

**LIŠĆE OBIČNE BUKVE (*Fagus sylvatica* L.), REFERENTNI UZORAK  
ICP FORESTA ZA MEĐULABORATORIJSKE USPOREDBE  
I NJEGOVA PRIMJENJIVOST ZA ODREĐIVANJE  
UKUPNOG DUŠIKA I UGLJIKA U LIŠĆU**

BEECH LEAVES (*Fagus Sylvatica* L.), REFERENCE SAMPLE OF  
ICP FORESTS AND ITS APPLICABILITY IN DETERMINATION  
OF TOTAL NITROGEN AND CARBON IN LEAVES

**Tamara JAKOVLJEVIĆ\***, **Gábor PÁNCZÉL\*\***, **Miklós MANNINGER\*\***,  
**Nenad POTOČIĆ\***, **Ivan SELETKOVIĆ\***, **Tomislav DUBRAVAC\***,  
**Marija GRADEČKI-POŠTENJAK\***

*SAŽETAK: U sklopu Međunarodnog programa za procjenu i praćenje utje-  
caja zračnog onečišćenja na šume (ICP Forests) provode se stalna istraživa-  
nja kemijskih metoda ispitivanja lišća i iglica s ploha intenzivnog motrenja.  
Hrvatska sudjeluje sa 7 ICP ploha tipičnih šumskih zajednica. Kako bi se  
mogla pratiti pouzdanost primijenjenih metoda u laboratorijskim analizama i  
osiguranje kvalitete rezultata, organiziraju se svake godine međulaboratorijske  
usporedbe na uzorcima pripremljenim u laboratorijima zemalja koje su  
uključene u ICP Forests program. Hrvatski šumarski institut pripremio je lišće  
obične bukve za potrebe programa, koje se sada koristi i kao laboratorijski re-  
ferentni materijal. U ovom radu napravljena je međulaboratorijska usporedba  
i ispitana ponovljivost i obnovljivost između mjernih rezultata određivanja  
ukupnog dušika i ugljika u referentnom lišću obične bukve, na elementarnom  
analizatoru CNS 2000 u laboratoriju Hrvatskog šumarskog instituta i na ele-  
mentarnom analizatoru EA 300 u laboratoriju Mađarskog šumarskog insti-  
tuta, uključenim u ICP Forests program. Statistička analiza obuhvaćala je  
usporedni prikaz mjernih rezultata hrvatske metode (Metoda A) i mađarske  
metode (Metoda B), deskriptivnu statistiku za obje metode, F test za testirane  
razlike između varijanci obje metode, regresijsku analiza, t-test za zavisne  
uzorke, Boxplot dijagrame i kontrolne karte ponovljivosti metode B. Iz uspo-  
rednih prikaza rezultata vidljivo je da postoje velike oscilacije rezultata Me-  
tode B za dušik i da neki rezultati prelaze gornju specifikacijsku granicu. Za  
ugljik, metoda B daje veće vrijednosti od metode A, ali one su unutar specifi-  
kacijskih granica i manje su varijacije u odnosu na metodu A (Slika 2.) F pre-  
lazi kritičnu vrijednost, ali varijanca metode A je manja od varijance metode  
B. Stoga je metoda A preciznija. Za ugljik, izračunati F prelazi kritičnu vrijed-  
nost. Varijanca metode A je značajno veća od metode B s 95 % vjerojatnošću  
(Tablica 5). Regresijskom analizom dobiveni koeficijenti korelacije r za me-  
tode određivanja dušika i ugljika (Tablica 6) govore o srednje pozitivnoj pove-  
zanosti. T-Testom (Tablica 7) je potvrđeno, da rezultati dobiveni dvjema*

\* Dr. sc. Tamara Jakovljević, dr. sc. Nenad Potočić,  
dr. sc. Ivan Seletković, dr. sc. Tomislav Dubravac,  
Mr. sc. Marija Gradečki-Poštenjak, Hrvatski šumarski institut,  
Cvjetno naselje 41, 10450 Jastrebarsko, Hrvatska,  
tamaraj@sumins.hr

\*\* Gábor Pánczél, Miklós Manninger, Hungarian Forest Reserach  
Institute, Frankel L. u. 42–44, Budimpešta, Mađarska

metodama za određivanje ukupnog dušika i ugljika uz razinu pouzdanosti od 95 % su značajno različiti.

Kontrolni grafikoni za dušik Metode B pokazuju razliku u ponovljivosti mjerenja i više od 30 % rezultata nalazi se izvan specifikacijskih granica (Slika 4.). Ponovljivost rezultata ugljika je dobra. Kemijske analize lišća ograničene su za izbor instrumenata i metoda za određivanje pojedinih elemenata, stoga ovakva testiranja potvrđuju bolju primjenjivost elementarnih analizatora, kao što je CNS 2000 od EA 300 za određivanje dušika i ugljika zbog specifičnosti uzoraka.

**Ključne riječi:** elementarni analitičar, CNS 2000, EA 300, ICP Forests, lišće obične bukve, međulaboratorijske usporedbe, referentni uzorak, ukupni dušik i ugljik

## UVOD – Introduction

Stanje ishrane drveća često je pokazatelj stanja šumskog ekosustava. Kemijske analize lišća i iglica preporučena su metode za određivanje mineralnog statusa drveća. Ove metode zahtijevaju standardne vrijednosti s kojima se dobivene koncentracije mikro i makroelemenata mogu usporediti (Van de Burg, 1990). Praćenje stanja ishrane drveća provodi se na tzv. plohama inten-

zivnog motrenja u Hrvatskoj, koje sudjeluju u programu ICP Forests. Da bi se moglo govoriti o ishrani šumskih vrsta drveća i o točnosti potrebno, je biti siguran da su utvrđene količine biogenih elemenata točne i analitičke metode pouzdane. Pouzdanost primijenjenih metoda potvrđuje se međulaboratorijskim usporedbama, koje se provode u okviru ICP Forests.

### Međulaboratorijske usporedbe u okviru ICP Forest

#### *Interlaboratory comparison of in ICP Forests programme*

Međulaboratorijske usporedbe obuhvaćaju organiziranje, provedbu i vrednovanje ispitivanja istog ili sličnog predmeta ispitivanja, provedenog u dva ili više laboratorija u skladu s prethodno utvrđenim uvjetima (HAA, 2009).

One predstavljaju bitan podatak za osiguranje kvalitete i kontrolu metoda ispitivanja. U sklopu ICP Foresta organizirane su za gotovo sve aktivnosti obuhvaćene monitoringom stanja šumskih ekosustava i sudjelovanje je obavezno za sve članice ICP Forest (Marchetto i sur., 2009).

Za određivanje svojstava pojedine metode potrebno je u cijelom postupku primjene umjeriti instrumente s

referentnim etalonima i referentnim materijalima, usporediti rezultate s rezultatima dobivenim u međulaboratorijskim usporedbama, sustavno ocijeniti čimbenike koji utječu na rezultat i ocijeniti nesigurnost rezultata, koja se temelji na znanstvenom razumijevanju teoretskih načela metode i praktičnome iskustvu (HRN EN/ ISO 17 025, 2007).

Metode, koje laboratoriji koriste za analizu uzoraka biljnog materijala preporučene su od ICP Foresta (Raitio, 1995). Metode su razvijene na osnovi višegodišnjih istraživanja i ispitivanja najprihvatljivijih metoda za ovu vrstu uzoraka.

### Laboratorijski referentni materijal – *Laboratory reference material*

2004. godine za potrebe 7. i 8. Međulaboratorijske usporedbe ICP Forest-a srušeno je stablo obične bukve (Šumarija Jastrebarsko) u teškim metalima nezagađenom području. Prema ICP Forests priručniku za analizu lišća i iglica, uzorkovanje četinjača provodi se u tijeku mirovanja, a listača prije žućenja.

Lišće je osušeno na 105°C, samljeveno i homogenizirano. Zbog određivanja mangana, željeza, bakra, kadmija, aluminija i olova u lišću, mlin koji se koristi za pripremu uzorka ne smije kontaminirati uzorke metalima (Jakovljević, 2006).

Prilikom homogenizacije, neophodno je bilo pažljivo rukovati s uzorkom kako bi se izbjegla kontaminacija. 1 kg uzorka koristi laboratorij Šumarskog instituta, Jastrebarsko, kao interni referentni materijal za provjeru ponovljivosti i obnovljivosti metoda.



Slika 1. Lišće obične bukve sa ICP plohe u Hrvatskoj  
Figure 1 Beech leaves from ICP plot in Croatia

(Foto – photo: M. Gradečki-Poštenjak)

Ovako pripremljeni uzorak poslan je u Forest Foliar Co-ordinating Centre u Beč, odakle je distribuirano u 29 europskih zemalja, 43 laboratorija koji su sudjelovali u međulaboratorijskim usporedbama. Nacionalni laboratoriji uključeni u program ICP Forests moraju sudjelovati u međulaboratorijskim ispitivanjima te provesti analize obveznih parametara (dušik, sumpor, ugljik, fosfor, kalij, kalcij i magnezij) te ako imaju mo-

gućnosti za izborne parametre (željezo, bakar, olovo, kadmij, bor, cink). Za svaki pojedini element ICP Forest određuje dozvoljeno odstupanje koje se kreće od 5–30 % (Tablica 1). Lišće obične bukve pokazuje ujedno i dobar odnos biogenih elemenata.

Kako bi se poboljšala kvaliteta analiza biljnog materijala međulaboratorijske usporebe provode se svake godine.

Tablica 1. Srednja vrijednost i dozvoljena odstupanja koncentracija biogenih elemenata u referentnom uzorku lišću obične bukve – Hrvatska (prema UN-ECE ICP Forests, 2007)

Table 1 Mean concentration of biogen elements and tolerable variations in the reference sample of beech leaves – Croatia (modified from UN-ECE ICP Forests, 2007)

element - element	N mg/g	P mg/g	K mg/g	S mg/g	C %	Ca mg/g	Mg mg/g
Srednje vrijednosti/ Mean values	20.17	1.24	5.25	1.40	50.65	7.16	2.55
Dozvoljena odstupanja/ Tolerable variations	± 10 %	± 15 %	± 15 %	± 20 %	± 5 %	± 15 %	± 15 %

### Metode određivanja dušika i ugljika u biljnom materijalu u hrvatskom i mađarskom laboratoriju

#### Methods for determination of total nitrogen and carbon in croatian and hungarian laboratory

Metode, koju primjenjuje laboratorij Šumarskog instituta, određivanje ukupnog dušika i ugljika u biljnom materijalu, akreditirane su prema međunarodnoj normi za ispitne laboratorije HRN EN ISO/IEC 17 025 te kao takve podliježu godišnjem nadzoru Hrvatske akreditacijske agencije. Područje i točnost vrijednosti koje se mogu dobiti iz ovako validiranih metoda (npr. nesigurnost rezultata, selektivnost metode, linearnost, granice ponovljivosti ili obnovljivosti, neosjetljivost na vanjske utjecaje, osjetljivost na matrice uzoraka) kako su

ocijenjene za predviđenu uporabu, moraju odgovarati potrebama šumarstva.

Prema zahtjevima norme laboratorij mora imati postupke za praćenje kvalitete rezultata ispitivanja. Kvaliteta se prati uključivanjem u programe ispitivanja osposobljenosti i ako je to moguće sudjelovanjem u bilateralnim međulaboratorijskim usporedbama.

Stoga su ukupni dušik i ugljik određivani ICP Forest referentnom metodom na elementarnom analizatoru CNS 2000 u hrvatskom Šumarskom institutu

Tablica 2. Pregled karakteristika metoda za određivanje ukupnog dušika i ugljika u Hrvatskoj i Mađarskoj

Table 2 Overview of method specifications for the determination of total nitrogen and carbon in Croatia and Hungary

instrument - instrument	CNS 2000 (Hrvatska - Croatia) Metoda A- Method A	EA 3000 (Mađarska - Hungary) Metoda B- Method B
princip-princip	suho spaljivanje - dry combustion	suho spaljivanje - dry combustion
temperatura-temperature	1250 °C	max 1000 °C
detekcija - detection	C = infracrvena spektrometrija infrared spectrometry N = termalna provodljivost thermal conductivity	C = plinska kromatografija gas chromatography N = termoprovodljivost thermal conductivity
plinovi - gasses	kisik-oxigen helij-helium komprimirani zrak compressed air	helij - helium kisik-oxigen
referentni materijal reference material količina dušika i ugljika u referentnom materijalu za kalibraciju concentration of nitrogen and carbon in reference material for calibration odvaga za kalibraciju calibration weight	rašeno brašno - RYE flour  C % 45,06 ± 0,20 N % 1,71 ± 0,02  100 mg - 400 mg	BBOT 2,5 - bis(5-terc-butyl-2-benzo-oksalo-2-il)tiufen C % 72,53 ± 0,20 N % 6,51 ± 0,02  0,05 mg - 6 mg
masa uzorka-sample weight	~ 200 mg	2 mg - 4 mg

(Metoda A) te na elementarnom analizatoru EA 3000 u mađarskom Šumarskom institutu (Metoda B). Obje metode predstavljaju elementarne analize. Specifičnosti metoda dane su u tablici 2.

Ispitivanja provedena u dva laboratorija imala su zadatak utvrditi da li postoji statistički značajna povezanost između mjernih rezultata, jer tada mjerni rezul-

tati metode A bitno ne odstupaju od mjernih rezultata metode B. Cilj ovog ispitivanja je utvrditi ponovljivost (isti uvjeti, isti laboratorij, isti instrument i isti analitičar u kratkom razdoblju) i obnovljivost (različiti uvjeti, različiti laboratoriji, različiti instrumenti, različiti analitičari u dužem razdoblju) metoda određivanja istih parametara.

### MATERIJALI I METODE RADA – Material and methods

Rezultati svih određivanih varijabli statistički su obrađeni. Kako bi mogli utvrditi kakva je povezanost između dviju metoda. Početna hipoteza je da mjerni rezultati Metode A odgovaraju mjernim rezultatima metode B. Ulazni podaci uključivali su: specifikacijske granice za promatrane parametre uzete iz ICP Forests interlaboratorijskih ispitivanja (ICP Forests, 2007) za lišće bukve sa sadržajem dušika od 18,15 mg/g - 22,19 mg/g i ugljika 48,12 g/100 g - 53,18 g/100 g dobiveni iz evaluiranih rezultata ICP Forest-a, prema kojemu rezultati određivanja dušika mogu odstupati utvrđene vrijednosti 10 %, a od ugljika 5 %.

RSD mjerenja promatranih parametara je između 1,5 % - 2%, razina značajnosti za statističko testiranje je 95% ( $p < 0,05$ ) a 95% granice greške su  $\pm 3SD$ .

Koraci statističke obrade obuhvaćali su:

1. određivanje veličine uzorka (broj potrebnih mjerenja) za statističko testiranje  
 Za mjerne rezultate na osnovi intervala pouzdanosti za aritmetičku sredinu  

$$n = (2\sigma/\Delta)^2 \quad (1)$$

gdje je  $\sigma$  - standardna devijacija  
 a  $\Delta$  - preciznost procjene (širina granica greške)  
 $SD = RSD/100 \cdot \text{referentna vrijednost} \quad (2)$   
 Iz zadane gornje (GSG) i donje specifikacijske granice (DSG) izračunata je standardna devijacija:  
 $SD = (GSG - DSG)/6 \quad (3)$   
 (Košiček, 2007).

2. usporedni prikaz mjernih rezultata hrvatske metode (Metoda A) i mađarske metode (Metoda B)
3. deskriptivnu statistiku za obje metode
4. F test za testirane razlike između varijanci obje metode
5. regresijska analiza
6. t-test za zavisne uzorke
7. Boxplot
8. kontrolne karte ponovljivosti metode B

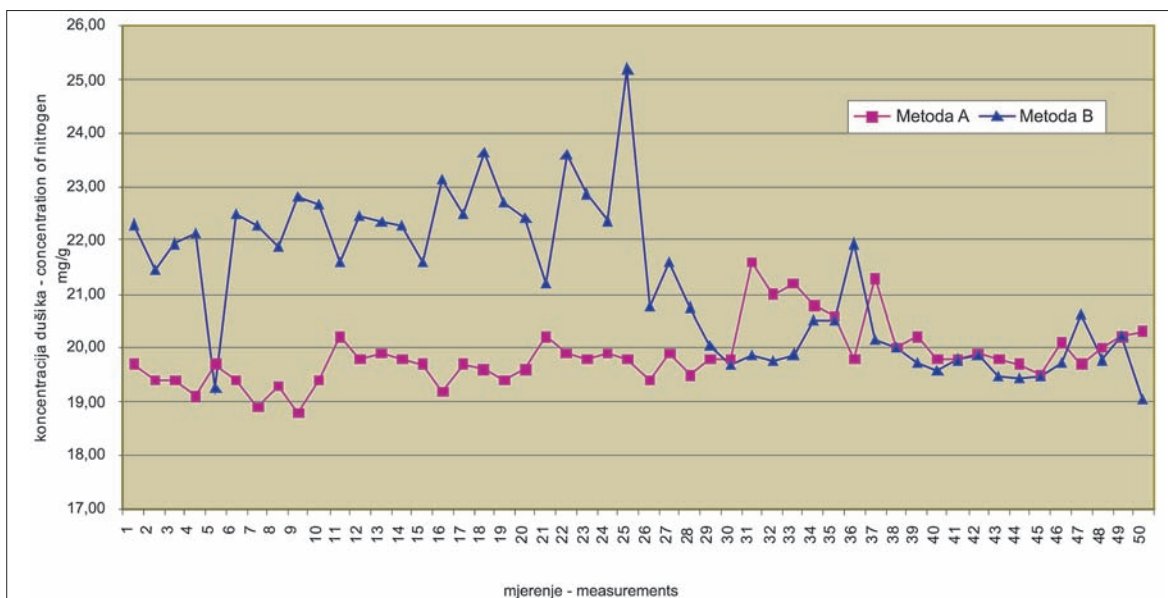
Za sve statističke analize razina značajnosti od 5 % smatra se statistički važnim.

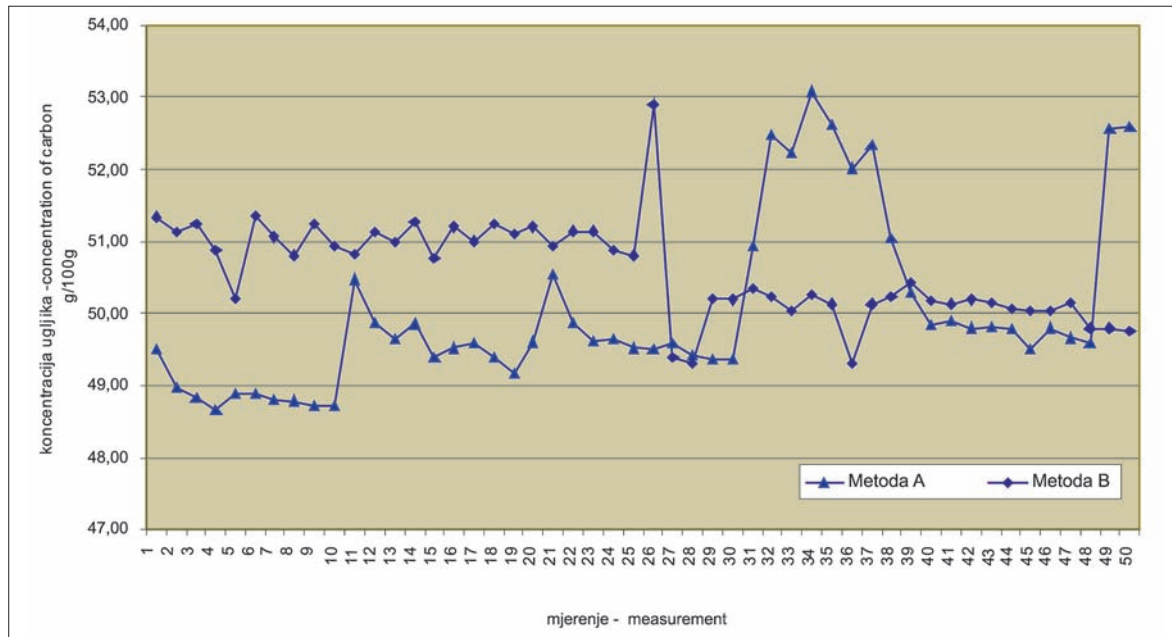
Svi parametri analiza, kao i grafički prikazi sačinjeni su korištenjem programa EXCEL.

### REZULTATI I RASPRAVA – Results and discussion

Dvije metode su općenito gledajući vrlo slične. Obje predstavljaju elementarne analize. Nakon određivanja veličine uzorka  $N = 50$  (izrazi 1, 2, 3), napravljeni su usporedni prikazi iz kojih je vidljivo da postoji velika oscilacije rezultata Metode B za dušik i da neki

rezultati prelaze gornju specifikacijsku granicu. Za ugljik, metoda B daje veće vrijednosti od metode A, ali one su unutar specifikacijskih granica i manje su varijacije u odnosu na metodu A (Slika 2.)





Slika 2. Usporedni prikaz rezultata određivanja ukupnog dušika i ugljika u hrvatskom laboratoriju (Metoda A) i mađarskom laboratoriju (Metoda B)

Figure 2 Comparison of the results for determination of total nitrogen and carbon in Croatian laboratory (Method A) and Hungarian laboratory (Method B)

Napravljena je deskriptivna statistika (srednja vrijednost, standardna devijacija, broj razmatranih rezultata, minimum, maksimum i medijan) za metode određivanja ukupnog dušika i ukupnog ugljika (Tablica 3. i 4.)

Tablica 3. Deskriptivna statistika za metode određivanja ukupnog dušika u hrvatskom laboratoriju (Metoda A) i mađarskom laboratoriju (Metoda B)

Table 3 Descriptive statistics for methods of determining total nitrogen in Croatian lab (Method A) and Hungarian lab (Method B)

Određivanja dušika – Determination of nitrogen	Metoda A – Method A (mg/g)	Metoda B – Method B (mg/g)
Mean	19,866	21,2234
Standard Error	0,079826853	0,203023998
Median	19,8	21,315
Mode	19,8	22,49
Standard Deviation	0,564461094	1,435596456
Sample Variance	0,318616327	2,060937184
Minimum	18,8	19,06
Maximum	21,6	25,19
Sum	993,3	1061,17
Count	50	50
Confidence Level (95,0 %)	0,160418065	0,407991991

Tablica 4. Deskriptivna statistika za metode određivanja ukupnog ugljika u hrvatskom laboratoriju (Metoda A) i mađarskom laboratoriju (Metoda B)

Table 4 Descriptive statistics for methods of determining total carbon in Croatian lab (Method A) and Hungarian lab (Method B)

Određivanje ugljika – Determination of carbon	Metoda A – Method A (g/100g)	Metoda B – Method B (g/100g)
Mean	50,5854	
Standard Error	0,170723942	0,094211252
Median	49,625	50,6025
Mode	49,49	51,234
Standard Deviation	1,207200573	0,666174151
Sample Variance	1,457333224	0,443788
Minimum	48,66	49,299
Maximum	53,08	52,904
Sum	2501,44	2529,27
Count	50	50
Confidence Level (95,0%)	0,3430826	0,189324595

F-Test – testirano je da li se metoda A i metoda B razlikuju u svojoj preciznosti ( $F \geq 1$ ). Nulta hipoteza je istinita tj. vrijednost F blizu 1. U sličaju količine dušika on je različit od 1. Izračunati F prelazi kritičnu vrijednost i nulta hipoteza je odbačena, ali varijanca metode A je manja od varijance metode B. Stoga je metoda A

preciznija. Za ugljik, izračunati F prelazi kritičnu vrijednost i nulta hipoteza je odbačena. Varijanca metode A je značajno veća od metode B s 95 % vjerojatnošću. Metoda B za ugljik je preciznija, iako su sve vrijednosti ugljika i za metodu a unutar specifikacijskih granica (Tablica 5).

Tablica 5. Rezultati F-testa: Varijanca za dušik i ugljik određenih dvjema različitim laboratorijima

Table 5 Results of F test: Variance for nitrogen and carbon obtained by two different labs

F-test za dušik i ugljik/ F-Test Two-Sample for Variances of nitrogen and carbon	dušik Metoda A/Method A	nitrogen Metoda B/Method B	ugljik Metoda A/Method A	carbon Metoda B/Method B
Mean	50,0288	50,5854	19,866	21,2234
Variance	1,457333224	0,443788	0,3186163	2,060937184
Observations	50	50	50	50
df	49	49	49	49
F	3,283850002		0,1545978	
P(F<=f) one-tail	2,81444E-05		5,113E-10	
F Critical one-tail	1,607289464		0,6221655	

S obzirom da je regresijskom analizom dobiveni koeficijenti korelacije r za metode određivanja dušika i ugljika (Tablica 6) govore o srednje pozitivnoj povezanosti (0,40-0,50) dviju metoda (Vasilj, 2000). Nadalje smo razmatrali da li je koeficijent korelacije r stvarno signifikantan. Signifikantnost korelacija testirana je t-testom. t-Testom (Tablica 7) je potvrđeno, da rezultati dobiveni dvjema metodama za određivanje ukupnog dušika i ugljika uz razinu pouzdanosti od 95 % su značajno

različiti. Utvrđeno da je vrijednost t veća od kritične vrijednosti za  $p = 0,005$ , pa je stoga nulta hipoteza da su metode iste odbačena.

Boxplots nam pokazuje simetriju podataka i distribuciju ponovljenih mjerenja (Slika 3). Kod određivanja dušika vidljivo je da kod metoda A minimum i maksimalne vrijednosti nisu tako raspršene kao kod metode B. Kod ugljika je vidljivo da su rezultati metode A više raspršeni, ali su svi rezultati unutar specifikacijskih granica. Metoda pokazuje manje razlike kod ponovljenih mjerenja.

Tablica 6. Regresijska analiza za metode određivanja dušika i ugljika

Table 6 Regression analysis for methods of determination nitrogen and carbon

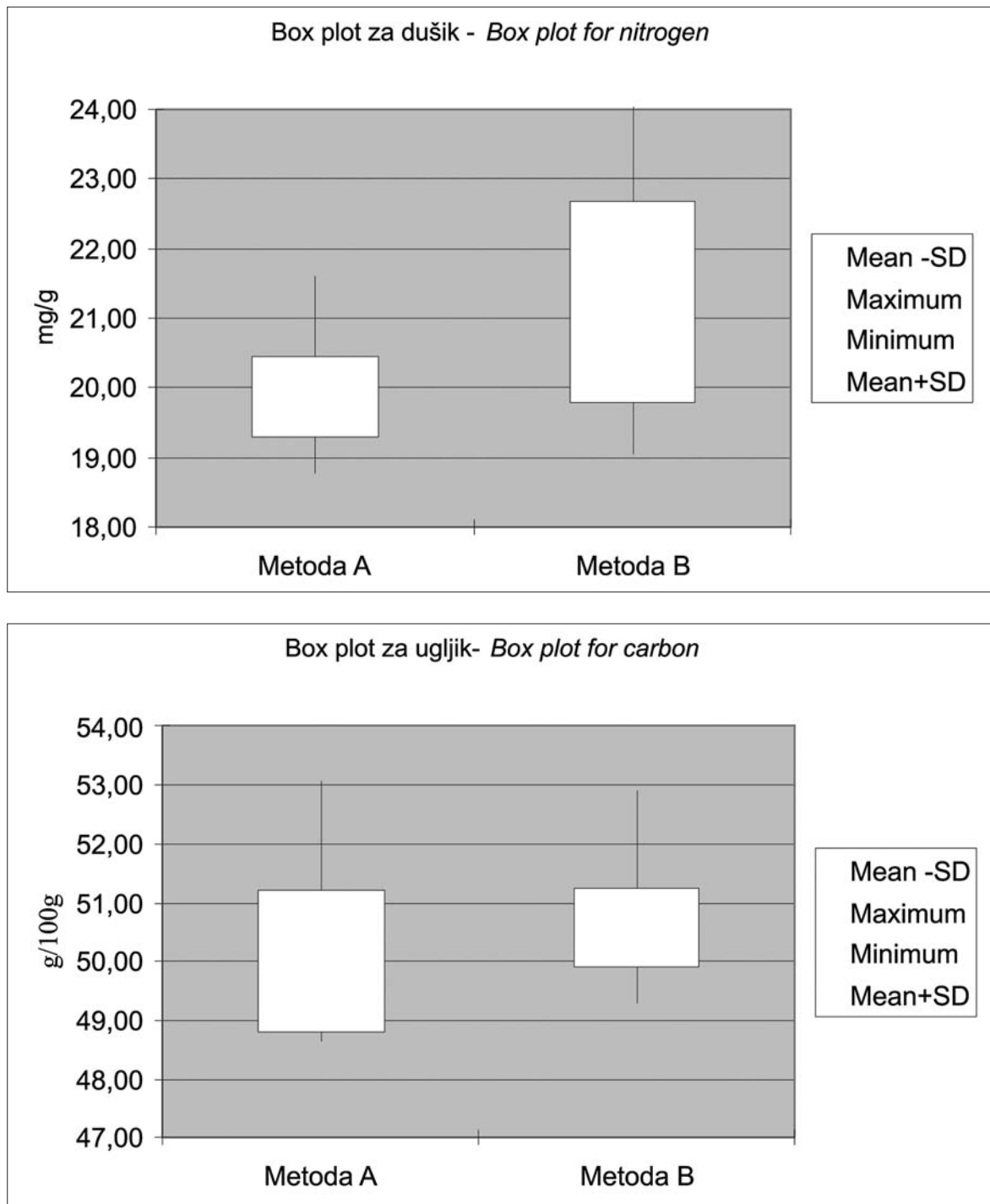
analiza/analysis	dušik/nitrogen	ugljik/carbon
r	0,451845021	0,455041042
R <sup>2</sup>	0,204163923	0,20706235
Standardna pogreška - Standard Error	0,508772051	1,086116407
Broj uzoraka - Sample number	50	50

Kontrolne karte za metodu B (Slika 4) napravljene su na osnovi 50 mjerenja iz kojih je izračunata srednja vrijednost ( $\bar{X}_m$ ) i standardna devijacija laboratorijskog refe-

Tablica 7. Rezultati t-testa: Srednje vrijednosti koncentracija dušika i ugljika određene metodom A i metodom B u različitim laboratorijima

Table 7 Results of t-test: Paired two sample for means concentration of nitrogen and carbon determining in different labs

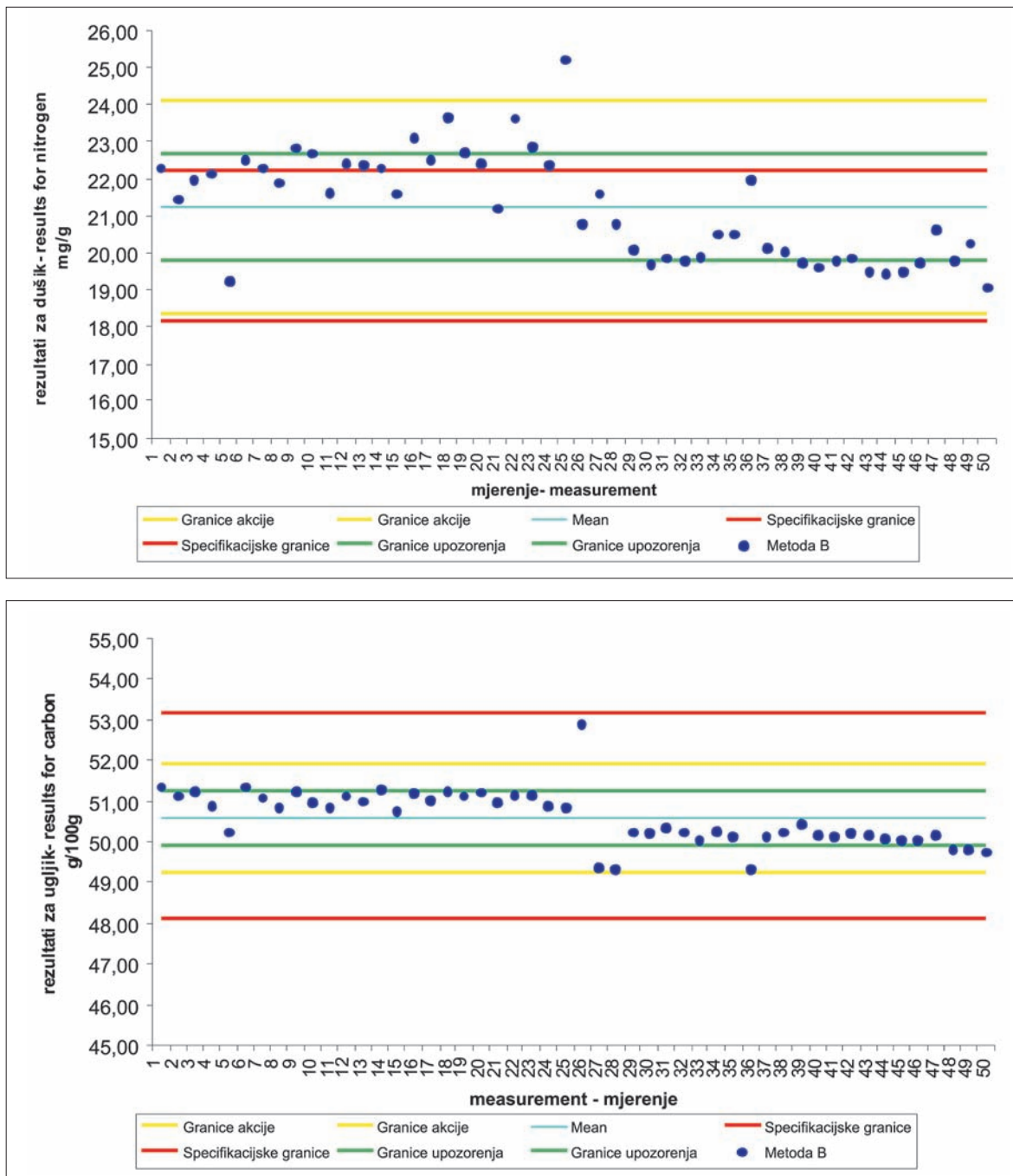
t- Test za dušik i ugljik/ t-Test: Paired Two Sample for Means for nitrogen	dušik Metoda A/Method A	nitrogen Metoda B/Method B	ugljik Metoda A/Method A	carbon Metoda B/Method B
Mean	19,866	21,2234	50,0288	50,5854
Variance	0,318616327	2,060937184	1,457333224	0,443788
Observations	50	50	50	50
Pearson Correlation	-0,451845021		-0,455041042	
Hypothesized Mean Difference	0		0	
df	49		49	
t Stat	-5,441061629		-2,42550166	
P(T<=t) one-tail	8,38988E-07		0,009508391	
t Critical one-tail	1,676550893		1,676550893	
P(T<=t) two-tail	1,67798E-06		0,019016783	
t Critical two-tail	2,009575199		2,009575199	



Slika 3. Boxplot dijagrami određivanja ukupnog dušika i ugljika metodom A i metodom B  
 Figure 3 Boxplot graphs for determination of nitrogen and carbon by Method A and Method B

rentnog materijala (bukva CRO).Određene vrijednosti omogućile su procjenu gornjih i donjih preporučenih granica i granica pouzdanosti. U praksi se koriste  $\pm 2S.D.$  i  $\pm 3 S.D.$  granice za preporučenu granicu i granicu pouzdanosti. Ako je standardna devijacija pravilno procijenjena, 95 % rezultata mjerenja nalazi se unutar intervala srednje vrijednosti koncentracije  $X_m \pm 2S.D.$  i više od 99 % u intervalu  $X_m \pm 3S.D.$  (Jakovljević, 2009). Iz kontrolnih karta može se uočiti, da se u normalnoj raspodjeli unutar srednje vrijednosti koncentracija

$\pm 3S.D.$  nalaze gotovo svi rezultati (99, 72 %) određivanja ugljika. Njihova je grupiranost oko sredine takva, da se gotovo 2/3 uzorka nalazi u intervalu srednje vrijednosti koncentracija  $\pm 2 S.D.$  Međutim vrlo mala grupa vrijednosti koncentracija koja pada izvan područja intervala srednje vrijednosti koncentracija  $\pm 3 S.D.$  Kontrolna karta za dušik pokazuje razliku u ponovljivosti mjerenja i više od 30 % rezultata nalazi se izvan specifikacijskih granica.



Slika 4. Kontrolni grafikoni za dušik i ugljik određeni Metodom B  
 Figure 4 Control charts for nitrogen and carbon determined by Method B155

### ZAKLJUČCI – Conclusions

- graf usporedbe metoda A (hrvatski laboratorij) i metoda B (mađarski laboratorij) za određivanja ukupnog dušika pokazuje velike oscilacije rezultata
- oko 30 % rezultati određivanja ukupnog dušika metodom B su izvan specifikacijskih granica
- regresijskom analizom dobiveni koeficijenti korelacije  $r$  za metode određivanja dušika i ugljika govore o srednje pozitivnoj povezanosti
- t-Testom je potvrđeno, da rezultati dobiveni dvjema metodama za određivanje ukupnog dušika i ugljika uz razinu pouzdanosti od 95 % značajno su različiti.
- svi rezultati određivanja ukupnog dušika metodom A su unutar specifikacijskih granica referentnog materijala (bukva)
- graf usporedbe za određivanje ukupnog ugljika pokazuje za metodu B veće vrijednosti od rezultata dobivenih metodom A
- svi rezultati metode A i B za određivanje ukupnog ugljika su unutar specifikacijskih granica referentnog materijala (bukva)



- kontrolni grafikoni za metodu B za dušik pokazuju dnevne razlike u mjerenjima i više od 30 % rezultata su izvan preporučenih granica
- kontrolni grafikon za metodu B za ugljik pokazuje dobru ponovljivost rezultata mjerenja i svi su rezultati unutar preporučenih granica.

Određivanje ukupnog dušika i ugljika na elementarnom analizatoru CNS 2000 (Metoda A) pokazala je dobru ponovljivost analize referentnog materijala. Obnovljivost rezultata u laboratoriju u mađarskoj pokazala je da elementarni analizator EA 3000 (Metoda B) pokazuje veliku osjetljivost i da je prikladniji za odre-

đivanja dušika i ugljika u čistim, kemijskim supstancama zbog nehomogenosti uzoraka lišća bukve. Male odvage referentnog materijala za kalibraciju instrumenta u usporedbi s odvagom uzorka negativno utječu na proces kalibracije.

Kemijske analiza šumskog biljnog materijala ograničene su za izbor instrumenata i metoda za određivanje pojedinih elemenata, stoga ovakva testiranja potvrđuju bolju primjenjivost elementarnih analizatora, kao što je CNS 2000 za određivanje dušika i ugljika zbog specifičnosti uzoraka.

#### LITERATURA – References

- EC-UN/ECE, Stefan, K., A. Fürst, R. Hacker, U. Bartels, 1997.: Forest Foliar Condition in Europe. Technical Report. EC and UN/ECE, Brussels, Geneva.
- EC-UN/ECE, Bartels, U 1998: ICP-Forests 3<sup>rd</sup> Needle/Leaf Interlaboratory Test 1997/98 –Results.
- Jakovljević, T., 2006: Folijarne analize uzoraka s ploha intenzivnog motrenja i interlaboratorijska ispitivanja u sklopu programa ICP Forests, Radovi, Šumarski institut, Izv. Izdanje 9, 369–376.
- Jakovljević, T., K. Berković, G. Tartari, B. Vrbek, J. Vorkapić Furač, 2009: Atmosferska taloženja u šumskim ekosustavima Europe i istraživanje novih metoda određivanja fosfora i amonijakalnog dušika u okviru ICP Forests programa, Šumarski list 135 (5–6): 267–278.
- Košiček, M., 2007.: Statistika u validaciji analitičkih metoda, HMD, Zagreb
- Marchetto, A., R. Mosello, J. Derome, K. Derome, P. Sorsi König, N. Clarke, G. Tartari, A. Kowalska, 2009: First combined FutMON- ICP Forests atmospheric deposition and soil solution Working Ring Test.
- ISO 5725 :1986: Precision of test methods. Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests.
- UN EC ICP Forests, 2006: Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analyses of the effects of air pollution on forests, Part IV, Sampling and Analysis of Needles and Leaves.
- ISO 8258:1998: Shewhart control charts.
- Miller, J. N., 2005: Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 5<sup>th</sup> Edition, Pearson Education Limited, UK.
- Holler, F. J., D. A. Skoog, S. R. Crouch, 2007: Principles of Instrumental Analysis, 6<sup>th</sup> edition, Thomson Brooks,, 895–899, USA.
- HRN EN ISO/IEC 17025:2007: Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija.
- HAA-Pr-2/6, 2009: Pravila za međulaboratorijska i druga poredbena ispitivanja.
- LECO corporation, 2000: Organic application note form No. 203 – 821 – 172, Carbon, Nitrogen and Sulfur in Plant Tissue, St. Joseph, USA.

*SUMMARY: Within the framework of International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests (ICP Forests), research and chemical analyses of plant material has been carried out in Croatia on seven intensive monitoring plots with typical forest communities. In order to monitor the reliability of methods of laboratory analyses, as well as to ensure operational quality of analytical methods that can be applied in leaves and needles analysis, each year Inter-laboratory testing on samples prepared in laboratories of countries taking part in ICP Forest is organised. Croatian forest research institute, prepared leaves of common beech as reference sample for this programme that is now used also as the laboratory reference material.*

*In this work, the interlaboratory measurements and repeatability and reproducibility were tested between results of determination total nitrogen and car-*

bon in the reference sample of common beech leaves on elemental analyser CNS 2000 (Method A) in the laboratory of Croatia forest research institute and on the elemental analyser EA 300 (Method B) in the laboratory of Hungarian forest institute involved ICP Forests programme. Statistical analysis included comparative description of results for determination of total nitrogen and carbon, descriptive statistics for 2 methods, Boxplot analysis, F test, T test, Regression analyses and Control charts for method B. The comparison of the results showed big oscillations of the results of Method B for nitrogen and some of them were out of specification limits. For carbon, the values were higher than in Method A (Figure 2). Furthermore, F values were over critical but variance of Method A was smaller than of Method B. Therefore, method A was more accurate. For carbon, F was over critical values. Variance of method A was more significant than of method B with probability of 95 % (Table 5). Coefficient of correlation,  $r$  in regression analysis for methods (Table 6) gave positive correlation. With t-test (Table 7) was proved that results of these methods for determination of total nitrogen and carbon with probability of 95 % were significantly different. Control chart for nitrogen showed difference in repeatability, also more than 30 % of results were out of specification limits. Repeatability of results for carbon was good (Figure 4). Chemical analysis of leaves are reduced for choice of instruments and methods for determination of elements because of specificity of samples from forest. Therefore this kind of testing confirmed better applicability of element analyser such as CNS 2000 than EA 300 for determination of total nitrogen and carbon.

*Key words*: common beech leaves, CNS 2000, EA 300, elemental analyser, ICP Forests, interlaboratory testing, reference sample, total nitrogen and carbon