

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2021

Ročník XXV, číslo 2/2021

Brno 2021

Obsah

- 1 Využití diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) při stanovení čistoty krystalických účinných látek pesticidů vykazujících polymorfii (různé krystalické struktury)**
Dagmar Julínková, Jindřich Foltýn, Olga Nováková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení zkoušení přípravků na ochranu rostlin,
Zemědělská 1a, 613 00 Brno 1

- 2 Zavedení metody hustotní frakcionace půdní organické hmoty**
Andrea Zálešáková, Stanislav Malý
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,
Hroznová 2, 656 06 Brno 26

Za obsah příspěvků odpovídají autoři

Využití diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) při stanovení čistoty krystalických účinných látek pesticidů vykazujících polymorfii (různé krystalické struktury)

Dagmar Julínková, Jindřich Foltýn, Olga Nováková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdZPOR, Zemědělská 1a, 613 00 Brno
dagmar.julinkova@ukzuz.cz

1 Úvod

Řada krystalických organických sloučenin je schopna vytvářet různé krystalové modifikace (polymorfy). Tyto modifikace se mohou lišit jak svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi jako jsou bod tání, barva, rozpustnost, tvrdost, vodivost, tak i biologickými vlastnostmi. Např. u trinitrotoluenu (TNT) přechod jedné krystalové modifikace na druhou zvyšuje citlivost k explozi. Polymorfie je tedy vlastnost určitých organických sloučenin krystalizovat ve dvou nebo více krystalových modifikacích, jejichž krystalová struktura je odlišná.

Rozdíly v chování různých krystalických forem sloučenin poprvé zjistil německý chemik E. Mitscherlich již v roce 1822. Všiml si, že u některých arseničnanů a fosforečnanů může jedna sloučenina určitého chemického složení vykristalovat ve více krystalových formách.

Nejvíce jsou v tomto ohledu prozkoumány farmaceutické substance. Avšak také u pesticidů je důležitá znalost krystalové struktury účinné látky přítomné ve formulaci. Výrobci přípravků na ochranu rostlin (POR) věnují syntéze požadovaného polymorfu značnou pozornost. Nestabilní modifikace mohou způsobovat fyzikální nestabilitu formulace, jako je např. koagulace částic, která zapříčiní ucpávání trysek při aplikaci postřikové kapaliny a nežádoucí sedimentaci kapalných heterogenních formulací. Různé modifikace mají také rozdílnou biodostupnost pro cílové organismy.

Pro posouzení čistoty a charakterizaci krystalových modifikací se využívá DSC kalorimetrie. Čistotu organických látek, u kterých během tání nedochází k tepelnému rozkladu a vykazují jeden bod tání, lze hodnotit podle změny charakteristické teploty tání (vzniká eutektický systém) nebo podle změny tvaru endotermy tání krystalické látky. Pokud je krystalická látka mírně znečištěna, její teplota tání klesá a charakteristická endoterma se rozšiřuje a snižuje. Pokud organická látka krystaluje ve více

krystalových modifikacích, vykazuje více než jeden bod tání. Pak je přímé stanovení čistoty velmi problematické.

Obecně mohou být organické látky negativně ovlivněny vlhkostí, jejich vlastní nestabilitou nebo nevhodným zacházením se vzorkem, např. skladováním za nevhodných teplot, což ovlivní převážně jejich fyzikální chování.

2 Cíl

Cílem práce bylo nalézt postup, který umožní stanovit čistotu účinné látky v případě, že obsahuje více krystalových modifikací, a to převedením modifikace s nižším bodem tání na modifikaci s vyšším bodem tání. Následně je možno stanovit bod tání účinné látky a z takto stanoveného jednoho bodu tání rovněž čistotu v % mol.

3 Princip

Stanovení čistoty metodou DSC je založeno na skutečnosti, že eutektické nečistoty snižují bod tání eutektického systému. Tento jev popisuje zjednodušená van't Hoffova rovnice:

$$T_f = T_0 - x_2 \frac{Q}{\Delta H_f}$$

kde

T_f je teplota v průběhu tání (teplota kapaliny), T_0 je teplota tání čisté složky (hlavní složky), x_2 je molární zlomek nečistoty v kapalně fázi, R je univerzální plynová konstanta, ΔH_f je molární teplo tání hlavní složky.

Na základě této rovnice se vypočítá čistota organické sloučeniny, pokud je větší než 90 % mol. V případě účinných látek pesticidů s vysokým obsahem tj. 99 % hm a výše je rozdíl v % mol a v % hm zanedbatelný.

V případě, že organická látka obsahuje jen jednu krystalovou modifikaci a nerozkládá se v bodě tání, lze stanovit čistotu po zjištění bodu tání přímo.

Nad bodem tání eutektické směsi se nachází nečistoty(a) v kapalně fázi a pevná fáze obsahuje pouze čistou složku. Při dalším zahřívání se rozpouští čistá složka v eutektickém roztoku a tím dochází

k úměrnému zředění nečistoty. Van't Hoffova rovnice je platná pro rovnovážné podmínky. V průběhu tavení narůstá rychlost tavení natolik rychle, že naměřené hodnoty se musí korigovat linearizací.

Pokud organická látka obsahuje dvě a více krystalických modifikací, je přímé stanovení metodou DSC nemožné. Podstatné je nalezení takových podmínek, za kterých lze převést více krystalových struktur v jednu a tím umožnit měření a následný výpočet čistoty organické látky.

4 Přístroje a pomůcky

4.1 DSC kalorimetr DSC+ firmy Mettler-Toledo.

4.2 40 μ L hliníkové kelímky firmy Mettler-Toledo.

4.3 Manuální lis pro přípravu vzorků firmy Mettler-Toledo.

5 Pracovní postup

5.1 Převedení dvou polymorfů na jeden

Při zjištění dvou krystalových modifikací je nutné nejdříve převést nejméně stabilní krystalovou modifikaci, tj. modifikace s nižším bodem tání, nastavením 5 až 30 minutové isotermy s přesnou hodnotou teploty jejího bodu tání na stabilní modifikaci (modifikace s vyšším bodem tání), poté snížit teplotu přibližně o 40 °C a pak opět spustit ohřev vzorku nad bod tání nejvyšší krystalové modifikace a následně stanovit bod tání a poté i čistotu sloučeniny. Potřebná doba isotermy na kompletní převedení krystalové modifikace s nižším bodem tání se volí na základě experimentálních dat.

5.2 Převedení tří polymorfů na jeden

Při zjištění tří krystalových modifikací je nutné převést nestabilní modifikace s nižšími body tání na stabilní modifikaci (nejvyšší bod tání) nastavením 5 až 10 minutové isotermy s přesnou hodnotou teploty bodu tání prostřední modifikace, poté snížit teplotu přibližně o 40 °C a pak opět spustit ohřev vzorku nad bod tání nejvyšší krystalové modifikace a následně stanovit bod tání výsledné modifikace a poté i čistotu sloučeniny. Potřebná doba isotermy na kompletní převedení krystalové modifikace s prostředním bodem tání se volí na základě experimentálních dat.

Na základě experimentálních měření bylo zjištěno, že způsob postupného odstraňování polymorfů s nejnižším bodem tání (polymorf III) na polymorf II a následně na polymorf I nevede k cíli.

6 Výsledky a diskuse

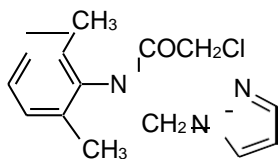
6.1 Stanovení čistoty standardů účinných látek s více identifikovanými polymorfy

Vyšší počet krystalových modifikací (polymorfů), tj. 2 až 3 modifikace byl nalezen u 9 účinných látek, viz Tabulka 1.

Tabulka 1. Přehled účinných látek, u nichž byl identifikován vyšší počet polymorfů.

Účinná látka	Počet stanovených polymorfů	Počet polymorfů uváděných v literatuře ^{[1] - [6]}
Cyprodinil	2	2
Fipronil	2	5
Flumioxazin	2	7
Karboxin	2	2
Metazachlor	1 - 3	5
Pencycuron	2	2
Pendimethalin	2	2
Pyraclostrobin	2	4
Tebuconazol	2	3

Metazachlor (herbucid)



V literatuře se lze setkat s různými body tání metazachloru, který závisí na použitém rozpouštědle, ze kterého byl krystalován [4], např. 85 °C [2] ale i s mnoha odkazy na jednotlivé polymorfy.

Metazachlor (MTZC) krystaluje v pěti krystalových modifikacích označených jako I, II, III, IV a V, které se liší v FTIR spektrech a v DSC kalorimetrii [1]. Modifikace IV a V jsou velmi nestabilní a mohou být zachyceny po roztání metazachloru a super rychlým ochlazením. V praktických podmínkách se s nimi neseznamujeme. Modifikace I krystaluje v šesterečné soustavě s b.t. = 83 °C, modifikace II krystaluje v trojklonné soustavě s b.t. = 80 °C a modifikace III krystaluje v jednoklonné soustavě s b.t. = 76 °C. U těchto modifikací je možné pozorovat enantiotropické reversibilní „solid-solid“ přechody jedné modifikace v druhou. Metastabilní modifikace I a II vykazují kinetickou stabilitu, a tak mohou být přítomny i v komerčně vyráběných formulacích. Protože metazachlor se vyrábí jako suspenzní koncentrát (SC), tyto metastabilní formulace I a II nejsou žádoucí, protože existuje potenciální přechod na modifikaci III, který může způsobovat problémy se vytvářením tuhých sedimentů v dodávaných obalech.

Nejvhodnější modifikací pro komerčně vyráběné suspenzní koncentráty je termodynamicky stabilní modifikace III.

Při analýze různých standardů účinné látky metazachlor byly analyzovány standardy s jedním polymorfem (Obrázek 1), se dvěma polymorfy (Obrázek 2) a se třemi polymorfy (Obrázek 3).

Při řešení jednoho polymorfu MTZC (III) byl vypracován tento postup měření:

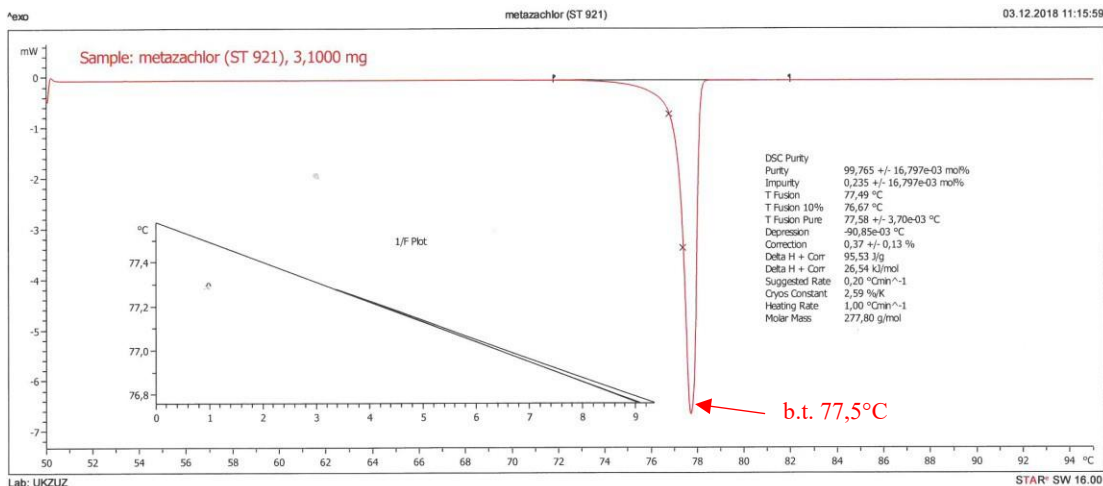
- a) (25 – 50) °C s rychlostí měření 5 °C/min,
- b) (50 – 95) °C/min.

Při řešení dvou polymorfů MTZC (III a I) byl vypracován tento postup měření:

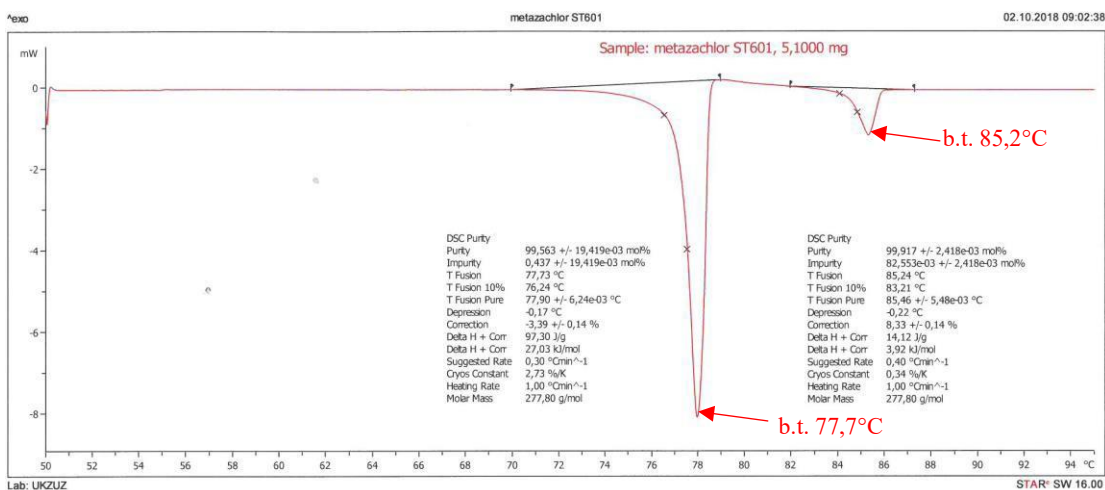
- a) (25 – 50) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,
- b) (50 – 78) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min,
- c) 78 °C isoterma 10 min,
- d) (78 – 40) °C s rychlostí chlazení 5 °C/min,
- e) (40 – 95) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.

Při řešení tří polymorfů MTZC (III, II a I) byl vypracován tento postup měření:

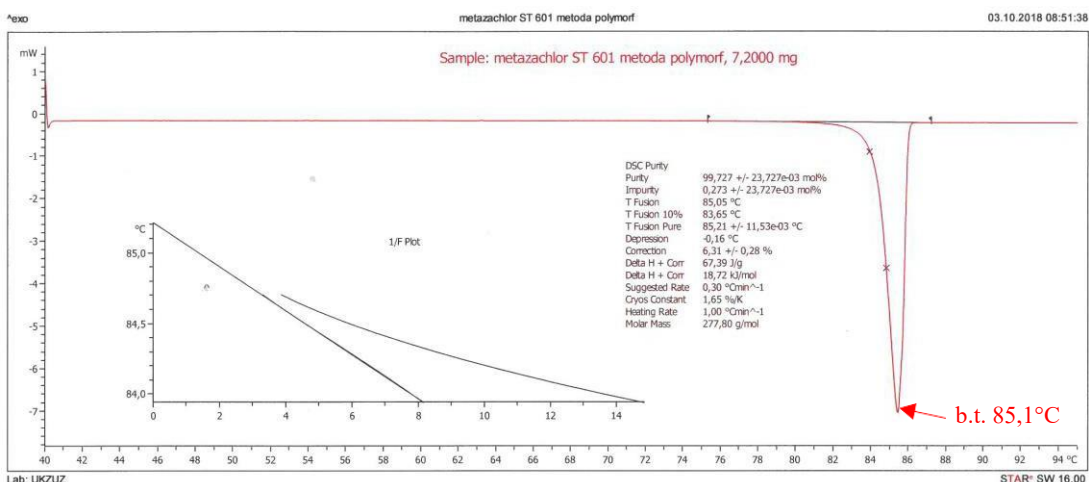
- a) (25 – 50) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,
- b) (50 – 81,5) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min,
- c) 81,5 °C isoterma 10 min,
- d) (81,5 – 40) °C s rychlostí chlazení 5 °C/min,
- e) (40 – 95) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.



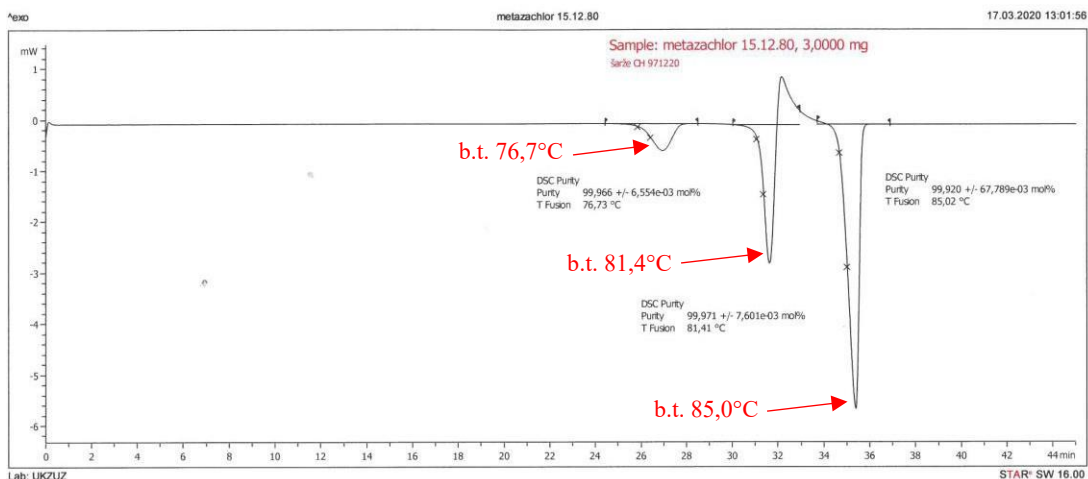
Obrázek 1. Metazachlor (ST 921) s jedním polymorfem III (b.t. 77,5 °C).



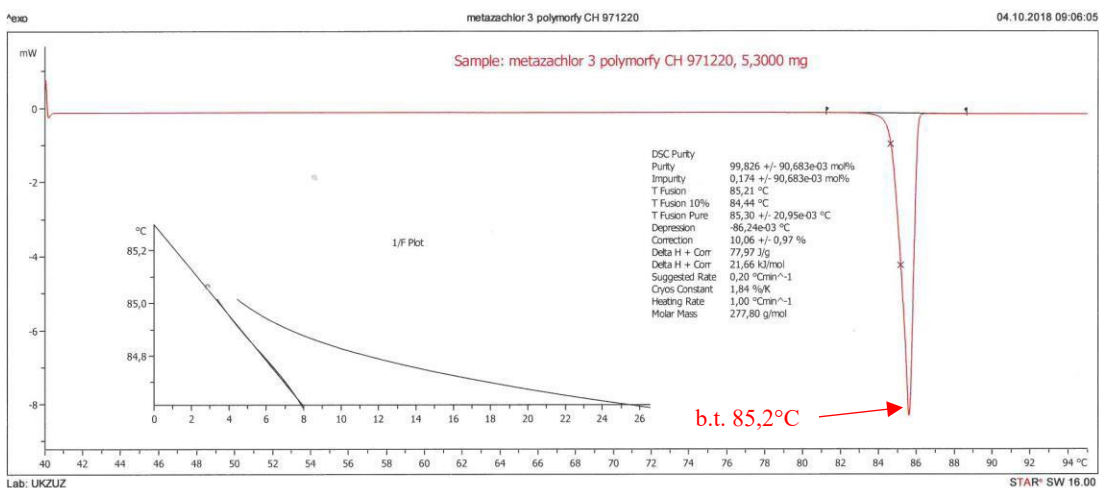
Obrázek 2a. Metazachlor (ST 601) se dvěma polymorfy III (77,7 °C) a I (b.t 85,2 °C).



Obrázek 2b. Metazachlor (ST 601) - polymorf I (b.t 85,1 °C), po odstranění polymorfu III.

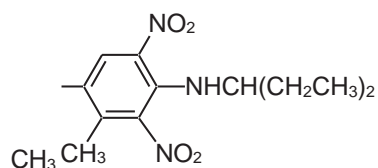


Obrázek 3a. Metazachlor (č.š. CH971220) s polymorfem, III (b.t 76,7°C), II (b.t 81,4°C) a I (b.t. 85,0 °C).



Obrázek 3b. Metazachlor (č. š. CH971220) - polymorf I (b.t 85,2 °C), po odstranění polymorfů III a II.

Pendimethalin (herbicide)

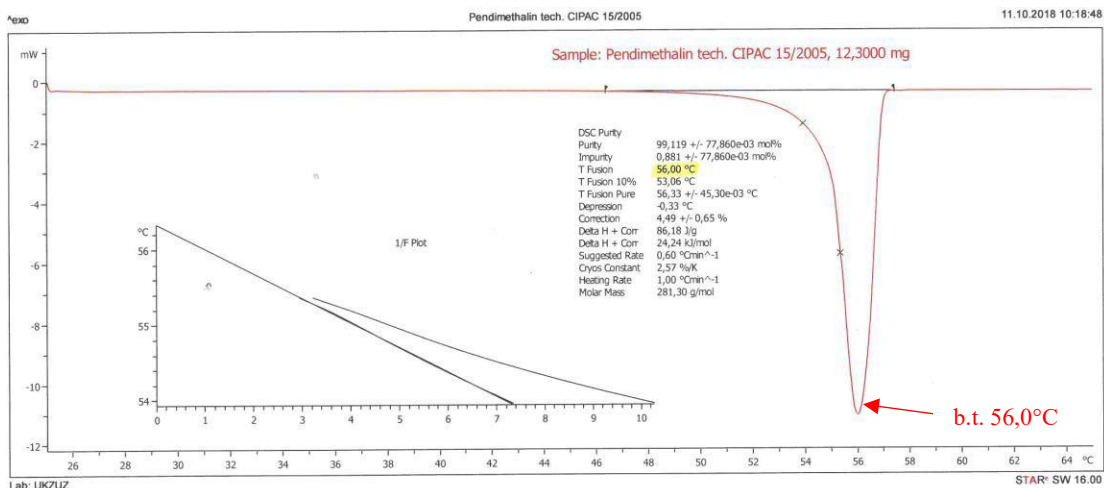


Pendimethalin se v literatuře [4] popisuje jako oranžovo-žlutá krystalická látka s bodem tání (54 – 58) °C a je známo, že existuje ve dvou krystalických modifikacích. Trojklonná modifikace, označovaná jako I tvoří oranžové makrokrystaly s b.t. = 56 °C a je termodynamicky stálá. Jednoklonná modifikace, označovaná jako II tvoří mikrokrystalky s b.t. = 58 °C a je termodynamicky nestálá (metastabilní) a má jasně žlutou barvu. Je známo, že žlutá modifikace skladováním při nižší teplotě, než je bod tání, přechází fázovou přeměnou na stabilní oranžovou modifikaci.

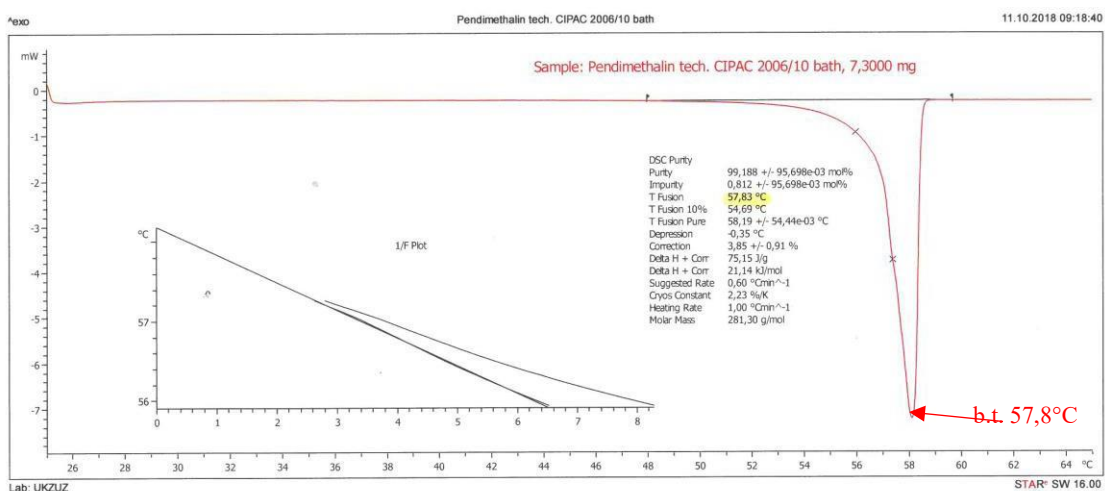
Pendimethalin ve formulaci SC má tendenci vytvářet při skladování velké krystaly (nevýhoda látek s nízkým bodem tání), což má vliv na stabilitu formulace vytvářením sedimentů. Skladováním při teplotě nad 35 °C se sedimentace urychlí.

Při analýze různých standardů účinné látky pendimethalin byl analyzovány standardy s jedním polymorfem (Obrázek 6) a se dvěma polymorfy (Obrázek 7).

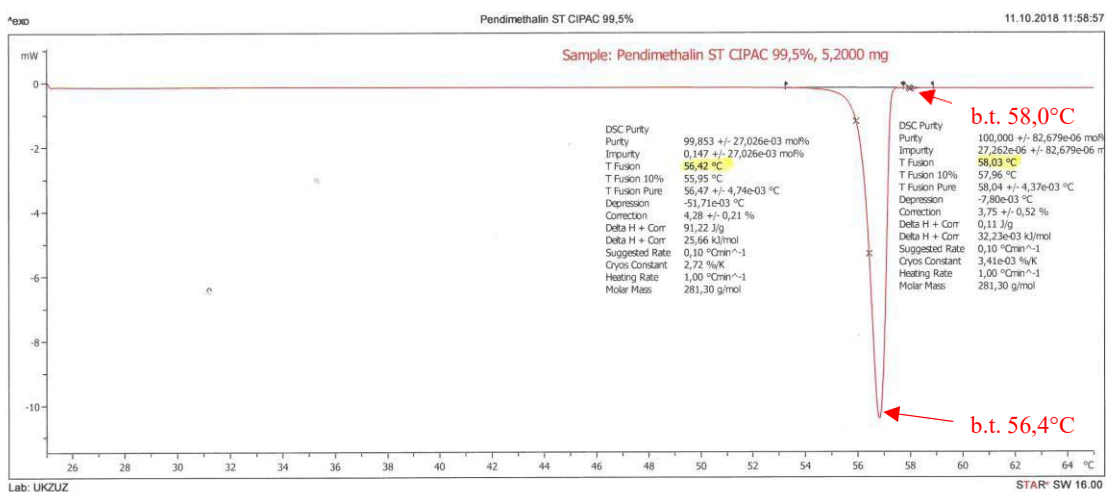
Na Obrázku 6a je uveden příklad pendimethalinu s polymorfem I a na Obrázku 6b je uveden příklad pendimethalinu s polymorfem II.



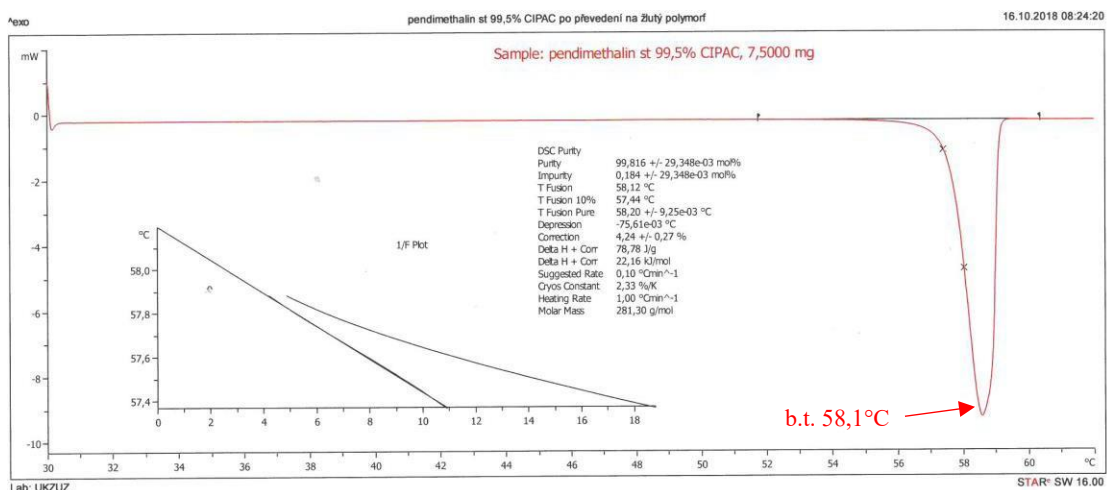
Obrázek 6a. Pendimethalin tech. 15/2005 – polymorf I (b.t. 56,0 °C), oranžová barva.



Obrázek 6b. Pendimethalin tech. 2006/10 – polymorf II (b.t. 57,8 °C), žlutá barva.



Obrázek 7a. Pendimethalin ST CIPAC 99,5% se dvěma polymorfy I (b.t. 56,4 °C) a II (b.t. 58 °C, malý pík).



Obrázek 7b. Pendimethalin ST CIPAC 99,5% polymorf II (b.t. 58,1 °C, žlutý) po odstranění polymorfu I (oranžový).

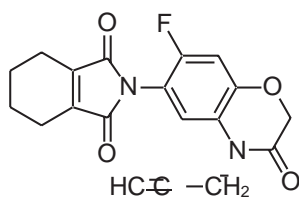
Při řešení jednoho polymorfu pendimethalinu byl vypracován tento postup měření:

- a) (25 – 65) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.

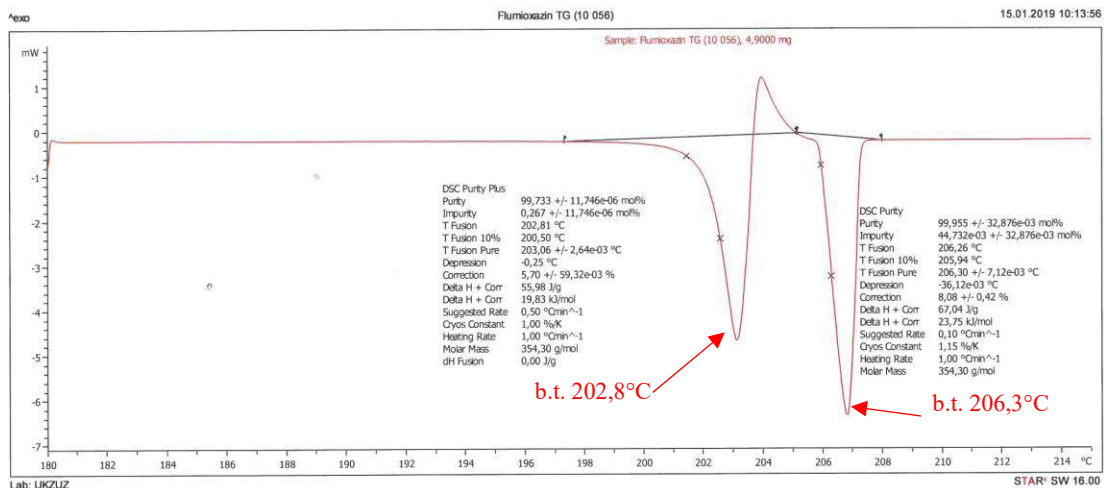
Při řešení dvou polymorfů pendimethalinu (I a II) byl vypracován tento postup měření:

- a) (25 – 40) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,
 b) (40 – 56,4) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min,
 c) 56,4 °C isoterma 10 min,
 d) (56,4 – 30) °C s rychlostí chlazení 5 °C/min,
 e) (30 – 62) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.

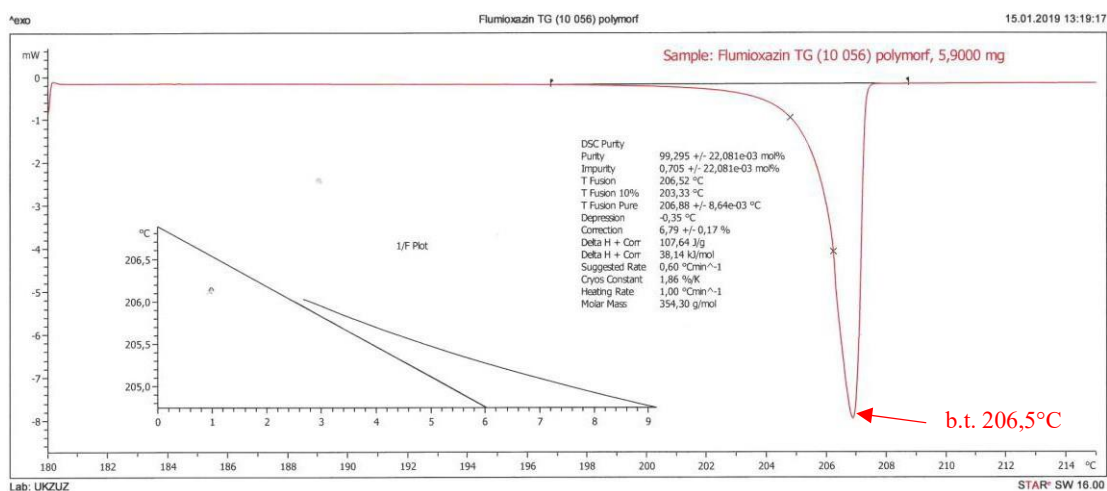
Flumioxazin (herbicid)



Flumioxazin se v literatuře [4] popisuje jako žlutohnědý prášek s b.t. (202 – 204) °C. Tvoří až 7 různých krystalových modifikací, z nichž je nejvíce zmiňován krystalový typ A, který tvoří solváty a má výborné fyzikálně-chemické vlastnosti.



Obrázek 8a. Flumioxazin TG (10 056) s polymorfem A (b.t. 202,8 °C s následující exotermickou rekrytalizací) a B (b.t. 206,3 °C).



Obrázek 8b. Flumioxazin TG (10 056) s jedním polymorfem po převedení polymorfu A (b.t. 202,8 °C) na polymorf B (b.t. 206,5 °C).

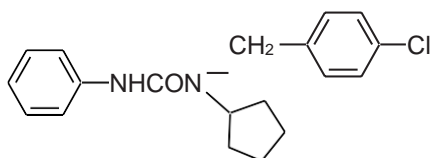
Při řešení jednoho polymorfu flumioxazinu byl vypracován tento postup měření:

- b) (25 – 180) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,
- c) (180 – 215) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.

Při řešení dvou polymorfů flumioxazinu (A a B) byl vypracován tento postup měření:

- a) (25 – 180) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,
- b) (180 – 203,2) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min,
- c) 203,2 °C isoterma 10 min,
- d) (203,2 – 50) °C s rychlostí chlazení 5 °C/min,
- e) (50 – 180) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,
- f) (180 – 215) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.

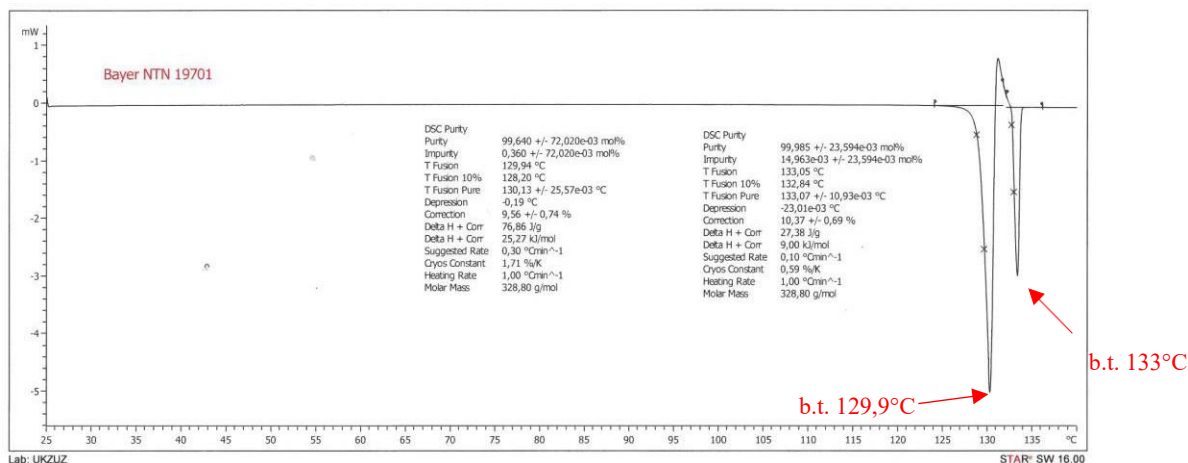
Pencycuron (fungicid)



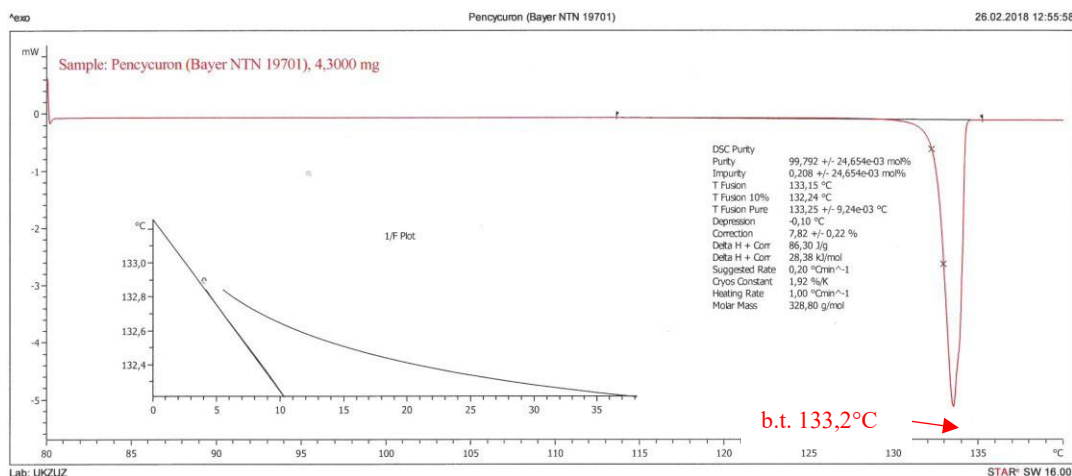
Pencycuron se v literatuře [4] popisuje jako bezbarvá látka krystalující ve dvou krystalických modifikacích A s b.t. 128 °C a krystalickou modifikací B s b.t. 132 °C.

Pesticidní přípravky s účinnou látkou pencycuron se vyrábí např. ve formulaci EC, SC a FS. Pokud formulace SC a FS bude obsahovat obě krystalové modifikace, bude docházet skladováním k sedimentaci a k problémům s redispersací.

Při analýze účinné látky pencycuronu byl analyzován standard se dvěma polymorfy viz Obrázek 9. Na Obrázku 9a je uveden příklad se dvěma polymorfy A a B, na Obrázku 9b je uveden příklad s jedním polymorfem B po odstranění polymorfu A.



Obrázek 9a. Pencycuron č.š. NTN 19701 s polymorfem A (b.t. 129,9 °C s následující exotermickou rekrystalizací) a B (b.t. 133 °C).



Obrázek 9b. Pencycuron č.š. NTN 19701 s jedním polymorfem B (b.t. 133,2 °C).

Při řešení jednoho polymorfu pencycuronu byl vypracován tento postup měření:

d) (25 – 140) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min.

Při řešení dvou polymorfů pencycuronu (A a B) byl vypracován tento postup měření:

g) (25 – 100) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,

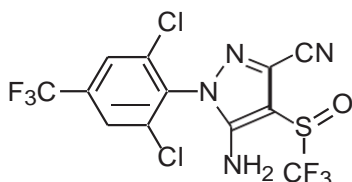
h) (100 – 130) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min,

i) 130 °C isoterma 5 min,

j) (130 – 80) °C s rychlostí chlazení 5 °C/min,

k) (80 – 140) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.

Fipronil (insekticid)

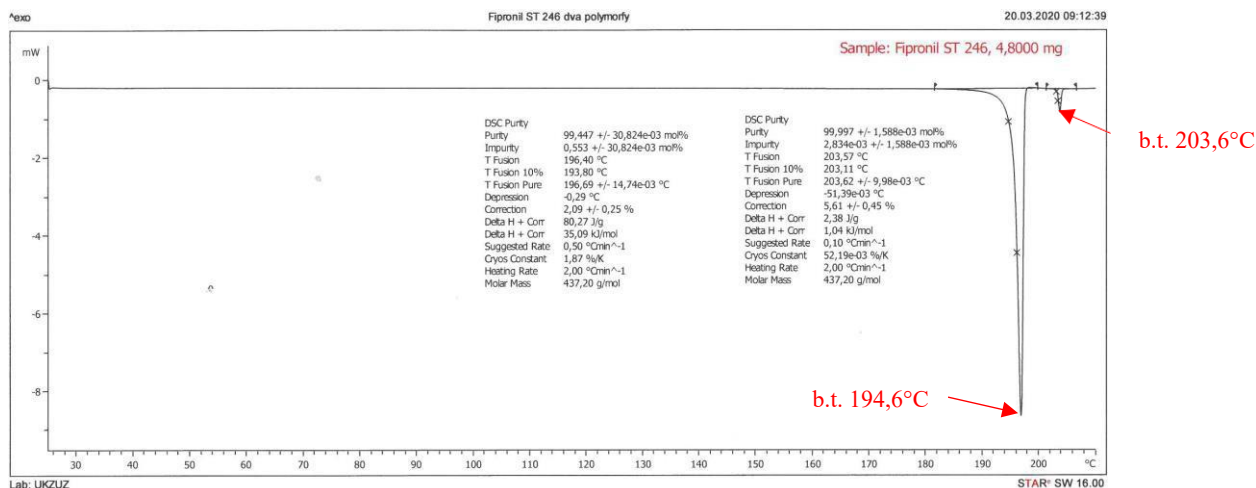


Fipronil se v literatuře popisuje jako bílá krystalická látka s b.t. (200 – 201) °C. Existuje až v pěti různých krystalických modifikacích, z nich nejstabilnější modifikace je jednoklonná modifikace I s b.t. (196 – 198) °C a modifikace V s b.t. 203°C. Modifikace II snadno přechází během zahřívání na modifikaci I a V a nemá praktický význam, stejně jako modifikace III. Modifikace IV vytváří stabilní solváty, a proto se využívá k přípravě modifikace I nebo V.

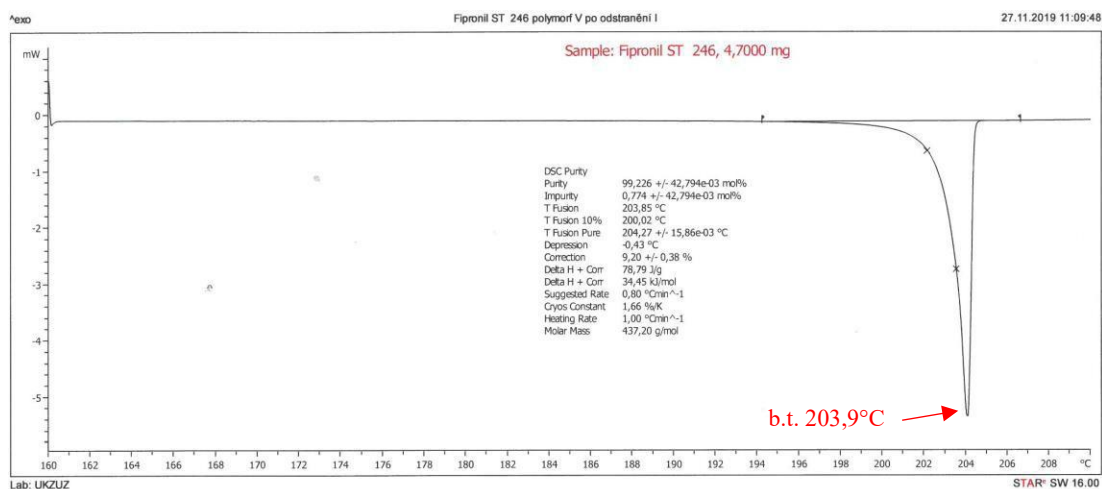
Modifikace I krystaluje ve formě destiček, které mají tu výhodu, že při vzájemném tření vytváří méně prachu (nízká prašnost), usnadňuje filtraci a sušení ve výrobě. To má příznivý vliv na stabilitu pevných formulací zejména WG.

Při analýze účinné látky fipronilu byl analyzován standard ST 246 se dvěma polymorfy viz Obrázek 10.

Na Obrázku 10a je uveden příklad standardu Fipronilu ST 246 se dvěma polymorfy I a V, na Obrázku 10b je uveden příklad téhož standardu s jedním polymorfem V po odstranění polymorfu I.



Obrázek 10a. Fipronil ST 246 s polymorfem I (b.t. 196,4 °C) a V (b.t. 203,6 °C).

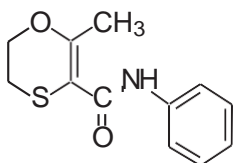


Obrázek 10b. Fipronil ST 246 s jedním polymorfem V (b.t. 203,9 °C).

Při řešení dvou polymorfů fipronilu byl vypracován tento postup měření:

- (25 – 180) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,
- (180 – 196,4) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min,
- 196,4°C isoterma 10 min,
- (196,4 – 160°C) s rychlostí chlazení 5 °C/min,
- (160 – 210) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.

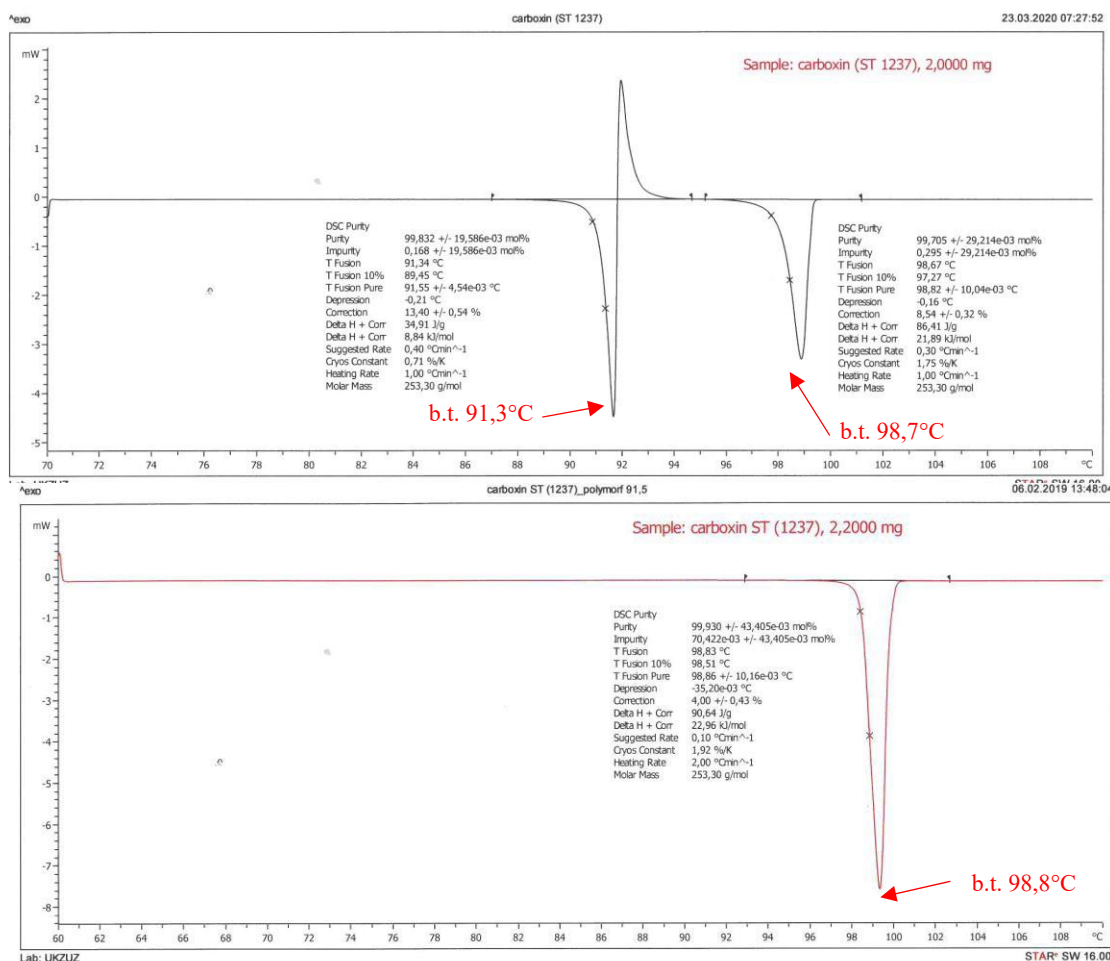
Karboxin (fungicid)



Karboxin tvoří bílé krystaly s b.t. (91 – 92) °C [4]. Karboxin existuje ve dvou krystalových modifikacích, a to ve formě trojklonné modifikace I o b.t. (98 – 100) °C, která je termodynamicky stálejší a ve formě jednoklonné modifikace II o b.t. (91,5 – 92,5) °C. Modifikace II přechází v polárních rozpouštědlech postupně na modifikaci I.

Při analýze účinné látky karboxinu byl analyzován standard se dvěma polymorfy viz Obrázek 11. Na Obrázku 11a je uveden příklad standardu karboxinu ST 1237 se dvěma polymorfy I a II, na obrázku 11b je uveden příklad stejného standardu s jedním polymorfem I po odstranění polymorfu II.

Obrázek 11a. Karboxin ST 1237 s polymorfem I (b.t. 98,7 °C s následující exotermickou rekrystalizací) a polymorfem II (b.t. 91,3 °C).

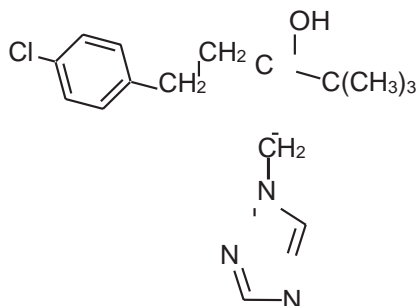


Obrázek 11b. Karboxin ST 1237 s jedním polymorfem I (b.t. 98,8 °C).

Při řešení dvou polymorfů karboxinu byl vypracován tento postup měření:

- (25 – 60) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,
- (60 – 91,5) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min,
- 91,5 °C isoterma 10 min,
- (91,5 – 60) °C s rychlostí chlazení 5 °C/min,
- (60 – 110) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.

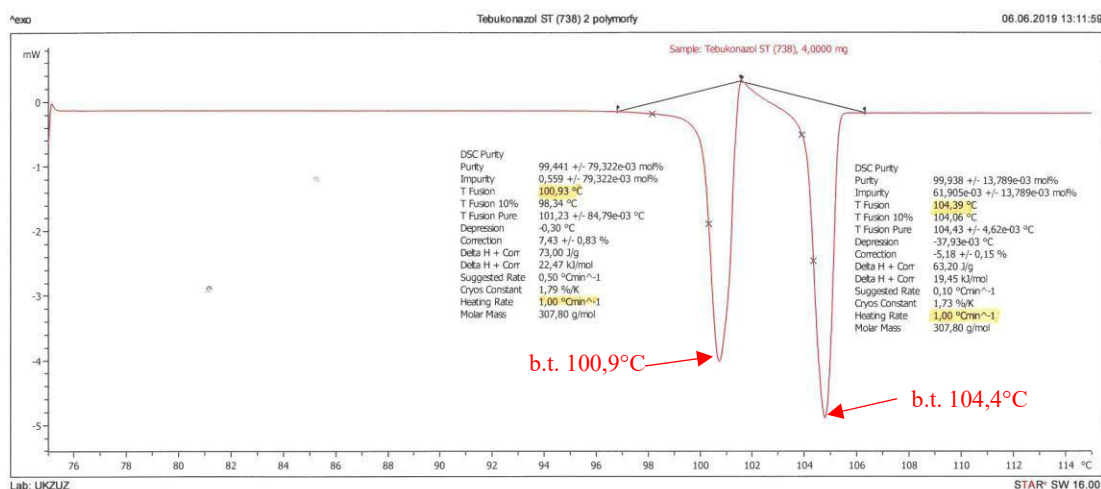
Tebukonazol (fungicid)



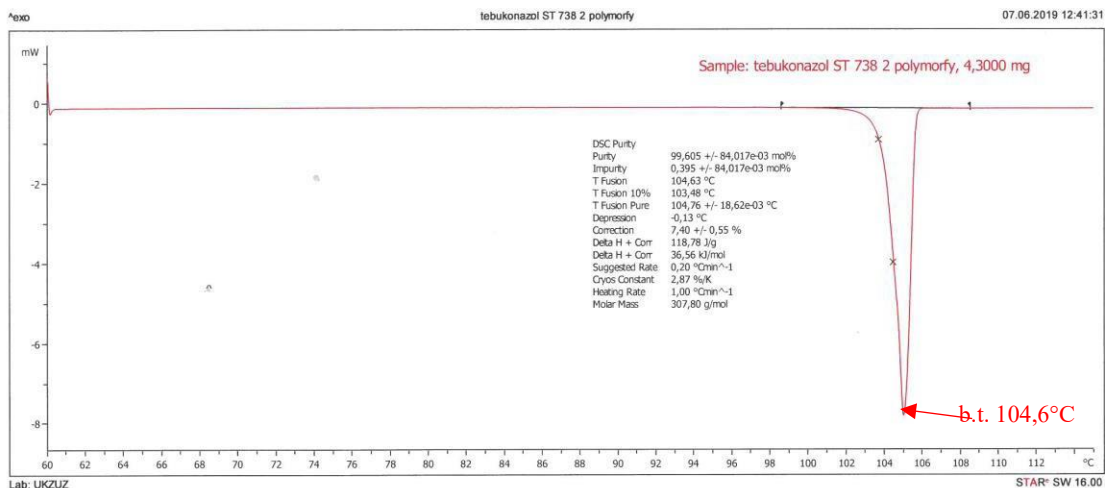
Tebukonazol tvoří bezbarvé krystaly s b.t. 105 °C [4]. V literatuře CIPAC [5] je informace o třech krystalových modifikacích, a to I, II a IV. Tyto modifikace lze rozlišit FTIR spektrem, ale nejsou uvedeny body tání. V literatuře [6] je uveden bod tání krystalové modifikace II b.t. (95 – 112) °C a b.t. 104,9°C pro modifikaci I.

Při analýze účinné látky tebukonazolu byl analyzován standard se dvěma polymorfy, viz Obrázek 12.

Na Obrázku 12a je uveden příklad standardu tebukonazolu ST 738 se dvěma polymorfy I a II, na Obrázku 12b je uveden příklad stejného standardu s jedním polymorfem I po odstranění polymorfu II.



Obrázek 12a. Tebukonazol ST 738 s polymorfem II (b.t. 100,9 °C s následující exotermickou rekrystalizací) a polymorfem I (b.t. 104,4 °C)

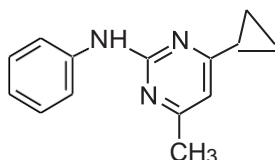


Obrázek 12b. Tebukonazol ST 738 s jedním polymorfem I (b.t. 104,6 °C).

Při řešení dvou polymorfů tebukonazolu byl vypracován tento postup měření:

- a) (25 – 75) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,
- b) (75 – 101) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min,
- c) 101 °C isoterma 30 min,
- d) (101 – 60) °C s rychlostí chlazení 5 °C/min,
- e) (60 – 115) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.

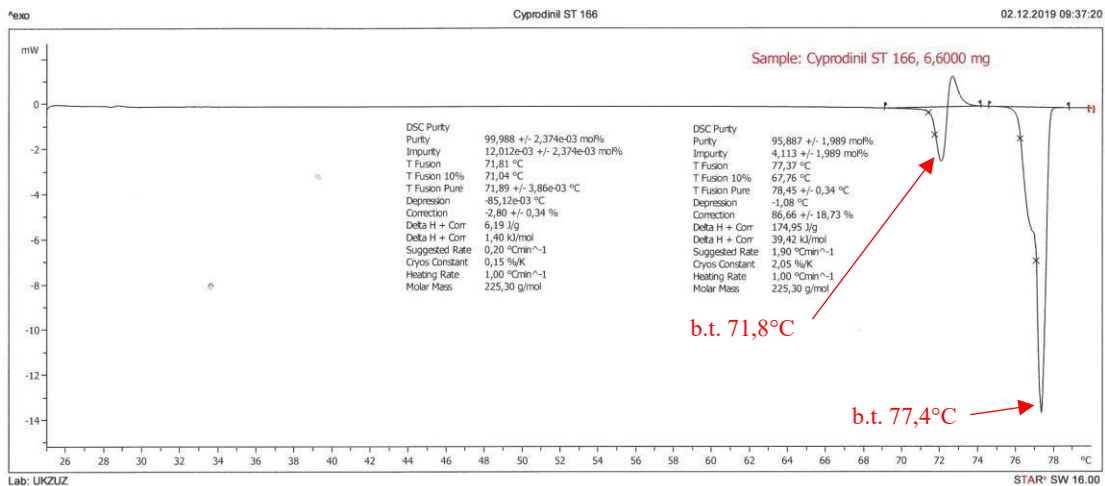
Cyprodinil (fungicid)



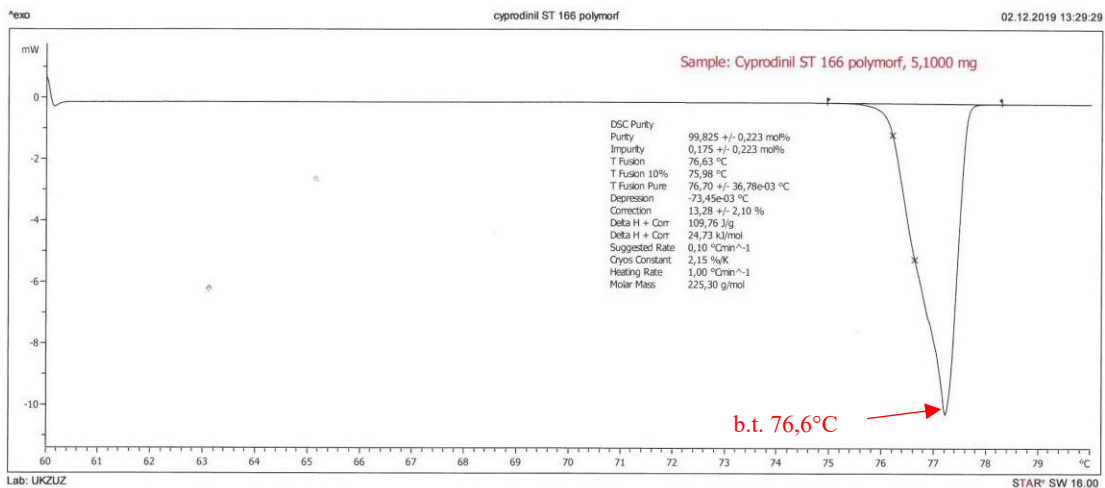
Cyprodinil tvoří béžové krystaly s b.t. 75,9 °C [4]. U účinné látky cyprodinilu jsou ale známy dvě krystalové modifikace. Modifikace A jsou bílé krystalky s b.t. (70 – 72) °C a modifikace B jsou světle béžové krystalky s b.t. (74 – 76) °C.

Metastabilní modifikace B může enantiotropickou přeměnou přecházet na termodynamicky stabilní modifikaci A, což způsobuje tvorbu větších krystalů, která vede k problémům s aplikací (ucpávání trysek postřikovačů), ale i k problémům se skladovatelností formulací.

Při analýze účinné látky cyprodinilu byl analyzován standard ST 166 se dvěma polymorfy, viz Obrázek 13. Na Obrázku 13a je uveden příklad standardu cyprodinilu ST 166 se dvěma polymorfy A a B, na Obrázku 13b je uveden příklad stejného standardu s jedním polymorfem B po odstranění polymorfu A.



Obrázek 13a. Cyprodinil ST 166 s polymorfem A (b.t. 71,8 °C s následující exotermickou rekrytalizací) a polymorfem B (b.t. 77,4 °C).

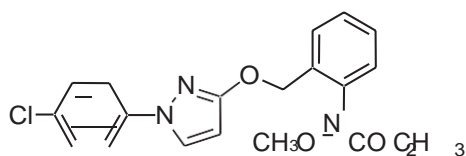


Obrázek 13b. Cyprodinil ST 166 s jedním polymorfem B (b.t 76,6 °C) po odstranění polymorfu A.

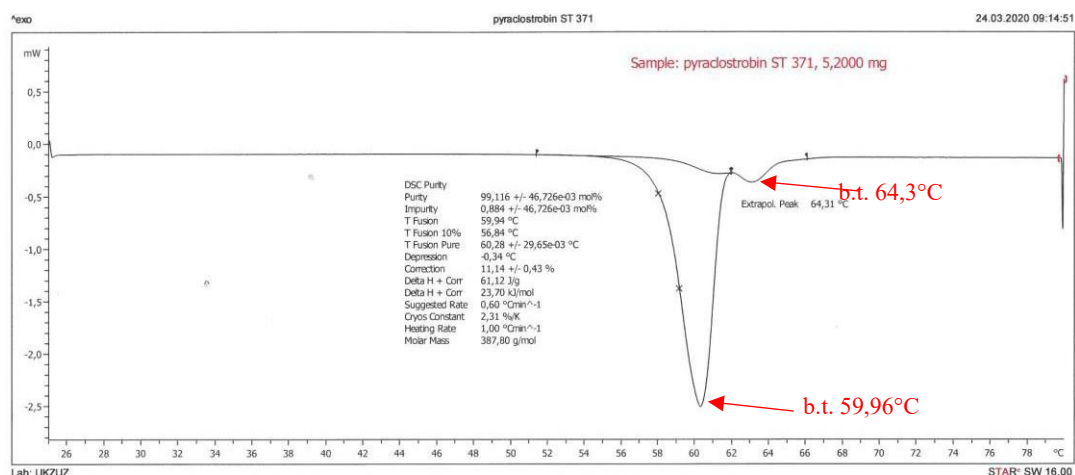
Při řešení dvou polymorfů cyprodinilu byl vypracován tento postup měření:

- (25 – 55) °C s rychlostí ohřevu 5°C/min,
- (55 – 71,8) °C s rychlostí ohřevu 1°C/min,
- 71,8 °C isoterma 10 min,
- (71,8°C – 60) °C s rychlostí chlazení 5 °C/min,
- (60 – 80) °C s rychlostí ohřevu 1°C/min.

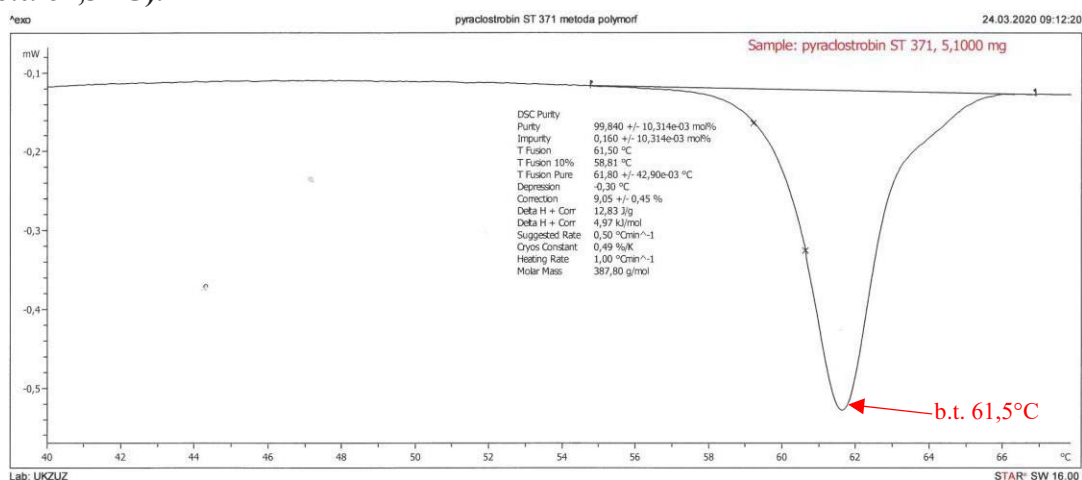
Pyraklostrobin (fungicid)



Pyralostrobin tvoří bílé až světle béžové krystaly [4] s b.t. (63,7 – 65,2) °C. U pyraclostrobinu jsou známy 4 krystalové modifikace označované I (b.t. 55 °C – 56 °C), II (b.t. 57 °C – 58 °C), III (b.t. 59 °C – 60 °C) a IV (b.t. 62 °C – 72 °C, 64 °C – 68 °C nebo 65 °C – 67 °C). Termodynamická stabilita klesá v řadě IV > III > II > I. Existuje rovněž amorfní pyraclostrobin ale tato forma není vhodná pro SC formulace, neboť během mletí surových krystalů dochází ve výrobě k ucpávání mlecích zařízení. Proto se pro přípravu SC formulací používá převážně krystalová modifikace IV. Byl analyzován standard ST 371 účinné látky pyraclostrobin se dvěma polymorfy viz Obrázek 14. Na Obrázku 14a je uveden příklad standardu pyraclostrobin ST 371 se dvěma polymorfy III a IV, na Obrázku 14b je uveden příklad stejného standardu s jedním polymorfem IV po odstranění polymorfu III.



Obrázek 14a. Pyraclostrobin ST 371 s polymorfem III (b.t. 59,96 °C) a polymorfem IV (b.t. 64,3 °C).



Obrázek 14b. Pyraclostrobin ST 371 s polymorfem IV (b.t. 61,5 °C) po odstranění polymorfu III.

Při řešení dvou polymorfů pyraclostrobinu byl vypracován tento postup měření:

- a) (25 – 45) °C s rychlostí ohřevu 5 °C/min,
- b) (45 – 59,9) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min,
- c) 59,9 °C isoterma 10 min,
- d) (59,9 – 40) °C s rychlostí chlazení 5 °C/min,
- e) (40 – 70) °C s rychlostí ohřevu 1 °C/min.

Stanovené hodnoty DSC čistoty standardů účinných látek a deklarované hodnoty jejich čistoty jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Přehled měřených účinných látek, u nichž byl identifikován vyšší počet polymorfů a jejich čistota.

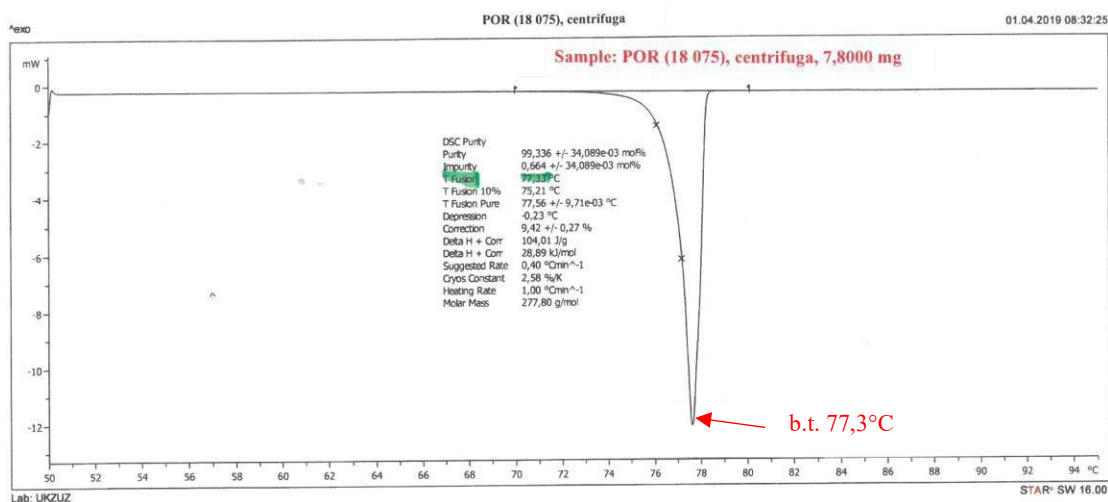
Účinná látka	Označení standardu	Počet stanovených polymorfů	Stanovená DSC čistota (%)	Deklarovaná čistota (%)
Cyprodinil	ST 166	2	99,8	99,9
Fipronil	ST 246	2	99,2	99,1
Flumioxazin	TG (10 056)	2	99,3	97,7
Karboxin	ST 1237	2	99,9	99,4
Metazachlor	ST 921	1	99,8	99,9
Metazachlor	ST 601	2	99,7	99,9
Metazachlor	č.š. CH971220	3	99,8	> 99,5
Pencycuron	č.š. NTN 19701	2	99,8	-
Pendimethalin	Tech. CIPAC 15/2005	1	99,1	-
Pendimethalin	Tech. CIPAC 2006/10	1	99,2	-
Pendimethalin	CIPAC standard	2	99,8	99,5
Pyraclostrobin	ST 371	2	99,8	99,9
Tebuconazol	ST 738	2	99,6	99,6

6.2 Využití stanovení polymorfů ve vzorcích POR

V rámci práce byla také ověřena možnost stanovení obsahu polymorfu v reálných vzorcích POR. Byly vybrány vzorky formulace SC (18 075) a (18 076) s obsahem účinné látky metazachlor, které vykazovaly při postregistrační kontrole rozdílné chování.

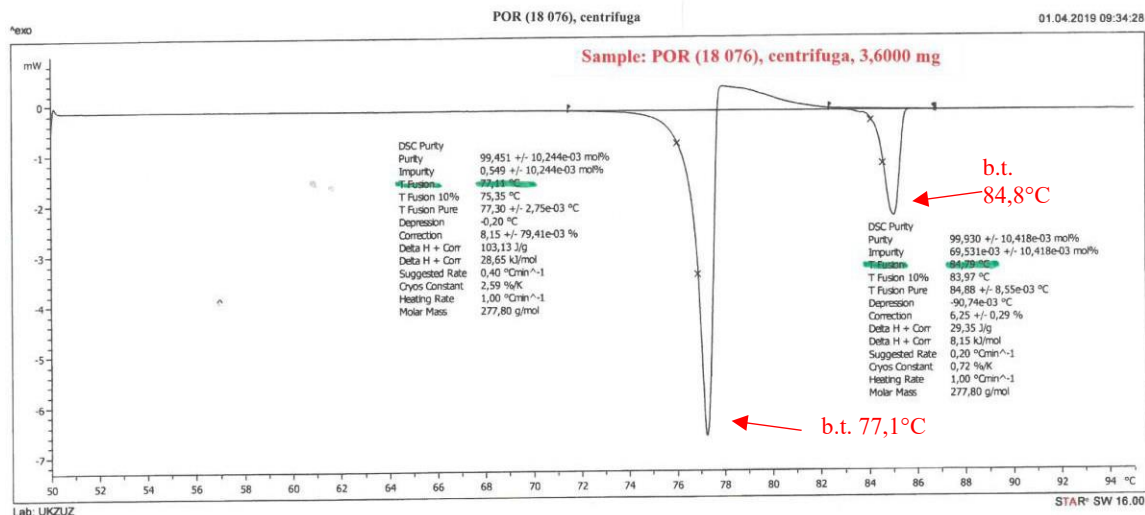
U vzorku POR (18 075), balení 5 L HDPE kanystr, nebyly problémy s jeho homogenizací viz Obrázek 4. Vzhledem k formulaci SC byla vyzkoušena separace účinné látky vodou tímto postupem:

3 g POR se smíchá v centrifugační zkumavce s 60 mL vody, dobře zhomogenizuje a centrifuguje se při 5 tis. ot./min. Vodný separovaný podíl se odebere plastovou pipetkou. Postup se 5 × opakuje. Vyčištěný metazachlor se nechá volně uschnout 24 h na filtračním papíru při laboratorní teplotě. Suchý a vyčištěný metazachlor byl podroben DSC analýze. Bylo zjištěno, že reálný vzorek obsahuje pouze polymorf III, Obrázek 4. Tato SC formulace nevykazovala ani po urychleném skladovacím testu (8 týdnů při 40 ± 2 °C) sedimentaci vzorku. Její skladovatelnost do budoucna nebude vykazovat problémy s vytvářením sedimentů v kanystru a bude po celou dobu expirace snadno homogenizovatelná!



Obrázek 4. Metazachlor s obsahem polymorfu III (b.t. 77,3 °C) v POR (18 075).

Velký rozdíl byl zaznamenán u POR (18 076), balení 5 L HDPE kanystr viz Obrázek 5. Při jeho homogenizaci bylo potřeba intenzivního třepání. Byl odebrán vzorek ke zjištění, jaký(é) polymorf(y) tento POR obsahuje. Separace metazachloru byla provedena výše uvedeným postupem a vysušený metazachlor byl podroben DSC analýze. Metazachlor obsahoval polymorfy III a I. Tím, že v POR jsou obsaženy dva polymorfy, tak potenciální přechod polymorfu I na III bude způsobovat do budoucna u tohoto vzorku POR problémy se skladovatelností (homogenizace, vytváření tvrdého sedimentu v kanystrech apod.)



Obrázek 5. Metazachlor s obsahem dvou polymorfů III (b.t. 77,1 °C) a I (b.t. 84,8 °C) v POR (18 076).

6.3 Účinné látky, u nichž nebylo více polymorfů identifikováno

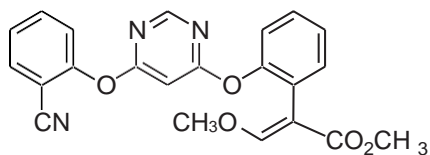
U níže uvedených měřených standardů účinných látek nebylo nalezeno více polymorfů než jeden, ačkoli literatura uvádí vyšší počet, viz Tabulka 3.

Tabulka 3. Přehled účinných látek, u nichž literatura uvádí vyšší počet polymorfů, avšak byl identifikován pouze jeden polymorf.

Účinná látka	Výsledek analýzy DSC	Počet polymorfů uváděných v literatuře ^[1] , [2], [4], [7] - [9]
Azoxystrobin*	Nalezen 1 polymorf	2
Dithianon	Rozklad v bodu tání	4
Mesotrion*	Rozklad v bodu tání	2
Propazin	Nalezen 1 polymorf	2
Quizalofop-p-ethyl	Nalezen 1 polymorf	2
Trifluralin*	Nalezen 1 polymorf	2

*Získané podrobnější informace se uvádějí níže pro možnou budoucí potřebu k rozlišení polymorfů u uvedených látek.

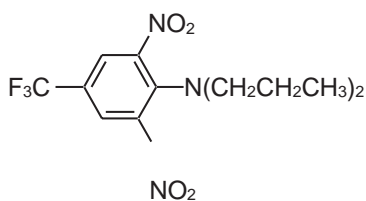
Azoxystrobin (fungicid)



Azoxystrobin tvoří bílé krystaly s b.t. 116 °C [4]. Podle zkušeností laboratoře krystaly azoxystrobinu mohou mít bílou nebo nažloutlou barvu. Rozdíl v barvě nemá vliv na krystalovou strukturu!

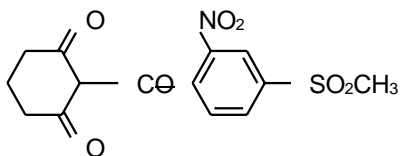
U azoxystrobinu jsou známy dvě krystalové modifikace označované A (b.t. 114 °C – 117 °C) a B (b.t. 101 °C – 105 °C). Modifikace A je termodynamicky stálá. Krystalové modifikace lze rozlišit i pomocí FTIR. Pro modifikaci A jsou typické vibrace: 1378 cm⁻¹, 1328 cm⁻¹, 1154 cm⁻¹ a pro modifikaci B jsou typické vibrace: 1389 cm⁻¹, 1335 cm⁻¹, 1245 cm⁻¹.

Trifluralin (herbicid)



Trifluralin tvoří žlutooranžové krystaly s b.t. (48,5 – 49) °C [4]. V literatuře jsou ale známy dva typy krystalových modifikací [7]. Žlutá modifikace s b.t. (43 – 44) °C tvoří jemné krystaly, oranžová modifikace s b.t. (48,5 – 49) °C tvoří hrubé krystaly. Žlutá modifikace je metastabilní a přechází při laboratorní teplotě postupně na oranžovou modifikaci, která je termodynamicky stálá. Pokud formulace obsahuje žlutou modifikaci, přechod na stabilnější oranžovou modifikaci bude způsobovat vznik aglomerátů a poté blokaci filtrů při aplikaci postřikové jichy. Preferovaná forma v POR je oranžová modifikace, ale existuje i speciální mikrokapsulovaná formulace s obsahem žluté krystalické modifikace, která má lepší dispergovatelnost ve vodě než oranžová forma.

Mesotrion (herbicid)



Mesotrion tvoří světle žluté krystaly s b. t. 165 °C [4]. V patentu [8] jsou zmíněny dvě krystalové modifikace: modifikace I, která je termodynamicky stabilní a tvoří větší krystaly a dále metastabilní modifikace II, která tvoří velmi jemné krystalky, které se velmi těžko filtrují. Modifikace II postupně přechází na modifikaci I. Pokud POR (nejčastěji SC formulace) obsahují modifikaci II, bude nestabilní a dojde k agregaci účinné látky a k tvorbě sedimentů.

Podle zkušeností laboratoře je barva standardů mesotriionu např. ST 351, 753 téměř bílá a z uvedených FTIR spekter dostupné v patentu [9] lze usoudit na modifikaci I.

7 Závěr

V práci byly hledány a optimalizovány podmínky pro řešení čistoty standardů účinných látek se dvěma a více polymorfy. Nejlepším řešením pro standardy se dvěma polymorfy se ukázalo převedení polymorfu s nižším bodem tání na polymorf s vyšším bodem tání a poté stanovení čistoty standardu již obvyklým způsobem ze zjištěného jednoho bodu tání a uplatnění van'Hoffovy rovnice pro výpočet čistoty standardu. Tato metoda byla testována na devíti standardech pesticidů, u kterých byla zjištěna rozdílná krystalová struktura.

U standardu se třemi polymorfy, metoda postupným odstraňování metastabilních polymorfů s domněním, že zůstane jen jeden, nefungovala. Tři polymorfy byly nalezeny pouze u standardu metazachloru z roku 1980. Tady se osvědčila metoda odstranění prostředního metastabilního polymorfu II, přičemž došlo zároveň i k odstranění polymorfu III. Výsledkem bylo získání jen jednoho polymorfu I s následným možným výpočtem čistoty standardu. Tato metoda nemohla být ověřena ověřit na jiných standardech, neboť nebyl k dispozici další standard se třemi polymorfy.

Je pravděpodobné, že do budoucna standardy s obsahem tří polymorfů budou velmi vzácné, neboť snahou výrobců POR je syntetizovat polymorf s požadovanou krystalovou strukturou a předejít tak problémům s fyzikálním chování heterogenních formulací.

Práce zaměřená na stanovení čistoty standardů obsahujících dva a více polymorfů mimo jiné také ukázala možnost využití DSC kalorimetrie pro predikci chování reálných vzorků POR s obsahem vyššího množství polymorfů jak při homogenizaci, tak také při jejich skladování.

8 Literatura

1. J. Therm. Anal. Cal.77, 2004.
2. C.Tomlin, The pesticide Manual 10th Ed. British Crop protection Council, UK 1994, p. 667.
3. US Patent 8212054 – Crystalline complexes of pendimethalin and metazachlor
4. e-Pesticide Manual version 4.0, BCPC 2006.
5. Tebuconazole 494 (W.Dobrat and A.Martijn, editors) Vol. H, pp. 268, CIPAC 1998.
6. Patent WO 2019095891A1 – Tebuconazole polymorph and preparation method therefor.
7. US Patent 5317004 – Microencapsulated yellow polymorphic form of trifluralin.
8. Patent WO2006021743A1 – Process for the preparation of polymorphs of mesotrione.
9. US Patent 2008/0194880A1 – Process for the preparation of polymorphs of mesotrione.

Zavedení metody hustotní frakcionace půdní organické hmoty

Andrea Zálešáková, Stanislav Malý

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdMB, Hroznová 2, 656 02 Brno
stanislav.maly@ukzuz.cz

1 Úvod

Půdní organická hmota (SOM, soil organic matter) je nepostradatelná pro řadu klíčových funkcí a procesů, které půda zajišťuje pro fungování celého ekosystému. Jako příklad můžeme uvést agregaci půdních částic a s ní související ochranu proti erozi, schopnost půdy zadržovat vodu, vázat organické polutanty a tím snižovat jejich biodostupnost, vázat minerální živiny a bránit jejich vyplavování, sloužit jako substrát půdním mikroorganismům a bezobratlým a ovlivňovat tepelný režim půdy (Blanco-Canqui et al., 2013). Uvedené funkce SOM souvisí s její strukturou a vazbou na minerální částice. V předložené práci se zabýváme zavedením metody pro hustotní separaci lehké frakce SOM (LF), tvořené zbytky rostlin a živočichů, od těžké frakce (HF, heavy fraction), tvořené produkty dekompozice složitých organických látek, asociovanými s částicemi jílu či prachu. Předpokládá se, že LF představuje labilní frakci, která je citlivá na agrotechnické zásahy. Naopak HF, chráněná proti mikrobiálnímu rozkladu, je charakterizována delší dobou obratu. Pro extrakci se používá inertní kapalina s hustotou $> 1 \text{ g.cm}^{-3}$, nejčastěji jodid sodný (NaI) nebo polywolframan sodný (SPT, Sodium Polytungstate).

Cílem práce bylo:

1. Zavést metodu hustotní frakcionace SOM,
2. Stanovit opakovatelnost metody,
3. Vyhodnotit, jakým způsobem ovlivňuje obhospodařování půdy obsah uhlíku vázaného v LF a HF a popsat vztahy mezi LF/HF a fyzikálně-chemickými a mikrobiologickými půdními vlastnostmi.

2 Princip

Metoda hustotní frakcionace vychází z práce Golchin et al. (1994). Půdní vzorek se třepe v roztoku těžké kapaliny, zde polywolframanu sodného (hustota = 1,85 g.cm⁻³), dále se centrifuguje, nechá se stát a plovoucí lehká frakce se odsaje na filtr (0,7 μm), kde se promyje destilovanou/demineralizovanou vodou a vysuší. Těžká frakce na dně zkumavky se promyje destilovanou/ demineralizovanou vodou a vysuší. Následně se, jak v lehké frakci, tak v těžké frakci, stanoví obsah organického uhlíku (TOC).

3 Materiál a metody

3.1 Půdy

V rámci monitoringu mikrobiálních vlastností půd ČR bylo odebráno celkem 76 půdních vzorků. Z celkového počtu 71 lokalit bylo 46 na orných půdách, 14 na trvalých travních porostech (TTP) a na 11 lokalitách došlo během sledovaného období (od roku 1993) ke změně způsobu obhospodařování. Ve všech případech se jednalo o zatravnění orné půdy, ke kterému došlo v období 1995 až 2005 (data pro jednotlivé plochy jsou dostupná). Pět ploch TTP, které se nacházejí v chráněných oblastech, bylo vzorkováno dvakrát. Ostatní plochy byly vzorkovány jednou.

Vzorky byly po odběru uloženy v ledničce, prosety (2 mm), vysušeny (20 °C) a skladovány při laboratorní teplotě.

3.2 Půdní fyzikálně-chemické a mikrobiologické charakteristiky

Fyzikálně-chemické a mikrobiologické analýzy půd byly provedeny podle Jednotných pracovních postupů ÚKZÚZ (Zbiral et al., 2010; Zbiral et al., 2011). Obsah C v nefumigovaných půdách při stanovení C mikrobiální biomasy (MBC) je označen jako C_{ext}. Bazální respirace (R_B) a substrátem indukovaná respirace (R_s) byly stanoveny jako spotřeba O₂.

3.3 Přístroje a pomůcky

1. Horizontální třepačka ($180 \text{ kmitů} \cdot \text{min}^{-1}$).
2. Centrifuga s rotorem pro zkumavky (6).
3. Hustoměr (rozpětí $1,800 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ až $1,900 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$).
4. Horkovzdušná sušárna.
5. Sestava pro membránovou filtraci: nálevka pro membránovou filtraci (pro filtry o průměru 50 mm) s víčkem a hadičkou pro odsávání, odsávací baňka, membránová vývěva.
6. Zkumavky centrifugačnís víčkem (50 ml).
7. Membránové filtry ze skleněných vláken (průměr 50 mm, velikost pórů $0,7 \mu\text{m}$).
8. Petriho misky.
9. Odměrný válec pro měření hustoty SPT.
10. Hmoždířový mlýn RM200 (Retsch).
11. Analyzátor NC 2100 C (Jena Analytik, Německo) s modulem pro stanovení C v pevné fázi.

3.4 Chemikálie

1. Polywolframnan sodný (SPT) $3\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 9\text{WO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (hustota = $1,850 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$),
Výrobce: TC-Tungsten Compounds GmbH, Německo; kat. č. SPT0 - s velmi nízkým obsahem uhlíku.

3.5 Pracovní postup

Do předem zvážené centrifugační zkumavky se ve dvou opakováních naváží 10 g suché a proseté (2 mm) půdy. Ke vzorku se přidá 25 ml roztoku SPT a vzniklá suspenze se třepé 30 min na třepačce při laboratorní teplotě a při frekvenci $180 \text{ kmitů} \cdot \text{min}^{-1}$. Poté se suspenze centrifuguje 30 min při 1500 g. Materiál ulpělý na víčku a stěnách zkumavky se spláchně 4×1 ml roztoku SPT zpět do zkumavky, hrdlo zkumavky se otře buničitou vatou, zkumavka se uzavře a nechá stát 24 h. Plovoucí lehká frakce se opatrně sesbírá lžičkou na zvážený membránový filtr, supernatant se rovněž opatrně slije na filtr a následně se lehká frakce promyje 100 ml destilované/demineralizované vody. Filtr se poté přenesé do zvážené Petriho misky. Prošlý filtrát (tj. SPT) se sbírá za účelem jeho recyklace. Sediment na dně zkumavky (těžká

frakce) se resuspenduje v 25 ml destilované/demineralizované vody a centrifuguje 3 min při 2000 g. Supernatant se vylíje a sediment se opět resuspenduje, tento proces se opakuje celkem 4 ×. Následně se těžká frakce ve zkumavce a lehká frakce společně s membránovým filtrem suší při 60 °C po dobu 24 h v sušárně a zváží se. Těžká frakce se pomocí lžičky vyškrabe ze zkumavky, poté se pomelel a proseje přes síto (0,25 mm), lehká frakce se jen opatrně seškrábne z filtru do zvážené porcelánové lodičky. U obou frakcí se metodou suchého spalování stanoví obsah celkového organického uhlíku (TOC) při 1100 °C.

Poznámka

¹ Vysušená těžká frakce byla pomleta na hmoždířovém mlýnu po dobu 2 min s nastavenou hodnotou přitlačného tlaku 6.

3.6 Výpočet

$$\text{TOC}_{\text{LF}} = ((m_1 - m_2 - m_3) / m_4) \times c_1$$

$$\text{TOC}_{\text{HF}} = ((m_5 - m_6) / m_4) \times c_2$$

Alternativně lze vypočítat obsah TOC v HF jako: $(1 - ((m_1 - m_2 - m_3) / m_4)) \times c_2$, kde se zanedbají ztráty vzorku.

TOC_{LF} obsah organického uhlíku lehké frakce SOM ve vzorku

TOC_{HF} obsah organického uhlíku těžké frakce SOM ve vzorku

m_1 hmotnost Petriho misky s filtrem a LF [g]

m_2 hmotnost prázdné Petriho misky [g]

m_3 hmotnost filtru [g]

m_4 hmotnost vzorku [g]

c_1 koncentrace TOC v LF [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]

m_5 hmotnost zkumavky s HF [g]

m_6 hmotnost prázdné zkumavky [g]

c_2 koncentrace TOC v HF [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]

4 Statistické vyhodnocení a grafické zpracování dat

Statistické vyhodnocení a grafické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu R 4.0.3 (R Development Core Team, 2020). Pro úpravu dat byly použity balíčky dplyr a tidyr, pro výpočet Tukeyho testu balíček multcomp, grafy byly vytvořeny pomocí balíčku lattice. Pro grafické zobrazení zrnitostního trojúhelníku byl použit balíček plotrix, k výpočtu hierarchical partitioning balíček hier.part. Pro zjištění vlivu obhospodařování (orná půda, TTP) byl aplikován t-test a pro porovnání pracovníků jeho párová varianta. V případě nesplnění požadavků na homogenitu variancí a normalitu byla data logaritmována. Korelace byla spočítána jako Spearmanův korelační koeficient. Všechny testy byly provedeny na hladině významnosti $p = 0,05$. Před statistickou analýzou byly spočteny průměry pro půdy z chráněných oblastí, které byly odebírány opakovaně v obou odběrových letech. Ze statistických testů byla vyloučena odlehlá půda 9117. Pro úpravu grafů byl použit program Inkscape 1.0.

4.1 Optimalizace parametrů

Hmotnost vzorku

Podle literatury se hmotnost vzorku pohybuje kolem 10 g, a proto se na začátku experimentu vycházelo z této hodnoty. S cílem zvýšit množství extrahované LF a tím i snížit variabilitu mezi paralelními stanoveními byl proveden pokus s navážkou 15 g půdy. Protože při zvýšené navážce často docházelo k zahlcení filtrační nálevky a ucpání filtru, navážka se upravila na původních 10 g.

Objem SPT

Za optimální je považován poměr navážky vzorku a objemu SPT 1 : 3 až 1 : 5. Protože zde nebyla limitace objemem zkumavky, vycházelo se z navážky 10 g vzorku a 50 ml roztoku SPT. V dalším kroku optimalizace parametrů však bylo nutné zredukovat objem centrifugační zkumavky z původních 100 ml na 50 ml, a tím pádem i objem SPT. Při vlastních analýzách se používalo 10 g půdy a 30 ml SPT, tedy poměr 1 : 3.

Délka třepání

Následně se upravovala doba třepání. Výchozí čas třepání byl 2 h, přičemž bylo snahou jej co nejvíce zkrátit, neboť se předpokládá, že delší třepání vede k narušování půdních agregátů, a tím dochází ke zkreslování výsledků. Protože některé práce uvádějí pouze krátké protřepání vzorku v ruce, bylo provedeno porovnání rozdílů mezi třepáním vzorku po dobu 30 min a 60 min. Získaná data, která shrnuje tabulka 1, ukazují, že zkrácení doby nevede k významným rozdílům ve výtěžku LF i HF.

Tabulka 1. Výtěžek LF a HF v závislosti na délce třepání.

	30 min třepání	60 min třepání
Průměrný výtěžek LF [mg] (n = 4)	92	95
Průměrný výtěžek HF [g] (n = 4)	8,37	8,84

Způsob sedimentace vzorku

Gregorich et al. (2008) uvádějí, že pro separaci lehké frakce od těžké lze použít pozvolnou sedimentaci vzorku po dobu 48 h nebo jeho centrifugaci. Protože 48h sedimentace je pro rutinní analýzy nepraktická, cílem bylo oddělit LF a HF centrifugací. Experiment probíhal následovně: v první sadě vzorků se jedna dvojice nechala stát 24 h, druhá 48 h a třetí se centrifugovala 1 h při 1500 g. Účinek separace se porovnával vizuálně, konkrétně zda a do jaké míry byl roztok SPT mezi sedimentem a plovoucí frakcí zakalen. Bylo zjištěno, že nejlepší separace je dosaženo při 48h stání, následně stání po 24 h a nakonec centrifugací. Proto se v druhé sadě testovala délka centrifugace, a to v časech (30; 60; 90; 120; 150) min při 1500 g. Supernatant po 60 min centrifugace vizuálně obsahoval méně plovoucích částic, než při centrifugaci 30 min, avšak stále nebylo dosaženo vzhledu vzorku, který sedimentoval gravitační silou po 48 h. Odstředování delší než 60 min nevedlo ke zlepšení. Ve třetí sadě vzorků se zkoušela kombinace odstředování a stání vzorku: 30 min odstředování a 24 h stání; 30 min odstředování a 48 h stání; 60 min odstředování a 24 h stání a 60 min odstředování a 48 h stání. K dosažení stejného výsledku jako v případě 48 h stání stačilo pouze 30 min odstředování v kombinaci se 24 h stáním.

Izolace lehké frakce

K izolaci lehké frakce od těžké se využívá několik způsobů, a to: odsání pipetou či vývěvou, dále přímé vylití celého objemu supernatantu na filtr nebo opatrné sesbírání plovoucího materiálu lžičkou na filtr. V této práci se nejdříve vyzkoušelo vylití supernatantu na filtr. Protože docházelo ke kontaminaci lehké frakce těžkou, bylo snahou zavést jiný způsob separace. Proto se lehká frakce u dalších vzorků odsála automatickou pipetou. To se ukázalo být velmi nepraktické – materiál ulpíval uvnitř i vně plastové špičky, navíc docházelo ke značnému zakalení supernatantu. Všeobecně je doporučováno odsávání pomocí vakua. Tato metoda se ukázala rovněž nevhodná, neboť docházelo k ulpívání materiálu v odsávací hadičce, jejímu následnému ucpání a navrácení odsátého materiálu zpět do zkumavky, čímž došlo k rozvíření supernatantu. V závěru se tedy uplatnil opatrný sběr (tzn. nedochází k rozvíření materiálu v supernatantu) LF lžičkou, zbylá část se opatrně slije na filtr, nevylévá se však celý objem supernatantu.

Odstřed'ování při promývání těžké frakce

U půdy 2001 docházelo při promývání těžké frakce ke ztrátám průměrně o 7,3 % hmotnosti vzorku (u ostatních vzorků byly ztráty asi 2 %). Proto bylo vyzkoušeno odstřed'ování při 5000 g, které by mohlo ztráty snížit. To se však ukázalo být nedostatečné, a přistoupilo se k odstřed'ování při maximu centrifugy, tj. 8780 g. Z výsledků vyplynulo, že zvýšení odstředivé síly vede k redukci ztrát vzorku, avšak při následném zpracování vzorku dochází opět ke ztrátám díky ulpívání vzorku na dně zkumavky. V závěru se proto od změny odstřed'ování upustilo.

4.2 Výsledky a diskuse

Verifikační parametry

Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti byly vybrány čtyři půdy s různými fyzikálně chemickými vlastnostmi, které shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2. Vlastnosti půd pro stanovení opakovatelnosti.

	Obhosp.	Jíl %	Prach %	Písek %	pH 1 M KCl	TOC mg.g⁻¹
2001	Orná	30,1	48,5	21,4	6,2	20,3
2019	Orná	14,2	37,8	48,0	6,6	10,3
6025	TTP	13,4	34,3	52,3	4,8	29,5
9005	TTP	22,8	50,2	27,0	4,4	49,4

Jíl – obsah částic menších než 0,002 mm, Písek – obsah částic větších než 0,05 mm, Prach – obsah částí v rozmezí 0,002 mm – 0,05 mm, TOC – celkový organický uhlík. Půda označená 9005 byla odebrána z lokality na území chráněné krajinné oblasti.

Opakovatelnost byla stanovena jako směrodatná odchylka deseti měření uvedených vzorků, vždy ve dvou opakováních, ze kterých byl vypočten průměr. Výsledky shrnuje tabulka 3, graficky jsou data zobrazena na obr. 1. U půdy 2001 bylo jedno z paralelních měření TOC_{LF} v první sérii odlehlé. Pro tuto půdu byla opakovatelnost spočtena jak pro úplnou sadu dat, tak po odstranění tohoto měření. Výsledky ukazují vyšší variabilitu v případě TOC_{LF}, variační koeficient se pohyboval v rozmezí 6,66 % až 15,0 %, pokud se odstraní odlehlé měření. Hodnoty variačního koeficientu TOC_{HF} nepřekročily 10 %. Vyšší variabilita TOC_{LF} souvisí s větší heterogenitou lehké frakce a určitými praktickými obtížemi při její separaci během analýzy. Vliv půdních vlastností na opakovatelnost se neprokázal. Pro obě stanovované frakce jsou hodnoty opakovatelnosti akceptovatelné.

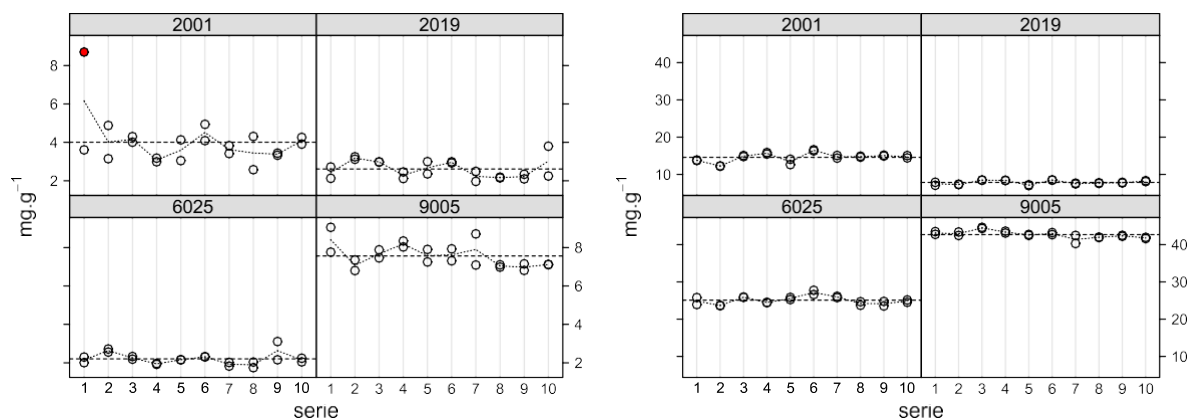
Robustnost

Vzhledem k tomu, že provedení analýzy vyžaduje manuální zručnost, byl na vybraných vzorcích půd (2018, 2019, 6025, 8024, 9117) porovnáván vliv lidského faktoru na stanovení TOC_{LF} a TOC_{HF}. Výsledky neprokázaly rozdíly v analýzách, které provedly dvě pracovnice; p-hodnota byla 0,387 pro TOC_{LF} a 0,672 pro TOC_{HF}.

Tabulka 3. Hodnoty opakovatelnosti (n=10) pro TOC_{LF} a TOC_{HF} . Hodnoty průměrů a směrodatných odchylek jsou uvedeny v $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, variačních oeficientů (cv) v %.

Půda	Parametr	TOC_{LF}	TOC_{HF}
2001	průměr	4,01	14,6
	sd	0,867	1,19
	cv	21,7	8,17
2001 (bez odlehlého)	průměr	3,75	14,6
	sd	0,430	1,20
	cv	11,5	8,21
2019	průměr	2,62	7,86
	sd	0,393	0,505
	cv	15,0	6,42
6025	průměr	2,21	25,1
	sd	0,267	1,06
	cv	12,1	4,24
9005	průměr	7,56	42,7
	sd	0,503	0,889
	cv	6,66	2,08

(bez odlehlého) – výpočet proveden po odstranění odlehlého měření v první sérii



Obrázek 1. Výsledky stanovení opakovatelnosti TOC_{LF} (vlevo) a TOC_{HF} (vpravo). Červeně je označeno odlehlé měření TOC_{LF} v půdě 2001. Vertikální čára označuje průměrnou hodnotu.

4.3 Vztah LH a HF ke způsobu obhospodařování půdy a půdním fyzikálně chemickým a mikrobiologickým vlastnostem

Vztah LF a HF ke způsobu ohospodařování a půdním vlastnostem byl studován v 71 vzorcích odebraných na pozorovacích plochách půdního bazálního monitoringu ÚKZÚZ. Níže uvedený text stručně shrnuje získané poznatky, aniž by se věnoval detailní diskusi.

Deskriptivní statistika a odlehlá půda 9117

Popisnou statistiku základních půdních vlastností uvádí tabulka 4; obsahu TOC_{LF} , TOC_{HF} a poměru obou frakcí tabulka 5.

Důkladnější pohled do tabulky 5 odhaluje podezřele vysokou hodnotu maxima poměru mezi obsahem C lehké a těžké frakce $TOC_{LF:HF}$ v sadě půd TTP. Clevelendův graf ukazuje jako odlehlý bod půdu 9117 (obrázek 2, vlevo).

Tabulka 4. Základní fyzikálně-chemické a mikrobiologické půdní charakteristiky.

Obhospodař.	Statistka	pH 1 M KCl	Jíl %	TOC mg.g ⁻¹	MBC μg.g ⁻¹	R _B	R _S
Orná (n = 46)	Minimum	4,3	2,05	6,09	79	0,71	6,86
	Medián	5,8	22,1	15,7	192	1,37	19,8
	Maximum	7,4	64,1	36,8	385	3,31	47,2
TTP (n = 14)	Minimum	3,3	6,28	15,0	121	0,94	2,55
	Medián	4,7	15,1	29,8	476	2,85	30,5
	Maximum	7,4	47,4	55,5	1334	6,41	59,9
Změna (n = 11)	Minimum	4,0	8,08	12,5	148	1,17	9,38
	Medián	4,6	11,7	16,8	313	2,21	22,7
	Maximum	7,3	26,0	36,3	515	3,63	42,2

Jíl – obsah částic menších než 0,002 mm; MBC – uhlík mikrobiální biomasy, R_B – bazální respirace (μg O₂.g⁻¹.h⁻¹), R_S – substrátem indukovaná respirace (μg O₂.g⁻¹.h⁻¹), TOC – celkový organický uhlík; TTP – trvalý travní porost, Změna – plochy, na kterých došlo ke změně obhospodařování

Tabulka 5. Popisná statistika obsahu organického C lehké a těžké frakce a poměru obou frakcí.

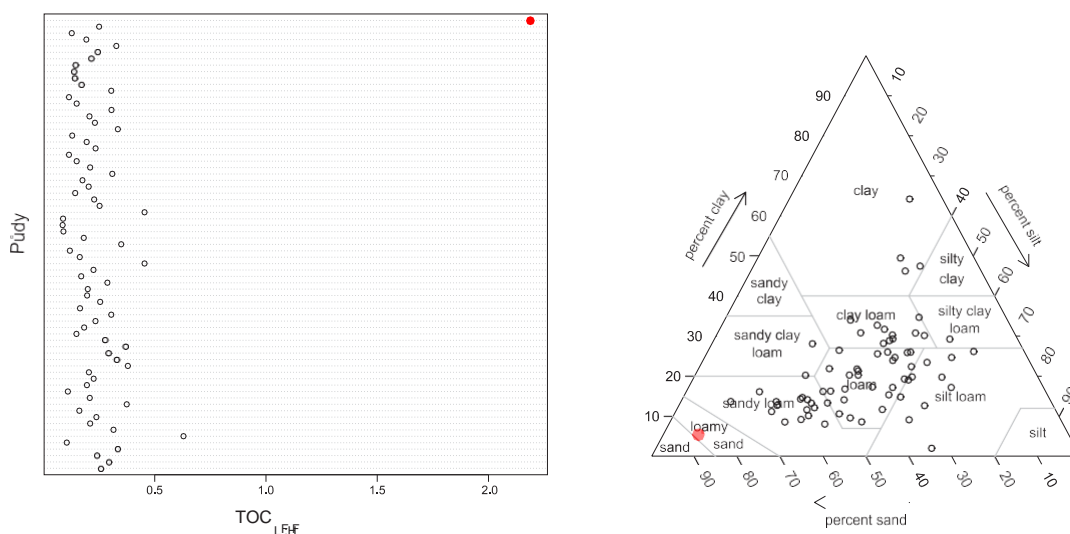
Obhosp.	Statistika	TOC _{LF} mg.g ⁻¹	TOC _{HF} mg.g ⁻¹	TOC _{LF:HF}
Orná (n = 46)	Minimum	1,33	4,29	0,087
	Dolní kvartil	2,16	9,56	0,185
	Medián	2,67	12,3	0,230
	Průměr	2,89	12,6	0,243
	Horní kvartil	3,22	14,6	0,303
	Maximum	6,29	28,6	0,630
TTP (n = 14)	Minimum	2,21	5,35	0,088
	Dolní kvartil	3,40	18,6	0,131
	Medián	4,26	21,7	0,179
	Průměr	5,33	23,5	0,355
	Horní kvartil	6,71	29,3	0,308
	Maximum	11,4	45,1	2,181
Změna (n = 11)	Minimum	2,07	9,43	0,091
	Dolní kvartil	2,42	11,4	0,157
	Medián	2,67	13,7	0,184
	Průměr	2,83	15,9	0,194
	Horní kvartil	2,97	19,3	0,234
	Maximum	4,87	28,3	0,310

TOC_{LF:HF} označuje poměr TOC_{LF} : TOC_{HF}

Nalezená hodnota poměru TOC_{LF:HF} je zde více než čtyřikrát vyšší v porovnání s ostatními půdami. Důvodem této neobvykle vysoké hodnoty je pravděpodobně zrnitostní složení půdy 9117, která je jako jediná z celé sady klasifikována jako písčité hlína (loamy sand) (obrázek 2, vpravo). Je známo, že písčité půdy mají nižší kapacitu vázat organické sloučeniny na povrchích půdních částic, než je tomu u půd s vyšším obsahem jílovitých částic.

Protože plocha 9117 se nachází na trvalém travním porostu v chráněné oblasti, lze očekávat relativně vyšší vstupy rostlinných zbytků. Tomu odpovídá hodnota TOC_{LF} 11,4 mg.g⁻¹, která je v celé sadě nejvyšší. Naopak obsah C těžké frakce 5,25 mg.g⁻¹ je druhý nejnižší. Přesto je extrémnost poměru TOC_{LF:HF} v půdě 9117 nečekaná, protože v případě ostatních půdních vlastností jsou rozdíly v porovnání s ostatními půdami mnohem méně výrazné. Každopádně se jedná o vlastnost půdy v kontextu charakteru stanoviště, nikoliv jednorázový výkyv. Plocha 9117 byla vzorkována opakovaně v letech 2017 a 2018 s odpovídajícími si nalezenými

hodnotami $TOC_{LF:HF}$ 1,92 a 2,44. Jak si ukážeme dále, popsaná skutečnost ovlivnila mikrobiální parametry, které jsou s obsahem půdního organického C úzce spojené.



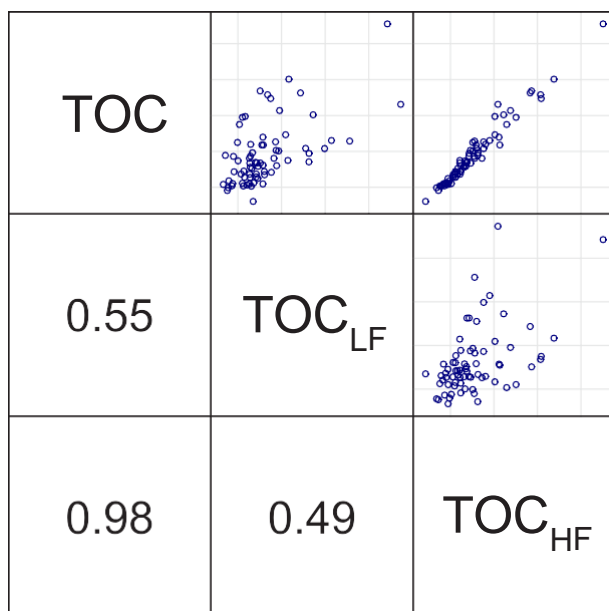
Obrázek 2. Clevelandův graf poměru $TOC_{LF:HF}$ (vlevo). Trojúhelník pro klasifikaci půd do půdních druhů na základě zrnitostního složení (vpravo) se zobrazenými jednotlivými půdami. Clay – jíl, silt – prach, sand – písek. Velikost jednotlivých částic viz tab. 2. Odlehlý bod 9117 je v obou grafech znázorněn červeně.

Vliv obhospodařování na obsah LF a HF, vztah mezi TOC a oběma frakcemi

Vliv obhospodařování na obsah LF a HF byl analyzován v půdách, které jsou trvale vedeny jako orné nebo TTP. Hodnoty TOC_{LF} a TOC_{HF} byly přibližně dvojnásobné v půdách TTP oproti půdě orné (tab. 5) a tento rozdíl byl vysoce signifikantní ($p < 0,001$). Jedná se o důsledek vyšší rostlinné biomasy na plochách TTP a agrotechnických zásahů, jako např. orby. Signifikantní rozdíl naopak nebyl nalezen pro poměr $TOC_{LF:HF}$. Z hlediska transformace C rostlinných zbytků do sloučenin vázaných na povrchích minerálních částic je použitá sada půd zřejmě značně homogenní. Tomu odpovídá i velmi těsný vztah mezi TOC a TOC_{HF} (tab. 6, Obr. 3). Pokud bychom ale chtěli v tomto směru zobecňovat, je na místě maximální opatrnost. Ačkoliv popsaný vztah mezi TOC a TOC_{HF} je velmi úzký, půda 9117 ukazuje, že neplatí vždy. Jestliže medián obsahu TOC_{HF} v TOC v půdách TTP činil 82,1 % a minimální hodnota 63,2 %, v půdě 9117 to bylo pouze 35,6 %. Půda 9117 je rovněž jediná, ve které je poměr $TOC_{LF:HF}$ větší než 1. Pro pochopení mechanismu, který způsobuje nalezené rozdíly, je třeba analyzovat další půdy, které ve svých vlastnostech zaplní mezeru mezi půdou 9117 a zbývající sadou.

Tabulka 6. Procentuální obsah TOC v HF.

Statistika	Orná (n = 46)	TTP (n = 13)
Minimum	67,2	63,2
Dolní kvartil	76,2	75,8
Medián	79,1	82,1
Průměr	79,3	79,6
Horní kvartil	83,9	85,4
Maximum	92,2	88,9

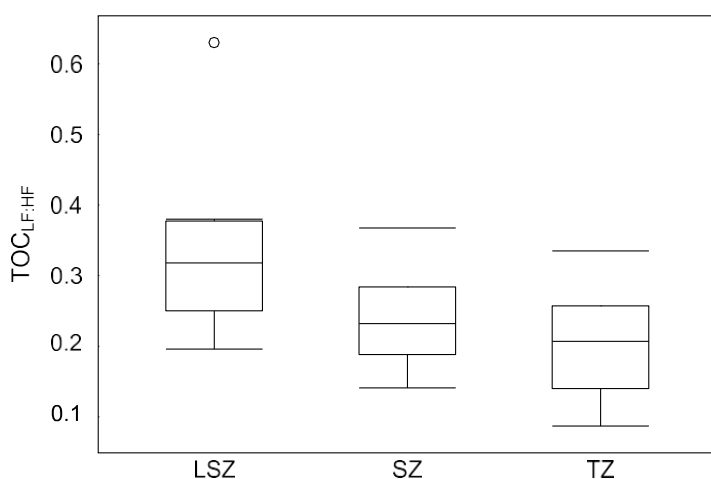


Obrázek 3. Matice korelací (Spearmanův koeficient) mezi TOC a oběma frakcemi.

Vliv půdních abiotických vlastností na obsah LF a HF

Korelační analýza neprokázala vztah mezi TOC_{LF}, TOC_{HF} a TOC_{LF:HF} na straně jedné a pH a zrnitostními frakcemi (jíl, prach, písek), na straně druhé (data nejsou ukázána). Zjištění ohledně odlehlé půdy 9117, popsané v části „Deskriptivní statistika a odlehlý bod 9117“, naznačuje vliv půdních druhů na akumulaci C v těžké frakci. Statistická analýza s cílem

potvrdit tuto hypotézu byla provedena na orných půdách, ze kterých byly vybrány tyto půdní druhy: lehká střední zemina (LSZ, 8 půd), střední zemina (SZ, 23) a těžká zemina (TZ, 12). Pro půdy TTP se podobný soubor obsahující minimálně 5 půd v každé kategorii nepodařilo vytvořit. Analýza neprokázala vliv půdních druhů na TOC_{LF} , naopak signifikantní výsledek byl nalezen v případě TOC_{HF} ($p < 0,05$; $LSZ < SZ < TZ$). Tukeyho test rozdílů mezi jednotlivými půdními druhy nicméně neprokázal. Nejvýrazněji se vliv půdních druhů projevil na poměru $TOC_{LF:HF}$ ($p < 0,05$, obr. 4). Tukeyho test odlišil LSZ od SZ/TZ. Uvedené výsledky potvrzují hypotézu, že písčité půdy mají nižší kapacitu vázat organickou hmotu.

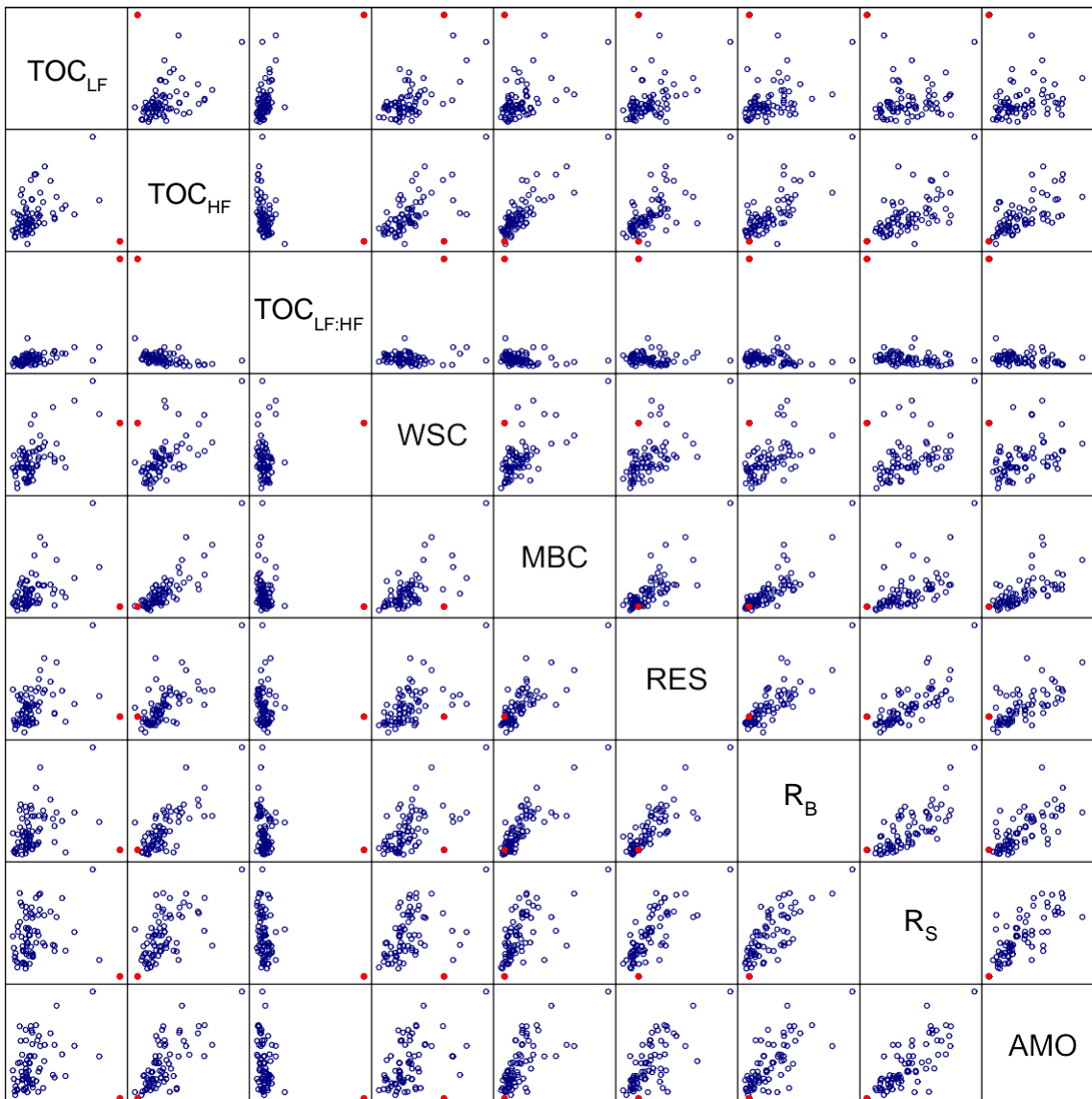


Obrázek 4. Krabicové diagramy vztahu $TOC_{LF:HF}$ a půdních druhů. LSZ – lehčí střední zemina, SZ – střední zemina, TZ – těžká zemina.

Lehká a těžká frakce půdní organické hmoty ve vztahu k mikrobiálním parametrům

Pro hodnocení byly vybrány mikrobiální parametry charakterizující akumulaci C v mikrobiální biomase (MBC), aktivní frakci mikrobiálního heterotrofního společenstva (substrátem indukovaná respirace, R_s), celkovou C mineralizační aktivitu (bazální respirace jako spotřebovaný O_2 , R_B ; uvolněný CO_2 , RES) a N mineralizaci (AMO). Kromě TOC_{LF} a TOC_{HF} byl do analýzy zahrnut vodou extrahovatelný C (WSC) jako nejlabilnější frakce půdní organické hmoty, tvořená zejména nízkomolekulárními sloučeninami.

Odlehlé případy ve statistické analýze představují příležitost, jak rozšířit znalosti směrem původně neplánovaným. Podívejme se proto na matici vzájemných vztahů mikrobiálních parametrů a jednotlivých frakcí vyjádřenou graficky (Obrázek 6). Červeně je zobrazen odlehlý bod 9117, charakterizovaný vysokým poměrem $TOC_{LF:HF}$ (2,18). V pravé dolní části grafu vidíme, že hodnoty mikrobiologických půdních vlastností v půdě 9117 dosahují minimálních hodnot (AMO, R_s) nebo se jí blíží (MBC, R_B , RES). Určitým vodítkem pro pochopení těchto vztahů může být skutečnost, že mikrobiální parametry jsou nižší než odpovídá koncentraci WSC. Toto zjištění může naznačovat omezenou schopnost půdních mikroorganismů v půdě 9117 využít labilní organickou hmotu. Tato hypotéza je v souladu s nízkou hodnotou TOC_{HF} , protože podle současných poznatků většinu uhlíku HF představují produkty mikrobiálního metabolismu. Je ale třeba zdůraznit, že na základě jedné půdy nelze činit závěry, jednak je třeba vzít v potaz např. skutečnost, že WSC je nejen substrát pro půdní mikroorganismy, ale zároveň produkt jejich metabolismu.



Obrázek 5. Grafy zobrazující vztahy mezi frakcemi půdní organické hmoty a mikrobiálními parametry (AMO – anaerobní amonifikace, MBC – C mikrobiální biomasy, R_B – bazální respirace jako rychlost spotřeby O₂, RES – bazální respirace jako rychlost produkce CO₂, R_S – substrátem indukovaná respirace, WSC – vodou extrahovatelný C). Odlehlý bod 9117 je zobrazen červeně.

Pro kvantitativní hodnocení příspěvku jednotlivých frakcí organické hmoty k variabilitě mikrobiálních parametrů byla použita metoda hierarchical partitioning (Chevan a Sutherland, 1991), která byla navržena pro situace, kdy je větší počet vzájemně korelovaných vysvětlujících proměnných (multikolinearita). Výsledky v tabulce 7 ukazují, že pět zvolených půdních parametrů (obsah jílovitých částic, pH, TOC_{LF}, TOC_{HF}, WSC) vysvětlovalo 60,3 % až 74,0 % variability ve zvolených mikrobiálních parametrech (R^2). Nejvýznamnější individuální příspěvek k variabilitě, který se nepřekrývá s příspěvky ostatních proměnných, představoval TOC_{HF} (43,3 % - 57,6 %). Příspěvek labilních, ale odlišných frakcí, WSC a TOC_{LF} byl nižší a pohyboval se v rozmezí 14,0 % až 28,9 % pro WSC a 4,21 % až 17,2 % pro TOC_{LF}. Obecně byl vztah mikrobiálních a abiotických proměnných konsistentní s výjimkou R_s s vysokým vlivem pH (34,0 %) a nižším TOC_{LF} (4,21 %). Interpretace není přímočará. V případě TOC_{HF} se může do značné míry jednat o nepřímý efekt, protože HF významně souvisí s vodním režimem ($r = 0,77$ pro korelaci s maximální vodní kapacitou, $p < 0,001$), přičemž vodní režim půdy významně ovlivňuje mikrobiální aktivitu. Půdní organická hmota navíc vykazuje vysokou kationtovou výměnnou kapacitu, což může mít pozitivní vliv na mikrobiální společenstvo. Navíc TOC_{HF} sice představuje organickou hmotu chráněnou proti mikrobiálnímu ataku, částečně ale může být desorbována a sloužit jako substrát pro mikroorganismy.

Díky složitým a mnohdy obousměrným vztahům mezi jednotlivými frakcemi a mikrobiálními půdními vlastnostmi je pro pochopení mechanismů řídicích transformací organické hmoty nutné kombinovat data ze studií na půdách s širokým spektrem vlastností (např. monitoring) a pokusů s definovanými zásahy (např. dlouhodobé stacionární pokusy). Abychom z naměřených dat získali maximum, je nezbytné aplikovat adekvátní statistické postupy. Pro data prezentovaná v této kapitole lze např. navrhnout strukturní modelování.

Tabulka 7. Tabulka koeficientu determinace mnohonásobné regrese R^2 a procentuálních individuálních podílů vybraných půdních vlastností na variabilitě mikrobiálních parametrů uvedených v prvním řádku.

	MBC	R _B	RES	R _S	AMO
R ²	0,740	0,656	0,644	0,686	0,603
jíl	0,89	2,40	3,10	4,49	2,00
pH (1 M KCl)	1,61	1,50	13,3	34,0	11,4
TOC _{LF}	15,0	11,3	17,2	4,21	11,3
TOC _{HF}	55,6	55,9	44,0	43,3	57,6
WSC	26,9	28,9	22,4	14,0	17,7

Vysvětlivky viz obrázek 5.

5 Závěr

V práci byly úspěšně zavedeny postupy pro stanovení C lehké a těžké frakce půdní organické hmoty a optimalizovány parametry analýzy. Obsah TOC_{LF} a TOC_{HF} byl stanoven v 71 půdách půdního bazálního monitoringu. Statistická analýza prokázala vliv půdního druhu na poměr obou frakcí, tzn. na proces transformace labilního TOC_{LF} na stabilnější TOC_{HF}. Obsah HF se ukázal jako významný faktor z hlediska vlivu SOM na mikrobiální biomasu a C a N mineralizaci. Částečně se pravděpodobně jedná o nepřímý vliv, např. přes vodní režim půdy.

6 Literatura

1. Blanco-Canqui H., Shapiro C.A., Wortmann C.S., Drijber R.A., Mamo M., Shaver T.M., Ferguson R.B. Soil organic carbon: The value to soil properties. *Journal of Soil and Water Conservation*, **2013**, 129A-134A.
2. Golchin A., Oades J.M., Skjemstad J.O., Clarke P. Study of free and occluded particulate organic matter in soils by solid-state ¹³C NMR spectroscopy and scanning electron microscopy. *Aust. J. Soil Res.* 32, 1994, 285–309.
3. Gregorich E. G., Carter, M. R: Soil sampling and methods of analysis. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008, s. 1224. ISBN 978-0-8493-3586-0.
4. Chevan A., Sutherland M. Hierarchical partitioning. *American Statistician*, 1991, 90-96.
5. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2020, Vienna, Austria.

6. Zbiral J., Honsa I. Et al. Jednotné pracovní postupy, Analýza půd I. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, 2010, 253 s.
7. Zbiral J., Malý S., Váňa M. Jednotné pracovní postupy, Analýza půd III. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, 2011, 290 s.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXV, 2021/2

Ročník: XXV, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2021

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 44

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196