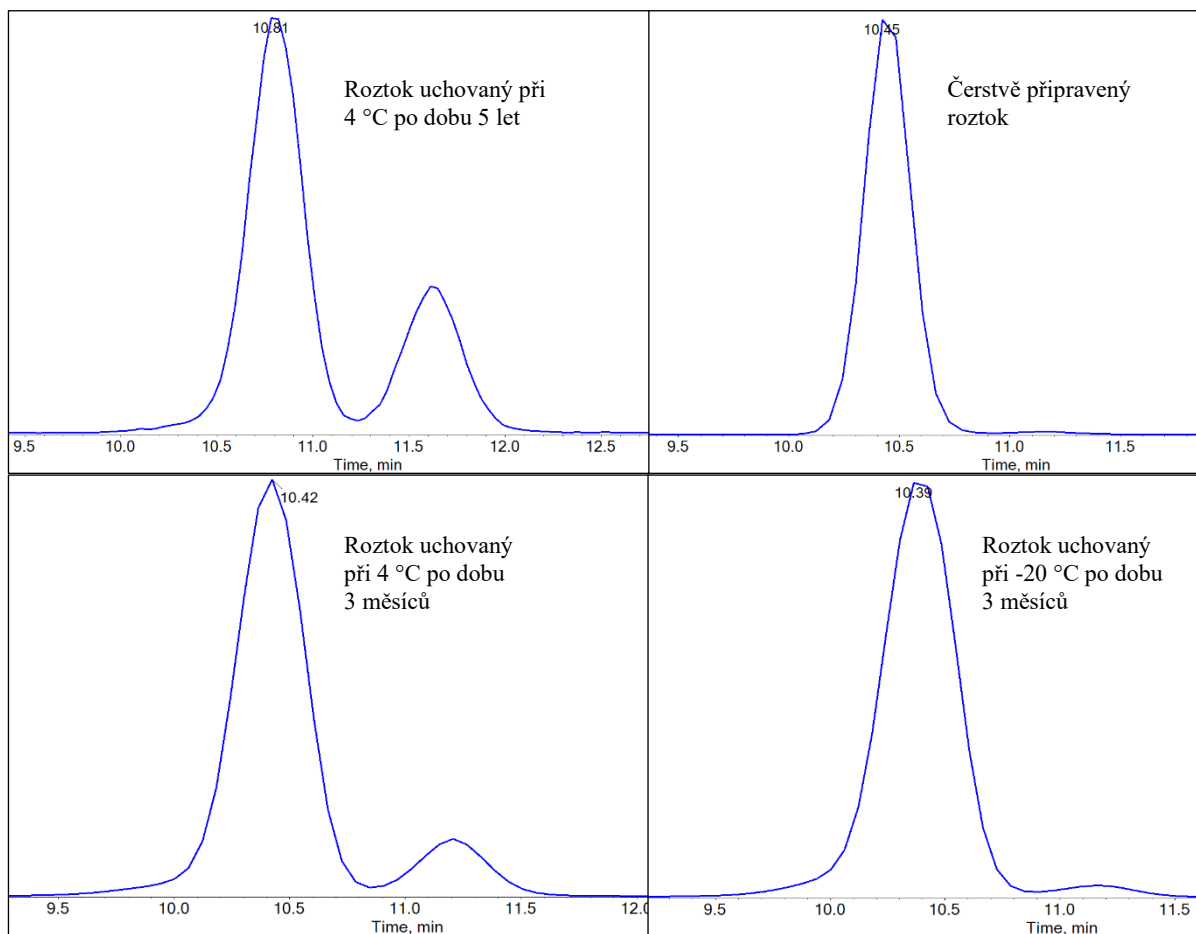
Obrázek 5. Chromatogramy lambda-cyhalothrinu v krmivu na hladinách 40 µg/kg a 8 µg/kg.

Zavedená metoda se prokázala jako funkční napříč různými maticemi. Hladina 8 µg/kg byla spolehlivě detekovatelná v krmivu, ovoci i rostlinném materiálu. Jako příklad je na Obrázku 5 výše uveden lambda-cyhalothrin v krmivu na hladinách 40 µg/kg a 8 µg/kg.

3.2.2 Stabilita standardu gamma-cyhalothrinu

Během ověření roztoků standardů bylo zjištěno, že v zásobním roztoku standardu gamma-cyhalothrinu dochází k procesům degradace. Během skladování při 4 °C po dobu 5 let byl na odezvě gamma-cyhalothrinu pozorován úbytek o téměř 27,1 %. Byl tedy připraven nový zásobní roztok, který byl rozdělen na dva podíly. Jeden podíl byl skladován při 4 °C a druhý při -20 °C. Během skladování při 4 °C po dobu třech měsíců byl na odezvě gamma-cyhalothrinu pozorován úbytek 12,1 %. U skladování při -20 °C byl úbytek výrazně menší, a to 2,8 %.

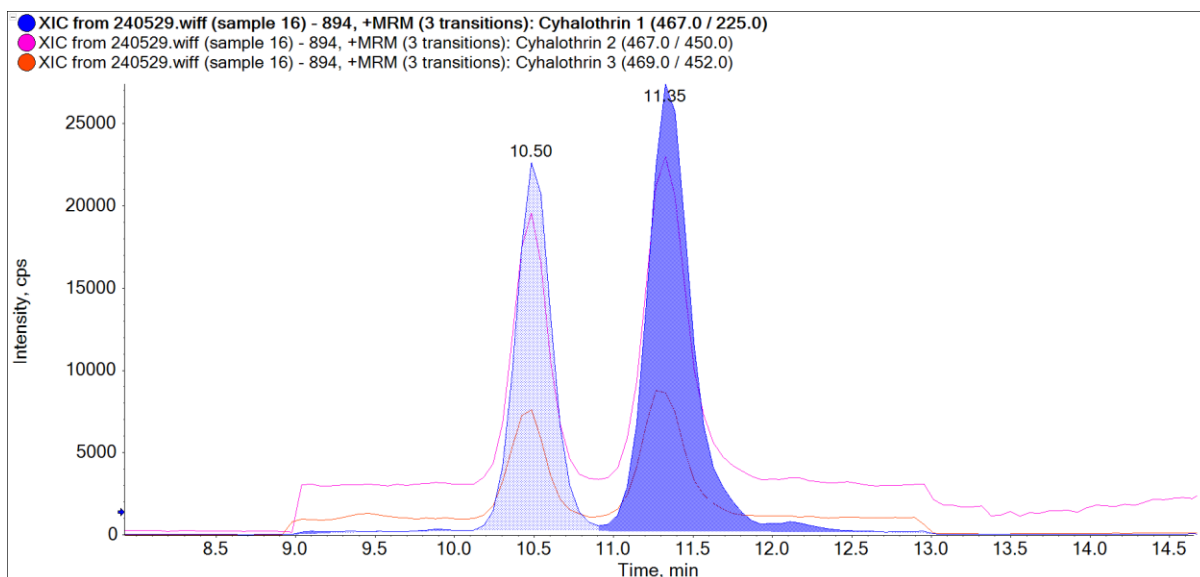
Chromatogramy jednotlivých roztoků jsou porovnány na Obrázku 6. Ke zpomalení degradace zásobního roztoku gamma-cyhalothrinu je ho tedy třeba uchovávat v mrazničce při -20 °C.



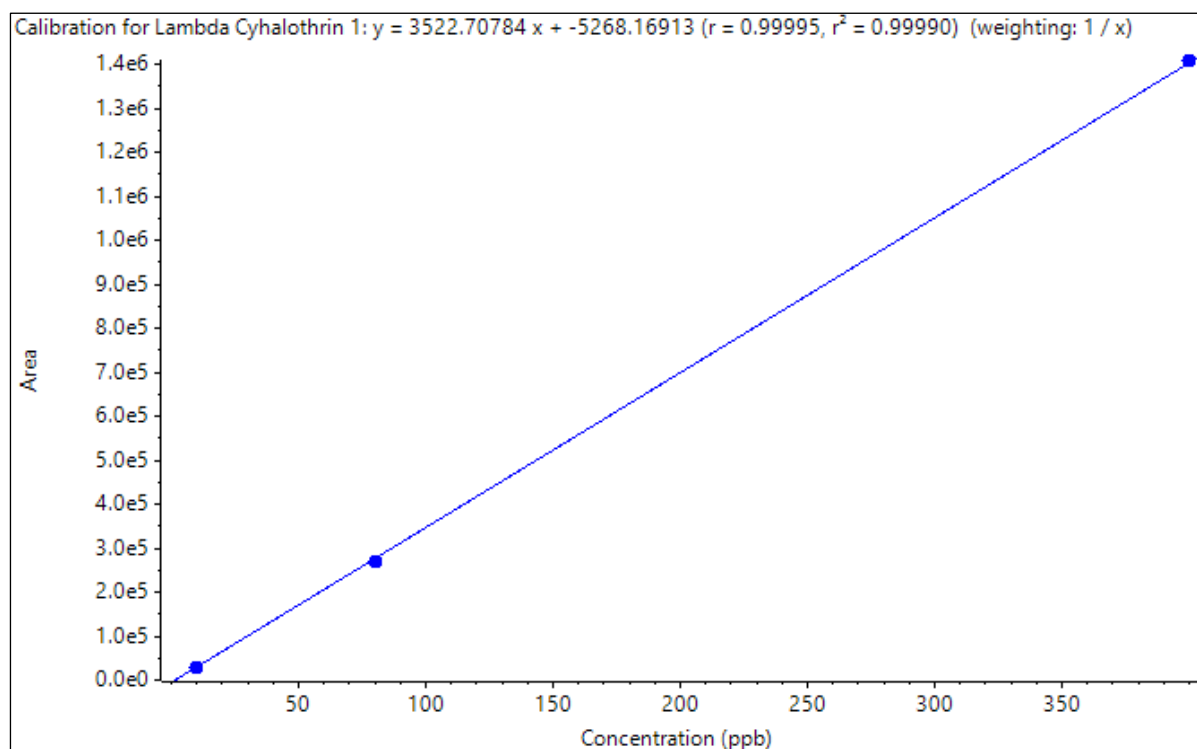
Obrázek 6. Porovnání chromatogramů různě starých a různě skladovaných roztoků standardu gamma-cyhalothrinu.

3.2.3 Aplikace měřicí metody na reálné vzorky rostlinného materiálu a postřikových kapalin

Pomocí zavedené měřicí metody byly stanoveny lambda- a gamma-cyhalothrin v reálných vzorcích rostlinného materiálu a postřikových kapalin (jíchy). Vzorek byl připraven podle kapitoly 3.1.4. Cílem bylo ověřit, zda se ve vzorcích nacházejí uvedené použité účinné látky. Na Obrázku 7 je jako příklad uveden chromatogram lambda-cyhalothrinu ve vzorku řepky. Kvantifikace byla provedena na standard lambda- i gamma-cyhalothrinu (ukázka kalibrační závislosti pro lambda-cyhalothrin v rostlinném materiálu je na Obrázku 8). Výsledná data pak byla porovnána s výsledky měření pomocí GC-MS/MS (achirální analýza) a jsou shrnuty v Tabulce 5.



Obrázek 7. Chromatogram lambda-cyhalothrinu ve vzorku řepky.



Obrázek 8. Kalibrační závislost pro lambda-cyhalothrin v rozsahu (0,010 – 0,400) mg/kg pro stanovení v rostlinném materiálu (matrice – řepka).

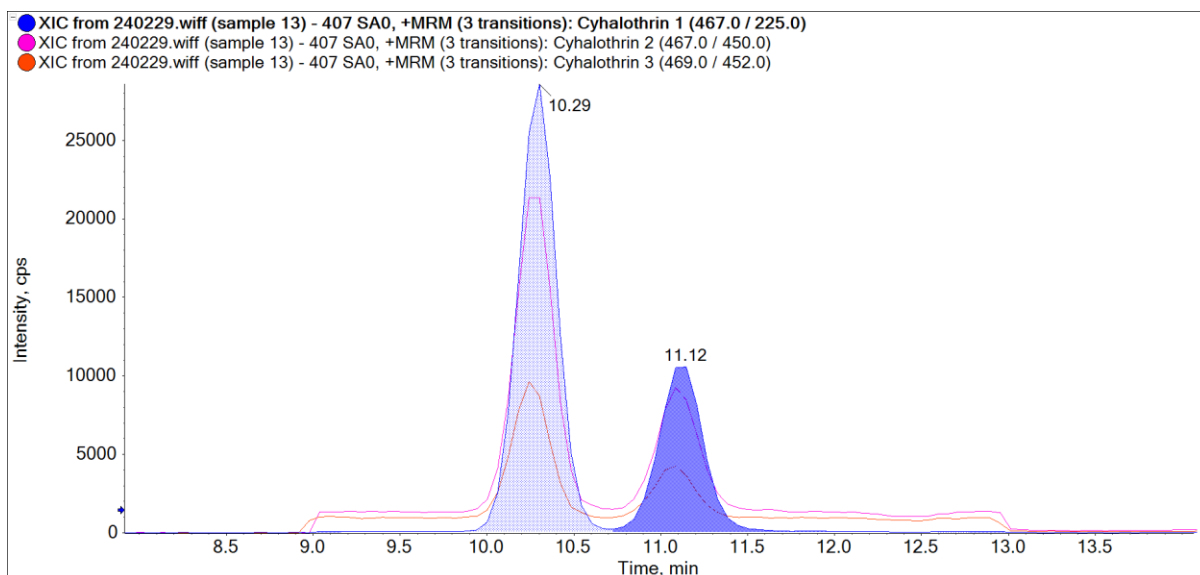
Tabulka 5. Shrnutí a porovnání výsledků stanovení pomocí chirální LC-MS/MS a achirální GC-MS/MS analýzy.

Předpoklad	Materiál	Potvrzení přítomnosti daného izomeru	LC-MS/MS (chirální)		GC-MS/MS (achirální)	
			Gamma-cyhalothrin	Lambda-cyhalothrin	Počítáno na Lambda [mg/kg]	Rozdíl mezi LC-MS/MS a GC-MS/MS [%]
			Počítáno na Gamma [mg/kg]	Počítáno na Lambda [mg/kg]		
Lamda/Gamma	řepka	ANO	0,072	0,115	0,098	16
Lambda	řepka	ANO	0,113	0,249	0,208	18
Lambda	řepka	ANO	0,132	0,278	0,244	13
Lambda	řepka	ANO	0,107	0,255	0,237	7
Lambda	řepka	ANO	0,035	0,085	0,073	15
Gamma	řepka	ANO	0,032	x	0,022	36
Gamma	řepka	ANO	0,024	x	0,017	34
Gamma	mák	ANO	0,195	x	0,171	13
Gamma	mák	ANO	0,189	x	0,181	4
Gamma	pšenice	ANO	0,152	x	0,131	15
Gamma	jícha	ANO	24,5 mg/l	x	22,6 mg/l	8

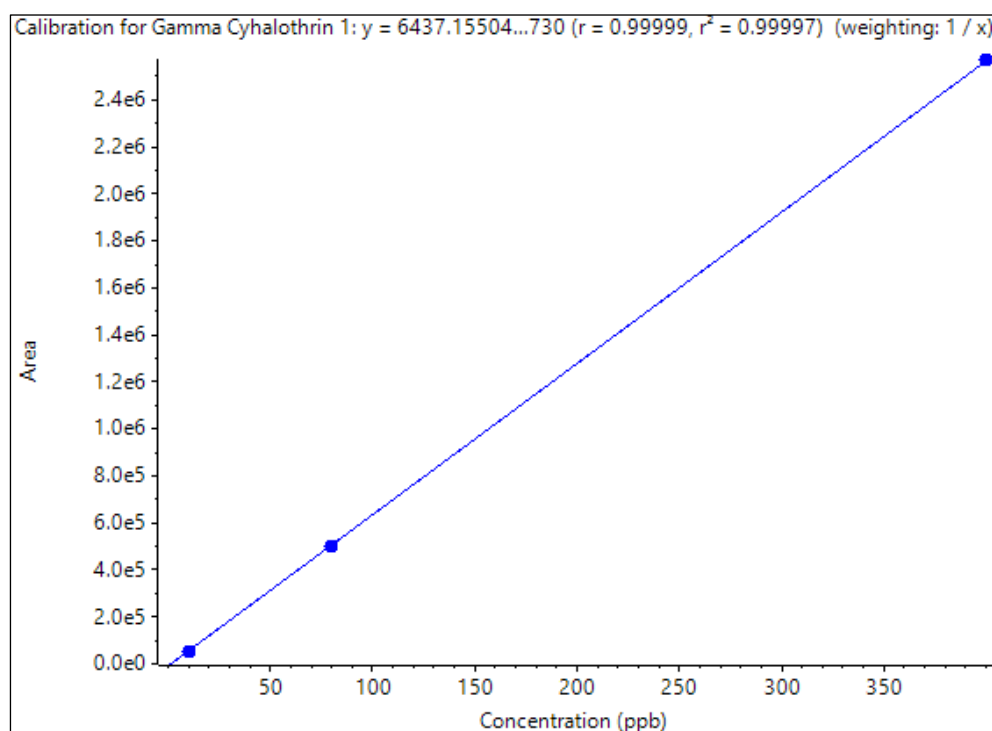
Po stanovení vybraných vzorků bylo potvrzeno, že nálezy lambda- nebo gamma- cyhalothrinu odpovídají předpokladu. V Tabulce 5 je u výsledků uvedeno, na který standard (lambda- nebo gamma-cyhalothrin) byl daný výsledek kvantifikován. V případě postřikové kapaliny se jednalo o přípravek Rapid, kde byla potvrzena přítomnost účinné látky gamma-cyhalothrin.

3.2.4 Účast v kruhovém testu

Zavedená metoda byla také ověřena účastí v kruhovém testu EUPT-SRM19 pořádaném EURL pro SRM. Analyzovanou maticí bylo pyré z červených hroznů. Zde bylo v cílovém seznamu analytů zahrnuto i stanovení gamma-cyhalothrinu. Vzorek byl zpracován postupem podle kapitoly 3.1.4. Na Obrázku 9 je uveden chromatogram cyhalothrinu ve vzorku kruhového testu. Kvantifikace byla provedena na standard gamma-cyhalothrinu (ukázka kalibrační závislosti pro gamma-cyhalothrin v hroznovém víně je na Obrázku 10).



Obrázek 9. Chromatogram cyhalothrinu ve vzorku kruhového testu EUPT-SRM19.



Obrázek 10. Kalibrační závislost pro gamma-cyhalothrin v rozsahu 0,010–0,400 mg/kg pro stanovení v ovoci (matrice – hroznové víno).

Díky možnosti chirální separace je vidět, že ve vzorku kruhového testu nebyl pouze SR-izomer, ale také RS-izomer. Požadavek byl pouze na SR-izomer, nikoliv na sumu. V předběžné zprávě pak bylo potvrzeno, že vzorek byl obohacen jak o gamma-cyhalothrin, tak i o lambda-cyhalothrin. Použití chirální kolony ke správné identifikaci a kvantifikaci bylo tedy nutné. Výsledky kruhového testu budou k dispozici v závěrečné zprávě.

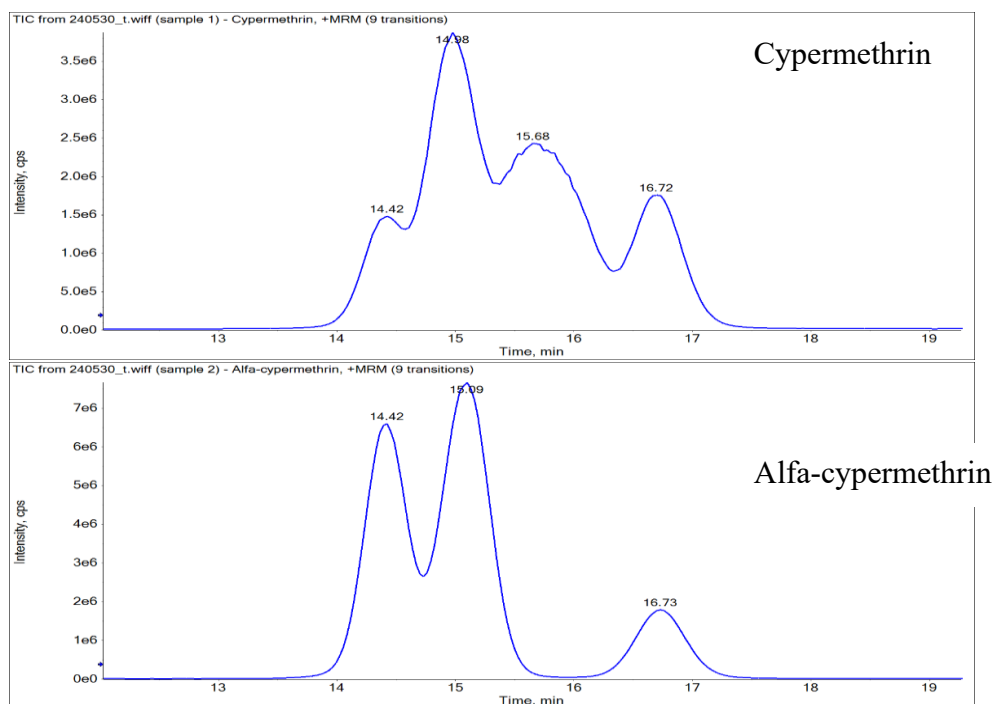
3.2.5 Aplikace zavedené metody na další pesticidy z řady syntetických pyrethroidů

Zavedená metoda a použitá chirální kolona byly také otestovány pro stanovení dalších syntetických pyrethroidů, a to insekticidů cypermethrinu a fenvalerátu. Cypermethrin je směs osmi stereizomerů. Podle složení izomerů se rozlišují cypermethrin, alfa-cypermethrin, beta-cypermethrin, theta-cypermethrin a zeta-cypermethrin. Povolený je ale pouze cypermethrin. Povolení k používání alfa-cypermethrinu a zeta-cypermethrinu bylo již v minulých letech ukončeno. Beta-cypermethrin nikdy nebyl v EU povolen a theta-cypermethrin není ani zahrnut v databázi pesticidů EU. Fenvalerát je směs čtyř stereoizomerů. Esfenvalerát obsahuje pouze SS-izomer, který je jako insekticid neaktivnější. Esfenvalerát je součástí definice fenvalerátu (9, 10).

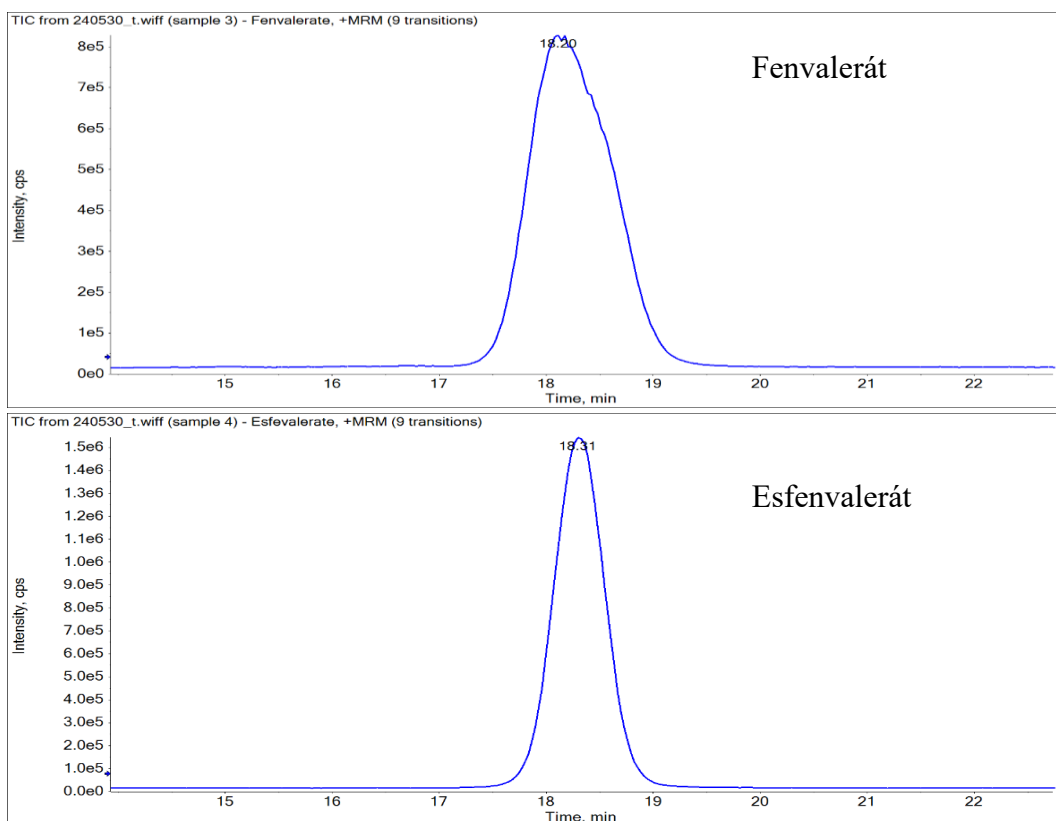
Pro ověření metody byly připraveny jednotlivé standardy ředěné do rozpouštědla. Nejprve byla vyzkoušena stávající měřicí metoda s modifikací nastavení MRM přechodů, které jsou uvedeny v Tabulce 6. Poté byly upravovány a vyzkoušeny různé podmínky pro LC. Použité nastavení je popsáno v kapitole 3.1.5. Původní zavedená chromatografická metoda byla ale pro detekci těchto látek příliš krátká a bylo nutné ji prodloužit na 30 min. Cílem bylo nejprve zjistit chromatografické chování daných látek. Porovnány byly následující dvojice – cypermethrin vs. alfa-cypermethrin, fenvalerát vs. esfenvalerát (Obrázky 11 a 12).

Tabulka 6. Nastavení MRM přechodů pro cyhalothrin, cypermenthrin a fenvalerát.

MRM přechod	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Cyhalothrin 1	467	225	60	10	23	12
Cyhalothrin 2	467	450	60	10	15	6
Cyhalothrin 3	469	452	60	10	13	6
Cypermethrin 1	433	416	41	10	13	10
Cypermethrin 2	433	191	41	10	21	6
Cypermethrin 3	435	418	51	10	13	8
Fenvalerate 1	437	167	51	10	23	8
Fenvalerate 2	437	420	51	10	13	14
Fenvalerate 3	437	125	51	10	65	10



Obrázek 11. Porovnání chromatogramů cypermethrinu a alfa-cypermethrinu.



Obrázek 12. Porovnání chromatogramů fenvalerátu a esfenvalerátu.

Z chromatogramů je patrné, že separace izomerů daných analytů nebyla dostatečná, vizuálně ale rozdíly pozorovat lze. V následující fázi bylo ověřeno, že ani změnou průtoku, ani složením mobilní fáze není možné separaci izomerů výše uvedených látek významně zlepšit. Vybraná kolona a zavedená metoda je tedy specifická pouze pro stanovení cyhalothrinu. V případě potřeby chirální analýzy cypermethrinu je nutné využít metodika EURL specifickou pro tuto účinnou látku (9).

4 Závěr

S pomocí metodiky EURL byla zavedena metoda pro separaci gamma- a lambda-cyhalothrinu na chirální koloně pomocí LC-MS/MS. Izomery lze bez komplikací separovat a ověřit tak, jaká z účinných látek byla použita a zda je požadavek na obsah ve vzorcích splněn. Během testování metody byla zjištěna nestabilita standardu gamma-cyhalothrinu. Díky tomuto zjištění byly upraveny podmínky skladování zásobního roztoku. V rámci práce byly také analyzovány reálné vzorky rostlinného materiálu a postřikových kapalin. Data byla porovnána s výsledky měření pomocí GC-MS/MS. Ve všech vzorcích byl potvrzen výskyt uvedené účinné látky. Laboratoř se také zúčastnila kruhového testu EURL. Výsledky budou dostupné v závěrečné zprávě.

Zavedená metoda byla také aplikována na separaci jiných pyrethroidů, a to cypermethrinu a fenvalerátu. I po změně chromatografických podmínek však nebylo možné enantiomery těchto látek dostatečně separovat. Tato zavedená metoda s použitím vybrané kolony je vhodná pouze pro separaci enantiomerů cyhalothrinu.

5 Literatura

1. Analysis of Lambda- and Gamma-Cyhalothrin involving QuEChERS Extraction and Enantioselective LC-Separation of RS and SR-Isomers, **2019**, *SRM Reports*, *EURL*.
2. Hodoşan, C.; Gîrd, C.E.; Ghica, M.V.; Dinu-Pîrvu, C.-E.; Nistor, L.; Bărbuică, I.S.; Marin, Ş.-C.; Mihalache, A.; Popa, L. Pyrethrins and Pyrethroids: A Comprehensive Review of Natural Occurring Compounds and Their Synthetic Derivatives. *Plants* **2023**, *12*, 4022. <https://doi.org/10.3390/plants12234022>.
3. Anupam Kumar, Shailja Jasrotia, Joydeep Dutta, George Z. Kyzas: Pyrethroids toxicity in vertebrates and invertebrates and amelioration by bioactive compounds: A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **2023**, *196*, ISSN 0048-3575. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105615>.
4. Lambda-cyhalothrin, *General Fact Sheet*, **2001**, *NPIC*.
5. Lucía Abad-Gil, María Luisa Marina: Enantioselective analysis of pesticides in food, biological, and environmental samples by chromatographic techniques and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography Open*, **2023**, *4*, ISSN 2772-3917. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2023.100099>.
6. Highly Sensitive and Comprehensive Detection for Chiral Separation of Pesticides using HPLC-CD-MS, *Application Note*, *Jasco*.
7. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10600.1 Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou LC-MS
8. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10610.1 Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS
9. Analysis of Residues of Cypermethrin Mixtures in Food employing QuEChERS and LC-MS/MS, **2024**, *SRM Analytical Observations Report*, *EURL*.
10. Hideo Kaneko: Chapter 76 - Pyrethroid Chemistry and Metabolism, *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, **2010**, Pages 1635-1663, ISBN 9780123743671. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00076-8>.

Zavedení multiplex PCR pro identifikaci odrůd kukuřice

Jitka Klemková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdMB, Hroznová 2, 603 00 Brno
jitka.klempova@ukzuz.gov.cz

1 Úvod

Práce navazuje na metodiku zavedenou v rámci vyřešeného vývojového úkolu Zavedení metody založené na analýze mikrosatelitů (SSR markerů) pro identifikaci odrůd kukuřice. Současná metodika je založena na analýze 12 mikrosatelitních markerů, přičemž každý lokus je amplifikován a analyzován v samostatné singleplex reakci. Převedení stávajícího protokolu na multiplex PCR umožňuje amplifikaci více cílových sekvencí v jedné reakční směsi, což zásadně snižuje provozní náklady a zrychluje celý proces genotypizace.

2 Cíl

Předmětem této práce je uspořádat analýzu SSR markerů do několika multiplexů s cílem dosavadní metodiku komplexně zefektivnit.

V rámci řešení bude navrženo a optimalizováno několik variant multiplexů, přičemž každá sada bude obsahovat dva a více párů primerů. Důležitým kritériem pro návrh multiplexních reakcí je dostatečná délková odlišitelnost výsledných PCR produktů. Pro přesnou separaci a detekci pomocí kapilární elektroforézy by se analyzované fragmenty měly lišit v ideálním případě alespoň o 20 bp. Příprava multiplexů vyžaduje rozsáhlou optimalizaci reakčních podmínek PCR a následné fragmentační analýzy. Pro zvýšení efektivity multiplexování a řešení problémů s překrývajícími se délkami fragmentů mohou být pro některé lokusy navrženy a optimalizovány upravené primery, které poskytnou delší a lépe rozlišitelné amplifikační produkty.

3 Materiál a metody

3.1 Přístrojové a technické vybavení

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l.

Centrifuga na destičky.

Fragmentový analyzátor Fragment Analyzer (Advanced Analytical).

Mikroobjemový UV-VIS spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Minicentrifuga.

PCR box.

Termocyklér C1000 Touch Thermal Cyclcer (Bio-Rad).

Vortex.

Výrobník ledu.

3.2 Chemikálie

Reagencie pro PCR

Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen)

Složení kitu: 2 \times Type-it Multiplex PCR Master Mix, 5 \times Q-Solution, RNase-Free Water.

Amplifikační primery 100 μ M (Generi Biotech).

PCR voda.

Reagencie pro fragmentační analýzu

dsDNA 905 Reagent Kit (1-500bp) (Agilent).

Složení kitu: dsDNA Separation Gel, Intercalating Dye, 5 \times 930 dsDNA Inlet Buffer, 5 \times Capillary Conditioning Solution, Dilution Buffer 1 \times TE pufr, 1 bp a 500 bp Markers, 35 – 400 bp Range DNA Ladder, Minerální Oil.

Capillary Storage Buffer (Agilent).

3.3 Testovaný materiál

Byl zvolen reprezentativní soubor 20 vzorků kukuřic (Tabulka 1), který pokrývá co nejširší spektrum pozorovaných alel pro všechny testované lokusy. Jako výchozí materiál byla použita archivovaná genomová DNA extrahovaná v rámci rutinních analýz v předchozích letech.

Tato DNA je uchovávána při teplotě -70 °C, čímž je zajištěna její dlouhodobá stabilita a integrita. Koncentrace všech vzorků DNA byla přeměřena spektrofotometricky a následně naředěna na pracovní koncentraci 10 ng/μl.

Tabulka 1. Seznam vzorků kukuřic.

Číslo	Odrůda	Pracovní označení	Číslo	Odrůda	Pracovní označení
1	kw5g7508	K16	11	KXC0312	K233
2	kw6f576bt1	K17	12	RH18043	K254
3	kw6h1002	K18	13	SM668	K259
4	NM502	K26	14	EW2711	K269
5	Juri CS	K48	15	CET172395	K282
6	Cegura	K55	16	LZM270/37	K303
7	ES Amulet	K71	17	CB21 CMS	K315
8	Balasco	K91	18	RGT Axxional	K341
9	KWS 3356	K113	19	EG7329 x EG7B36	K356
10	EG3014	K228	20	SH27/07-7 x SH27/07-22	K357

3.4 Pracovní postup

Analytické postupy zahrnující sestavení PCR reakce a následnou separaci amplifikovaných produktů vycházejí z jednotných pracovních postupů (JPP: PCR (Type-it Microsatellite PCR Kit); Fragmentační analýza (DNF-900 dsDNA Reagent Kit)) platných pro rutinní analýzy za účelem identifikace odrůd pomocí SSR markerů. Závěrečná fáze obnáší vyhodnocení a interpretaci získaných dat z fragmentační analýzy (JPP: Vyhodnocení výsledků a tvorba databáze profilů DNA).

Tabulka 2. Seznam 12 SSR markerů pro genotypizaci kukuřic. Údaje pro předpokládané rozmezí a počet detekovaných alel vycházejí z analýzy více než 380 vzorků kukuřic od r. 2017.

Marker	Chromozom	Motiv repeticce	Délka alel (bp)	Počet alel
bnlg1129	9	(AG) ₁₂	185-203	6
phi015	8	AAAC	89-109	4
phi083	2	(AGCT) ₂	133-145	4
phi102228	3	AAGC	126-134	3
phi109275	1	AGCT	132-150	3
phi233376	8	CCG	140-160	7
umc1061	10	(TCG) ₆	105-112	3
umc1117	4	(TCGCA) ₄	136-147	3
umc1133	6	ATAC	96-108	3
umc1448	2	(GCT) ₅	142-152	7
umc1478	5	(GGAG) ₄	142-148	3
umc1545	7	(AAGA) ₄	73-87	4

3.4.1 PCR reakce

Amplifikace 12 SSR markerů je uspořádána do tří multiplexních a tří samostatných reakcí. Pro namnožení těchto cílových sekvencí se používá komerční kit Type-it Microsatellite PCR (Qiagen), který je přímo určen pro genotypové analýzy probíhající v multiplexu. V případě multiplex PCR se připraví 10× primer mixy obsahující 2 μM – 4 μM příslušných primerů (Tabulka 4). Ředí se vodou pro PCR, není-li uvedeno jinak. Reakční směs pro vlastní PCR obsahuje mastermix a templátovou DNA. Složení mastermixu je uvedeno v Tabulce 5a a 5b. Jednotlivé komponenty se pipetují v pořadí, ve kterém jsou uvedeny v tabulce, směs se promíchá jemným propipetováním, krátce stočí na minicentrifuze a rozalikvotuje po 10 μl do označených PCR zkumavek. Následně se do reakce přidává 2,5 μl templátové DNA (v případě beztemplátové kontroly 2,5 μl vody), celkový reakční objem činí 12,5 μl. Reakční

podmínky jsou optimalizovány na C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). Teplotní profily a jednotlivé kroky PCR jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 3. Sekvence specifických primerů, teplotní protokoly (TP) a přiřazení k příslušnému multiplexu (MP-K,L,N).

Marker	F primer (5' → 3')	R primer (5' → 3')	PCR	Set
bnlg1129	GAG AGT ATG CTA CTC GCC GC	GAC GAG TTT GGA GTG CCA TT	TP5	MPK
phi015	GCA ACG TAC CGT ACC TTT CCG A	ACG CTG CAT TCA ATT ACC GGG AAG	TP5	MPK
phi083	CAA ACA TCA GCC AGA GAC AAG GAC	ATT CAT CGA CGC GTC ACA GTC TAC T	TP5	MPK
phi102228	ATT CCG ACG CAA TCA ACA	TTC ATC TCC TCC AGG AGC CTT	TP1	MPL
phi109275	CGG TTC ATG CTA GCT CTG C	GTT GTG GCT GTG GTG GTG	TP1	MPN
phi233376	CCG GCA GTC GAT TAC TCC	CGA GAC CAA GAG AAC CCT CA	TP_SP2	-
umc1061	AGC AGG AGT ACC CAT GAA AGT CC	TAT CAC AGC ACG AAG CGA TAG ATG	TP1	MPN
umc1117	AAT TCT AGT CCT GGG TCG GAA CTC	CGT GGC CGT GGA GTC TAC TAC T	TP_SP1	-
umc1133	ATT CGA TCT AGG GTT TGG GTT CAG	GAT GCA GTA GCA TGC TGG ATG TAG	TP1	MPL
umc1448	ATC CTC TCA TCT TTA GGT CCA CCG	CAT ATA CAG TCT CTT CTG GCT GCT CA	TP_SP1	-
umc1478	GAG AGT ATG CTA CTC GCC GC	GAC GAG TTT GGA GTG CCA TT	TP1	MPL
umc1545	GCA ACG TAC CGT ACC TTT CCG A	ACG CTG CAT TCA ATT ACC GGG AAG	TP1	MPN

3.4.2 Fragmentační analýza

Získané PCR produkty se separují a detekují metodou kapilární elektroforézy. Vzorky se separují ve 12 kapilárovém fragmentačním analyzátoru od firmy Advanced Analytical (experimentální protokol DNF-905-55 – DNA 1-500bp.mthds), následně se vyhodnocují prostřednictvím programu PROSize™ 3.0 Analytical Software. Pro kvalitativní analýzu dsDNA fragmentů o velikosti 35 bp - 500 bp se využívá komerční soupravy dsDNA 905 Reagent Kit (1-500 bp). Vzorky se před fragmentační analýzou osmkrát ředí 1× TE pufrem, který je součástí kitu, přičemž celkový objem musí být minimálně 30 µl (28 µl 1× TE + 4 µl PCR produkt). Analýzou surových dat se získají údaje o velikosti (bp) separovaných dsDNA fragmentů. Data jsou standardizována na dolní (LM, 1 bp) a horní (UM, 500 bp) kvalitativní marker, DNA Ladder o rozsahu 35-400 bp slouží jako hmotnostní standard a je analyzován

paralelně se vzorky. Pro správné sestavení kalibrační křivky musí být detekováno všech 9 píků DNA Ladderu. V každém běhu (včetně beztemplátové kontroly PCR) musí být detekován rozeznatelný pík pro LM a UM.

Tabulka 4. Složení 10× primer mixů pro multiplex PCR (100 µl).

Zásobní primer 100µM	Objem (µl)	Finální koncentrace (µM)
<i>10× MPK (1) primer mix</i>		
PCR voda	76	-
F phi015	4	4
R phi015	4	4
F phi083	4	4
R phi083	4	4
F bnlg1129	4	4
R bnlg1129	4	4
<i>10× MPL (2) primer mix</i>		
PCR voda	88	-
F umc1133	2	2
R umc1133	2	2
F phi102228	2	2
R phi102228	2	2
F umc1478	2	2
R umc1478	2	2
<i>10× MPN (3) primer mix</i>		
PCR voda	88	-
F umc1545	2	2
R umc1545	2	2
F umc1061	2	2
R umc1061	2	2
F phi109275	2	2
R phi109275	2	2

Tabulka 5a. Složení reakční směsi (12,5 μ l) pro singleplex PCR.

Složka	Finální koncentrace	Objem na reakci (μl)
PCR voda	-	2,75
Type-it PCR Master Mix, 2 \times	1 \times	6,25
Forward primer (10 μ M)	0,4 μ M	0,5
Reverse primer (10 μ M)	0,4 μ M	0,5
Templátová DNA (10 ng/ μ l)	25 ng	2,5

Tabulka 5b. Složení reakční směsi (12,5 μ l) pro multiplex PCR.

Složka	Finální koncentrace	Objem na reakci (μl)
PCR voda	-	1,25
Q-Solution, 5 \times	0,5 \times	1,25
Type-it PCR Master Mix, 2 \times	1 \times	6,25
10 \times MP Primer Mix (viz Tabulka 4)	0,2/0,4 μ M	1,25
Templátová DNA (10 ng/ μ l)	25 ng	2,5

Tabulka 6. Teplotní profily PCR.

SSR	Název programu	Parametry programu			Set	Pozn.*
		Teplota (°C)	Doba (s)	Počet cyklů		
phi015 phi083 bnlg1129	TP5.prcl	95	300	1	MPK	MP
		95	30	35		
		63	90			
		72	60			
		68	600	1		
		4	hold			
umc1133 phi102228 umc1478 umc1545 umc1061 phi109275	TP1.prcl	95	300	1	MPL MPN	MP
		95	30	35		
		60	90			
		72	30			
		68	600	1		
		4	hold			
umc1117 umc1448	TP_SP1 umc1117-66,5st.prcl umc1448-66,5st.prcl	95	300	1	-	SP
		95	30	35		
		66,5	60			
		72	30			
		68	600	1		
		4	hold			
phi233376	TP_SP2 phi233376-68st.prcl	95	300	1	-	SP
		95	30	35		
		68	60			
		72	30			
		68	600	1		
		4	hold	1		

*multiplex (MP), singleplex (SP) uspořádání

3.4.3 Vyhodnocení a interpretace dat

Primární data se dále převádějí do binární matice a statisticky se zpracovávají pro určení genetické podobnosti (GS) mezi jednotlivými odrůdami. Na základě přítomnosti (1) či nepřítomnosti (0) alely se pro každý vzorek sestaví alelický profil (reprezentovaný binární maticí) pro všechny SSR markery. Maticový soubor se vyhodnotí ve statistickém programu PAST (Paleontological Statistics) ver. 3.17 stanovením koeficientu podobnosti podle Jaccarda.

Informaci o vzájemné genetické odlišnosti (GD) lze získat jednoduchou transformací $GD = 1 - GS$. Vizualizace výsledných dat (genetických podobností) sestrojením dendrogramu se provádí metodu párování pomocí nevážených aritmetických průměrů (UPGMA).

4 Výsledky a diskuse

V současné době je pro genotypování kukuřice zavedena metodika založená na analýze 12 SSR markerů (Tabulka 2), přičemž každý lokus se analyzuje v samostatné singleplex reakci. Pro každý vzorek je potřeba udělat 12 PCR a následně pro každý produkt zvlášť provést kapilární elektroforézu. Za účelem snížení ceny a časové náročnosti genotypizace je vhodné testování provádět v multiplexu, kdy je v jedné reakci analyzováno více markerů najednou.

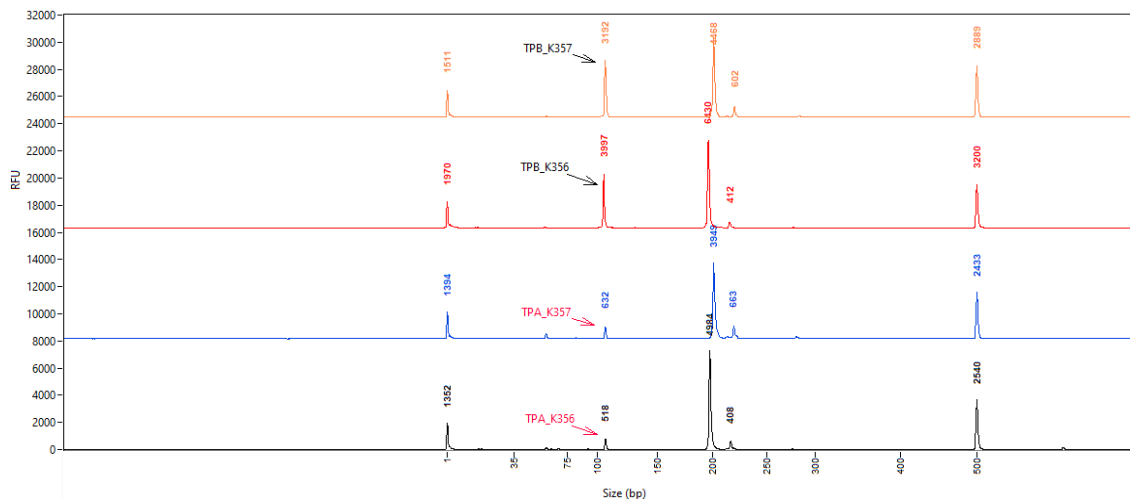
Obvykle se při genotypování používají fluorescenčně značené specifické primery (různé kombinace fluorescenčních barev) a lze tak v jedné reakci analyzovat i překrývající se lokusy. Běžně rozšířené kapilární genetické analyzátoři jsou schopni současně detekovat až pět barevných spekter. Nicméně stávající fragmentový analyzátor (Advanced Analytical) vícekanálovou detekci neumožňuje, takže při návrhu multiplexů je markery potřeba slučovat tak, aby byly jednoznačně odlišitelné podle délky výsledných fragmentů. Z informací o jednotlivých SSR (Tabulka 2) je patrné, že tvorba multiplexů s vyšším počtem markerů je do jisté míry omezena tím, že pro velkou část markerů je velikost pozorovaných alel mezi 120-150 bp. I přesto nižší multiplexy (2-4 SSR) představují výrazné zefektivnění analýzy.

Převedení do multiplexního formátu vyžaduje rozsáhlou optimalizaci reakčních podmínek a ověření kompatibility všech primerů v jedné reakční směsi. Předpokladem úspěšného multiplexu je nastavení experimentálních parametrů tak, aby byla zajištěna vyvážená a specifická amplifikace všech cílových lokusů a současně se minimalizoval výskyt nespecifických produktů.

4.1 Návrh a optimalizace multiplex PCR

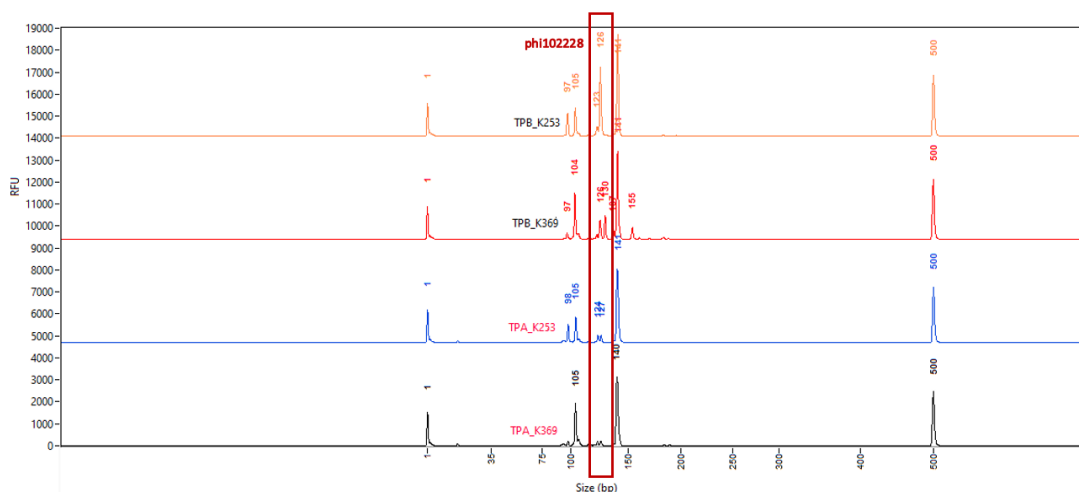
Pro prvotní screening bylo sestaveno 18 variant multiplexů, které se liší kombinací markerů přítomných v reakční směsi (2-3 SSR). Tím se ověřilo, jestli dochází k amplifikaci všech očekávaných fragmentů v porovnání se singleplex reakcemi a jestli nedochází k nežádoucí interakci mezi primery, což by negativně ovlivnilo průběh reakce. Testování proběhlo na čtyřech vzorcích, které byly vybrány s cílem pokrýt co nejvíce známých alel a současně aby alespoň několik lokusů bylo heterozygotních. Heterozygotní vzorky byly použity záměrně, protože u nich bývá intenzita signálu nižší, často na hranici detekce, oproti optimálním výsledkům u homozygotních vzorků. Na úvod byly zvoleny tři různé teplotní protokoly pro PCR. TPA (95 °C/5 min; 35x (95 °C/30 s; 66 °C/60 s; 72 °C/30 s); 68 °C/600 s; 4 °C/hold) vychází z reakčních podmínek pro stávající singleplex reakce, TPB (95 °C/5 min; 33x (95 °C/30 s; 60 °C/90 s; 72 °C/30 s); 68 °C/600 s; 4 °C/hold) se liší teplotou (T_a), dobou annealingu (t_a) a počtem cyklů. Pro několik vybraných kombinací markerů, kde se optimální teplota (T_m) pro nasedání příslušných primerů výrazně liší, byl otestován ještě protokol TPC s nižší T_a (63 °C) oproti TPA. Složení reakční směsi, vstupní množství templátové DNA (25 ng) a teplotní profil amplifikace vycházely z předchozích zkušeností s optimalizací parametrů PCR a z doporučení manuálu kitu. Pro výchozí složení reakčního mixu byla zvolena 0,2 μ M koncentrace primerů, a reakční objem 12,5 μ l. Bylo provedeno porovnání délky produktů oproti singleplexu a kontrola nežádoucích vedlejších produktů, které by komplikovaly odečet výsledku. Při porovnání intenzity signálu a ostroty jednotlivých píků se TPA neukázal jako optimální. Nejčastější problémy spočívaly v nízkých intenzitách fluorescenčního signálu, nerovnoměrné amplifikaci jednotlivých markerů a v několika případech za daných podmínek amplifikace vůbec neproběhla (Obrázky 1 a 2). Protokol TPB s nižší T_a a delší dobou annealingu dává přijatelné výsledky pro většinu testovaných variant multiplexů. Z těchto variant by bylo možné vybrat několik kombinací, které by snížily celkový počet reakcí z dvanácti na polovinu:

- 3x MP pro 3 SSR a 3x SP (celkem 6 reakcí)
- 2x MP pro 3 SSR, 2x MP pro 2 SSR a 2x SP (celkem 6 reakcí).

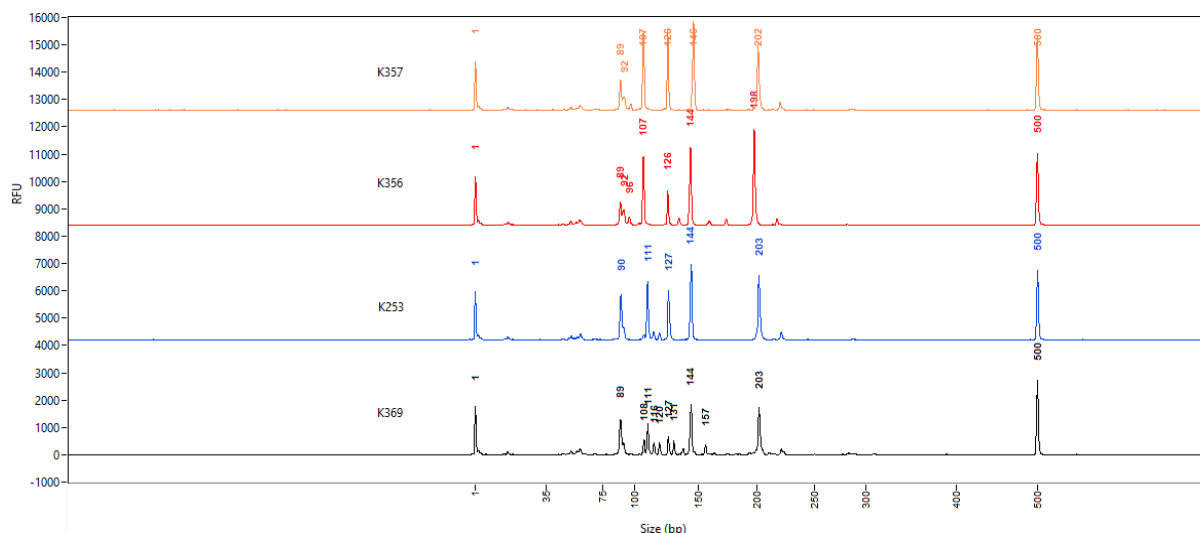


Obrázek 1. Příklad alel s nízkým signálem (MP pro umc1061 a bnlg1129). Porovnání intenzity signálu za podmínek TPA (K356: 0,5/5,0 RFU; K357: 0,6/4,0 RFU) a TPB (K356: 3,9/6,4 RFU; K357: 3,2/4,5 RFU).

Ve snaze o další zefektivnění byly navrženy 4 varianty multiplexů pro 4-5 SSR, testovaných při protokolech TPA a TPB. Více markerů do jedné reakce už nakombinovat nelze, aby nedocházelo k překryvu alel. Za podmínek TPA nedošlo k amplifikaci všech markerů v multiplexu, TPB poskytl přijatelné výsledky pro dvě kombinace MP pro 5 SSR (Obrázek 3) a jeden MP pro 4 SSR. Za účelem dalšího snížení celkového počtu reakcí na pět, byl k těmto multiplexům navržen set pro 3 SSR. Tato kombinace se ale neosvědčila z důvodu vysokého rizika chybného přiřazení alel. Konkrétně by to mohlo nastat v důsledku překryvu vedlejšího produktu (~145 bp), který byl detekován společně s alelou (D) pro phi083, a nejkratší alely (A) pro umc1448 (~144 bp).



Obrázek 2. Porovnání výsledku multiplexu pro 3 SSR při TPA a TPB (MP pro umc1133, phi102228 a umc1478). Za podmínek TPA nedošlo k amplifikaci phi102228.



Obrázek 3. Příklad multiplexu pro 5 SSR (umc1545, umc1061, phi102228, phi233376, bnlg1129), teplotní protokol TPB.

Jako finální uspořádání byly předvybrány tři stabilní multiplexy po 3 SSR (sety označeny MPK, MPL, MPN), které v kombinaci s analýzou zbývajících 3 SSR v singleplexu sníží celkový počet reakcí na 6. Toto uspořádání je podrobně popsáno v kapitole 3. Materiál a metody (podkapitola 3.4.1 a Tabulka 4).

- MPK: phi015, phi083, bnlg1129
- MPL: umc1133, phi102228, umc1478
- MPN: umc1545, umc1061, phi109275

Pro tyto vybrané multiplexy bylo optimalizováno finální složení reakční směsi (testovány koncentrace primerů: 0,2 μ M, 0,3 μ M a 0,4 μ M) a upraven teplotní protokol PCR (T_a 60 $^{\circ}$ C, 63 $^{\circ}$ C a 66 $^{\circ}$ C; t_a 90 s; t_{ext} 30 s a 60 s; počet cyklů 33 a 35). Optimální složení a teplotní profily (TP1, TP5) jsou uvedeny v Tabulce 4. a 6. Aby se minimalizovalo potencionální riziko chybného odečtu, byly testovány vzorky se zastoupením nejdelší a nejkratší alely pro každý marker. Pro kontrolu dostatečné intenzity signálu (RFU) byly otestovány vybrané heterozygotní vzorky. Výsledky jsou srovnatelné s analýzami provedenými v singleplexu, přičemž v oblasti zájmu nebyly pozorovány žádné další nespecifické vedlejší produkty.

4.2 Analýza výsledných dat

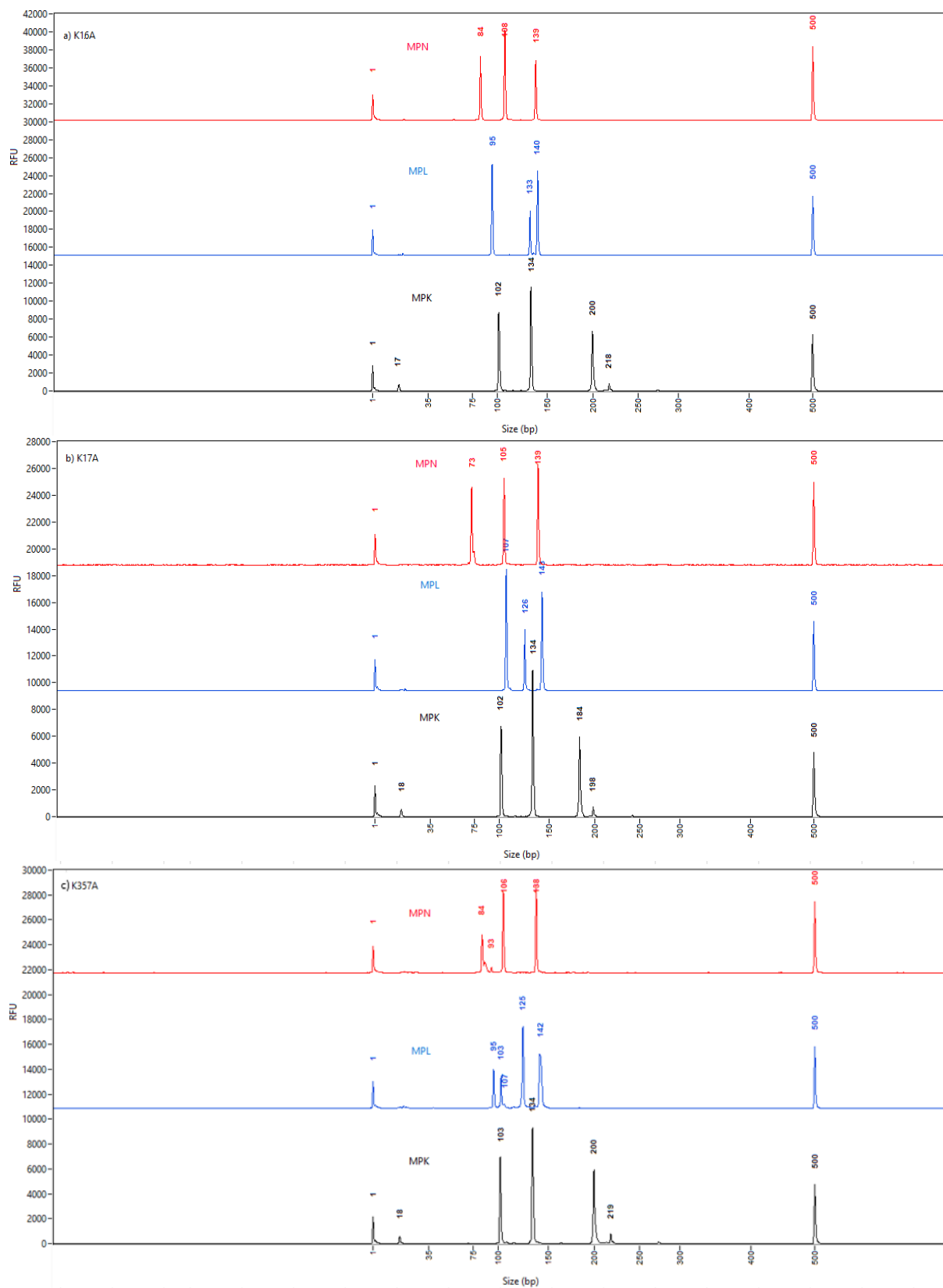
Funkčnost optimalizovaných multiplexů byla finálně ověřena na celém souboru 20 vybraných vzorků kukuřice (Tabulka 1), ukázky výsledných elektroforeogramů jsou uvedeny na Obrázcích 4 a 5. Výstupem analýzy jsou údaje o velikosti jednotlivých alel udávané v párech bází (Tabulka 7), jejichž kombinací pro všechny testované markery se získá DNA (alelický) profil vzorku. Výsledné alelické profily získané analýzou 9 SSR v multiplexech MPK, MPL a MPN (Tabulka 8) představují referenční data pro budoucí rutinní analýzy.

Tabulka 7. Přehled pozorovaných alel pro 9 testovaných SSR markerů u 20 vzorků kukuřic.

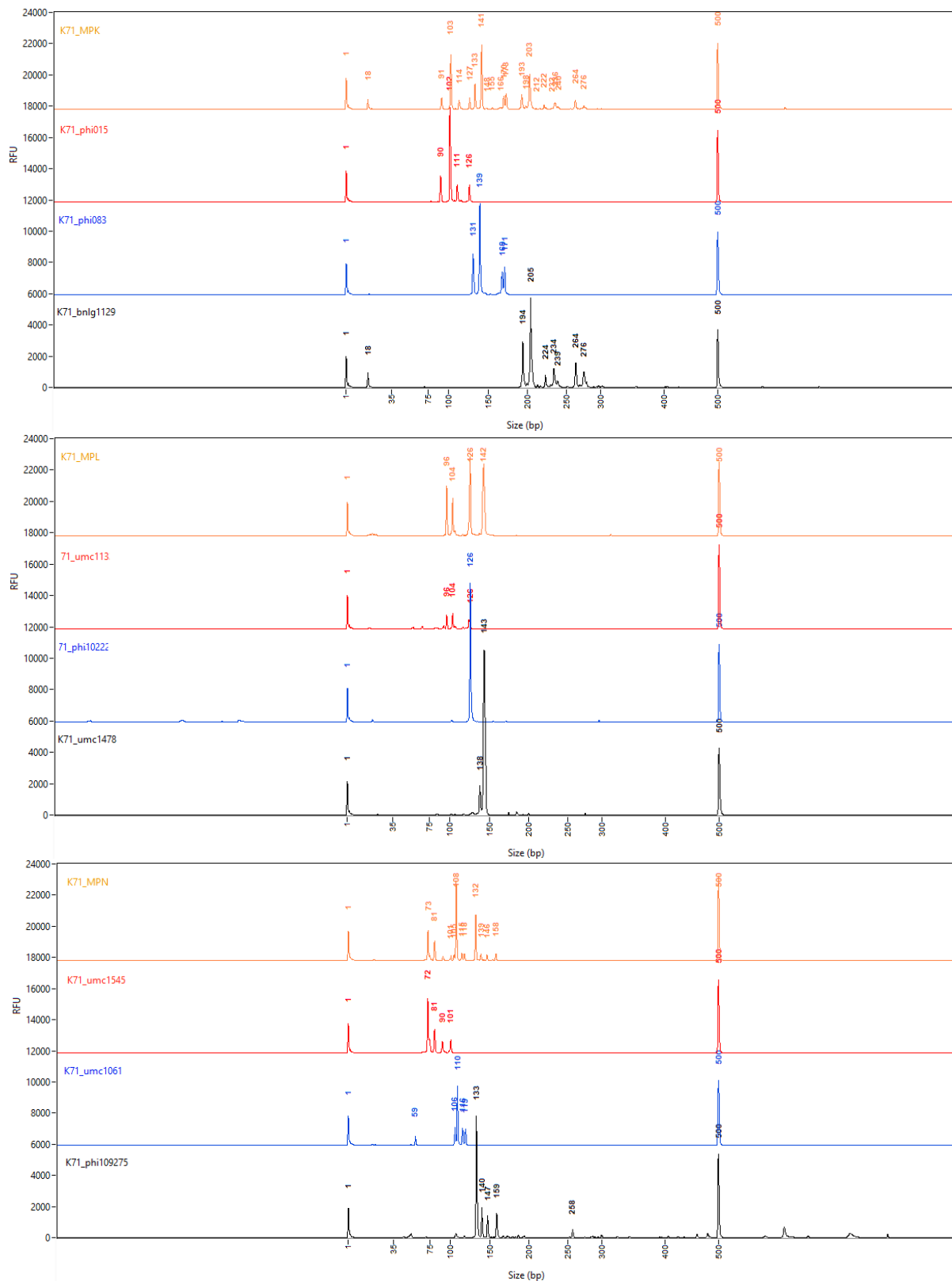
MPK						MPL						MPN					
phi015		phi083		bnlg1129		umc1133		phi102228		umc1478		umc1545		umc1061		phi109275	
89-109 (AAAC)		133-145 (AGCT) ₂		185-203 (AG) ₁₂		96-108 (ATAC)		126-134 (AAGC)		142-148 (GGAG) ₄		73-87 (AAGA) ₄		105-108 (TCG) ₆		132-150 (AGCT)	
A	91	A	133	A	185	A	96	A	126	A	142	A	73	A	105	B	138
B	103	B	137	B	193	B	104	B	130	B	148	B	81	B	108	C	150
C	109	C	141	C	195	C	108	C	134	D	146	C	83			E	132
D	89	D	145	D	197							D	87				
				F	201												
				G	203												

Pro heterozygotní lokusy byl pozorován zvýšený výskyt vedlejších produktů, což je zřejmé například u vzorku K71 (Obrázek 5). Přítomnost vedlejších produktů může zásadním způsobem komplikovat správný odečet alel. Při vyhodnocování takových problematických vzorků je potřeba správně rozlišit, kdy se jedná o vedlejší produkt jednoho markeru a kdy jde o skutečnou alelu jiného markeru v daném multiplexu.

Při návrhu multiplexů byla snaha seskupovat markery tak, aby byly vzájemně délkově odlišitelné alespoň o 20 bp. Nicméně zřídka se mohou vyskytnout kritické kombinace, kdy je detekována nejdélší alela jednoho markeru a nejkratší alela druhého. To se projevilo u vzorku K16 (Obrázek 4), kde je tato vzdálenost menší než 10 bp. V takových případech je pro správné přiřazení fragmentu klíčové využít známé alelické rozmezí pro daný lokus. Přesné vyhodnocení takových hraničních elektroforeogramů a spolehlivé rozlišení mezi alelou a vedlejším produktem vyžaduje určité zkušenosti.



Obrázek 4. Elektroforeogramy pro vzorky K16 (a), K17 (b), a K357 (c); MPK černý, MPL modrý, MPN červený.



Obrázek 5. Elektroforegramy pro vzorek K71. Porovnání MP a SP.

Tabulka 8. Alelické profily získané analýzou 9 SSR ve třech multiplexech (MPK, MPL, MPN).

	bnlg1129	umc1061	phi015	phi083	umc1545	phi102228	phi109275	umc1133	umc1478		bnlg1129	umc1061	phi015	phi083	umc1545	phi102228	phi109275	umc1133	umc1478
K16	F	B	B	A	C	C	B	A	A	K233	BF	A	B	AB	C	AC	B	AC	A
K17	A	A	B	A	A	A	B	C	A	K254	FG	A	BC	CD	C	A	EB	A	A
K18	A	A	B	B	C	C	C	C	B	K259	B	A	B	A	B	A	B	C	A
K26	D	A	A	A	D	B	B	C	A	K269	FG	B	B	A	AC	AB	EC	AB	A
K48	BD	B	AB	AC	C	AC	EB	A	AD	K282	DG	A	AB	A	C	AC	B	AB	A
K55	G	AB	A	AB	AC	A	EB	AB	A	K303	DF	A	AB	AC	CD	A	EB	C	AD
K71	BG	B	AB	AC	AB	A	E	AB	A	K315	G	B	D	A	C	A	B	B	A
K91	AF	B	B	BCD	C	AC	BC	AC	A	K341	F	A	B	AB	AC	A	B	AC	AD
K113	FG	B	BC	A	C	AC	BC	AB	A	K356	D	A	A	C	CD	AC	EB	C	A
K228	G	A	B	A	C	B	B	A	A	K357	F	A	B	A	C	A	B	AB	A

5 Závěr

Původní metodika, založená na analýze 12 SSR markerů v 12 samostatných singleplex PCR reakcích, byla v rámci práce úspěšně převedena do formátu tří stabilních multiplex PCR reakcí po třech SSR markerech a tří singleplex PCR reakcí. Tím se podařilo snížit celkový počet požadovaných amplifikačních reakcí (a následných analýz výsledných produktů kapilární elektroforézou) z dvanácti na šest, což představuje úsporu 50 % v počtu reakcí a výrazné zefektivnění laboratorního postupu.

Byly navrženy a ověřeny optimální reakční podmínky pro dosažení co nejvíce rovnoměrné a specifické amplifikace všech cílových lokusů v multiplexech. Upravená metodika byla ověřena na reprezentativním souboru 20 vzorků kukuřice, které pokrývá co nejširší spektrum pozorovaných alel pro všechny testované lokusy. Získané alelické profily potvrdily, že nová metoda poskytuje srovnatelné a spolehlivé výsledky s původní singleplex metodou.

Cíl práce, komplexní zefektivnění metodiky z hlediska časové náročnosti, spotřeby reagensů a finančních nákladů, byl splněn.

6 Literatura

1. Mason AS, **2015**. SSR Genotyping. Plant Genotyping: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 1245, 77-89.
2. Pospíš P, Michálek P, Ruttkay-Nedecký B, Kopel P, Trnková L, **2014**. Optimalizace multiplex PCR. Journal of Metallomics and Nanotechnologies, 1 (2), 60-63.
3. Genome, 40 (4), 442-450.
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
5. ZZ VÚ č. 50.03/2015 - Zavedení metody založené na analýze mikrosatelitů (SSR markerů) pro identifikaci odrůd kukuřice
6. JPP – PCR (Type-it Microsatellite PCR Kit)
7. JPP – Fragmentační analýza (DNF-900 dsDNA Reagent Kit)
8. JPP – Vyhodnocení výsledků a tvorba databáze profilů DNA
9. PP – Pracovní pokyny v LMGD – Identifikace odrůd pomocí SSR markerů
10. Qiagen: Type-it[®] Microsatellite PCR Handbook, **2011**.
11. Advanced Analytical: DNF-900 dsDNA Reagent Kit User Guide, **2014**.

Stanovení obsahu křemíku v hnojivech metodou ICP-OES

Václav Rypl, Libuše Tůmová, Barbora Schimmerová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdNRL Plzeň, Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň
vaclav.rypl@ukzuz.gov.cz

1 Úvod

V současné době vzrůstá počet požadavků na stanovení obsahu křemíku v hnojivech. S tím souvisí požadavek na zvýšení přesnosti a správnosti stanovení a nahrazení původní titrační metody zatížené interferencemi efektivnější metodou. Pro práci se použily vzorky hnojiv vybrané ve spolupráci s pracovníky Oddělení hnojiv v Praze. Vzorky byly analyzovány titrační metodou a vyvíjenou metodou ICP-OES.

2 Materiál a metody

2.1 Chemikálie

2.1.1 Deionizovaná voda.

2.1.2 Hydroxid sodný, NaOH, p.a.

2.1.3 Hydroxid sodný, ředěný, NaOH \approx 1 mol/l.

Příprava: Do 1000ml plastové odměrné baňky se naváží 40,5 g NaOH (2.1.2), přidá se přibližně 400 ml deionizované vody (2.1.1) a rozpustí se. Baňka se následně po vytemperování doplní deionizovanou vodou po značku a důkladně protřepe.

2.1.4 Hydroxid amonný, NH₄OH, vodný roztok, 25 %, p.a.

2.1.5 Hydroxid amonný, 100 × ředěný, NH₄OH \approx 0,25 %.

Příprava: Do 1000ml plastové odměrné baňky se přidá přibližně 400 ml deionizované vody (2.1.1), pomocí odměrného válce se přidá 10 ml NH₄OH (2.1.4), následně se po vytemperování baňka doplní deionizovanou vodou po značku a důkladně protřepe.

2.1.6 Chlorid sodný, NaCl, Suprapur, 99,99 %, Merck.

2.1.7 Hydroxid amonný, 100 × ředěný s přidavkem NaCl, $\text{NH}_4\text{OH} \approx 0,25 \%$.

Příprava: Do 1000ml plastové odměrné baňky se naváží 0,1182 g NaCl (2.1.6), který se rozpustí v přidaných 400 ml deionizované vody (2.1.1). Do baňky se pak pomocí odměrného válce přidá 10 ml NH_4OH (2.1.4) a po vytemperování se doplní po značku deionizovanou vodou (2.1.1).

2.1.8 Základní standard Si, 1000 mg/l, Astasol, Analytika.

2.1.9 Pracovní standard Si, 50 mg/l, matrice H_2O .

Příprava: Do 100ml plastové odměrné baňky se přidá 20 ml ředěného roztoku NH_4OH s přidavkem NaCl (2.1.7) a potom se pipetuje 5 ml základního standardu Si. Následně se doplní po značku ředěným roztokem hydroxidu amonného s přidavkem NaCl (2.1.7).

2.2 Přístroje a pomůcky

2.2.1 Grafitový mineralizační blok, Multicube CT, Anton Paar.

2.2.2 Plastové mineralizační tuby do grafitového bloku.

2.2.3 ICP OES Spectro Arcos 3, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Německo.

2.2.4 Automatická pipeta s plastovými špičkami.

2.2.5 Plastové odměrné baňky a další použité laboratorní nádoby.

2.2.6 Filtrační papír středně hustý – Munktell 389, 125 mm.

2.3 Vzorky

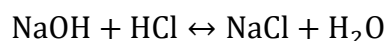
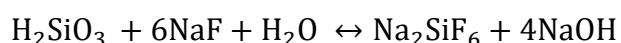
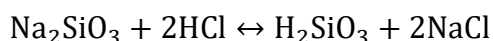
Pro vývoj metody byly použity vzorky hnojiv analyzovaných v OdNRL Plzeň v letech 2023 až 2025. Dále pracovníci Oddělení hnojiv požádali výrobce těchto typů materiálů o dodání svých produktů, přičemž většina z oslovených tyto vzorky dodala. Dále byly použity dvě čisté chemikálie, a to jednak pevný vzorek vodního skla a kapalný vzorek vodního skla. Celkem tedy bylo pro studii použito 14 vzorků, z toho byly dva pevné vzorky a 12 kapalných vzorků. Vzorky 436 a 438 jsou stejný produkt od stejného výrobce, ale liší se datem výroby o dva roky, proto byli oba zástupci toho samého vzorku ve studii ponechány.

Tabulka 7. Vzorky.

Č. vzorku LIMS 2025	Skupenství	Název vzorku
434	Pevné	Metasilikát sodný (čistá chemikálie)
435 (41/2024)	Pevné	Compo turbo-kořeny
436 (173/2023)	Kapalné	Carbon Si
437 (442/2023)	Kapalné	Topsil
438	Kapalné	CARBON Si
439	Kapalné	CARBONBOR Si
440	Kapalné	Carbon Ca - Si
441	Kapalné	Carbon Cu - Si
442	Kapalné	NanoFYT Si
443	Kapalné	Vodní sklo (čistá chemikálie)
444 (372/2025)	Kapalné	GENAKTIS 1
445	Kapalné	Controlphyt Si
459	Kapalné	YaraVita ACTILIS
482	Kapalné	Astelis 1

2.4 Titrační metoda stanovení SiO₂

Metoda je určena především pro stanovení SiO₂ ve vzorcích založených na bázi vodního skla. Tyto sodné nebo draselné soli kyseliny křemičité jsou rozpuštěny za varu v hydroxidu sodném. Použití hydroxidu sodného jako extrakčního činidla umožní převést křemík dostupný ve vzorku na sodnou sůl kyseliny křemičité a učinit ho rozpustným. Následně se vzorek neutralizuje kyselinou chlorovodíkovou. Po přidavku fluoridu sodného dojde k uvolnění hydroxyly. Vzorek se poté titruje pomocí HCl a tato spotřeba je úměrná obsahu SiO₂ ve vzorku. Titraci lze popsat pomocí následujících rovnic:



Ze stechiometrie vyplývá, že spotřeba 4 mol HCl odpovídají 1 mol SiO₂.

Přesný popis použité metody viz Jednotné pracovní postupy, postup 20310.1 Stanovení obsahu oxidu křemičitého titračně.

2.5 Metoda stanovení Si pomocí ICP OES

2.5.1 Extrakce

Varianta A

Do 50ml plastové mineralizační tuby se přesně naváží přibližně 0,5 g kapalného vzorku nebo 0,25 g pevného vzorku. Přidá se 20 ml 1M NaOH (2.1.3) a povaří se 30 min při 105 °C. Následně se doplní deionizovanou vodou (2.1.1) po značku a přefiltruje (2.2.6). Následně se odpipetuje 0,5 ml vzorku do 100ml plastové odměrné baňky a doplní zředěným roztokem amoniaku (2.1.5) po značku a důkladně se promíchá. Takto upravený extrakt se pak použije k měření. Stejným způsobem se připraví, pouze bez navážky vzorku, slepý pokus.

Varianta B

Do 50ml plastové mineralizační tuby se přesně naváží přibližně 0,5 g kapalného vzorku nebo 0,25 g pevného vzorku. Ke vzorku se pak přidá deionizovaná voda (2.1.1) po značku a vzorek se 5 min třepe v ruce. Extrakt se nefiltruje. Následně se odpipetuje 0,5 ml vzorku do 100ml plastové odměrné baňky a doplní zředěným roztokem amoniaku s přídavkem NaCl (2.1.7) po značku a důkladně se promíchá. Takto upravený extrakt se pak použije k měření. Stejným způsobem se připraví, pouze bez navážky vzorku, slepý pokus.

2.5.2 Kalibrace

Pracovní standard s obsahem 50 mg/l Si (2.1.9) se rozpipetuje podle tabulky 2.

Tabulka 8. Kalibrační křivka.

	Pracovní standard	Baňka	Pipetovaný objem	Ředění	Koncentrace
	mg/l	ml	ml	×	mg/l
St 7	50	50	10	5	10
St 6	50	50	5	10	5
St 5	50	50	2	25	2
St 4	50	50	1	50	1
St 3	50	50	0,5	100	0,5
St 2	50	50	0,2	250	0,2
St 1	50	50	0,1	500	0,1

Plastové baňky se doplní po rysku zředěným roztokem amoniaku s přidavkem NaCl (2.1.7), tento roztok se pak použije jako kalibrační blank.

2.5.3 Měření ICP OES

Přístroj se uvede do provozu podle pokynů výrobce. Přístroj se nakalibruje pomocí křivky připravené podle bodu 2.5.2. Změří se extrakty vzorků připravené podle bodu 2.5.1. V některých případech dojde při extrakci pomocí NaOH (varianta A) k vysrážení vzorku, potom se použije ke stanovení vodný extrakt (varianta B).

Výsledky mohou být vyjádřeny jako obsah křemíku v mg/kg nebo s využitím koeficientu 2,1392 převedeny na SiO₂ a vyjádřeny v hmotnostních %.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Optimalizace a vlastnosti titrační metody

3.1.1 Mez stanovitelnosti titrační metody

Nejprve byla určena mez stanovitelnosti titrační metody. Barevný přechod je v případě tohoto stanovení mimořádně obtížné zachytit a je také mimořádně dlouhý, proto byly průběžně zaznamenávány hodnoty spotřeby HCl od doby, kdy měl operátor poprvé pocit, že dochází k barevné změně, do okamžiku, kdy již bylo zcela jisté, že ke změně došlo. Délka tohoto přechodu přibližně odpovídala spotřebě 0,16 až 0,46 ml. Pro výpočet bylo použito stanovení 12 slepých pokusů. Trojnásobek ekvivalentu přepočtu spotřeby na SiO₂ byl vzat jako odhad meze stanovitelnosti. Těchto 12 odhadů bylo zprůměrováno s výsledkem LOQ = 1,44 % SiO₂. Jako praktická hodnota odhadu meze stanovitelnosti pomocí titrační metody pak byla zvolena hodnota LOQ = 1,5 % SiO₂.

3.1.2 Interference titrační metody

Byla identifikována interference kyseliny borité stanovení SiO₂ titračně. Toto je případ vzorku 439 – Carbonbor Si. Titrační metodou bylo dosaženo výsledku 15,8 % SiO₂, zatímco metodou ICP OES 0,8 % SiO₂, kdy výrobce deklaruje u tohoto hnojiva 1 % SiO₂. Je zřejmé, že metoda ICP OES poskytuje mnohem realističtější výsledek. Interference byla ověřena navázkou kyseliny borité 0,3306 g a následně byla provedena titrace. Navážka kyseliny borité byla vypočtena na základě faktu, že ve vzorku 439 bylo naměřeno 5,78 % vodorozpustného boru. Zvolená navážka pak měla modelovat obsah kyseliny borité ve vzorku 439. Předpoklad, že se

jedná o interferenci dokládá fakt, že v navážce 0,3306 g čisté kyseliny borité bylo titrační metodou změřeno 14,2 % SiO₂. Vzorek 439 zároveň obsahuje Si, což dokládá hodnota 0,8 % SiO₂ naměřená metodou ICP OES, takže po sečtení 14,2 + 0,8 se dostane očekávaný výsledek 15 % SiO₂, což je ve velmi dobré shodě s titrační metodou naměřenou hodnotou 15,8 % SiO₂.

3.1.3 Titrační metoda – shrnutí

Z výše uvedených skutečností vyplynulo, že z porovnání obou metod musely být vyloučeny všechny vzorky s obsahem SiO₂ pod 1,5 % z důvodu nedosažení meze stanovitelnosti titrační metody (tj. vz. 440, 441, 459, 482). Vzorek 439 – Carbonbor Si sice přesáhl titrační metodou mez stanovitelnosti, ale musel být z porovnání vyloučen z důvodu interference kyselinou boritou. To nám ukazuje limity titrační metody a také potřebu nové metody. Pro kapalně vzorky s nízkým obsahem Si je titrační metoda nepoužitelná. Vzhledem k tomu, že se výrobci snaží vytvářet čím dál komplexnější produkty, kdy se do hnojiv s obsahem Si snaží přidávat mikroelementy, jako například bór do vzorku 439 ve formě H₃BO₃, jeví se použitelnost titrační metody jako výrazně omezená, zvláště v situaci, kdy nejsou k dispozici spolehlivé údaje o složení vzorku.

3.2 Optimalizace metody ICP OES

Byly testovány parametry navážka vzorku, čas, teplota a vhodnost extrakčního činidla. Dále byly optimalizovány podmínky měření.

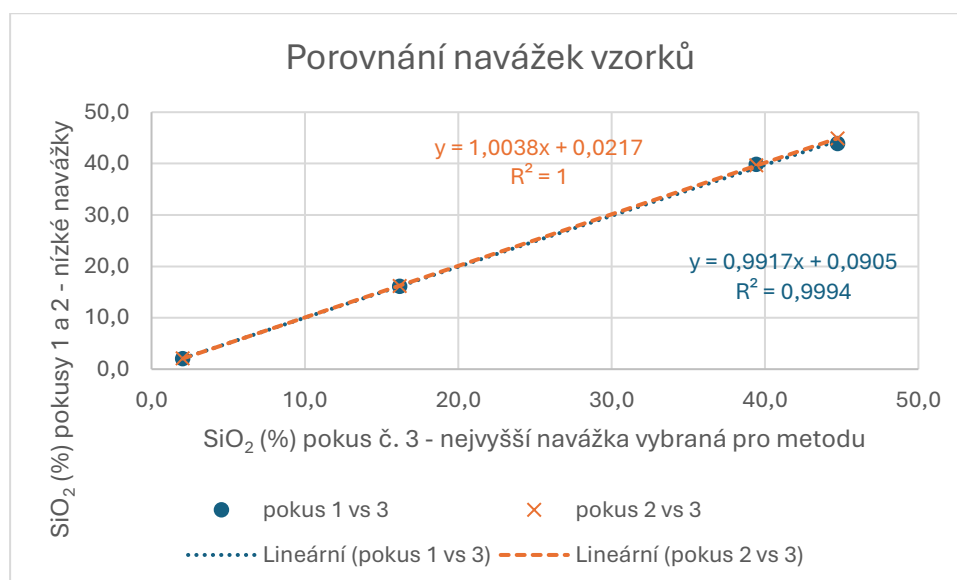
3.2.1 Optimalizace navážky

Pro pevné vzorky byly porovnány navážky 0,05 g, 0,15 g a 0,25 g. Pro kapalně vzorky byly porovnány navážky 0,1 g, 0,3 g a 0,5 g. Z tabulky 3 a grafu 1 je možné usoudit, že použitá navážka nemá vliv na výsledek. Z těchto dat tedy usuzujeme, že pro pevné vzorky lze použít navážku od 0,05 g do 0,25 g a pro kapalně vzorky lze použít navážku od 0,1 g do 0,5 g. Z důvodu zachování přijatelné meze stanovitelnosti a kvůli širokému rozsahu koncentrací Si v testovaných vzorcích byla jako základní navážka zvolena pro oba typy vzorků ta nejvyšší, tj. 0,25 g pro pevné a 0,5 g pro kapalně.

Tabulka 9. Navážky vzorků.

Pokus č.	1	2	3	1	2	3
Navážka (g)	0,05	0,15	0,25	0,05	0,15	0,25
Pevné	SiO ₂ (%)	SiO ₂ (%)	SiO ₂ (%)	Průměr	Průměr	Průměr
434a	43,9	45,0	45,2	43,9	44,9	44,7
434b	43,9	44,8	44,3			
435a	39,6	39,4	38,7	39,8	39,7	39,4
435b	40,1	39,9	40,2			
Navážka (g)	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5
Kapalné	SiO ₂ (%)	SiO ₂ (%)	SiO ₂ (%)	Průměr	Průměr	Průměr
436a	16,1	16,2	16,2	16,1	16,2	16,2
436b	16,1	16,2	16,2			
437a	2,07	2,09	2,04	2,1	2,1	2,0
437b	2,04	2,10	2,03			

Graf 1. Porovnání navážek vzorků.



3.2.2 Optimalizace teploty extrakce

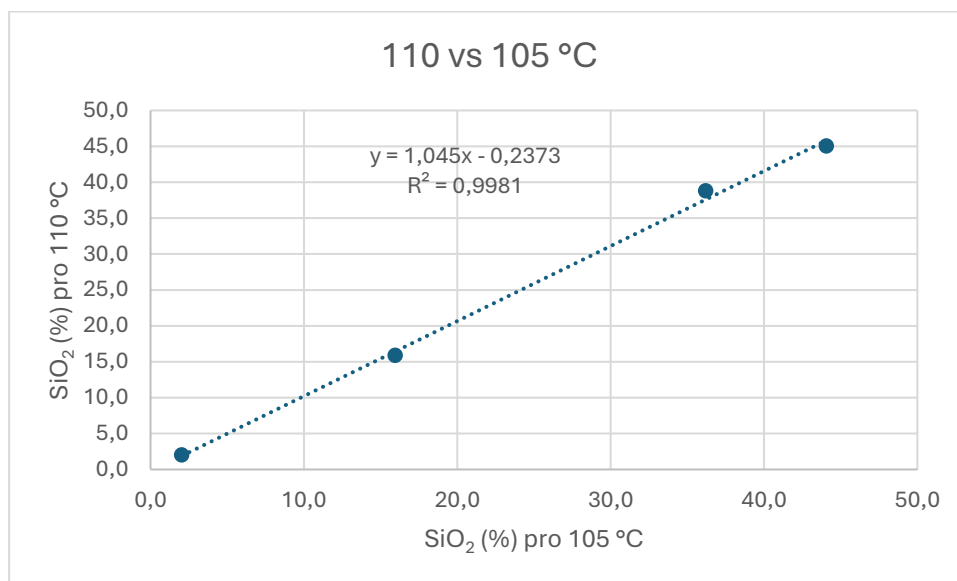
U některých vzorků může teplota ovlivnit extrahovatelnost křemíku tak, že se sodík snadněji naváže na aniont kyseliny křemičité a vytvoří její sodnou sůl, která je známá jako vodní sklo, které je dobře rozpustné ve vodě. Vzhledem k tomu, že teplota varu 1M NaOH by měla být

přibližně 100 °C tak, byly zvolené 2 teploty 105 °C a 110 °C, které byly nastavené na regulátoru mineralizačního zařízení. Vyšší teploty už nebyly testovány, protože se používají plastové mineralizační tuby, které jsou sice dimenzovány i na vyšší teploty, ale je zde riziko jejich poškození. Vyšší teploty navíc opotřebovávají rozkladné zařízení (hotblock). Jako dostačující a k instrumentaci šetrná byla vybrána teplota extrakce 105 °C. Oba pevné vzorky sice vykazaly při 110 °C vyšší výsledky (viz tabulka 4 a graf 2), což na jednu stranu odpovídá předpokladu, ale na stranu druhou nelze vyloučit instrumentální nejistotu jako zdroj této odchylky. Podrobnější prozkoumání fenoménu není možné, protože v setu 14 vzorků byly pevné pouze dva vzorky 434 a 435, přičemž vzorek 434 je čistá chemikálie, a pouze vzorek 435 je vzorkem reálným.

Tabulka 10. Porovnání teplot extrakce.

Teplota	110 °C	110 °C	105 °C	105 °C
	SiO ₂ (%)	Průměr	SiO ₂ (%)	Průměr
434a	45,4	45,0	44,4	44,1
434b	44,7		43,7	
435a	39,0	38,8	36,7	36,2
435b	38,6		35,7	
436a	15,8	15,9	15,9	16,0
436b	16,0		16,0	
437a	2,0	2,0	2,0	2,0
437b	2,1		2,0	

Graf 2. Porovnání teplot extrakce.



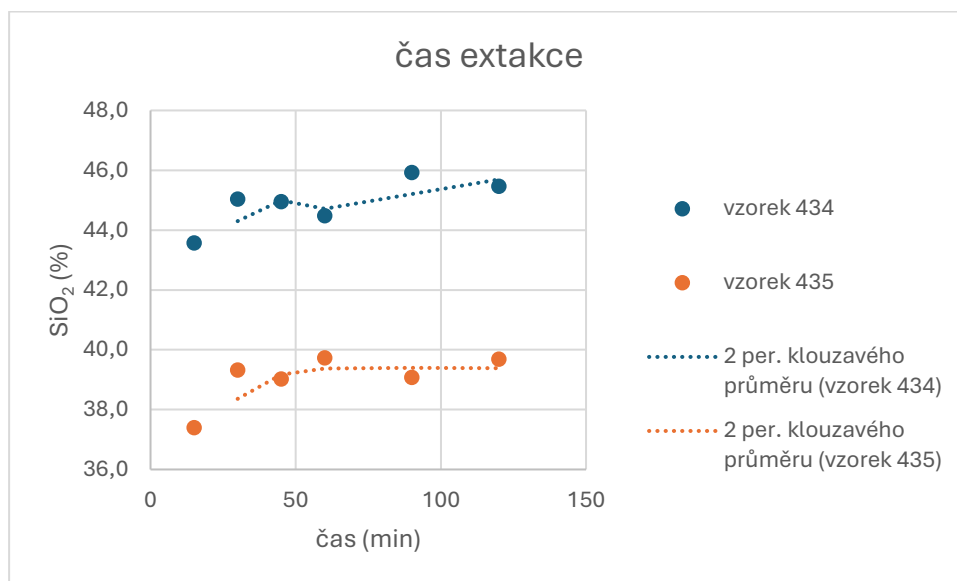
3.2.3 Optimalizace času extrakce

Extrakce byla provedena při 105 °C s navázkou 0,25 g pouze pro pevné vzorky 434 a 435. Z předběžných pokusů vyplývalo, že 10minutová extrakce je nedostatečná. Byly proto zvoleny časy 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min a 120 min, viz tabulka 5 a graf 3. Z výsledků vyplývá, že instrumentální nejistoty jsou poměrně velké, proto pro zvýraznění trendu byl v grafu použit klouzavý průměr. Jako dostačující doba pro extrakci křemíku byla zvolena doba extrakce 30 min.

Tabulka 11. Čas extrakce.

Čas (min.)	Vz. č. 434	Vz. č. 435
15	43,6	37,4
30	45,0	39,3
45	44,9	39,0
60	44,5	39,7
90	45,9	39,1
120	45,5	39,7

Graf 3. Čas extrakce.



3.2.4 Výběr extrakčního činidla

Jako základní extrakční činidlo byl zvolen extrakt v roztoku NaOH (2.1.3) tak, aby byl co nejpodobnější extrakci pomocí titrační metody s předpokladem, že dosažené výsledky budou co nejpodobnější výsledkům získaným titrační metodou. Tento předpoklad se podařilo částečně naplnit. U vzorků měřených titrační metodou s koncentrací vyšší, než mez stanovitelnosti, se dosahuje mírně nižších výsledků, než metodou ICP OES. Nicméně, to je pravděpodobně způsobeno vysokou nejistotou při odečtu bodu ekvivalence titrační metody.

Dále byla otestována extrakce pouze vodou, protože u vzorků 440 – Carbon Ca-Si a 459 – YaraVita Actilis došlo po přidání roztoku NaOH (2.1.3) do extrakční tuby ke vzniku sraženiny, kdy následně byla v těchto extraktech naměřena výrazně nižší koncentrace Si než ve vodných extraktech. U vzorku 459 je křemík ve formě cholinem stabilizované kyseliny orthokřemičité, což má umožnit udržení křemíku v rozpustné formě i při relativně nízkém pH, po přidání NaOH (2.1.3) k tomuto vzorku dojde k vyloučení křemíku z roztoku. Lze tedy dovozovat, že pro vzorky s organicky vázaným křemíkem, je možná jen vodná extrakce.

U vzorku 441 – Carbon Cu-Si sice byla naměřena vyšší koncentrace v extraktu pomocí NaOH než ve vodném extraktu, ale v obou případech byly výsledky výrazně nižší, než je deklarovaný obsah Si v hnojivu. Při vizuální kontrole tohoto vzorku bylo zjištěno, že se jedná o suspenzi,

což by naznačovalo, že vzorek je nestabilní a křemík se vysrážel. To bylo následně konzultováno s výrobcem, který potvrdil, že vzorek má být kapalina a nikoliv suspenze.

Závěrem z výše uvedených zjištění a pozorování je, že je vhodné zvláště u neznámých vzorků provést obě extrakce, jak NaOH, tak vodnou. Dále je vhodné u kapalných vzorků vizuálně zkontrolovat stav vzorku. Stabilita extraktů i naředěných extraktů pomocí amoniaku je minimálně měsíc, pokud jsou uchovány v temnu při laboratorní teplotě.

3.2.5 Optimalizace měření

Byly testovány různé způsoby přípravy kalibrační křivky, kdy matrice čistě vodné a v ředěném hydroxidu sodném neposkytovaly přijatelný koeficient determinace. Zvláště v koncentracích pod 0,5 mg/l Si se vyskytovaly velké odchylky. Tyto odchylky byly odstraněny výběrem matrice přibližně 0,25% NH₄OH s přídavkem NaCl tak, aby se modeloval obsah Na z extrakce pomocí NaOH. Aby bylo možné měřit vodné i NaOH extrakty pomocí jedné křivky, je nutné vodné extrakty naředit pomocí 0,25% NH₄OH s přídavkem NaCl.

Je nezbytné při přípravě křivky nepoužívat skleněné nádoby. To platí i pro použité chemikálie, kdy je třeba kupovat amoniak v plastových obalech a nikoliv skleněných. I použitá deionizovaná voda (2.1.1) obsahuje stopy křemíku, a to v koncentraci přibližně (5 – 10) µg/l Si. Kalibrační křivky jsou stabilní minimálně měsíc, pokud jsou uchovány v temnu při laboratorní teplotě, ale pokud je třeba provést velmi přesná měření, doporučuje se připravit čerstvou kalibrační křivku ze stejných chemikálií, které byly použity k extrakci.

Měření bylo provedeno na ICP OES s radiálním pohledem do plazmatu se standardním vnášecím systémem sestávajícím ze Scottovy zmlžovací komory a Cross flow nebulizéru. Měřicí podmínky jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 12. Podmínky měření.

Plasma power	1300	W
Coolant gas	14	l.min ⁻¹
Auxiliary gas	1	l.min ⁻¹
Add flow	0,2	l.min ⁻¹
Nebulizer gas	0,8	l.min ⁻¹
Přívod vzorku	2	ml.min ⁻¹
Vlnová délka	251,612	nm

Měření bylo provedeno i na dalších vlnových délkách, a to na 288,158 nm a 212,412 nm, které ale poskytly horší detekční limity než vybraná čára 251,612 nm.

3.3 Výsledky a validační parametry

3.3.1 Celkové výsledky

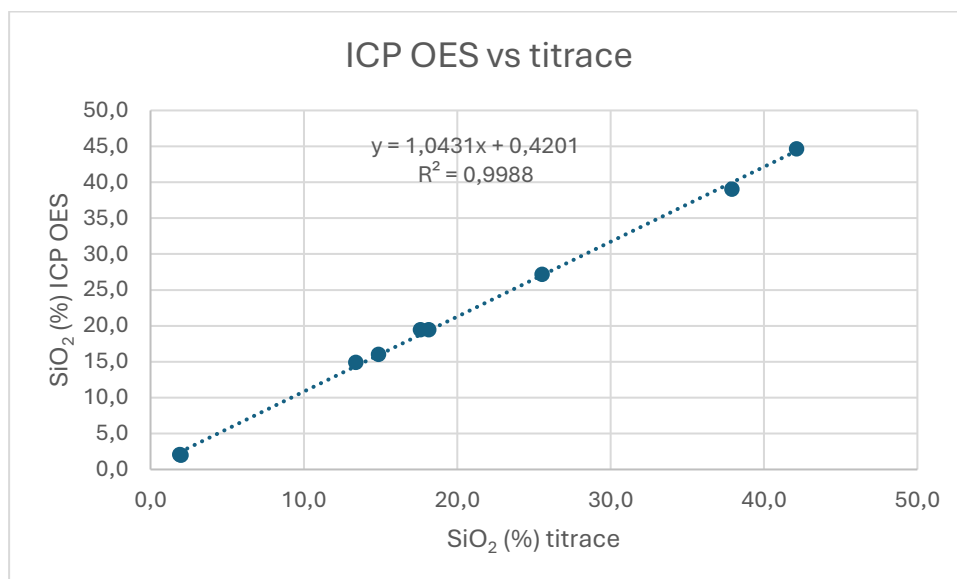
Všechny výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. Jedná se o průměrné hodnoty z paralelních stanovení.

Tabulka 13. Celkové výsledky.

Č. vzorku	Název vzorku	ICP OES NaOH	Titrace	ICP OES vodný výluh
		SiO ₂ %	SiO ₂ %	SiO ₂ %
434	Metasilikát sodný	44,7	42,1	45,1
435 (41/2024)	Compo turbo-kořeny	39,0	37,9	
436 (173/2023)	Carbon Si	16,0	14,9	
437 (442/2023)	Topsil	2,07	1,90	
438	CARBON Si	14,9	13,4	
439	CARBONBOR Si	0,79	15,8	0,78
440	Carbon Ca - Si	0,12	< 1,5	0,54
441	Carbon Cu - Si	0,14	< 1,5	0,04
442	NanoFYT Si	19,5	18,1	
443	Vodní sklo	27,2	25,5	
444 (372/2025)	GENAKTIS 1	1,98	1,99	
445	Controlphyt Si	19,4	17,6	
459	YaraVita ACTILIS	0,15	< 1,5	1,08
482	Astelis 1	1,82	< 1,5	1,78

Byly porovnány titrační metody a metody ICP OES viz graf 4. Z tohoto porovnání byly vyloučeny vzorky 440, 441, 459 a 482 kvůli měření pod mezí stanovitelnosti titrační metody a dále byl vyloučen vzorek 439 z důvodu interference titrační metody.

Graf 4. Porovnání metody ICP OES a metody titrační.



Dvouvýběrovým párovým t-testem se zamítá hypotéza o shodě středních hodnot na hladině $\alpha = 1\%$. Metoda ICP OES poskytuje výsledky průměrně o 6,7 rel.% vyšší než titrační metoda. Nižší výsledky dosažené titrační metodou jsou pravděpodobně způsobeny chemicko-analytickými vlastnostmi titrační metody, tj. velmi obtížným určením bodu ekvivalence, zvláště pak v maticích, kdy je původní vzorek barevný nebo dojde k zakalení vzorku během titrace. Vzhledem k nízké citlivosti titrační metody, jejím poměrně vysokým nejistotám daným obtížně viditelným barevným přechodem a její náchylnosti k interferencím lze tuto metodu považovat za méně spolehlivou, než je metoda ICP OES. Celkově lze považovat výsledek porovnání metod za uspokojivý, neboť korelace výsledků oběma metodami je vynikající, lze tedy dovodit, že bod ekvivalence byl sice určován konzistentně, ale se systematickou odchylkou.

3.3.2 Správnost

Správnost metody ICP OES byla ověřena přidavkem známého množství křemíku do extrakční tuby nebo do baňky během finálního ředění vzorku a byla vypočítána výtěžnost viz tabulky 8 a 9. Výsledky výtěžnosti se pohybují v intervalu (90 – 110) %, správnost metody lze považovat za prokázanou.

Tabulka 14. Výtěžnost v extraktu NaOH.

NaOH	Výtěžnost
Číslo vzorku	%
434	98,3
435	95,4
436	96,7
437	105,5
439	99,6
441	94,8
442	97,7
444	99,3
445	98,0
482	99,5

Tabulka 15. Výtěžnost ve vodném výluhu.

H ₂ O	Výtěžnost
číslo vzorku	%
434	98,0
439	98,1
440	94,1
441	98,3
459	95,0

3.3.3 Linearita

Pomocí modulu „Validce analytických metod“, který je součástí software Labsystém 7, byla testována linearita regresního modelu se závěrem „Linearita prokázána“.

3.3.4 Mez stanovitelnosti

Pomocí modulu „Validce analytických metod“, který je součástí software Labsystém 7, byla vypočtena mez stanovitelnosti z kontinuálního měření 10 slepých pokusů.

Varianta metody s extrakcí NaOH poskytuje mez detekce LOD = 0,0007898 mg/l a mez stanovitelnosti LOQ = 0,002633 mg/l, což odpovídá při použití 0,5 g vzorku do 50ml tuby a následném 200 × naředění LOQ = 52,7 mg/kg Si.

Varianta metody s vodnou extrakcí poskytuje mez detekce $LOD = 0,002325 \text{ mg/l}$ a mez stanovitelnosti $LOQ = 0,007749 \text{ mg/l}$, což odpovídá při použití 0,5 g vzorku do 50ml tuby a následném $200\times$ naředění $LOQ = 155 \text{ mg/kg Si}$.

Jako praktická hodnota meze stanovitelnosti bude pro obě extrakce použita hodnota $LOQ = 400 \text{ mg/kg Si}$ nebo $LOQ = 0,1 \% \text{ SiO}_2$.

3.3.5 Opakovatelnost

Pomocí modulu „Validce analytických metod“, který je součástí software Labsystém 7, byla vypočtena opakovatelnost z paralelních měření.

Varianta metody s extrakcí NaOH poskytuje vypočtenou opakovatelnost jako 1,24 %. Jako praktická hodnota byla zvolena opakovatelnost 7 %.

Varianta metody s extrakcí vodou poskytuje vypočtenou opakovatelnost jako 1,72 %. Jako praktická hodnota byla zvolena opakovatelnost 7 %. Pro tento výpočet bylo použito pouze 9 výsledků v důsledku nedostatečného počtu vhodných vzorků.

3.3.6 Nejistota

Pomocí modulu „Validce analytických metod“, který je součástí software Labsystém 7, byla vypočtena nejistota z paralelních měření.

Pro extrakci pomocí NaOH byla vypočítána relativní rozšířená nejistota jako 2,48 %. Jako praktická hodnota byla zvolena nejistota 10 %.

Pro extrakci pomocí vody byla vypočítána relativní rozšířená nejistota jako 2,48 %. Jako praktická hodnota byla zvolena nejistota 10 %. Pro tento výpočet bylo použito pouze 9 výsledků v důsledku nedostatečného počtu vhodných vzorků.

3.3.7 Srovnání metod

Titrační metoda je nenáročná na instrumentaci, pracuje s nejzákladnějšími chemikáliemi a je dostatečně jednoduchá. Umožňuje stanovení křemíku v pevných i kapalných vzorcích. Bohužel má nedostačující meze stanovitelnosti a projevují se u ní významné interference. Metoda spektrofotometrická popsaná v ISO/TC 134 je určena pouze pro pevné vzorky. Bohužel naprostá většina hnojiv obsahujících křemík jsou kapalná hnojiva. Vzorky použité pro tuto studii zhruba reflektují stav na trhu s hnojivy a výsledkem je, že více než 80 % vzorků je kapalných. ISO metoda tedy ani nebyla v této práci testována. Metoda ICP OES má dostačující meze stanovitelnosti, je robustní a je jednoduchá, je ale náročná na instrumentaci, umožňuje však stanovit křemík v kapalných i pevných vzorcích hnojiv.

4 Závěr

Byla vyvinuta rychlá, jednoduchá a robustní metoda stanovení křemíku v pevných i kapalných hnojivech pomocí ICP OES. Tato nová metoda stanovení křemíku pomocí ICP OES vykazuje dobrou shodu s výsledky dosaženými titrační metodou. Navíc poskytuje nižší detekční limity a výrazně vyšší odolnost proti rušivým vlivům, což nabývá na důležitosti v situaci, kdy se na trhu objevují nové produkty s komplexním složením. Metoda ICP OES poskytuje výsledky dostačující pro potřeby úřední kontroly.

5 Literatura

1. Žalmanová, A., Varmužová, R., Zbiral, J., Rypl, V., Petrová, J., Niedobová, E., Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – Zkoušení hnojiv – 2. vydání – Brno 2015
2. ISO/TC 134 Fertilizers and soil conditioners — Determination of Monosilicic Acid Concentrations in Nonliquid Fertilizer Materials, 2019

Bulletin Národní referenční laboratoře XXX, 2026/1

Ročník: XXX, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2026

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 51

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196