

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2004

Ročník VIII, číslo 2/2004

Brno 2004

Obsah

1.	Zabezpečení jakosti výsledků zkoušek	1
	(Vladimíra Vilamová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Opava)	
2.	Porovnání výsledků stanovení glukosinolátů v řepce olejce metodou HPLC a metodou GC	27
	(Radvana Šulová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno)	
3.	Stanovení celkového dusíku v lesních půdách metodou blízké infračervené spektroskopie	49
	(David Čížmár, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno)	

Za obsah příspěvků odpovídá autor.

Plné znění všech bulletinů Národní referenční laboratoře (včetně barevných grafů a obrázků) můžete najít na našich webových stránkách v části věnované Národní referenční laboratoři (<http://www.ukzuz.cz/NRL/Publikace>).

Bulletin laboratorního odboru VIII 2004/2

Ročník: VIII, č. 2
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2004
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce: Ing. Eliška Matějová
Náklad: 130 výtisků
Počet stran: 54
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou

ISSN 1212-5466

Zabezpečení jakosti výsledků zkoušek

Vladimíra Vilamová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř – Regionální oddělení Opava (NRL-RO), Jaselská 16,
e-mail: vladimira.vilamova@ukzuz.cz

1. Úvod

Prověření systému jakosti zkušební laboratoře akreditované podle mezinárodní normy ČSN EN ISO/IEC 17025 zahrnuje všechny požadavky, které musí zkušební laboratoř splnit, aby mohla prokázat, že je odborně způsobilá a že je schopná produkovat odborně platné výsledky.

Cílem zkušební laboratoře je produkovat správné a přesné výsledky v co možná nejkratších termínech za dodržení všech požadavků této normy. Výsledky zkoušek prováděných v NRL RO Opava slouží jako podklady pro správné rozhodnutí, pro další činnosti vyplývající ze zákonů a pro potřeby technických odborů. Je proto důležité, aby chybné výsledky byly s velkou jistotou vyloučeny.

Tato související dokumentace k Příručce jakosti (SDPJ) zpracovává vertikálním způsobem téma „Zajišťování jakosti výsledků zkoušek a kalibrací – ČSN EN ISO/IEC 17025, kap. 5.9“ pro potřeby pracovníků zkušební laboratoře, vysvětluje pojmy, postupy a výpočty používané v laboratoři.

V ČSN EN ISO/IEC 17025, kap. 5.9 - Zajišťování jakosti výsledků zkoušek a kalibrací je uvedeno:

„Laboratoř musí mít postupy řízení jakosti pro monitorování platnosti provedených zkoušek a kalibrací. Výstupní údaje musí být zaznamenávány způsobem, který zajišťuje rozpoznatelnost trendů, a kde je to možné, musí být pro přezkoumávání výsledků použity statistické metody. Toto monitorování musí být plánováno a přezkoumáváno a může zahrnovat, ale nesmí být omezeno na:

- pravidelné používání certifikovaných referenčních materiálů a/nebo interní řízení jakosti využívající sekundární referenční materiály**
- účast v programech mezilaboratorního porovnávání nebo zkoušení způsobilosti**
- opakování zkoušek nebo kalibrací při použití stejných nebo jiných metod**
- opakované zkoušení nebo rekalibraci zkoušených položek**
- korelaci výsledků pro různé znaky určité položky“**

Každý výsledek jakéhokoli měření, který zkušební laboratoř vyprodukuje, je zatížen chybami. Tyto chyby lze rozdělit na primární a sekundární.

Primární chyby vznikají při vlastním měření a lze je dále rozdělit na náhodné (statistické), soustavné (systematické) a hrubé.

Sekundární chyby vznikají následně při matematicko-statistickém zpracování experimentálních výsledků a zařazujeme sem chyby matematického modelu, numerické metody, chyby zaokrouhlovací a může se vyskytnout i chyba hrubá.

Náhodné chyby se vyskytují zcela nepravidelně, vznikají působením velkého počtu nepravidelných a těžko ovlivnitelných vlivů, které se sčítají nebo kompenzují, takže jejich konečná hodnota je většinou malá a obvykle nezkresluje výsledek směrem k vyšším anebo nižším hodnotám. Tyto chyby nikdy nelze zcela odstranit. Soustavné chyby mají stálý předvídatelný charakter, zkreslují výsledek vždy v určitém směru a mají vždy konkrétní příčinu, např. nesprávně měřící, opotřebovaný nebo špatně kalibrovaný přístroj, nevhodně zvolenou měřící techniku apod. Může se jednat o chyby aditivní (výsledky jsou zkresleny o určitou hodnotu) nebo multiplikativní (výsledky jsou zkresleny úměrně velikosti údaje). Hrubé chyby vznikají většinou jednorázově v důsledku výjimečné příčiny v procesu měření nebo zpracování dat, malé pečlivosti nebo nedodržením předepsaných podmínek experimentu.

Chyby matematického modelu se projevují při interpretaci experimentálních dat nevhodným matematickým modelem (např. proložení parabolické závislosti přímkou) apod. Chyby numerické metody jsou důsledkem použití přibližné numerické metody namísto přesného zpracování. Nevyhneme se jim, jestliže přesné řešení leží pouze v limitě. Zaokrouhlovací chyby vznikají při výpočtech v důsledku zaokrouhlování na určitý počet desetinných míst. Obvykle jsou významné při postupech s velkým množstvím na sebe navazujících kroků. Nepromyšlené zaokrouhlování se výrazně projeví na výsledku i v případě odečítání velikostí srovnatelných čísel, což bývá časté při statistickém zpracování dat.

Obecně lze říct, že chyby ovlivňují správnost a přesnost výsledku.

Správnost je veličina v jednom experimentu statisticky nepostižitelná a lze ji posoudit pouze srovnáním s výsledky jiné spolehlivé metody nebo srovnáním se skutečnou hodnotou, pokud je známá.

Přesnost je veličina statisticky postižitelná opakováním pokusu za stejných podmínek. Jestliže při tom budeme získávat výsledky pouze málo odlišné, označíme takové měření za přesnější v porovnání s měřením, při kterém se výsledky značně liší.

Výsledky, které jsou přesné a správné současně, označujeme jako spolehlivé.

2. Operativní řízení jakosti

Operativní řízení jakosti (QC) je nedílnou součástí zabezpečování jakosti výsledků zkoušek. Dělí se na vnitřní řízení jakosti (IQC) a externí řízení jakosti (EQC).

2.1 Vnitřní řízení jakosti

Vnitřní řízení jakosti je považováno za souhrn postupů a činností prováděných laboratorním personálem pro nepřetržité sledování jednotlivých operací a výsledků měření za účelem rozhodování, zda výsledky jsou dostatečně spolehlivé a věrohodné pro expedici z laboratoře. Je to soubor opatření, které musí analytik splnit a tím se ujistit, že data produkovaná laboratoří splňují požadavky pro zamýšlené použití.

V NRL RO Opava zahrnuje IQC tyto kroky:

- kontrola opakovatelnosti analytických výsledků
- kontrola analýzou referenčních materiálů
- kontrola analýzou duplicitních vzorků
- navazování interního referenčního materiálu na certifikovaný referenční materiál

2.1.1 Kontrola opakovatelnosti analytických výsledků

Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti (podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týž pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí).

V případě dvou paralelních stanovení se přesnost výsledků určuje pomocí tzv. dovolené difference paralelních stanovení, tj. maximální rozpětí, které charakterizuje přesnost výsledků a dovoluje toto rozpětí vysvětlit přítomností náhodných chyb.

2.1.1.1 Výpočet hodnot opakovatelnosti

Pro určení dovolené difference se vychází z vypočtené směrodatné odchylky, kterou získáme z výsledků paralelních stanovení nebo z vícenásobného měření jednoho vzorku:

1) z paralelních stanovení (pro různé vzorky, pro různé koncentrační hladiny) $x_1, x_2, \dots$;
směrodatná odchylka s_x :

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m R_j^2}{2m}} \quad (1)$$

počet vzorků: **m**

počet měření: **n = 2m**

rozdíl dvou paralelních stanovení: **R_j**

$$R_j = (x_{j1} - x_{j2})$$

2) z vícenásobných měření jednoho vzorku:

směrodatná odchylka **s_x** (charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot **x_i** okolo průměru **x**):

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n_A} (x - x_i)^2} \quad (2)$$

počet stupňů volnosti: **n** (zde **n = n_A - 1**)

počet měření: **n_A**

aritmetický průměr: **x = 1/n_A * ∑_{j=1}ⁿ x_j**

Dovolená difference **R_{max}** je pak vyjádřena pro zvolenou hladinu významnosti **a** a koeficient spolehlivosti **P = (1-a)**:

$$R_{\max} = q \cdot s_x \quad (3)$$

směrodatná odchylka: **s_x**

tabelovaná hodnota koeficientu (viz. tabulka 1): **q**

Tabulka č. 1: Hodnoty koeficientů pro výpočet dovolené difference různého počtu paralelních stanovení

n	P, q					
	pro opakovaná měření			pro paralelní měření		
	0,90	0,95	0,99	0,90	0,95	0,99
2	2,33	2,77	3,64	2,06	2,46	3,23
3	2,90	3,31	4,12	1,71	1,96	2,43
4	3,24	3,63	4,40	1,57	1,76	2,14
5	3,48	3,86	4,60	1,50	1,66	1,98

Ukazatel opakovatelnosti je pak definován rovnicí (3), přičemž pro 95%-ní interval spolehlivosti dvou paralelních stanovení např. platí: **R_{max} = 2,77 · s_x**

2.1.1.2 Postup kontroly opakovatelnosti

Každá zkouška se provádí vždy ve dvou paralelních stanoveních ($n_A = 2$ (x_1, x_2)). Rozdíl obou výsledků, tj. jejich rozpětí R , se porovnává s dovolenou diferencí opakovatelnosti $R_{\max}$, která je pro zkoušky krmiv dána Vyhláškou 124/2001 Sb. a pro ostatní zkoušky statisticky spočítána z naměřených hodnot výše uvedeným postupem (využití programu EffiValidation). Tyto vypočtené nebo tabulkové hodnoty opakovatelnosti jsou uloženy v laboratorním informačním a řídicím systému LAB, který automaticky provede srovnání rozdílu paralelních stanovení s touto hodnotou, popř. upozorní na jejich překročení.

Hodnoty opakovatelnosti jsou vyjádřeny absolutně nebo relativně v %.

a) absolutní vyjádření R_a :

Vypočte se rozdíl paralelních stanovení:

$$R = (x_1 - x_2) = R_a \quad (4)$$

Výsledek R_a se porovnává s hodnotou opakovatelnosti.

b) relativní vyjádření $R_e(\%)$:

Vypočte se rozdíl paralelních stanovení R a jejich průměr x

$$R = (x_1 - x_2) \quad (5)$$

$$x = (x_1 + x_2) / 2 \quad (6)$$

$$R_e(\%) = R * 100 / x \quad (7)$$

Výsledek $R_e(\%)$ se porovnává s hodnotou opakovatelnosti.

Při kontrole opakovatelnosti mohou nastat tyto možnosti:

1) Pokud je splněna podmínka - $R_e, R_a \leq R_{\max}$

vypočte se průměr obou paralelních stanovení a uvede se jako výsledek analýzy.

2) Je-li - $R_e, R_a > R_{\max}$

provedou se další dvě opakovaná stanovení (x_3, x_4) a stejným postupem se zjistí, zda vyhovují podmínce opakovatelnosti. Pak je nutno určit, jestli v souboru 4 (a více) získaných výsledků není "odlehlý" výsledek (indikuje přítomnost hrubé chyby v daném souboru výsledků). Ověření se provádí pomocí statistických testů (Grubbsův test T, Deanův – Dixonův test Q). Tyto testy jsou použitelné pro 4 a více platných měření. Proveďte se pořádková statistika souboru výsledků, tzn. seřadí se podle hodnot od nejnižší (x_1) po nejvyšší (x_n).

Grubbsův test T testuje odlehlost krajních hodnot od průměru (míra rozptýlení) a Deanův – Dixonův test Q testuje odlehlost krajních hodnot od sousedních (rozpětí). Vypočtené hodnoty T_1 a T_n , Q_1 a Q_n se porovnají s kritickými tabelovanými hodnotami T_α a Q_α . Software pro

výpočet odlehlých bodů Grubbsovým a Deanovým – Dixonovým testem je součástí laboratorního informačního a řídicího programu LAB, který automaticky dokáže odlehlé body identifikovat.

Tyto testy se využívají i v případě, kdy je zkouška opakovaná dalšími dvěmi paralelními stanoveními, provedenými z důvodu ověření výsledku (výsledek neodpovídá deklarovaným nebo normovaným hodnotám, hodnoty analýz referenčního vzorku jsou mimo regulační meze apod.).

3) Jestliže při několika analýzách v kratším časovém úseku jsou rozdíly paralelních stanovení větší než dovolená hodnota opakovatelnosti, je třeba přezkoumat používaný analytický postup, odměrné sklo, váhy, používaný přístroj, kalibrační křivku, pomocné roztoky apod.

Rozpětí $R = x_1 - x_2$ je třeba chápat neabsolutně a všimnout si i jeho znaménka. Indexy 1, 2 značí pořadí, ve kterém byly výsledky získány. Vychází-li R soustavně větší nebo soustavně menší než nula, je účelné zjistit a odstranit příčinu této podezřelé pravidelnosti.

2.1.2 Kontrola analýzou referenčního materiálu

Zařazováním referenčních vzorků do každé analytické várky je sledována správnost a přesnost analytické metody. Podmínky stanovení jsou v rámci analytické série považovány za konstantní (použitá činidla a chemikálie, přístroje a zařízení a jejich nastavení, personál a laboratorní prostředí se za ideálních podmínek během analýzy série nemění). Tyto referenční vzorky jsou vyhodnocovány pomocí regulačních diagramů, které signalizují přítomnost nenáhodných chyb. Jejich vznik je datován do dvacátých let minulého století a je spojen se jménem amerického statistika Shewharta – Shewhartovy diagramy. Vynesením hodnot sledovaných parametrů v závislosti na čase či pořadí analýz lze sledovat stabilitu sledovaného systému a činit úsudky o povaze variability získaných výsledků. Regulační diagram je grafem dlouhodobého časového průběhu některé metrologické charakteristiky měření (průměru, rozpětí aj.) a slouží jako diagnostický nástroj k posouzení, zda se sledovaná veličina chová tak, jak očekáváme a nedošlo-li k nečekané změně.

Konstrukce Shewhartových diagramů spočívá v zakreslení centrální linie (CL), která značí standardní, očekávanou cílovou hodnotu sledovaného parametru a tří dvojic s ní rovnoběžných mezí nad i pod centrální linií. Nazýváme je obvykle horní a dolní pomocná mez (HPM, DPM), horní a dolní varovná mez (HVM, DVM) a horní a dolní regulační mez (HRM, DRM).

Regulační meze leží postupně ve vzdálenosti:

HPM, DPM: $CL \pm 1s$

HVM, DVM: $CL \pm 2s$

HRM, DRM: $CL \pm 3s$

kde s je směrodatná odchylka opakovaných měření (viz. rovnice č. 2).

V případě normálního rozdělení výsledků ohraničují varovné meze pásmo, ve kterém by mělo ležet 95% výsledků všech měření daného analytu v příslušném typu vzorku. Do pásma daného regulačními mezemi by pak mělo padnout 99,7% všech výsledků v dané oblasti.

2.1.2.1 Typy regulačních diagramů a způsoby jejich vedení

Regulační diagramy patří k základním nástrojům regulace jakosti výsledků zkoušek v analytické laboratoři. Lze je vést několika způsoby a pro různé typy referenčních materiálů. Laboratorní informační a řídicí systém LAB, používaný v NRL RO Opava, umožňuje jejich vedení různými způsoby, provede jejich automatické vyhodnocení a také statistické zpracování použitých hodnot, které určí, zda data splňují základní předpoklady (normalita, nezávislost, nepřítomnost vybočujících měření).

2.1.2.1.1 Analýza vnitrolaboratorního referenčního materiálu – VRM

Tímto postupem se kontroluje pouze přesnost metody. Pro tyto účely je možno použít libovolný materiál, který musí splňovat tyto základní podmínky:

- musí být dostatečně homogenní
- musí být stabilní
- musí ho být dostatečné množství
- matricí a fyzikálními vlastnostmi se musí co nejvíce podobat vzorkům zpracovávaným v laboratoři

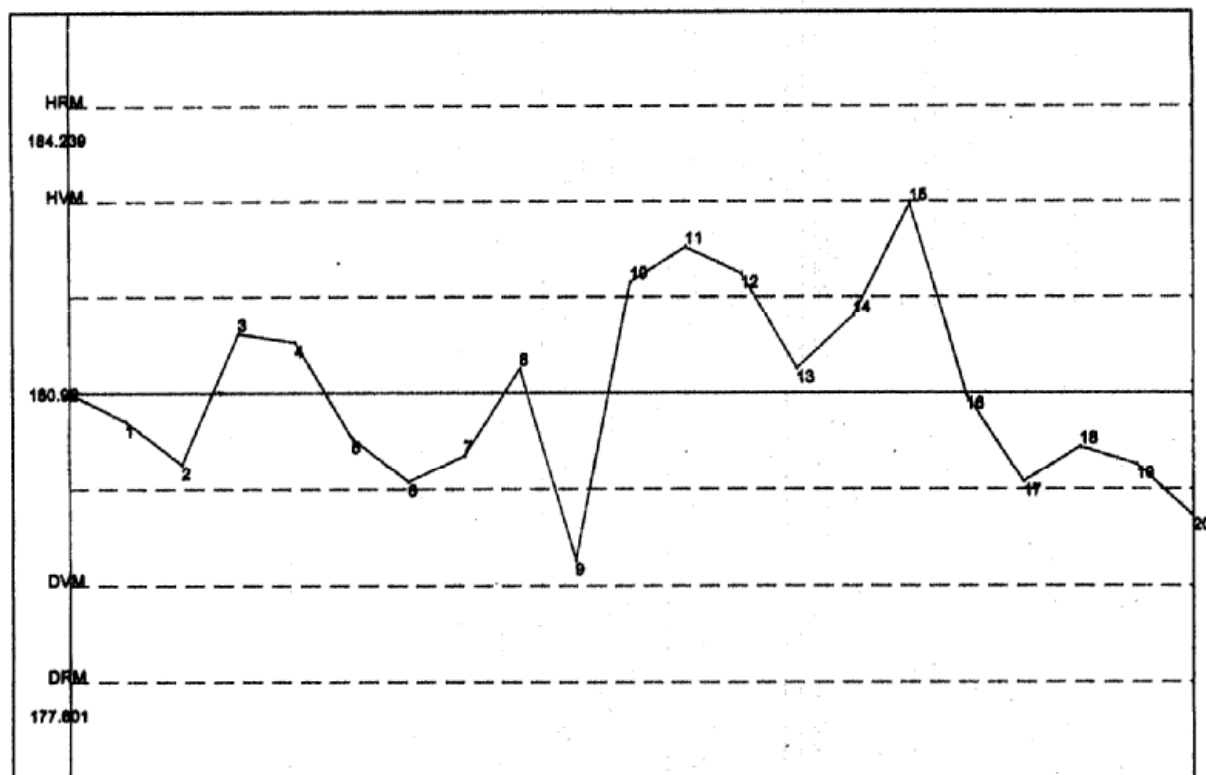
V počátečním období, kdy lze metodu považovat za stabilní (prověřením analýzou interního referenčního materiálu nebo certifikovaného referenčního materiálu) se s každou analytickou várkou provede zároveň několik analýz vlastního VRM, které budou sloužit jako výchozí množina hodnot pro budoucí analýzy. Při dalším zařazování VRM do každé analytické várky vzorků se tato úvodní série výsledků průběžně rozšiřuje později získanými daty za současného přepočítávání regulačních mezí a statistického zpracování dat. Takto získané regulační diagramy jsou vyhodnocovány podle pravidel, uvedených v kapitole 2.1.2.2.

Příklad: Regulační diagram pro vnitrolaboratorní referenční materiál (VRM K124/03) – stanovení dusíkatých látek v krmivech destilační metodou podle Kjeldahla

Tabulka č. 2: Hodnoty regulačního diagramu pro VRM K124/03 – stanovení N.L. v krmivech destilační metodou podle Kjeldahla

Číslo měření	Naměřená hodnota (g/kg)	Číslo měření	Naměřená hodnota (g/kg)
1	180,6	11	182,6
2	180,1	12	182,3
3	181,6	13	181,2
4	181,5	14	181,8
5	180,4	15	183,1
6	179,9	16	180,9
7	180,2	17	179,9
8	181,2	18	180,3
9	179,0	19	180,1
10	182,2	20	179,5

Obrázek č. 1: Regulační diagram VRM K124/03 – stanovení dusíkatých látek v krmivech destilační metodou podle Kjeldahla



Parametry regulačního diagramu: Průměr: 180,92

HRM: 184,239

DRM: 177,601

HVM: 183,133

DVM: 178,707

Hodnoty statistického zpracování dat regulačního diagramu:

Počet hodnot: 20

Průměr: 180,92

SD: 1,10625

RSD: 0,6114591 %

Medián: 180,75

SD med.: 0,3571413

Špičatost: 2,1835

Šikmost: 0,2836238

Shapirův - Wilkův test : normální rozdělení

Test.krit.: 0,0058772

Tab.hodn. : 0,905

Normalita (šikmost - špičatost): normální rozdělení

Test.krit.: 2,64493

Tab.hodn.: 5,99

Grubbsův test: OK

Dean-Dixonův test : OK

Autokorelace : nezávislost potvrzena

Test.krit.: 2,02676

Tab.hodn.: 2,079

Test vnitřních hradeb : OK

2.1.2.1.2 Analýza interního referenčního materiálu – IRM

Pro tyto účely je používán referenční materiál, který má známou a statisticky podloženou referenční hodnotu a je jimi sledována jak správnost, tak přesnost používané metody. V laboratoři se jedná o vzorky, které byly získány nebo připraveny následujícími způsoby:

- byly analyzovány v rámci mezilaboratorních porovnávacích zkoušek organizovaných NRL OKP Brno

- vlastní referenční materiál (stabilní, homogenní, matricí podobný analyzovaným vzorkům, dostupný v dostatečném množství) navázaný na certifikovaný referenční materiál (viz. dále)
- vlastní referenční materiál připravený uměle (z analytů o známé koncentraci)
- vlastní referenční materiál obohacený standardním přídatkem

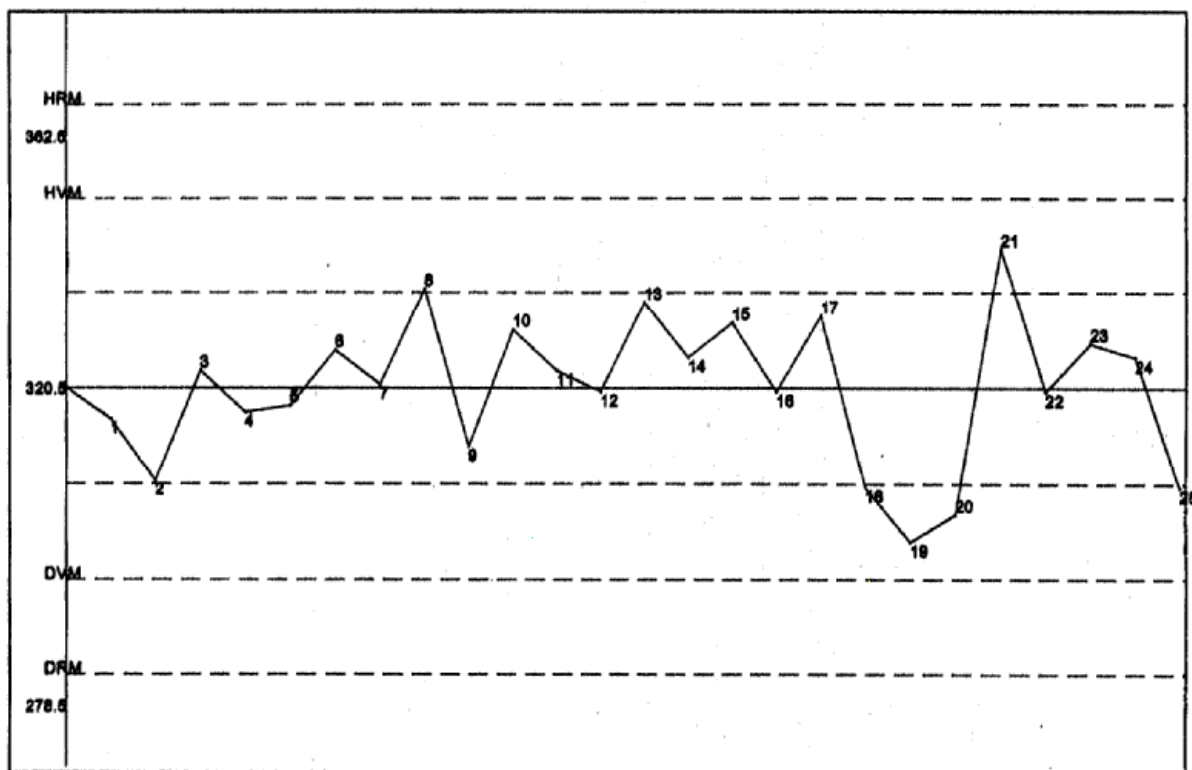
Vzorky, které byly analyzovány v rámci MPZ ÚKZÚZ Brno mají výsledky statisticky zpracované a publikované. Zpracování jejich výsledků se skládá ze dvou částí. V první části je vypočten medián a vyloučeny odlehlé hodnoty, ve druhé části je vypočítáno Z-score (rozdíl mezi naměřenou hodnotou a hodnotou aritmetického průměru dělený směrodatnou odchylkou vypočtenou po vyloučení odlehlých hodnot), které je vyjádřeno v číselné i grafické podobě. Medián a směrodatná odchylka se použijí pro zadání centrální linie a regulačních mezí regulačního diagramu. Takto získané regulační diagramy jsou vyhodnocovány podle pravidel, uvedených v kapitole 2.1.2.2.

Příklad: Regulační diagram interního referenčního materiálu o známé referenční hodnotě – stanovení draslíku v půdě ve výluhu Mehlich III metodou AES.

Tabulka č. 3: Hodnoty regulačního diagramu pro IRM 58 (KT 5617) – stanovení draslíku v půdách ve výluhu Mehlich III metodou AES

Číslo měření	Naměřená hodnota (mg/kg)	Číslo měření	Naměřená hodnota (mg/kg)
1	316	14	325
2	307	15	330
3	323	16	320
4	317	17	331
5	318	18	306
6	326	19	298
7	321	20	302
8	335	21	341
9	312	22	320
10	329	23	327
11	323	24	325
12	320	25	306
13	333		

Obrázek č. 2: Regulační diagram IRM 58 (KT 5617) - stanovení K v půdách ve výluhu Mehlich III metodou AES



Parametry regulačního diagramu: Referenční hodnota (z MPZ): 320,5

Směrodatná odchylka (z MPZ): 14,0

HRM: 362,5

DRM: 278,5

HVM: 348,5

DVM: 292,5

Hodnoty statistického zpracování dat regulačního diagramu:

Počet hodnot: 25

Průměr: 320,44

SD: 10,7008

RSD: 3,3394 %

Medián: 321

SD med.: 2,04082

Špičatost: 2,55827

Šikmost: -0,334869

Shapirův-Wilkův test : normální rozdělení

Test.krit.: 0,0006678

Tab.hodn.: 0,918

Normalita (šikmost-špičatost) : normální rozdělení

Test.krit.:3,63264

Tab.hodn.:5,99

Grubbsův test : OK

Dean-Dixonův test : OK

Autokorelace : nezávislost potvrzena

Test.krit.: 0,4007361

Tab.hodn.: 2,055

Test vnitřních hradeb : OK

2.1.2.2 Vyhodnocování regulačních diagramů

Shewhartovy regulační diagramy se hodnotí podle ČSN ISO 8258.

Opatření k regulaci systému se provedou, jestliže je odhaleno některé z následujících pravidel:

- jedna a více hodnot leží vně regulačních mezí
- šest bodů za sebou je plynule stoupajících nebo klesajících
- dva ze tří bodů v řadě za sebou leží vně varovných mezí ($\pm 2s$) na jedné straně diagramu
- patnáct bodů za sebou leží mezi pomocnými mezemi (uvnitř intervalu $\pm 1s$)
- posloupnost devíti bodů leží na jedné straně od centrální linie
- čtrnáct bodů za sebou pravidelně kolísá nahoru a dolů
- čtyři z pěti bodů za sebou leží za pomocnou mezí ($\pm 1s$) na jedné straně diagramu
- osm bodů za sebou leží za pomocnými mezemi ($\pm 1s$) po obou stranách diagramu
- cyklický či jiný nenáhodný vzhled vynášených dat.

Při zjištění nenáhodné složky v datech, indikované porušením některého z těchto pravidel, je systém označen za statisticky nestabilní a na takto získaná data se nelze dostatečně spolehnout. Je třeba neprodleně provést hlubší analýzu všech možných příčin a pozastavit produkci analytických dat směrem ven až do doby, než bude obnoven stav statistické regulace. V případě, že některý výsledek analýzy VRM, IRM nebo CRM překročí regulační meze, nelze považovat výsledky rozborů získané v období mezi analýzou tohoto kontrolního vzorku a nejbližšího vyhovujícího rozboru kontrolního vzorku za spolehlivé a příslušné vzorky je nutno po opětovném obnovení stavu statistické regulace znovu analyzovat.

Regulační diagramy jsou vedeny v systému LAB automaticky, pokud je zvolený kontrolní vzorek zařazen přímo do várky vzorků, se kterými byl analyzován. Zařazování

kontrolního vzorku se provádí u každého stanovení, pro které existuje referenční vzorek. Při zápisu hodnot výsledku měření vzorků analytické várky se nejdříve provede zápis hodnoty referenčního vzorku, která je zaznamenána do příslušného regulačního diagramu. Pokud výsledky referenčních vzorků leží v intervalu vymezeném určenými pracovními mezemi, potom lze předpokládat, že data získaná při vyšetření zkušebních vzorků v dané analytické várce jsou spolehlivá a do LABu se запиší hodnoty výsledků celé várky. V opačném případě postupuje pracovník podle pokynů pro vyhodnocování regulačních diagramů.

Tam, kde je to možné, zařazuje se referenční vzorek do každé analytické várky. Pro časově náročné zkoušky (HPLC, stanovení aminokyselin), kdy není možno zařadit referenční vzorek do každé analytické várky, musí referenční vzorky tvořit minimálně 5% všech analyzovaných vzorků. Takovéto výsledky se zapisují a vyhodnocují samostatně a jejich hodnocení se vztahuje ke všem vzorkům analyzovaným mezi dvěma analýzami kontrolního vzorku.

2.1.3 Kontrola analýzou duplicitního vzorku

Duplicitní vzorky jsou zařazovány do měření v případě, jestliže sledovaná látka je časově nestabilní (vitamín A, vitamín E) a nemá proto referenční vzorek. Pro takovéto vzorky je opakována jejich analýza v krátkém časovém období a výsledek je porovnáván s původní hodnotou. V obou případech musí výsledky měření vyhovovat podmínce opakovatelnosti. Výsledky duplicitních stanovení jsou vyhodnocovány pomocí regulačních diagramů vedených v systému LAB, kde je zaznamenáván relativně vyjádřený rozdíl duplicitních stanovení.

Původní výsledek: $x_1 = (x_{11} + x_{12})/2$,

Opakovaný výsledek: $x_2 = (x_{21} + x_{22})/2$

Hodnota použitá do RD: $(x_1 - x_2)/((x_1 + x_2)/2)$

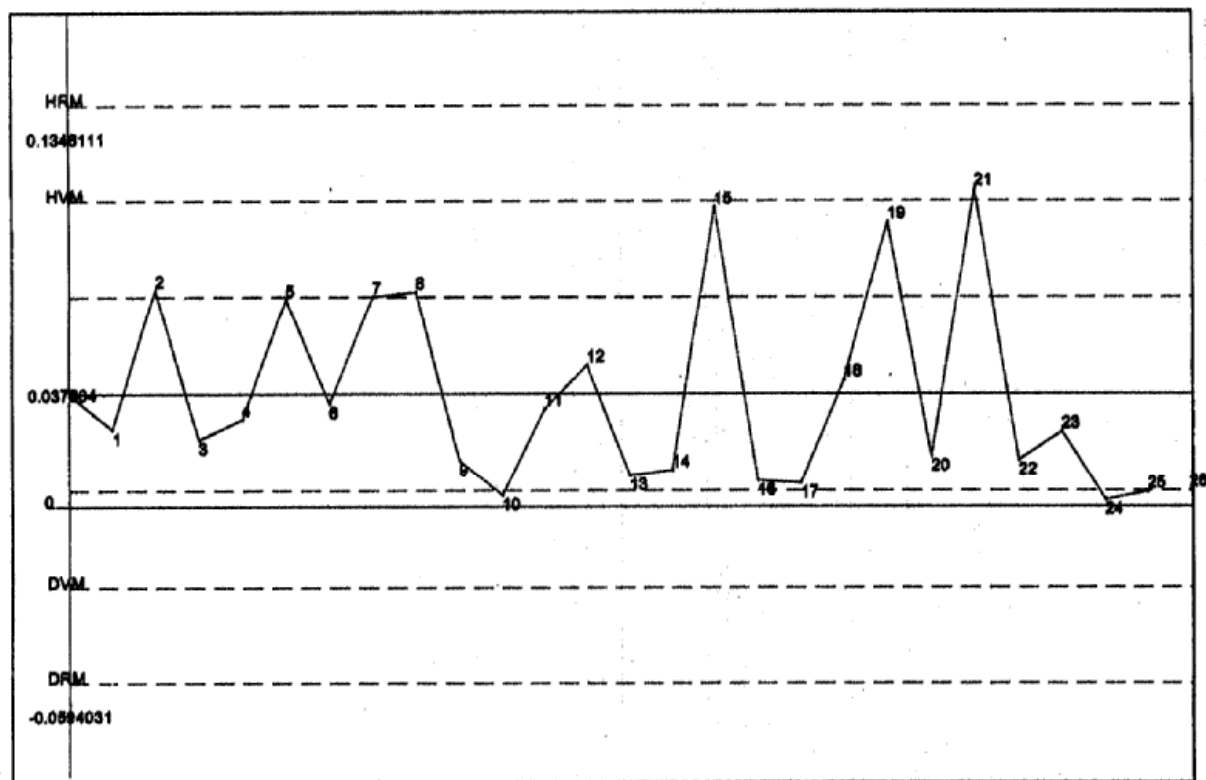
Příklad: Regulační diagram stanovení vitamínu E v krmivech metodou HPLC pro duplicitní vzorky

Tabulka č.4: Hodnoty regulačního diagramu duplicitních vzorků – stanovení vitamínu E v krmivech metodou HPLC

Číslo měření	Původní výsledek (mg/kg)	Opakovaný výsledek (mg/kg)	Relativní rozdíl výsledků	Číslo měření	Původní výsledek (mg/kg)	Opakovaný výsledek (mg/kg)	Relativní rozdíl výsledků
--------------	--------------------------	----------------------------	---------------------------	--------------	--------------------------	----------------------------	---------------------------

1	76,2	78,2	0,0259067	14	74,9	74,0	0,0120887
2	132,0	141,9	0,0722891	15	47,2	42,7	0,1001112
3	137,0	140,1	0,0223746	16	34,8	34,5	0,008658
4	71,3	69,2	0,0291919	17	51,1	51,5	0,0077973
5	68,0	72,9	0,0691124	18	63,0	60,4	0,0421394
6	60,1	62,2	0,0343418	19	43,0	39,1	0,0950061
7	31,8	29,6	0,0700896	20	71,1	72,3	0,0167365
8	55,9	60,0	0,0716444	21	22,8	20,5	0,1062355
9	26,5	26,1	0,0152091	22	39,2	38,6	0,0154242
10	53,5	53,7	0,0037314	23	15,8	16,2	0,025
11	24,1	24,9	0,032653	24	46,0	45,9	0,0021762
12	8539,5	8951	0,0470541	25	41,6	41,4	0,0048192
13	19,5	19,3	0,0103093				

Obrázek č. 3: Regulační diagram duplicitních vzorků – stanovení vitamínu E v krmivech metodou HPLC



Parametry regulačního diagramu: Průměr: 0,0376 (3,76%)

HRM: 0,1346 (13,46%)

HVM: 0,102276 (10,23%)

Hodnoty statistického zpracování dat regulačního diagramu:

Počet hodnot: 25

Průměr: 0,037604

SD: 0,0323357

RSD: 85,9901 %

Medián: 0,0259067

SD med.: 0,00687

Špičatost: 2,40229

Šikmost: 0,8288143

Shapirův - Wilkův test : normální rozdělení.

Test.krit.: 0,0297355

Tab.hodn.: 0,918

Grubbsův test : OK

Dean-Dixonův test : OK

Autokorelace : nezávislost potvrzena

Test.krit.: 0,702246

Tab.hodn.: 2,055

Test vnitřních hradeb : OK

Analýzy duplicitních vzorků musí pro sledovaný parametr tvořit minimálně 10% všech analýz.

Kromě vyhodnocení v LABu lze duplicitní vzorky vyhodnotit výpočtem, a to srovnáním jejich rozdílu s povolenou hodnotou opakovatelnosti. Jestliže rozdíl výsledků analýz duplicitních vzorků je menší než povolená hodnota opakovatelnosti, jedná se o systém statisticky vyvážený.

Stejným způsobem lze vyhodnocovat i výsledky vzorků z laboratorní kontroly shodnosti (z MPZ, z analýz IRM, z analýz CRM apod.). Do regulačního diagramu se vynáší relativní chyba R(%) vypočtená takto :

$$R (\%) = 100 * (\text{obsah nalezený} - \text{obsah "skutečný"}) / \text{obsah "skutečný"}$$

obsah "skutečný": hodnota IRM, CRM nebo medián z vyhodnocení MPZ

2.1.4 Navazování IRM na CRM

Podle možností a dostupnosti certifikovaných referenčních materiálů laboratoř jedenkrát ročně provádí navazování vlastních (přípravených) materiálů na certifikované referenční materiály. Účelem tohoto navazování je příprava vlastních IRM, kromě toho se

analýzou CRM ověří rovněž správnost postupu zkoušky, správná funkce přístrojů, správná práce pracovníků, apod. Vlastní interní referenční materiál musí být materiál, který se matricí a obsahem analytu co nejvíce podobá reálným vzorkům, musí být dostatečně homogenní, stabilní a musí ho být k dispozici dostatečné množství.

Vlastní navazování se provede tím způsobem, že v jedné analytické várce vzorků se společně analyzuje 3 – 6 navážek CRM a 10 – 20 navážek IRM. K vyhodnocení navazování jsou využívány programy EffiValidation a LAB. Naměřené hodnoty parametrů CRM se statisticky vyhodnotí, program EffiValidation provede jejich srovnání s certifikovanou hodnotou a její povolenou odchylkou (viz. tabulka č. 5). V případě, že analýza CRM je hodnocena jako přesná a správná, lze navazovaný materiál používat dále jako IRM.

Výsledky analýz parametrů vlastního IRM se vyhodnotí samostatně jako hodnoty regulačního diagramu v programu LAB. Statistickými testy se zjistí, zda ve výběru nejsou odlehlé hodnoty, zda naměřená data mají normální rozdělení a zda nejsou závislá. Průměr výsledků a jejich směrodatná odchylka pak určí regulační meze, ve kterých se při následném zařazování do analytických várek musí pohybovat hodnoty parametrů IRM (viz. tabulka č. 6, obrázek č. 4).

Příklad: Navazování IRM 61 (vlastní IRM) na CRM 12 (půda č. 7004 – firma Analytika s.r.o., Praha) pro stanovení manganu v půdách ve výluhu 2M HNO₃ metodou OES ICP

Tabulka č. 5: Vyhodnocení správnosti a přesnosti analýzou CRM 12 – stanovení Mn ve výluhu 2M HNO₃ metodou OES ICP

Naměřené hodnoty (mg/kg)	Průměr naměřených hodnot (mg/kg)	Referenční hodnota (mg/kg)	Referenční přesnost (mg/kg)	Výtěžnost (%)	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
533	543	527	24	103,04	přijata	přijata
546						
550						

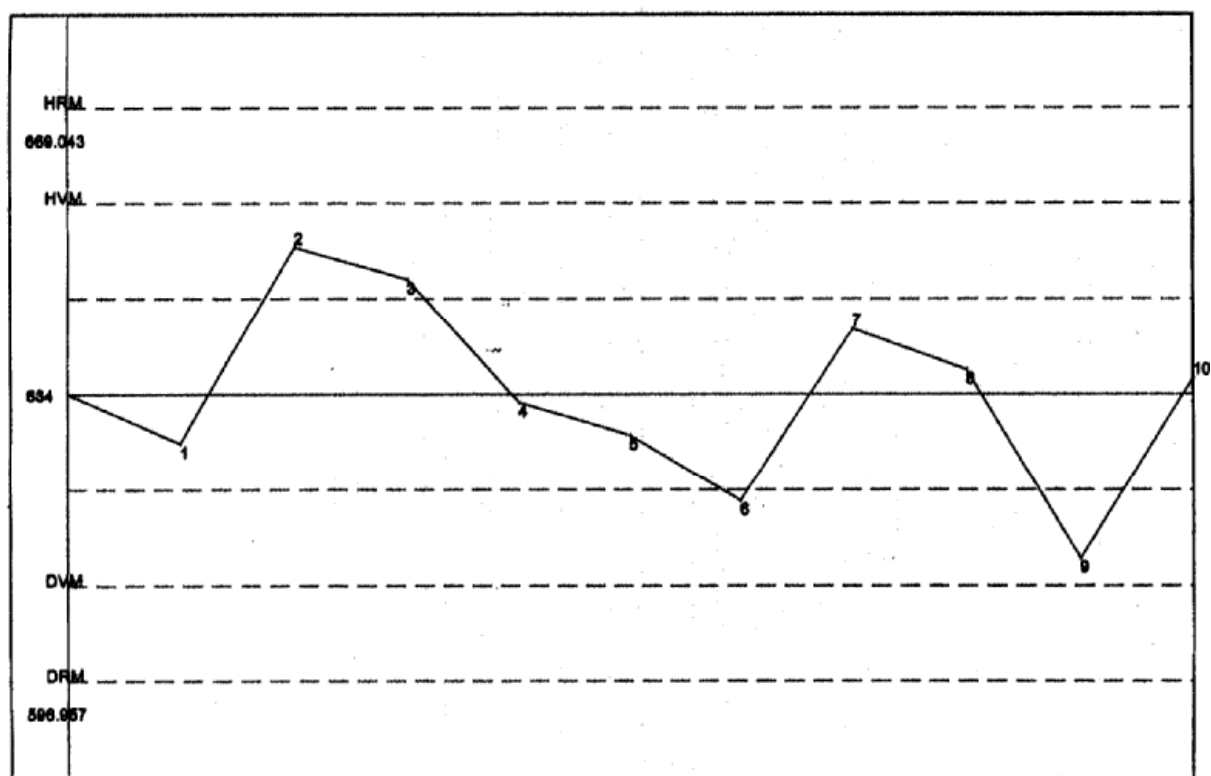
Závěr: Analytická metoda poskytuje pro certifikovaný referenční materiál statisticky správné a přesné výsledky.

Tabulka č. 6: Hodnoty regulačního diagramu pro IRM 61 – stanovení Mn v půdách (výluh 2M HNO₃, metoda OES ICP)

Číslo měření	Naměřená hodnota	Číslo měření	Naměřená hodnota
--------------	------------------	--------------	------------------

	(mg/kg)		(mg/kg)
1	628	6	621
2	652	7	642
3	648	8	637
4	633	9	614
5	629	10	636

Obrázek č. 4: Regulační diagram - stanovení Mn ve výluhu 2M HNO₃ (OES ICP)



Parametry regulačního diagramu: Průměr: 634

HRM: 352,54

DRM: 288,34

HVM: 341,84

DVM: 299,04

Hodnoty statistického zpracování dat regulačního diagramu:

Počet hodnot: 10

Průměr: 634

SD: 11.6809

RSD: 1.84242 %

Medián: 634.5

SD med.: 5.35714

Špičatost: 2.24185

Šikmost: -0.104055

Shapirův - Wilkův test: normální rozdělení.

Test.krit.: 0.0732971

Tab.hodn: 0.842

Normalita (šikmost - špičatost): normální rozdělení.

Test.krit.: 0.2729613

Tab.hodn.: 5.99

Grubbsův test : OK

Dean-Dixonův test : OK

Autokorelace : nezávislost potvrzena

Test.krit.: 0.1115692

Tab.hodn.: 2.201

Test vnitřních hradeb : OK

Závěr: Vlastní materiál byl navázán na certifikovaný referenční materiál a lze jej dále používat jako interní referenční materiál pro stanovení manganu v půdách ve výluhu 2M HNO₃ metodou OES ICP.

2.2 Externí řízení jakosti

Zkoušení způsobilosti, resp. mezilaboratorní porovnávání zkoušek, představuje zásadní nástroj externí kontroly kvality činnosti analytické laboratoře. Ta má tak možnost nejen monitorovat plnění vlastních požadavků na jakost, ale získávat i srovnání s ostatními laboratořemi, zabývajícími se podobnou problematikou. Externí kontrola jakosti představuje nejen účinnou strategii identifikace systematických chyb, ale umožňuje i zjištění negativních dlouhodobých trendů, které by posléze mohly vést k nepřesným výsledkům. Dalším neméně významným výstupem pravidelné účasti v MPZ je demonstrace kompetence laboratoře – doložení dlouhodobé opakovatelnosti jejich výkonů.

Vypovídací schopnost mezilaboratorních porovnání je podmíněna i úrovní jejich organizátora. NRL RO Opava se účastní všech mezilaboratorních porovnávání zkoušek organizovaných NRL OKP ÚKZÚZ Brno, které jsou zahrnuty do národního programu zkoušení způsobilosti laboratoří a do mezinárodního mezilaboratorního porovnání zkoušek organizovaného univerzitou ve Wageningenu (Wageningen evaluating programmes for analytical laboratories), a to v programu SETOC (International sediment exchange for tests on organic contaminants) pro stanovení polyaromatických uhlovodíků v půdách a v programu ISE (International soil-analytical exchange) pro stanovení obsahů jednotlivých prvků v půdách a podobných materiálech pro různá extrakční činidla. Kromě těchto pravidelných účastí mohou být využívána i jiná dostupná mezilaboratorní porovnávání. Pracovníci laboratoře jsou vždy s výsledky vyhodnocení MPZ seznámeni, výsledky každé periody jsou samostatně vyhodnoceny manažerem jakosti a v případě neuspokojivých výsledků následuje analýza jejich příčin a jsou přijata opatření směřující k nápravě. Tím je zaručena vazba mezi výsledky MPZ a každodenním řízením jakosti.

3. Závěr

Pracovníci NRL RO Opava musí dodržovat všechny uvedené postupy řízení jakosti. Výstupní údaje musí zaznamenávat způsobem, který umožňuje rozpoznatelnost trendů, které by mohly vést ke vzniku chyb a tam, kde je to možné, musí použít pro přezkoumávání výsledků statistické metody. Při dodržování těchto pravidel je zkušební laboratoř schopna produkovat dostatečně spolehlivé a věrohodné výsledky. (viz. Příloha č. 1: Zpráva o účasti ve zkušební způsobilosti laboratoře zasílaná Českému institutu pro akreditaci, o.p.s.).

4. Seznam použité literatury

1. ČSN EN ISO/IEC 17025: Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří. ČNI Praha, 2001, kapitola 5.9
2. ČSN ISO 8258: Shewhartovy regulační diagramy. ČNI Praha, 1994
3. Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc., Prof. Ing. Jiří Militký, CSc.: Kompendium statistického zpracování dat. Academia, Praha, 2002, str. 145 - 147
4. Prof. Ing. Oldřich Pytela: Chemometrie pro organické chemiky. Univerzita Pardubice, 2000
5. Ing. Karel Eckschlager, DrSc., RNDr. Ivan Horsák, CSc., Ing. Zdeněk Kodejš, CSc.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. SNTL Praha, 1980, str. 21 - 57
6. Ing. Vítězslav Centner, Ph.D.: Uživatelská příručka EffiValidation. Effichem, Lysice, 2002
7. Uživatelská příručka LABSYSTÉM. Labsystém Zlín, sdružení, Zlín, 1996

Příloha č. 1

ZPRÁVA O ÚČASTI VE ZKOUŠENÍ ZPŮSOBILOSTI

- rok 2003

Labora- toř	ÚKZÚZ, Zkušební laboratoř agrochemie a krmiv Opava, Jaselská 16, Opava				Číslo subjektu 1071.4
Datum účasti	Označení a název PT	Organizátor	Stanovované parametry / předmět zkoušky	Počet parametrů stanovených laboratoří/ úspěšnost	Nápravná opatření
3/2003	MPZ ÚKZÚZ 2003/1 – analýza půd, kalů a sedimentů	ÚKZÚZ	P, K, Mg, Ca, pH - základní rozbor / půdy	15/14	
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, V, Zn - celkový obsah / půdy	33/31	.
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Zn - extrakt v 2M HNO ₃ / půdy	30/30	
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, V, Zn - celkový obsah / kaly a sedimenty	24/23	
			N, P, K, Mg, Ca, Na, Fe, Mn, Al, LOI - celkový obsah / kaly a sedimenty	20/20	
3/2003	MPZ ÚKZÚZ 2003/1 – analýza rostlinného materiálu a krmiv	ÚKZÚZ	N, P, K, Mg, Ca, Na - základní rozbor / rostlinný materiál	18/16	Opakovat analýzu vz. č. 9035 na všechny makroprvky
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, V, Zn, Mn, Fe, B, Al - mikroelementy a cizorodé látky / rostlinný materiál	48/48	

Datum	Označení a	Organizátor	Stanovované	Počet parametrů	Nápravná
-------	------------	-------------	-------------	-----------------	----------

účasti	název PT		parametry / předmět zkoušky	stanovených laboratoří/ úspěšnost	opatření
			Vlhkost, N-látky, tuk, popel, vláknina, sacharoza, škrob, Ca, P, K, Mg, Na, Mn, Zn, Fe, Cu, NaCl - základní rozběr / krmiva	51/51	
			kyselina asparagová, threonin, serin, kyselina glutamová, prolin, glycin, alanin, cystin, valin, isoleucin, leucin, tyrosin, methionin, phenylalanin, histidin, lysin, arginin - aminokyseliny / krmiva	51/49	Opakovat analýzu vz. č. 1034 na tyrosin a threonin
6/2003	MPZ ÚKZÚZ 2003/2 – analýza půd, kalů a sedimentů	ÚKZÚZ	P, K, Mg, Ca, pH -základní rozběr / půdy	15/10	Opakovat analýzu všech tří vzorků, kontrolní měření na ICP, různé filtr. papíry, srovnat, Opakovat sérii AZP analyzovanou ve stejné době
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, V, Zn - celkový obsah / půdy	33/33	
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Zn - extrakt v 2M HNO ₃ / půdy	30/29	
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, V, Zn - celkový obsah / kaly a sedimenty	24/24	

Datum účasti	Označení a název PT	Organizátor	Stanovované parametry /	Počet parametrů stanovených	Nápravná opatření
-----------------	------------------------	-------------	----------------------------	--------------------------------	----------------------

			předmět zkoušky	laboratoří/ úspěšnost	
			N, P, K, Mg, Ca, Na, Fe, Mn, Al, LOI - celkový obsah / kaly a sedimenty	20/20	
6/2003	MPZ ÚKZÚZ 2003/2 – analýza rostlinného materiálu a krmiv	ÚKZÚZ	N, P, K, Mg, Ca, Na - základní rozběr /rostlinný materiál	18/18	
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, V, Zn, Mn, Fe, B, Al - mikroelementy a cizorodé látky / rostlinný materiál	48/45	Opakovat analýzu vz. 9063 na Mn a Ni
			Vlhkost, N-látky, tuk, popel, vláknina, sacharoza, škrob, Ca, P, K, Mg, Na, Mn, Zn, Fe, Cu, NaCl- základní rozběr / krmiva	51/51	
			kyselina asparagová, threonin, serin, kyselina glutamová, prolin, glycin, alanin, cystin, valin, isoleucin, leucin, tyrosin, methionin, phenylalanin, histidin, lysin, arginin - aminokyseliny / krmiva	51/51	
9/2003	MPZ ÚKZÚZ 2003/3 – analýza půd, kalů a sedimentů	ÚKZÚZ	P, K, Mg, Ca, pH - základní rozběr / půdy	15/14	
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, V, Zn - celkový obsah / půdy	33/32	

Datum	Označení a	Organizátor	Stanovované parametry /	Počet parametrů stanovených	Nápravná
--------------	-------------------	--------------------	------------------------------------	--	-----------------

účasti	název PT		předmět zkoušky	laboratoři/ úspěšnost	opatření
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Zn -extrakt v 2M HNO ₃ / půdy	30/30	
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, V, Zn - celkový obsah / kaly a sedimenty	24/24	
			N, P, K, Mg, Ca, Na, Fe, Mn, Al, LOI - celkový obsah / kaly a sedimenty	20/19	
9/2003	MPZ ÚKZÚZ 2003/3 – analýza rostlinného materiálu a krmiv	ÚKZÚZ	N, P, K, Mg, Ca, Na - základní rozbor / rostlinný materiál	18/18	
			As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, V, Zn, Mn, Fe, B, Al - mikroelementy a cizorodé látky / rostlinný materiál	48/43	Nové kal. standardy na OES ICP ředěním CRM, opakovat analýzu vz. 9044,
			Vlhkost, N-látky, tuk, popel, vláknina, sacharoza, škrob, Ca, P, K, Mg, Na, Mn, Zn, Fe, Cu, NaCl - základní rozbor / krmiva	51/48	Nové kal. standardy na OES ICP ředěním CRM, opakovat analýzu všech tří vz. na makro a mikroprvky,
			Kys. asparagová, threonin, serin, kys. glutamová, prolin, glycin, alanin, cystin, valin, isoleucin, leucin, tyrosin, methionin, phenylalanin, histidin, lysin, arginin - aminokyseliny / krmiva	51/51	

Datum účasti	Označení a název PT	Organizátor	Stanovované parametry /	Počet parametrů stanovených	Nápravná opatření
--------------	---------------------	-------------	-------------------------	-----------------------------	-------------------

			předmět zkoušky	laboratoři/ úspěšnost	
3/2003	Mimořádné MPZ ÚKZÚZ 2003/1 – stanovení půdního dusíku	ÚKZÚZ	N – NO ₃ ⁻ , N – NH ₄ ⁺ /půdy	6/6	
6/2003	Mimořádné MPZ ÚKZÚZ 2003/2	ÚKZÚZ	Acido-detergentní vláknina, neutrálně – detergentní vláknina /krmiva	6/6	.
6/2003	MPZ Tuk v řepce 2003	ÚKZÚZ	Tuk / řepka	3/3	
1/2003	MPZ v krmivech metodami HPLC 2003	ÚKZÚZ – - RO Plzeň	monensin, salinomycin, /krmiva	3/3	
6/2003	MPZ v krmivech metodami HPLC 2003	ÚKZÚZ - - RO Praha	Nikarbazin /krmiva	4/4	
11/2003	MPZ – HPLC vitamíny v krmivech metodou HPLC	ÚKZÚZ	Vitamin A, E /krmiva	4/3	
3/2003	MPS – hodnocení odpadů	SAŽP, COHEM, Bratislava	Al, Pb, Cd, Cr, Fe, Co, Cu, Ni, V, Zn/vodný výluh odpadu	10/10	
3/2003	MPS – hodnocení odpadů	SAŽP, COHEM, Bratislava	PAH/tuhý odpad	15/11	
1-3 /2003	International Soil-analytical exchange	Universita Wageningen, Holandsko	Al, As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, V, Zn – celkový obsah /půdy	84/83	
			Ca, K, Mg, P – Mehlich III/ půdy	16/16	
4-6/ 2003	International Soil-analytical exchange	Universita Wageningen, Holandsko	Al, As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, V, Zn – celkový obsah /půdy	84/83	Opakovat stanovení P u všech tří vzorků
			Ca, K, Mg, P – Mehlich III/ půdy	16/16	

Datum účasti	Označení a název PT	Organizátor	Stanovované parametry / předmět zkoušky	Počet parametrů stanovených laboratoří/ úspěšnost	Nápravná opatření
7-9/2003	International Soil-analytical exchange	Universita Wageningen, Holandsko	Al, As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, V, Zn – celkový obsah /půdy	84/84	
			Ca, K, Mg, P – Mehlich III/ půdy	16/16	
10-12 /2003	International Soil-analytical exchange	Universita Wageningen, Holandsko	Al, As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sb, Se, V, Zn – celkový obsah /půdy	84/84	
			Ca, K, Mg, P – Mehlich III / půdy	16/14	Op. analýzu vz.č. 962 a 970
1-3/2003	International sediment exchange for tests on organic contaminants	Universita Wageningen, Holandsko	NAP, ANA, FLU, PHE, ANT, FLT, PYR, CHR, BaA, BbF, BkF, BaP, DBA, IPY, BPE / půdy	60/58	Při dalším měření opakovat analýzu č. 758
3-6/2003	International sediment exchange for tests on organic contaminants	Universita Wageningen, Holandsko	NAP, ANA, FLU, PHE, ANT, FLT, PYR, CHR, BaA, BbF, BkF, BaP, DBA, IPY, BPE / půdy	60/58	
7-9/2003	International sediment exchange for tests on organic contaminants	Universita Wageningen, Holandsko	NAP, ANA, FLU, PHE, ANT, FLT, PYR, CHR, BaA, BbF, BkF, BaP, DBA, IPY, BPE / půdy	60/58	Opakovat analýzu některého vzorku
10-12 /2003	International sediment exchange for tests on organic contaminants	Universita Wageningen, Holandsko	NAP, ANA, FLU, PHE, ANT, FLT, PYR, CHR, BaA, BbF, BkF, BaP, DBA, IPY, BPE / půdy	60/57	Důsledná kontrola při přepisování výsledků
12/2003	Měření pH	ČMI Brno	PH/vody	1/1	

Porovnání výsledků stanovení glukosinolátů v řepce olejce metodou HPLC a metodou GC

Radvana Šulová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, RO Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno

E-mail : radvana.sulova@ukzuz.cz

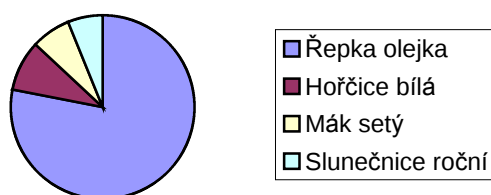
Obsah

1. Úvod
2. Teoretická část
 - 2.1. Glukosinoláty (GSL) – charakteristika
 - 2.2. Chemikálie a přístroje
 - 2.1.1. Chemikálie
 - 2.1.2. Přístroje
 - 2.3. Použité metody
 - 2.3.1. Stanovení GSL metodou HPLC. Optimalizace metody.
 - 2.3.2. Stanovení GSL metodou GC
3. Experimentální část
 - 3.1. Příprava vzorku
 - 3.2. Extrakce
 - 3.3. Čištění extraktu
 - 3.4. Vlastní analýza
 - 3.5. Výpočet obsahu GSL
4. Výsledky a diskuse
 - 4.1. Porovnání výsledků stanovení sumy GSL metodami HPLC (metanol) a GC
 - 4.2. Porovnání výsledků stanovení sumy GSL metodami HPLC (metanol,voda) a GC
5. Závěr

1. Úvod

Nejpěstovanější skupinou plodin po obilovinách v České republice jsou olejnin. Zastoupení jednotlivých druhů na celkové ploše olejnin v roce 2002 je uvedeno v následujícím grafu (1).

Graf č. 1: Zastoupení jednotlivých druhů na celkové ploše olejnin v roce 2002



Šlechtitelský proces olejnin a zvláště řepky olejky se stále zrychluje. V roce 2003 byl registrován odborem odrůdového zkušebnictví nejvyšší počet nových odrůd řepky ozimé. Aby bylo možné se v tak široké nabídce orientovat, potřebují pěstitelé komplexní informaci o hospodářských vlastnostech registrovaných odrůd. Vzhledem k tomu, že šlechtění u brukvovitých i dalších olejnin velmi ovlivňuje kvalitu, jsou údaje o jednotlivých ukazatelích technologické kvality odrůd požadované zvláště zpracovateli. V České republice se výhradně pěstují odrůdy typu „00“ tj. s minimálním obsahem kyseliny erukové a obsahem glukosinolátů (1).

Semeno řepky olejky je hodnoceno dle normy ČSN 46 2300-2, která přímo neurčuje způsob stanovení obsahu GSL. Stanovení GSL bylo v minulých letech prováděno dle normy platné v ČR využívající metodu plynové chromatografie (GC). Vzhledem ke vstupu naší země do EU je při posuzování semena řepky olejky mít na zřeteli nařízení Evropské komise Číslo 2316/1999. Stanovení sumy GSL si vyžádalo zavedení nové metodiky na našem pracovišti. Jedná se o stanovení GSL metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) podle ČSN EN ISO 9167-1 (4,5,6).

Stanovení sumy GSL a mastných kyselin patří k nejsledovanějším chemickým parametrům v semeni řepky olejky. Nízký obsah GSL je významnou podmínkou pro využití řepkového šrotu, pokrutin a výlisků jako vedlejších produktů při zpracování řepky olejky. Nadlimitní koncentrace rozkladných produktů GSL v řepkových produktech přidávaných do krmných směsí vede ke snižování příjmu krmiva a následně nižším váhovým přírůstkům u zvířat.

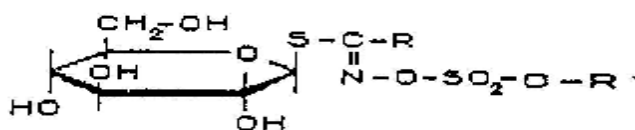
V minulých letech byly vyšlechtěny odrůdy s nízkým obsahem GSL tzv „00“ řepky. Šlechtitelé se v poslední době snaží uspět i s odrůdami s vyšším až limitním obsahem GSL pro jejich lepší technologické vlastnosti. Z tohoto důvodu bylo nutné zvládnout stanovení i těch GSL, které metodou GC stanovit nelze. Vhodnou analytickou metodou pro toto stanovení je metoda HPLC. Stanovení GSL v řepce olejce metodou HPLC bylo akreditováno v květnu roku 2003.

Srovnání výsledků získaných oběma metodami HPLC a GC a upozornění na analytická úskalí byly hlavní cíle naší práce.

2. Teoretická část

2.1. Glukosinoláty (GSL) - charakteristika

Glukosinoláty (GSL) jsou po chemické stránce glykosidy běžně se vyskytující v mnoha druzích rostlin, hlavně v čeledích brukvovitých (*Brassicaceae*), kaprovitých (*Capparidaceae*) a rezedovitých (*Resedaceae*). Molekula GSL je tvořena cukernou složkou (ve většině případů b-D-glukosou) a antiglykolem. V současné době známe více než 100 GSL. Tento vysoký počet je dán chemickou rozmanitostí postranního řetězce (2)(obr.1).



Obr.č.1: Obecná struktura glukosinolátů

Glukosinoláty rodu Brassiceae

U brukve řepky olejky bylo nalezeno 14 různých GSL, přičemž v semeni se vyskytují především alkenyl-GSL, v zelené hmotě jsou pak více obsaženy GSL indolového typu (3).

Tabulka č. 1: Přehled GSL u řepky olejky

Alk(en)yl glukosinoláty	R-
Hlavní	
1) Progoitirin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$
2) Glukonapin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
3) Glukobrassicinapin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
Ve stopovém množství	
4) Sinigrin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$
5) Napoleiferin	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$
6) Sinalbin	$p\text{-HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$
7) Glukoerucin	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
8) Glukoibervirin	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
9) Glukoiberin	$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
10) Glukoraphanin	$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
11) Glukoalyssin	$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
12) Glukonasturiin	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
Indolyl glukosinoláty	
13) Glukobrassicin	3-indolylmethyl-
14) Neoglukobrassicin	N-methoxy-3-indolylmethyl

Hlavní alkenyl glukosinolát -progoitirin představuje 30-80% celkového obsahu GSL v řepkovém semeni.

2.2. Chemikálie a přístroje

2.2.1. Chemikálie

Acetonitril čistoty pro HPLC (Riedel de Haen, Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo., USA)

Methanol čistoty pro HPLC (Riedel de Haen, Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo., USA)

The certification of the total glucosinolate and sulfur contents of rapeseed (colza)

CRM 367 (Commision of European Communities, Community Burea of Reference, Brussel)

Sinigrin (Fluka, Busch, Switzerland)

DEAE Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)

Sulfatáza Typ H-1 (Sigma, St.Louis, Mo., USA)

Pyridin (Merck, Damstadt, Germany)

Imidazol (Sigma, St.Louis, Mo., USA)

Hexametylyldisilazan (Fluka, Busch, Switzerland)

Trimetylchlorsilan (Fluka, Busch, Switzerland)

Kyselina octová (Lachema, Neratovice, ČR)

Kyselina mravenčí (Lachema, Neratovice, ČR)

Octan sodný (Lachema, Neratovice, ČR)

Petroleter (Lachema, Neratovice)

Deionizovaná voda

Dusík –nosný plyn pro GC

2.2.2. Přístroje a pomůcky

Kapalinový chromatograf **HPLC 1100 DAD detektor** (fy AGILENT, USA)

Chromatografická kolona **Supelcosil LC – 18 DB** (25cm x 4,6 mm, 5um)(SUPELCO, USA)

Předkolona Metaguard 4,6 mm Intersil ODS (SUPELCO, USA)

Plynový chromatograf **HP 5890 série II** s detektorem FID

Chromatografická kolona pro GC **Chromaton N-AW DMCS** (0,125-0,160 mm)

se zakotvenou fází SE 30-5 % (240cm x 2 mm)

Vodní lázeň

Odstředivka

Vakuová odparka RV 05-ST 1 P-B

Kahan sklofoukačský

Sušárna s oběhem vzduchu

Mikrodrtič-mlýnek na kávu (ETA, ČR)

Mlýnek na přemletí (Moulinex)

Skelná vata

Speciálně upravené skleněné kolony, vhodný stojan, zkumavky

2.2. Použité metody

2.2.1. Stanovení GSL metodou HPLC. Optimalizace metody.

Principem stanovení je extrakce GSL metanolem (ČSN EN ISO 9167-1) nebo vroucí vodou (bývalá ČSN) s následným čištěním a enzymatickou desulfatací na iontoměničových pryskyřicích. Stanovení se provádí pomocí HPLC s elučním gradientem a detekcí v ultrafialové oblasti (Tab.č.2).

Tabulka č. 2: HPLC podmínky

Parametr	Hodnota
Použitá kolona	Supelcosil LC – 18 DB (25cm x 4,6 mm, 5µm) (SUPELCO,USA)
Předkolona	Metaguard 4,6 mm Intersil ODS (SUPELCO,USA)
Složení mobilní fáze	20% acetonitril/redstilovaná voda (A/B) 5-55 min 80% - 20% složky A (20% acetonitril)
Průtok mobilní fáze	gradient 5-10 min 1ml/min 10-22 min. 1,5 ml /min, 22-55min 1,5 ml/min
Detekce	229 nm
Teplota	30°C
Objem nástřiku	20 µl

Pro optimalizaci a následnou akreditaci tohoto stanovení byly vytvořeny kalibrační závislosti pro jednotlivé GSL deklarované v CRM 367 (Tab.č. 3) připravené dle ČSN EN ISO 9167-1 za použití vnitřního standardu sinigrinu.

Tabulka č.3: Statistické hodnocení kalibračních závislostí z CRM 367

Název	Deklarovaná hodnota mmol/g	Nalezaná hodnota mmol/g	Rozšířená nejistota mmol/g
suma GSL	99+/-9	110+/-5	5

Analyt	Mez detekce μmol/g	Mez stanovitelnosti μmol/g	Opakovatelnost μmol/g
Desulfoprogoitrin	0,01	0,03	0,29
Desulfoepi-progoitrin	0,01	0,03	0,08
Desulfoglukonapoleiferin	0,01	0,03	0,2
Desulfoglukonapin	0,01	0,03	0,28
Desulfoglukobrassicinapin	0,01	0,03	0,06
Desulfoglukonasturiin	0,01	0,03	0,07
suma GSL			2,2

2.2.2 Stanovení GSL metodou GC

Principem stanovení GSL je jejich extrakce GSL vroucí vodou (bývalá ČSN) s následným odpařením extraktu a silylací vzorku. Finální analýza se provádí pomocí plynové chromatografie s plamenoionizačním detektorem (FID) (Tab.č. 4).

Tabulka č. 4: GC podmínky

Parametr	Hodnota
Použitá kolona	Chromaton N-AW DMCS (0,125-0,160 mm) se zakotvenou Se 30-5%
Detektor	FID
Nosný plyn	N ₂
Průtok nosného plynu	36 ml/min
T _{injektoru}	270°C
T _{detektoru}	290°C
Teplotní program	200°C (3 min) - 5°C/min - 245°C – 13°C/min - 280°C (7 min)
Objem nástřiku	1 µl

3. Experimentální část

Analytický postup při stanovení GSL v řepce olejce

1) metodou HPLC :

- příprava vzorků
- extrakce GSL ze vzorku
- čištění extraktu na ionexových kolonách
- finální analýzy a vyhodnocení

2) metodou GC :

- příprava vzorků
- extrakce GSL ze vzorku
- odpaření extraktu
- silylace směsí hexametyldisilazanu (HMDS) a trimetylchlorsilanu (TMCS) v prostředí pyridinu
- finální analýzy a vyhodnocení

3.1. Příprava CRM 367 a vzorků řepky olejky

a) řepkový šrot pro HPLC

Semena řepky a CRM 367 se pomelou v mlýnku na kávu a následně se extrahují vodou nebo methanolem.

b) odtučněný řepkový šrot pro GC

Semena řepky a CRM 367 se pomelou v mlýnku na kávu a přes noc přesuší v sušárně při teplotě 50°C. Tuk obsažený v pomletém vzorku se vyextrahuje petroleterem po dobu 8 hod. v Soxhletově extraktoru. Odtučněný řepkový šrot se znovu přemele. Připravený vzorek se uchovává na chladném a tmavém místě.

3.2 Extrakce

a) pro HPLC

Extrakce pro HPLC se provádí buď 70%-ním methanolem nebo vroucí vodou. Do dvou zkumavek (A, B) se naváží 200 mg pomletého vzorku. Ty se vloží do 70°C teplé vodní lázně (v případě extrakce metanolem) nebo do vroucí vodní lázně (v případě extrakce vodou) na 1 min. pro deaktivaci myrosinázy. Ke vzorku se přidají 2 ml 70%-ního metanolu nebo vroucí vody. Do zkumavky A se přidá 0,2 ml 5 mmol/l sinigrinu, do zkumavky B 0,2 ml 20 mmol/l sinigrinu. Obě zkumavky se nechají za občasného míchání ve vodní lázni (metanol při 70°C, voda při 100°C) po dobu 10 min. Následuje odstředění a supernatant se oddělí do zkumavek (A' a B'). Ke vzorku po odstředění se opět přidají 2 ml 70%-ního metanolu a postup se zopakuje. Odstředěný vzorek je přidán k podílu ve zkumavkách (A' a B'). Takto připravený supernatant je použit pro následnou desulfataci.

b) pro GC

Extrakce pro GC metodu se provádí pouze vodou. Do odstředivkové zkumavky se naváží 100 mg odtučněného řepkového šrotu a zkumavka se vloží do vodní lázně o teplotě 95°C. Po jedné minutě se přidá asi 1 ml vroucí vody, přičemž dojde k deaktivaci myrosinázy. Po dvou minutách se přidá 0,5 ml 0,2% sinigrinu (vnitřní standard). Extrahuje se za občasného míchání ještě po dobu 25 minut. Po ochlazení a odstředění se 0,4 ml čirého extraktu převede do zkumavky a odpaří do sucha při 95°C na vodní lázni za přívodu vzduchu. Dosuší se v sušárně při teplotě 105°C po dobu 20 minut. Poté se provede derivatizace. Do zkumavky s odparkem se přidá 0,5 ml pyridinu, 0,2 ml HMDS a 0,1 ml TMCS. Zkumavka se zataví a silyluje v sušárně 2 hodiny při teplotě 120°C.

Takto připravený vzorek lze po odstředění použít pro stanovení na plynovém chromatografu.

3.3. Čištění extraktu

Do Pasterových pipet umístěných kolmo ve stojanu se do zúženého konce umístí malé množství skelné vaty a nanese 0,5 ml dobře promíchané suspenze DEAE Sephadex A 25 (10g

v roztoku 2 mol/l kyseliny octové), která se nechá usadit. Takto připravené pipety dle Pastera se promyjí 2 x 2 ml imidazolformiátu a nakonec 1 ml deionizované vody.

Na připravenou a promytou kolonu se nanese 1 ml spojeného odstředěného extraktu, tak aby se nepoškodil povrch pryskyřice a nechá se vsáknout. Glukosinoláty se zachytí na ionexu. Kolona se poté promyje 2 x 1 ml 0,02 mol/l octanu sodného, čímž se odstraní nepochybné látky. Následně se na kolonu nanese 0,075 ml přečištěné sulfatázy a nechá se stát při pokojové teplotě nejméně 18 hodin. Desulfoglukosinoláty se ze sloupce vymyjí 2 x 1 ml vody. Eluát je připraven k analýze pomocí HPLC.

3.4. Vlastní analýza

a) HPLC analýza

Připravený vzorek se dá do vialky. 20 µl vzorku se dávkuje autosamplerem na chromatografickou kolonu Supelcosil LC-18-DB s předkolonou Metaguard do toku mobilní fáze a detekuje se DAD detektorem při 229 nm. Kolona je temperována na teplotu 30 °C. Dvou komponentní mobilní fáze je tvořena 20 % - ním acetonitrilem (A) a deionizovanou vodou (B). Průtok i poměr jednotlivých solventů je upraven tak, aby došlo k rozdělení všech GSL, které jsou obsaženy v certifikovaném referenčním materiálu pro řepkové semeno CRM 367.

b) GC analýza

1 µl vzorku se dávkuje na náplňovou chromatografickou kolonu Chromaton N-AW DMCS se zakotvenou fází Se 30-5 % do toku mobilní fáze tj N₂ (průtok 36 ml/min) a detekuje se FID detektorem. Průtok mobilní fáze a teplotní program je upraven tak, aby došlo k rozdělení GSL. Danou metodou lze stanovit čtyři glukosinoláty přítomné v řepkovém semeni - glukonapin, glukobrassikanapin, progoitrin a napoleiferin.

3.5. Výpočet

a) pro HPLC

Obsah každého glukosinolátu, vyjádřený v mikromolech na 1 gram sušiny výrobku se vypočítá ze vztahu :

$$\frac{A_g}{A_s} * \frac{n}{m} * K_g * \frac{100}{100 - w}$$

kde A_g plocha píku odpovídající desulfoglukosinolátu v jednotkách integrátoru

A_s plocha píku odpovídající desulfosinigrinu v jednotkách integrátoru

K_g faktor reakce desulfoglukosinolátu uvedený pro jednotlivé GSL v tabulce č.5

m hmotnost zkušební vzorku v gramech

n množství vnitřního standardu přidaného do zkumavky v mikromolech

w obsah vlhkosti a těkavých látek v analytickém vzorku vyjádřený v % vlhkosti

Tabulka č. 5 : Odezvové faktory pro jednotlivé GSL uvedené v ČSN EN ISO 9167-1

jednotlivé GSL	koeficienty odezvy (K_g)
desulfoglukoiberin	1,07
desulsoprogoitrin	1,09
desulfoepi-progoitrin	1,09
desulfosinigrin	1
desulfoglukoraphanin	1,07
desulfoglukonapoleiferin	1
desulfoglukoalyssin	1,07
desulfoglukonapin	1,11
desulfo 4-OH glukobrassicin	0,28
desulfoglukobrassicinapin	1,15
desulfoglukotropeaolin	0,95
desulfoglukobrassicin	0,29
desulfoglukonasturiin	0,95
desulfo-4-CH ₃ glukobrassicin	0,25
desulfoneoglukobrassicin	0,2

Uvedené koeficienty odezvy byly stanoveny experimentálně a byly přijaty na základě dohody mezi různými laboratořemi, které se zúčastnily zkoušek stanovení GSL pro zpracování normy ČSN EN ISO 9167-1.

b) pro GC

Výpočet obsahu glukosinolátů se provede metodou vnitřního standardu a vyjádří se v $\mu\text{mol}/1 \text{ g}$ odtučněného řepkového šrotu.

$$\frac{m_{IS} * \sum A_i * 100}{A_{IS} * m} * 24,096$$

kde m_{IS} hmotnost vnitřního standardu přidaného ke vzorku v mg

$\sum A_i$ suma ploch píků nalezených glukosinolátů

A_{IS} plocha píku vnitřního standardu

m hmotnost zkušebního vzorku v mg

24,096 koeficient pro přepočet procentického obsahu glukosinolátů na obsah vyjádřený v μmol

4. Výsledky a diskuse

Podle výše uvedených podmínek bylo proměřeno 68 vzorků řepky ozimé z pokusů označených RP 1 a RP 2 ze stanice Jaroměřice. Vzorky byly měřeny jak metodou GC, která byla dosud používána pro toto stanovení, tak i nově akreditovanou metodou HPLC (ČSN EN ISO 9167-1). Použité extrakční činidlo byl metanol. 24 vzorků řepky ozimé z pokusu RP1 ze stanice Jaroměřice bylo navíc proměřeno metodou HPLC za použití vroucí vody i methanolu jako extrakčního činidla.

4.1. Porovnání výsledků stanovení sumy GSL metodami HPLC (metanol) a GC

V tabulkách č.6-9 jsou uvedeny výsledky sumy GSL celkem pro 66 vzorků řepky metodou HPLC a metodou GC. Všechny výsledky byly přepočítány na 46%-ní obsah oleje ve vzorku, čímž byly získány hodnoty, které se dají porovnat. V tabulkách č.6,7 byly zařazeny vzorky, u kterých byl obsah sumy GSL nižší než 15 μ mol/g GSL ve vzorku v sušině. Nad tuto hodnotu je totiž obsah GSL v řepce vzhledem k opakovatelnosti stanovení považován za problematický z hlediska schvalování testovaných odrůd této plodiny. Tabulka č.6. (pokus RP1) uvádí výsledky do 15 μ mol/g GSL ve vzorku v sušině získané HPLC (extrakční činidlo metanol) a GC a jejich diferenci, tabulka č.7 uvádí obdobné výsledky pro pokus RP2. Tabulka č.8. (pokus RP1) a tabulka č.9 (pokus RP2) obdobně porovnává získané hodnoty sumy GSL pro vzorky, u kterých je suma GSL nad 15 μ mol/g GSL ve vzorku v sušině.

4.2. Porovnání výsledků stanovení sumy GSL metodami HPLC (metanol,voda) a GC

Vysoká toxicita vroucího metanolu, používaného pro extrakci GSL nás vedla ke snaze nahradit jej vroucí vodou.

Tabulky č.10-13 hodnotí získané výsledky sumy GSL při použití obou extrakčních činidel u 24 vzorků řepky metodou HPLC a metodou GC. I v tomto případě byly všechny výsledky přepočítány na 46%-ní obsah oleje ve vzorku, čímž se získaly hodnoty, které se dají porovnat. Tabulka č.10. (pokus RP1) uvádí výsledky do 15 μ mol/g GSL ve vzorku v sušině získané HPLC (extrakční činidlo metanol) a GC a jejich diferenci, tabulka č.11 uvádí obdobné výsledky pro pokus RP1(extrakční činidlo voda).

Tabulka č.12. (pokus RP1) a tabulka č.13 (pokus RP1) obdobně porovnává získané hodnoty sumy GSL u vzorků , u kterých je suma GSL nad 15μmol/g GSL ve vzorku v sušině.

Tabulky č. 6,7: Porovnání stanovení sumy GSL ve vzorcích RP 1 a RP 2 metodou HPLC - extrakce metanolem (ČSN EN ISO 9167-1) a metodou GC. Vzorky s obsahem sumy GSL do 15mmol/g v sušině při přepočtu na 46% obsah oleje.

RP 1 Ozn.vzorku	GSL(mmol/g) v MeOH		
	HPLC	GC	HPLC-GC
1571	10,28	5,08	5,20
1573	12,03	6,44	5,59
1574	11,29	5,74	5,55
1576	10,25	5,39	4,86
1577	9,95	5,44	4,51
1578	10,76	6,38	4,38
1579	11,70	6,20	5,50
1580	8,82	4,54	4,27
1582	8,60	4,57	4,03
1583	11,66	6,36	5,30
1585	11,49	6,37	5,12
1586	13,16	8,32	4,84
1587	14,30	8,84	5,45
1588	8,79	4,32	4,47
1589	10,42	5,20	5,22
1590	10,81	6,74	4,07
1591	11,42	6,66	4,76
1592	11,03	6,78	4,26
Průměr HPLC-GC			4,85

RP 2 Ozn.vzorku	GSL(mmol/g) v MeOH		
	HPLC	GC	LC-GC
632	11,78	5,71	6,07
633	10,35	4,64	5,70
634	9,36	4,03	5,34
635	12,43	6,68	5,74
636	14,19	7,26	6,93
637	12,64	5,80	6,84
638	12,42	5,57	6,85
640	12,66	6,04	6,62
641	9,37	3,76	5,60
642	11,94	5,72	6,22
643	11,78	5,76	6,02
644	7,05	3,18	3,88
645	12,85	7,30	5,55
646	7,53	2,70	4,83
647	12,23	5,50	6,73
648	14,58	6,78	7,80
649	12,33	4,70	7,63
650	12,03	4,54	7,49
651	14,67	6,72	7,95
652	13,87	7,15	6,72
658	10,35	5,48	4,87
659	10,53	5,96	4,57
660	12,35	5,53	6,82
661	10,23	4,39	5,85
661	10,23	4,39	5,85
663	11,96	6,55	5,41

Pokračování tab. č. : 6,7

RP 2	GSL(μmol/g) v MeOH		
Ozn.vzorku	HPLC	GC	LC-GC
664	8,78	4,56	4,22
665	6,53	2,43	4,10
667	11,34	5,83	5,51
668	10,44	5,22	5,22
669	11,60	4,77	6,82
670	8,82	3,90	4,92
671	12,58	5,85	6,74
675	14,49	8,31	6,18
Průměr HPLC-GC			5,99

kde HPLC – kapalinová chromatografie, GC – plynová chromatografie, MeOH – vroucí 70% methanol

Z tabulek č.6 a 7 vyplývá, že u vzorků řepky ozimé z pokusů RP1 i RP 2 obsahující GSL do 15 μ mol/g GSL ve vzorku v sušině je průměrná hodnota rozdílu obou stanovení sumy GSL přepočtená na obsah 46% oleje **5,42 mmol/g GSL**.

Tabulky č. 8, 9: Porovnání stanovení sumy GSL ve vzorcích RP 1 a RP 2 metodou HPLC - extrakce metanolem (ČSN EN ISO 9167-1) a metodou GC. Vzorky s obsahem sumy GSL nad 15mmol/g v sušině při přepočtu na 46% obsah oleje.

RP 1 Ozn.vzorku	GSL(mmol/g) v MeOH		
	HPLC	GC	HPLC-GC
1572	15,45	9,25	6,20
1575	23,84	13,89	9,94
1581	20,03	12,40	7,63
1584	33,71	21,61	12,10
1540	47,65	33,12	14,53
1628	40,51	29,42	11,09
Průměr HPLC-GC			10,25

RP 2 Ozn.vzorku	GSL(mmol/g) v MeOH		
	LC	GC	HPLC-GC
639	16,11	10,46	5,65
653	25,01	14,52	10,49
655	20,12	12,61	7,51
656	16,02	9,80	6,22
657	15,25	8,39	6,86
662	23,95	16,15	7,80
666	16,63	9,80	6,83
672	15,72	7,55	8,17
673	15,19	9,91	5,28
674	15,22	5,85	9,37
Průměr HPLC-GC			7,42

kde HPLC – kapalinová chromatografie, GC – plynová chromatografie, MeOH – vroucí 70% methanol

Z tabulek vyplývá, že u vzorků řepky ozimé z pokusů RP1 i RP 2 obsahujících GSL nad 15μmol/g GSL ve vzorku v sušině je průměrná hodnota rozdílu obou stanovení sumy GSL přepočtená na obsah 46% oleje **8,83 mmol/g GSL**.

Tabulky č. 10, 11: Porovnání stanovení sumy GSL ve vzorcích RP 1
metodou HPLC - extrakce metanolem i vodou (ČSN EN ISO 9167-1)
a metodou GC. Vzorky s obsahem sumy GSL do 15mmol/g v sušině
při přepočtu na 46% obsah oleje

RP 1 Ozn.vzorku	GSL(mmol/g) v MeOH		
	HPLC	GC	HPLC-GC
1571	10,28	5,08	5,20
1573	12,03	6,44	5,59
1574	11,29	5,74	5,55
1576	10,25	5,39	4,86
1577	9,95	5,44	4,51
1578	10,76	6,38	4,38
1579	11,70	6,20	5,50
1580	8,82	4,54	4,27
1582	8,60	4,57	4,03
1583	11,66	6,36	5,30
1585	11,49	6,37	5,12
1586	13,16	8,32	4,84
1587	14,30	8,84	5,45
1588	8,79	4,32	4,47
1589	10,42	5,20	5,22
1590	10,81	6,74	4,07
1591	11,42	6,66	4,76
1592	11,03	6,78	4,26
Průměr HPLC-GC			4,85

RP1 Ozn.vzorku	GSL(mmol/g) v H ₂ O		
	HPLC	GC	HPLC-GC
1571	9,32	5,08	4,24
1572	14,77	9,25	5,52
1573	11,55	6,44	5,11
1574	11,49	5,74	5,74
1576	10,94	5,39	5,55
1577	9,70	5,44	4,26
1578	9,96	6,38	3,58
1579	11,83	6,20	5,63
1580	7,87	4,54	3,33
1582	8,52	4,57	3,95
1583	10,21	6,36	3,85
1585	12,07	6,37	5,71
1586	9,46	8,32	1,14
1588	7,56	4,32	3,25
1589	9,41	5,20	4,21
1590	10,84	6,74	4,10
1591	12,40	6,66	5,74
1592	12,21	6,78	5,43
Průměr HPLC-GC			4,46

kde HPLC – kapalinová chromatografie, GC – plynová chromatografie, MeOH – vroucí 70% methanol, H₂O – vroucí redestilovaná voda

Z tabulek vyplývá, že u vzorků řepky ozimé z pokusů RP1 obsahující GSL do 15μmol/g GSL ve vzorku v sušině je průměrná hodnota rozdílu mezi hodnotami GSL přepočtená na obsah 46% oleje získaná oběma metodami i při použití těchto dvou extrakčních činidel srovnatelná.

Tabulky č.12, 13: Porovnání stanovení sumy GSL ve vzorcích RP 1

**metodou HPLC - extrakce metanolem i vodou (ČSN EN ISO 9167-1)
a metodou GC Vzorky s obsahem sumy GSL nad 15mmol/g v sušině
při přepočtu na 46% obsah oleje.**

RP 1 Ozn.vzorku	GSL(mmol/g) v MeOH		
	HPLC	GC	HPLC-GC
1572	15,45	9,25	6,20
1575	23,84	13,89	9,94
1581	20,03	12,40	7,63
1584	33,71	21,61	12,10
1540	47,65	33,12	14,53
1628	40,51	29,42	11,09
Průměr HPLC-GC			10,25

RP1 Ozn.vzorku	GSL(mmol/g) v H ₂ O		
	HPLC	GC	HPLC-GC
1575	24,47	13,89	10,58
1581	17,90	12,40	5,50
1584	34,48	20,85	13,63
1587	15,60	8,84	6,76
1540	51,43	33,12	18,31
1628	41,37	29,42	11,94
Průměr HPLC-GC			11,12

kde HPLC – kapalinová chromatografie, GC – plynová chromatografie, MeOH – vroucí 70% methanol, H₂O – vroucí redestilovaná voda

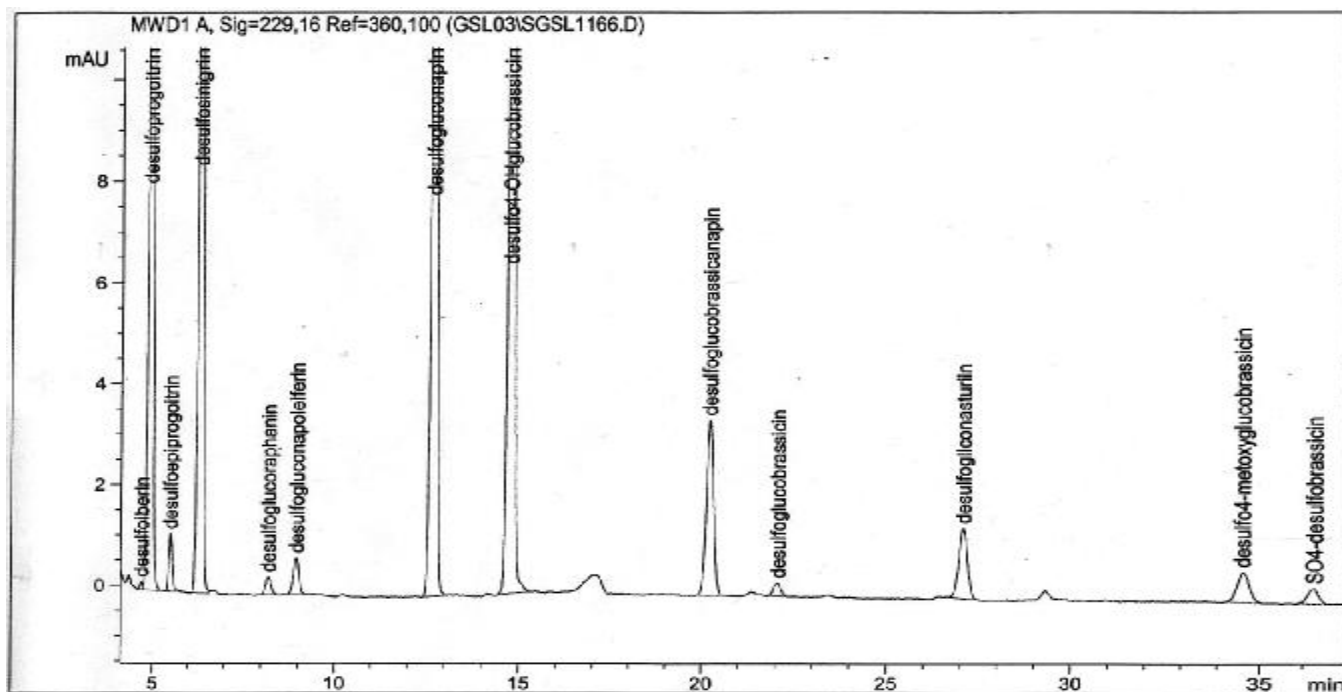
Z tabulek vyplývá, že u vzorků řepky ozimé z pokusů RP1 obsahující GSL nad 15μmol/g GSL ve vzorku v sušině je průměrná hodnota rozdílu mezi hodnotami GSL přepočtená na obsah 46% oleje získaná oběma metodami i při použití těchto dvou extrakčních činidel srovnatelná.

Opakovatelnost dle ČSN EN ISO je 2μmol/g při obsahu GSL do 20μmol/g

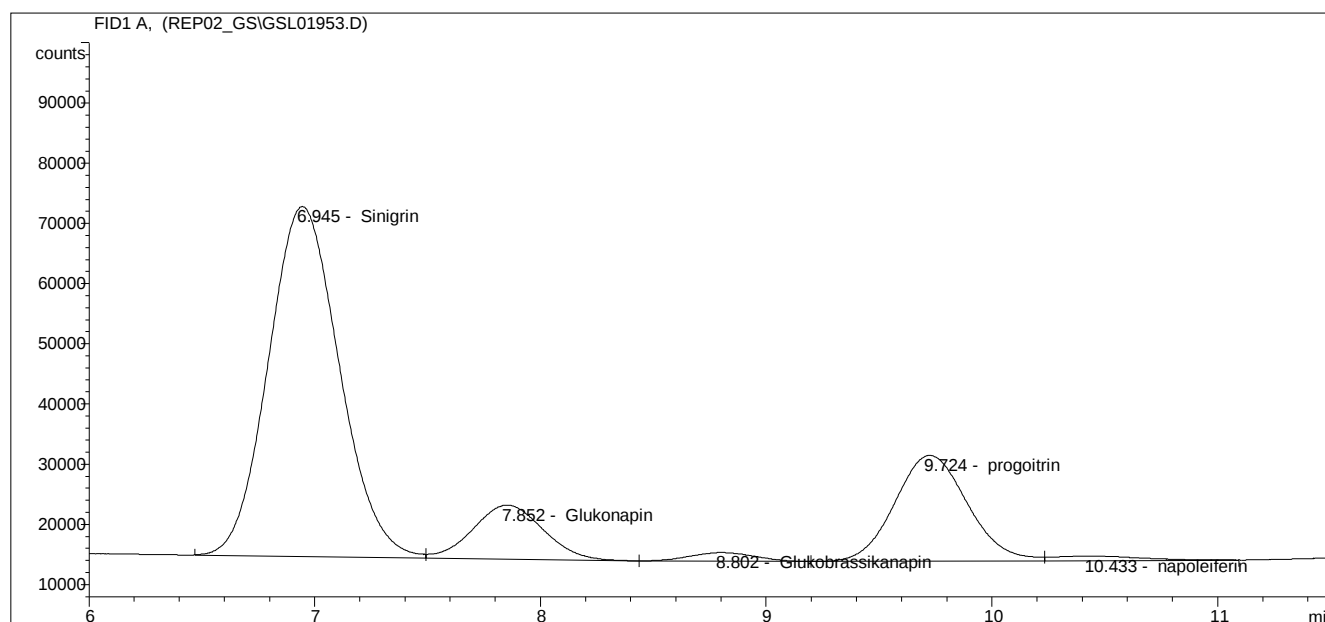
4μmol/g při obsahu GSL od 20 do 35μmol/g

Reprodukovatelnost dle ČSN EN ISO je 4μmol/g při obsahu GSL do 20μmol/g

8μmol/g při obsahu GSL od 20 do 35μmol/g



Obr. č.4: Chromatogram reálného vzorku metódou HPLC



Obr. č.5: Chromatogram reálného vzorku metódou GC

5. Závěr

Při porovnání výsledků stanovení sumy GSL v řepce olejce získaných metodou HPLC a metodou GC je zřejmé, že nově zavedená a akreditovaná metoda HPLC je pro stanovení GSL výhodnější. Použití této metody umožňuje stanovení 13 jednotlivých GSL oproti 4 GSL stanovovaným metodou GC.

Postup dle ČSN EN ISO 9167-1 je vhodný pro stanovení GSL. Metodu je možné použít pro stanovení sumy GSL v neodtučněném i odtučněném řepkovém šrotu metodou HPLC extrakcí metanolem nebo vroucí vodou při použití sinigrinu jako vnitřního standardu.

Z výše uvedených závislostí vyplývá, že účinnosti extrakcí GSL methanolem nebo vroucí vodou v neodtučněném řepkovém šrotu jsou srovnatelné. Velká výhoda extrakce vroucí vodou je ve výrazném snížení práce s vysoce toxickým vroucím methanolem.

Toto byl hlavní důvod návrhu výše zmíněného postupu pro odbor odrůdového zkušebnictví. Všechny vzorky budou proměřeny akreditovaným postupem za použití extrakce vroucí vodou. Pokud naměřená hodnota GSL u takto extrahovaných vzorků bude vyšší než 15• mol/g vzorku při přepočtu na 46%-ní obsahu oleje ve vzorku, bude vzorek proměřen znovu za použití extrakčního činidla metanolu. U vzorků s vyšším obsahem GSL by extrakce vroucí vodou mohla vést ke zkreslení výsledků, především z důvodu přítomnosti velkého množství termolabilních GSL.

Seznam použité literatury

- 1) Zehnálek, P., Holubář, J.: Přehled odrůd olejnin a kmínu 2003, ÚKZÚZ Brno 2003, ISBN 80-86548-28-7
- 2) Velíšek, J.: Chemie potravin, OSSIS Tábor (1999)2: 37,202,208
- 3) Stančík, L.: Amperometrické stanovení glukosinolátů pomocí enzymového biosenzoru, Diplomová práce, MU Brno 1993
- 4) Kolovrat, K.: Pracovní materiál VÚOL Opava
- 5) Hrnčířik, K., Velíšek, J., Davídek, J.: Comparison of HPLC and GLC methodologies for determination of glucosinolates using reference material, Z Lebens Unter Frosch A (1998)206: 103-107
- 6) Šulová, R.: Stanovení glukosinolátů v řepce olejné metodou HPLC, Bulletin LO 2001/3, LO ÚKZÚZ Brno 2001, ISSN 1212-5466
- 7) Centner, V.: EffiValidation 1.3 (2001) Effichem, uživatelský program

Seznam zkratek:

HPLC – kapalinová chromatografie

DAD – diode array detektor

GC – plynová chromatografie

FID – plamenoionizační detektor

GSL – glukosinoláty

CRM – certifikovaný referenční materiál

MeOH – vroucí 70% methanol

H₂O – vroucí redestilovaná voda

HTM – hexametyldisilazan

TSC – trimethylchlorsilan

RP1 – řepka pokus 1

RP2 – řepka pokus 2

Stanovení celkového dusíku v lesních půdách metodou blízké infračervené spektroskopie

David Čížmár

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Hroznová 2, 656 06 Brno, Národní referenční laborator –Regionální oddělení Brno, e-mail: david.cizmar@ukzuz.cz

Úvod

Dusík (N) je prvek, který rostliny potřebují na asimilaci proteinů s výjimkou luštěnin a několika dalších druhů rostlin. Dusík je získáván z půdy, a zpět do půdy se dostává ze zbytků rostlin obsahujících dusík. Půdní dusík je v půdách přítomen z 95-98 % v organické vazbě, a to v huminových látkách, rostlinných zbytcích, biomase a odumřelých organismech. Obsah organicky vázaného N v minerálních půdách je v úzké korelaci s organickým C a kolísá v mezích 0.02-0.4%. V organických půdách (humusový horizont lesních půd) může dosáhnout hodnoty až 3%. Předpokládá se, že ve většině orníc je 30-70% organického N vázáno v aminokyselinách a aminocukrech, zabudovaných do molekul huminových látek a 1-7% připadá na báze nukleových kyselin. Anorganicky vázaný N se vyskytuje převážně ve formě lehce rozpustných a též snadno vyplavitelných dusičnanů (NO_3^-) a jen v malé míře jako rozpuštěné popř. výměnné kationty NH_4^+ . Stanovení celkového dusíku N_{tot} tedy zahrnuje stanovení dusíku amonného, dusičnanového, dusitanového a organicky vázaného.

Od roku 1993 ÚKZÚZ provádí dlouhodobý projekt sledování průzkumu výživy lesních ekosystémů. Získané výsledky mají velký význam pro kontrolu stavu našich lesních porostů a v nemalé míře přispívají ke kontrole podmínek lesního hospodaření. Důležitou součástí tohoto projektu je sledování úlohy dusíku v procesu výživy a dále sledování distribuce dusíku v horizontech lesní půdy. Zdá se totiž, že klíčovou roli v půdních transformačních procesech vstupujícího dusíku by mohl sehrávat obsah uhlíku a dusíku v jednotlivých horizontech lesních půd. Poměr těchto dvou parametrů C:N vyjadřuje významný faktor při hodnocení kvality půdy.

V současné době běžně provádí pracoviště NIR spektroskopie LO Brno stanovení obsahu oxidovatelného uhlíku C_{ox} v jednotlivých horizontech lesních půd. Pro velký zájem odboru agrochemie půd a výživy rostlin stanovit poměr C:N byla vypracována metodika pro

stanovení celkového dusíku N_{tot} v organickém a minerálním horizontu lesních půd metodou NIR spektroskopie.

Klasická metoda stanovení celkového dusíku je časově náročná na mineralizaci vzorku a jeho následnou destilaci. Zároveň je také náročná na spotřebu chemikálií a není příliš šetrná k životnímu prostředí, neboť mineralizace vzorku probíhá s koncentrovanou kyselinou sírovou. Metoda NIR spektroskopie je rychlá a vhodná analytická technika umožňující nahrazení klasické laboratorní metody stanovení celkového dusíku.

Cílem tohoto vývojového úkolu bylo optimalizovat vlastní metodu NIR spektrometrie a vyhodnotit možnosti této metody na predikci obsahu celkového dusíku v lesních půdách.

MATERIÁL A METODY

Princip stanovení celkového dusíku N_{tot}

Pro stanovení všech forem dusíku jedním procesem bez předchozí separace nebo frakcionace připadají v úvahu dvě principiálně odlišné metody. Starší metoda podle Dumase využívá oxidaci za sucha s klasickým gazometrickým stanovením vzniklého dusíku. V praxi se prosadily četné modifikace Kjeldahlovy metody mineralizace za mokra s kyselinou sírovou a s různými přísadami, při nichž se organické sloučeniny dusíku oxidují na NH_4^+ , který se pak spolu s NH_4^+ přítomným již ve vzorku vydestiluje z alkalického prostředí jako NH_3 do určitého objemu odměrného roztoku kyseliny nebo do dostatečného přebytku roztoku H_3BO_3 . Zde se pak stanoví neutralizační titrací a to v případě destilace do odměrného roztoku kyseliny titrací jejího nespotřebovaného nadbytku odměrným roztokem zásady, v případě destilace do roztoku H_3BO_3 přímou titrací odměrným roztokem kyseliny. Ve všech uvedených případech se stanovení celkového dusíku provádí pomocí příslušných plně automatizovaných přístrojů. Při mineralizaci se ke vzorku přidávají jednak soli ke zvýšení bodu varu mineralizátu, jednak katalyzátory k urychlení oxidace.

Stanovení metodou NIR spektroskopie

Celkem bylo proměřeno metodou NIR spektroskopie více jak 600 vzorků lesních půd minerálního horizontu a 300 vzorků lesních půd organického horizontu. Všechny vzorky byly analyzovány klasickou metodou dle Kjeldahla na regionálním laboratorním oddělení ÚKZÚZ v Liberci a poté byly předány a analyzovány na pracovišti NIR spektroskopie v ÚKZÚZ Brno.

NIR měření byla prováděna ve viditelné a blízké infračervené spektrální oblasti přístrojem FOSS NIRSystem 6500 se scanujícím monochromátorem s reflektanční detekcí. Každý standardně upravený a vysušený vzorek lesní půdy byl umístěn do kyvety typu small ring cup s křemenným okénkem o průměru 4.5 cm. Spektrální reflektance udávaná jako průměr ze 25 spekter byla zobrazena jako logaritmus inverzní reflektance ($\log 1/R$) ve 2 nm intervalech v rozsahu 400-2500 nm. Na vývoj kalibračního modelu byla vybrána NIR spektrální oblast (1100-2500 nm)

Vývoj NIR metody pro stanovení N_{tot} v půdách je založen na vytvoření kalibrační rovnice, která kvantifikuje vztah mezi informací NIR absorpce a hodnotou stanovenou klasickou metodou. Metoda NIR spektroskopie je užitečná pouze tehdy, jestliže je vztažena na přesnou a správnou klasickou metodu. Pro získání dostatečně kvalitních kalibračních modelů jsme rozšířili komerčně dodávanou softwarovou výbavu přístroje FOSS NIRSystem 6500 o Software NIR calibration 1.0 (fa EFFICHEM, Lysice, CZ).

K vytvoření vztahu mezi spektry NIR a měřenými chemickými vlastnostmi sledovaného materiálu je možné použít různé kalibrační metody. Mezi nejčastěji používané techniky kalibrace v NIR spektroskopii patří: PCR (regrese na hlavních komponentách), PLS (vícenásobné lineární regrese metody nejmenších čtverců), LWR (lokálně vážená regrese), SMLR (vícenásobná stepwise lineární regrese) a ANN (regrese s použitím umělých neuronových sítí). Žádná z těchto uvedených kalibračních technik nemá univerzální využití, protože kalibrační technika vhodná pro danou aplikaci nemusí být akceptovatelná také pro ostatní. My jsme pro vytváření kalibračních modelů využili kalibrační techniku typu PLS a SMLR.

Ideální kalibrační model je vybírán tak, aby dával co nejmenší chybu křížové validace (RMSECV) a nejvyšší hodnotu korelačního koeficientu (R^2). RMSECV je nejčastěji používaná charakteristika pro hodnocení kvality predikce v NIR spektroskopii. Korelační koeficient (R^2) je v NIR spektroskopii velmi často používán v kombinaci s RMSECV. Charakterizuje míru korelace mezi výsledky z klasické metody a NIR metody.

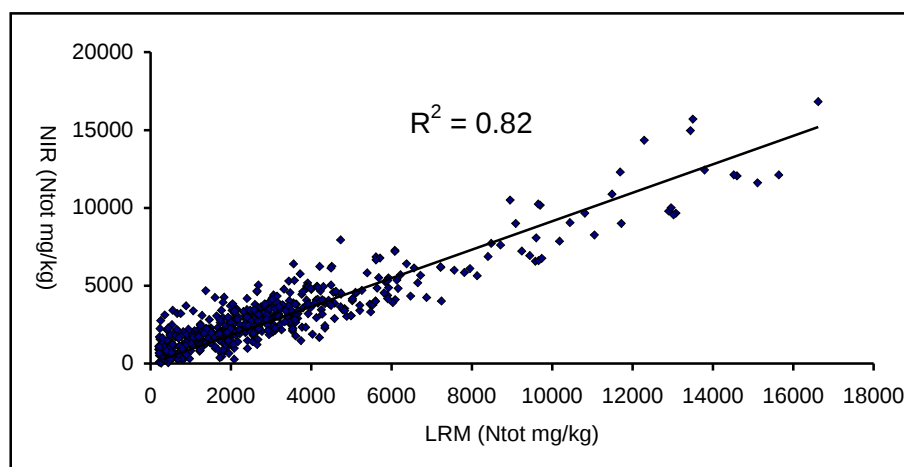
Výsledky a diskuse

Vzorky minerálního a organického horizontu lesních půd se liší v koncentracích N_{tot} , proto jsme na vývoj kalibračních modelů použili dvě samostatné kalibrace a to pro organický a minerální horizont (Obr.1–4). Kvalitativní parametry našich vytvořených kalibračních

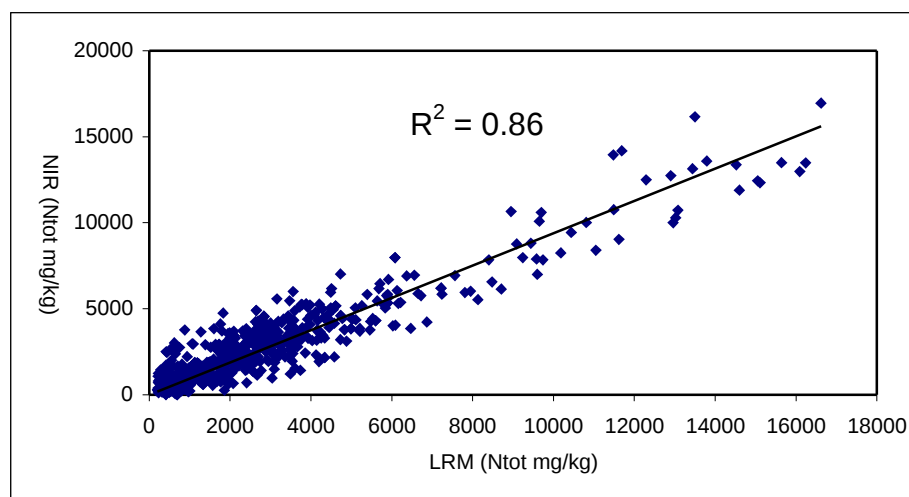
rovníc a použitá regresní technika jsou uvedeny v tabulce 1. Je evidentní, že N_{tot} v organickém horizontu lesních půd může být měřen metodou NIR spektroskopie přesněji než N_{tot} v minerálním horizontu lesních půd.

Hodnota RMSECV je vyšší pro minerální horizont obsahující nižší koncentraci N_{tot} , protože většina vzorků půd minerálního horizontu obsahuje koncentraci N_{tot} v rozsahu do 7000 mg/kg, zatímco v organickém horizontu to je 10 000 – 20 000 mg/kg. Citlivost změn kvalitativních parametrů na obsah N_{tot} ve vzorcích je tedy zřejmá.

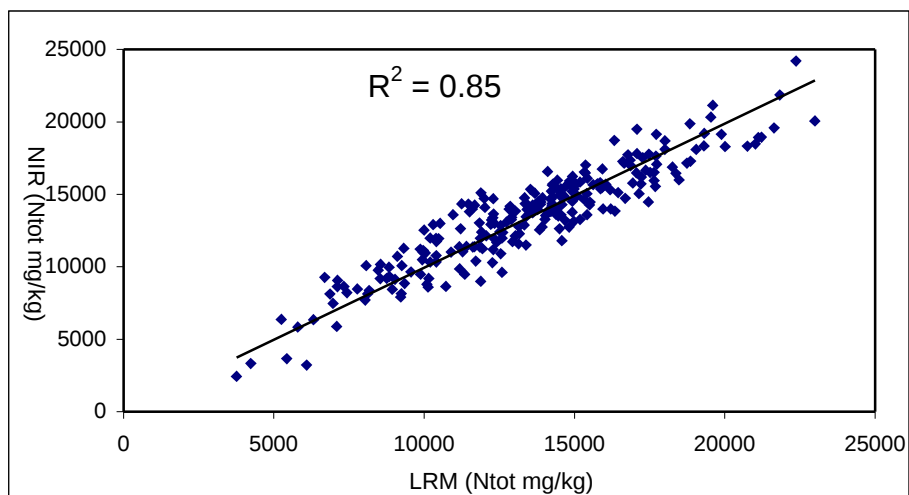
Dosavadní výsledky ukázaly, že je možné měřit N_{tot} jak v organickém, tak minerálním horizontu lesních půd. Při nižších koncentracích N_{tot} je predikce pomocí NIR techniky omezena. Přesto NIR technika dovoluje stanovení půdního N_{tot} ve velmi krátké době s přijatelnou přesností a správností.



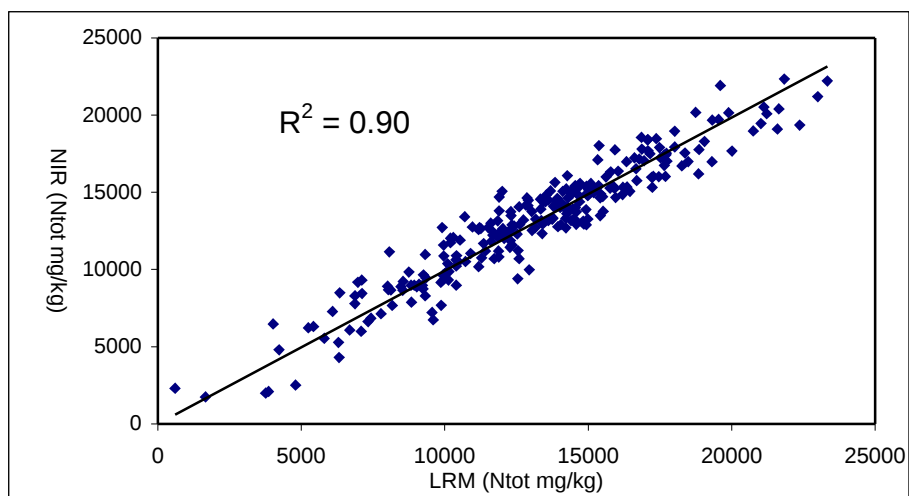
Obr.1 Kalibrační graf N_{tot} minerálního horizontu, regrese PLS



Obr.2 Kalibrační graf N_{tot} minerálního horizontu, regrese SMLR



Obr.3 Kalibrační graf Ntot organický horizont, regrese PLS



Obr.4 Kalibrační graf Ntot organický horizont, regrese SMLR

Tabulka č. 1

Typ Regrese	R^2	RMSECV (mg/kg)
Ntot – Organický horizont		
PLS	0,85	$1,42 \times 10^3$
SMLR	0,90	$1,24 \times 10^3$
Ntot – Mineralní horizont		
PLS	0,82	$1,10 \times 10^3$
SMLR	0,86	$1,00 \times 10^3$

Závěr

Pro hodnocení kvality půdy je důležité znát poměr C:N. Obsah Cox metodou NIR spektroskopie stanovujeme v minerálním a organickém horizontu lesních půd už od roku 2002. Výsledkem této práce jsou kalibrační rovnice pro stanovení obsahu N_{tot} v minerálním a organickém horizontu lesních půd. Z prezentovaných výsledků (RMSECV a R^2 a kalibračních rovnic) je zřejmé, že tato metoda je vhodná pro stanovení N_{tot} v lesních půdách.

Literatura

1. John S.Shenk, Mark O.Westerhaus – *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy, Handbook of Near-Infrared Analysis*
2. Vitezslav Centner – *Methods and Diagnostics in Multivariate Calibration*, 1998
3. Cheng-Wen Chang, David A.Laird, Maurice J.Mausbach and Charles R.Hurburgh,Jr.– *Near-Infrared reflectance spectroscopy – Principal components regression analyses of soil properties, Soil Sci. Soc. Am. J.*, 65480-490 (2001)
4. R.C.Dalal and R.J.Henry – *Simultaneous determination of moisture. Organic carbon, and total nitrogen by near infrared reflectance spectrophotometry, Soil Sci. Soc. Am. J.*, Vol. 50, 1986
5. Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – *Analýza půd III*, 1997