

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2011

Ročník XV, číslo 2/2011

Brno 2011

Obsah

1. **Stanovení obsahu vody a obsahu glycerolu ve vedlejším produktu vznikajícím při výrobě bionafty** 1

Eva Fojtlová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
2. **Zavedení metody pro testování chemikálií pomocí testu s využitím dravého roztoče *Hypoaspis aculifer*** 13

Martin Váňa
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OMB Brno, Hroznová 2,
656 06 Brno
3. **Využití metody gelové permeační chromatografie pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků** 26

Šárka Plhalová, Miloš Rychlý, Ivana Veverková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Opava,
Jaselská 16, 746 23 Opava
4. **Využití HPLC pro stanovení kyseliny močové** 46

Alena Žalmanová, Václav Ryppl
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Plzeň,
Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Plné znění Bulletinů NRL (včetně grafů a obrázků) najdete i na našich webových stránkách v části věnované Národní referenční laboratoři (<http://www.ukzuz.cz>).

Stanovení obsahu vody a obsahu glycerolu ve vedlejších produktu vznikajícím při výrobě bionafty

Eva Fojtlová

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

1 Úvod

Výroba bionafty spočívá v esterifikaci řepkového oleje. Při tomto procesu vedle metylesteru řepkového oleje (MEŘO) vzniká jako vedlejší produkt glycerinová fáze (G fáze). Tento produkt obsahuje asi 40 % glycerolu, sodné nebo draselné soli mastných kyselin, metanol a vodu. Jeho složení je závislé na použitém technologickém postupu.

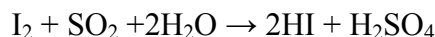
Dalším zpracováním G fáze (čištěním) se získává surový glycerol, který obsahuje asi 80 % glycerolu, který je vhodný pro použití v krmivářském průmyslu. Proto je nutné sledovat kvalitu surového glycerolu stejně tak jako kvalitu všech ostatních surovin, které se používají pro výrobu krmiv. K nejdůležitějším ukazatelům kvality surového glycerolu patří obsah vody a obsah glycerolu. Cílem práce bylo zavést a ověřit metody na stanovení těchto dvou parametrů.

2 Materiál a metody

K zavedení a ověření metody byly použity vzorky, které byly do laboratoře dodány z různých výroben surového glycerolu.

Pro stanovení obsahu vody byla vybrána titrační metoda podle Karl Fischera. Je podrobně popsána v normě ČSN ISO 760 Stanovení vody – Metoda Karl Fischera. Metoda je vhodná pro stanovení volné i krystalové vody u většiny tuhých nebo kapalných organických i anorganických chemických výrobků.

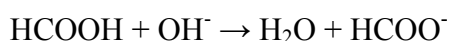
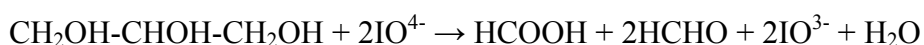
Princip stanovení spočívá v tom, že voda obsažená ve zkušebním vzorku reaguje v bezvodém prostředí s roztokem jodu a oxidu siřičitého za přítomnosti pyridinu a metanolu (Fischerovo činidlo) a je založen na reakci



Pyridin neutralizuje vznikající kyseliny a posouvá tak rovnováhu reakce doprava. Toxický a zápachající pyridin bývá často nahrazen imidazolem.

V současné době je komerčně dostupná celá řada Fischerových činidel, která jsou modifikována k použití pro různé matrice vzorků. V práci se jako titrant použilo jednosložkové Fischerovo činidlo Hydranal Composite 5 (výrobce Fluka), které obsahuje jod, oxid siřičitý, imidazoly a diethylen glykol monoethyl ether. Titr tohoto činidla je 5 mg $\text{H}_2\text{O}/\text{ml}$. Jako rozpouštědlo (bezvodé prostředí) se použil Hydranal Methanol Rapid (výrobce Fluka), který kromě metanolu obsahuje i látky urychlující reakci (výrobce tyto látky v dostupných materiálech nespecifikuje).

Obsah glycerolu byl stanoven také titračně. Jedná se o acidobazickou titraci, kde se roztokem hydroxidu sodného titruje kyselina mravenčí uvolněná z glycerolu kvantitativní reakcí s jodistanem sodným. Princip metody je popsán následující rovnicí



Metoda vychází z ČSN 661326 Glycerin technický - Stanovení obsahu glycerolu titračně (zrušena bez náhrady 1.5.2003) a z metody M351 firmy Mettler Toledo - Stanovení obsahu glycerinu podle normy USP 26. Je použitelná pouze pro analýzu vzorků, které vedle glycerolu neobsahují jiné organické sloučeniny, které mají více než dvě hydroxylové skupiny na sousedních uhlíkových atomech. Jsou to např. cukry, které rovněž reagují s kyselinou mravenčí a ruší stanovení.

Obě titrace popsané ve výše uvedených metodách byly prováděny na automatickém titrátoru Mettler Toledo T50 Excellence, který obsahoval kromě svého standardního vybavení i KF titrační stojan s titrační nádobkou a magnetickým míchadlem a dvouhrotou platinovou elektrodu pro Karl Fischerovy titrace.

2.1 Chemikálie

Používají se chemikálie čistoty p.a., pokud není uvedeno jinak.

- 1 Rozpouštědlo pro Karl Fischer titraci Hydranal-Methanol Rapid, (Fluka).
- 2 Fischerovo činidlo Hydranal Composite 5, (Fluka).
- 3 Certifikovaný standardní roztok pro stanovení ekvivalentu Fischerova činidla Hydranal – water standard 10,0 (Fluka).
- 4 Voda (demineralizovaná, destilovaná nebo deionizovaná).
- 5 Kyselina sírová, H_2SO_4 , koncentrovaná.
- 6 Kyselina sírová, H_2SO_4 , roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije asi 500 ml vody (4) a přidá se 5,5 ml kyseliny sírové (5). Po vytemperování se doplní vodou po značku a promíchá.
- 7 Jodistan sodný, NaIO_4 .
- 8 Jodistan sodný, NaIO_4 , roztok, $c(\text{NaIO}_4) = 60 \text{ g/l}$.
Příprava: 60 g jodistanu sodného (7) se rozpustí v asi 500 ml vody (4), přidá se 120 ml kyseliny sírové (6), doplní se vodou do 1000 ml a promíchá. Doporučuje se připravovat tento roztok bezprostředně před použitím. Roztok se uchovává v tmavé skleněné láhvi se skleněnou zabroušenou zátkou.
- 9 Hydrogenftalát draselný, 99,989%, certifikovaný standard.
- 10 Hydroxid sodný, NaOH , odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$, neobsahující oxid uhličitý. Dodává se komerčně.
- 11 Polyethylen glykol 200, (Fluka).
- 12 Polyethylen glykol, vodný roztok 1 : 1 (v/v).
Příprava: 50 ml polyethylen glykolu (11) se smíchá s 50 ml vody (4).
- 13 Pufry: pH = 4; pH = 7; pH = 9. Dodávají se komerčně.
- 14 Glycerol, > 99,5 %, obsah vody < 0,1 %.
- 15 Kyselina chlorovodíková, HCl , koncentrovaná.

- 16 Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije asi 500 ml vody (4) a přidá se 8,3 ml kyseliny chlorovodíkové (15). Po vytemperování se doplní vodou po značku a promíchá.

- 17 Jodid draselný, KI.

- 18 Jodid draselný, KI, $c(\text{KI}) = 150 \text{ g/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se naváží 150 g jodidu draselného (17), rozpustí se asi v 800 ml vody (4) a doplní se po značku. Připravuje se denně čerstvý.

- 19 Thiosíran sodný, pentahydrát, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

- 20 Thiosíran sodný, odměrný roztok, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: 24,817 g thiosíranu sodného (19) se rozpustí ve vodě (4) a doplní do 1000 ml.

- 21 Škrob, roztok, $c = 10 \text{ g/l}$.

Příprava: 10 g škrobu se rozmíchá ve 100 ml vody (4) vlije se do 900 ml vroucí vody a nechá se vařit asi 1 min. Po ochlazení se roztok uchovává v lednici při teplotě $(4 - 8) ^\circ\text{C}$.

2.2 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
- 2 Automatický titrátor Mettler Toledo T50 Excellence s titračním stojanem DV 705 pro Karl Fischerovu titraci a s elektrodou pro přímé měření pH a acidobazické titrace ve vodném prostředí.
- 3 Mikrostříkačka, 10 μl .
- 4 Injekční stříkačky plastové jednorázové, 5 ml, 10 ml.
- 5 Automatické pipety.

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Stanovení obsahu vody

Před vlastním měřením vzorků (postup 2.3.1.3) je nutno stanovit přesnou koncentraci Fischerova činidla (2) podle postupu 2.3.1.1. Toto činidlo je stálé, proto se titr činidla ověřuje

pouze jedenkrát měsíčně. Před každým použitím titrátoru je však nutno ověřit jeho správný chod podle postupu 2.3.1.2.

2.3.1.1 Stanovení ekvivalentu vody Fischerova činidla

Do nádoby titračního stojanu se načerpá asi 40 ml rozpouštědla (1) a předtitruje se Fischerovým činidlem (2). Během předtitrace se odstraní veškerý obsah vody z rozpouštědla.

Otevře se ampule s certifikovaným standardním roztokem (3), suchá injekční stříkačka s dlouhou jehlou se vypláchne asi 1 ml standardu (3) a celý zbytek standardu se ihned nasaje do stříkačky. Standardní roztok (3) je velmi hygroskopický. Pro dosažení přesnosti a správnosti měření je třeba v nejvyšší možné míře zamezit jeho kontaktu se vzduchem (vzdušná vlhkost). Plná stříkačka se umístí na analytickou váhu a váha se vytáruje. Spustí se titrace na titrátoru a do nádoby titračního stojanu se ihned vstříkne (0,5 – 1,0) ml standardu. Musí se pracovat rychle a velmi pečlivě tak, aby při přenášení stříkačky neodkápala žádná kapalina mimo rozpouštědlo v titrační nádobě. Nádobku titračního stojanu je nutno ihned po nadávkování uzavřít. Po nadávkování se injekční stříkačka se zbylým standardem opět zváží a tím se určí hmotnost standardu nadávkovaného do titrační nádoby. Ekvivalent vody Fischerova činidla se stanoví třikrát bezprostředně za sebou. Software titrátoru vypočte průměrnou hodnotu.

2.3.1.2 Ověření správnosti chodu titrátoru

Do nádoby titračního stojanu se načerpá asi 40 ml rozpouštědla (1) a předtitruje se Fischerovým činidlem (2). Během předtitrace se odstraní veškerý obsah vody z rozpouštědla (1).

Do mikrostříkačky se nasaje 10 µl vody (4), spustí se titrace a voda se ihned vstříkne beze zbytku do rozpouštědla v nádobce titračního stojanu. Ihned se uzavře. Stanovení se provádí třikrát bezprostředně za sebou. Výťažnost tohoto stanovení se musí pohybovat v rozmezí (98 – 102) % rel. V případě, že tomu tak není, musí se stanovit ekvivalent vody Fischerova činidla podle 2.3.1.1.

2.3.1.3 Měření vzorků

Do nádoby titračního stojanu se načerpá asi 40 ml rozpouštědla (1) a předtitruje se Fischerovým činidlem (2). Během předtitrace se odstraní veškerý obsah vody z rozpouštědla.

Do suché injekční stříkačky se nasaje vzorek (poznámka 1), vyprázdní se do odpadu a stříkačka se opět celá naplní vzorkem. Plná injekční stříkačka se umístí na váhu a váha se vytáruje. Spustí se titrace, vzorek se ihned vstříkne do nádoby titračního stojanu. Dávkuje se asi 0,1 g vzorku. Po nadávkování se injekční stříkačka umístí na váhu a přesně se stanoví nadávkované množství vzorku.

Poznámky

1 V průběhu analýzy je třeba mít na paměti, že glycerol je velmi hygroskopický, a proto je nezbytné minimalizovat dobu kontaktu vzorku se vzduchem.

2.3.1.4 Výpočet a vyjadřování výsledků

K výpočtu ekvivalentu vody Fischerova činidla i obsahu vody ve vzorcích se využívá software automatického titrátoru.

Obecně platí následující vztahy

Ekvivalent vody Fischerova činidla se vypočte podle

$$T = E \times W/V_1$$

kde

T je ekvivalent vody Fischerova činidla (mg/ml),

E hmotnost nadávkovaného certifikovaného standardního roztoku (3) (g),

W přesný obsah vody v certifikovaném standardním roztoku (3), který je uveden v příloženém certifikátu (mg/g),

V₁ objem Fischerova činidla (2) (ml).

Obsah vody ve vzorku se vypočte podle

$$X = V_2 \times T/m \times 10$$

kde

X je obsah vody ve vzorku (%),

V_2 spotřeba Fischerova činidla (2) (ml),

T ekvivalent vody Fischerova činidla (mg/ml),

m hmotnost nadávkovaného vzorku (g).

2.3.2 Stanovení obsahu glycerolu

Před vlastním měřením vzorků je třeba stanovit přesnou koncentraci titračního činidla podle postupu (2.3.2.1) a ověřit správný chod titrátoru podle postupu (2.3.2.2).

2.3.2.1 Stanovení přesné koncentrace titračního činidla

Do titrační nádoby se přesně naváží (0,0800 – 0,1200) g hydrogenftalátu draselného (9) předem vysušeného 3 h při 120 °C, přidá se asi 50 ml vody (4) a obsah se promíchá. Nádoba se vloží se do titračního stojanu titrátoru a podle nastavené metody se provede titrace. Měření se opakuje třikrát.

2.3.2.2 Ověření správnosti chodu titrátoru

Do titrační nádoby se přesně naváží asi 100 mg glycerolu (14), přidá se 50 ml vody (4) a obsah se krouživými pohyby dobře promíchá. pH roztoku se upraví hydroxidem sodným (10) na hodnotu 7,8. Potom se přidá 10 ml roztoku jodistanu sodného (8), nádoba se přikryje hodinovým sklíčkem, umístí se do temna a nechá se stát 30 min. Poté se přidají 2 ml roztoku polyethylenglykolu (12) a nechá se stát za stejných podmínek dalších 20 min. Po uplynutí této doby se titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného (10). Výťažnost stanovení se musí pohybovat v rozmezí (98 – 102) %. Pokud tomu tak není, postupuje se podle příručky kvality laboratoře.

2.3.2.3 Měření vzorků

Do titrační nádoby se přesně naváží asi 100 mg vzorku, přidá se 50 ml vody (4) a obsah se krouživými pohyby dobře promíchá. pH roztoku se upraví na hodnotu 7,8. K tomu se používá buď roztok hydroxidu sodného (10) nebo roztok kyseliny sírové (6). Potom se přidá 10 ml roztoku jodistanu sodného (8), nádoba se přikryje hodinovým sklíčkem, umístí se do temna a nechá se stát 30 min. Poté se přidají 2 ml roztoku polyethylenglykolu (12) a nechá se stát za stejných podmínek dalších 20 min. Po uplynutí této doby se titruje na titrátoru odměrným roztokem hydroxidu sodného (10). Slepý pokus se provede stejným postupem, ale bez navážky vzorku.

Poznámky

- 2 *Kvalita roztoku jodistanu se časem mění. Může se přezkoušet následujícím způsobem: Pipetuje se 10 ml roztoku jodistanu sodného (8) do 250ml odměrné baňky, doplní se vodou (4) po značku a důkladně se promíchá. Do titrační baňky se naváží 500 mg glycerolu (14), přidá se 50 ml vody, důkladně se promíchá a přidá se pipetou 50 ml zředěného roztoku jodistanu sodného (8). Nechá se stát 30 min. Přidá se 5 ml kyseliny chlorovodíkové (16), 10 ml roztoku jodidu draselného (18), promíchá se kroužením a přidá se 100 ml vody. Titruje se odměrným roztokem thiosíranu sodného (20) za použití škrobu (21) jako indikátoru do vymizení modrého zabarvení. Stejným způsobem se provede slepé stanovení s 50 ml vody bez glycerolu. Z obou spotřeb se vypočte poměr. Počet ml odměrného roztoku spotřebovaného na titraci glycerolu se vydělí počtem ml na titraci slepého pokusu. Je-li poměr v rozmezí 0,750 až 0,765, je jodistanový roztok v pořádku a vyhovuje požadavkům analýzy.*

2.3.2.4 Výpočet a vyjadřování výsledků

K výpočtu přesné koncentrace titračního činidla i obsahu glycerolu ve vzorcích se využívá software automatického titrátoru.

Obecně platí, že při oxidaci glycerolu jodistanem odpovídá jeden mol glycerolu jednomu molu kyseliny mravenčí, která je potom titrována hydroxidem sodným.

Pro výpočet obsahu glycerolu (%) platí

$$X = (V_1 - V_2) \times c \times 9,209/m$$

kde

X je obsah glycerolu ve vzorku (%),

V₁ spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného při vlastním stanovení (ml),

V₂ spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného při slepém stanovení (ml),

- c přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného (mol/l),
m hmotnost vzorku (g).

2.4 Diskuse a výsledky

2.4.1 Stanovení obsahu vody

Tabulka 1 uvádí výsledky opakovaného desetinásobného měření vzorku 1, 2 a 3. Obsah vody ve vzorcích se výrazně lišil a pokrýval celý koncentrační rozsah v analyzovaných vzorcích.

Tabulka 1. Výsledky měření vzorků 1, 2, 3.

Vzorek	Obsah H ₂ O (%)									
1	1,381	1,678	1,491	1,322	1,414	1,371	1,358	1,354	1,415	1,241
1	1,373	1,362	1,358	1,389	1,381	1,404	1,376	1,412	1,411	1,402
2	15,982	15,804	16,156	16,115	16,162	16,122	16,013	15,989	16,104	16,099
2	15,856	15,89	15,772	15,838	15,791	15,804	15,909	15,731	15,849	15,82
3	39,82	39,747	39,878	39,861	39,915	39,906	39,836	39,893	39,807	40,037
3	39,74	39,886	39,951	39,645	39,65	39,989	39,882	39,764	40,065	39,789

Hodnoty uvedené v tabulce 1 byly statisticky zpracovány pomocí software Effi validation.

Výsledky zpracování jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2. Statistické vyhodnocení – opakovatelnost.

EffiChem

your validation software

ANALYTICKÁ METODA:

- krmiva - stavovení vody v glycerolu - titrace -

VALIDACE:

Plná validace

PARAMETR:

Opakovatelnost: po úrovních z vícenásobného měření

VALIDOVANÁ VLASTNOST:

List 4

VYHODNOCENÍ:

Úroveň	Popis	Průměr	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
1	vzorek 1	1,37974	0,04866	3,52706	19
2	vzorek 2	15,9403	0,14438	0,90575	20
3	vzorek 3	39,85305	0,1128	0,28304	20

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 0,11023 jednotek, tj. 2.07 %.

Tabulka 3. Statistické vyhodnocení – nejistota.

EffiChem

your validation software

ANALYTICKÁ METODA:

- krmiva - stanovení glycerolu - titrace - 26.2.2

VALIDACE:

Nejistoty

PARAMETR:

Nejistoty: z přesnosti - vícenásobná měření k dispozici

VALIDOVANÁ VLASTNOST:

List 1

VYHODNOCENÍ:

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	74,73167
St. nejistota	0,49086
Rel. st. nejistota (%)	0,65683
Faktor pokrytí	2
Rozšířená st. nejistota	0,98172
Rel. rozšířená nejistota	1,31367

Závěr: Rozšířená st. nejistota je 0,98172. Relativní rozšířená nejistota je 1,31 %.

Správnost metody byla ověřena účastí laboratoře v několika kruhových testech.

2.4.2 Stanovení obsahu glycerolu

V tabulce 4 jsou uvedeny výsledky desetinásobného měření vzorků 1595, 1594 a glycerolu (14). Koncentrační rozsah měřené složky pokrývá celý očekávaný koncentrační rozsah u reálných vzorků.

Tabulka 4. Výsledky měření vzorků 1595, 1594 a glycerolu.

Vzorek	Obsah glycerolu (%)									
1595	37,843	36,47	38,296	38,409	38,994	38,754	37,441	38,484	37,308	37,542
1594	85,641	85,746	85,472	86,044	85,56	86,157	85,713	85,608	85,991	16,099
Glycerol	99,973	100,65	100,42	100,17	100,82	100,64	100,34	100,65	100,43	100,34

Hodnoty uvedené v tabulce 4 byly statisticky zpracovány pomocí software Effi validation.

Výsledky zpracování jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6.

Tabulka 5. Statistické vyhodnocení – opakovatelnost.

EffiChem

your validation software

ANALYTICKÁ METODA:

- krmiva - stanovení glycerolu - titrace - 26.2.2

VALIDACE:

Plná validace

PARAMETR:

Opakovatelnost: po úrovních z vícenásobného měření

VALIDOVANÁ VLASTNOST:

List 1

VYHODNOCENÍ:

Úroveň	Popis	Průměr	Opakovatelnost	Rel. Opakovatelnost	n
1	1595	37,9541	0,77397	2,03923	10
2	1594	85,7989	0,24206	0,28212	10
3	standard	100,442	0,25537	0,25425	10

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je 0,49086 jednotek, tj. 1,20 %.

Tabulka 6. Statistické vyhodnocení – nejistota.

EffiChem

your validation software

ANALYTICKÁ METODA:

- krmiva - stanovení glycerolu - titrace - 26.2.2

VALIDACE:

Nejistoty

PARAMETR:

Nejistoty: z přesnosti - vícenásobná měření k dispozici

VALIDOVANÁ VLASTNOST:

List 1

VYHODNOCENÍ:

Charakteristika	Hodnota
Vypočtená hodnota	74,73167
St. nejistota	0,49086
Rel. st. nejistota (%)	0,65683
Faktor pokrytí	2
Rozšířená st. nejistota	0,98172
Rel. rozšířená nejistota	1,31367

Závěr: Rozšířená st. nejistota je 0,98172. Relativní rozšířená nejistota je 1,31 %.

Správnost metody byla ověřena účastí laboratoře v několika kruhových testech.

3 Závěr

V rámci této práce byla v laboratoři zavedena Karl Fisherova titrační metoda na stanovení obsahu vody v surovém glycerolu a titrační metoda na stanovení obsahu glycerolu v surovém glycerolu. Obě metody poskytují správné a přesné výsledky.

4 Literatura

1. ČSN ISO 760 Stanovení vody – Metoda Karl Fischera, říjen 1998.
2. ČSN 661326 Glycerin technický – Stanovení obsahu glycerolu titračně, říjen 1994.
3. Vybrané metody Mettler Toledo pro analýzu biopaliv, aplikační brožura 36.
4. Hydranal – Manual, Eugen Scholz reagents for Karl Fischer titration, 2006, Sigma-Aldrich.
5. Základy volumetrických Karl Fischer titrací s 10 vybranými aplikacemi, Mettler Toledo, aplikační brožura 26.

Zavedení metody pro testování chemikálií pomocí testu s využitím dravého roztoče *Hypoaspis aculifer*

Martin Váňa

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno
martin.vana@ukzuz.cz

1 Úvod

Ekotoxikologické testy jsou nespecifické, to znamená, že představují komplexní pohled na toxické účinky všech látek přítomných v testovaných vzorcích bez nutné bližší znalosti jejich složení či chemické struktury. Tato nespecifičnost má své klady, ale i zápory. Hlavním pozitivem je rychlé a informativní zhodnocení daných vzorků. V těchto případech hraje důležitou roli čas, neboť je na prvním místě nutno ověřit možnou toxicitu vzorku. Podrobná chemická analýza je záležitost dlouhodobější a především nákladnější. U vzorku obsahujícího více látek není možné odhadnout, natož určit, jeho toxické účinky pouze na základě chemického složení. Látky obsažené ve vzorku mohou navíc mezi sebou vzájemně interagovat a zvyšovat svoji toxicitu.

V současné době jsou v laboratořích oddělení mikrobiologie a biochemie OMB zavedeny a úspěšně aplikovány testy s chvostoskoky, roupicemi a rostlinami. Zavedení testu s dravými roztoči rozšířilo stávající baterii testů o organismus stojící na konci potravního řetězce (predátora).

Cílem práce bylo zavedení a optimalizace reprodukčního testu s dravými roztoči *Hypoaspis aculeifer* dle OECD 226 pomocí následujících kroků:

- (i) zajištění přístrojového vybavení (extrakční zařízení),
- (ii) obstarání chovné kultury dravých roztočů a kultury krmných roztočů,
- (iii) optimalizace extrakčních teplot a výtěžnost extrakce,
- (iv) test referenční látky.

2 Princip

Metoda je určena k detekci potenciálního vlivu agrochemikálií (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva) na schopnost reprodukce jedinců roztoče *Hypoaspis aculeifer* po jednorázové aplikaci testovaného přípravku. Test probíhá minimálně při šesti koncentracích daného přípravku. Koncentrační řada vychází z maximální dávky doporučené pro aplikaci na půdu, která je uprostřed sledované koncentrační škály. Součástí testu je i kontrolní varianta neošetřená testovaným přípravkem. Test trvá 14 dní a na jeho konci se vyhodnotí mortalita dospělců a vliv na reprodukci.

3 Materiál a metody

3.1 Přístroje a pomůcky

- 1 Testovací skleněné nádoby (150 – 200) ml.
- 2 Extrakční nádoby.
- 3 Síto o jmenovité délce ok 2 mm.
- 4 Nádoba na míchání umělého substrátu.
- 5 Míchačka na umělý substrát.
- 6 Růstová komora vytemperovaná na 20 °C, osvětlení 400 lux – 800 lux.
- 7 pH metr.
- 8 Předvážky, přesnost 0,01 g, váhová kapacita do 200 g.
- 9 Šrotovací zařízení na rozsekání rašeliny.
- 10 Binokular.
- 11 Dokumentační zařízení.
- 12 Mrazák (– 20 °C).
- 13 Extrakční zařízení vlastní výroby (obr. 2). Rozměry extrakčního zařízení jsou (95 × 180 × 90) cm (v × š × h). Konstrukce i plášť extrakčního zařízení je povrchově upravena pozinkováním proti korozi. Všechny stěny jsou izolovány polystyrenovými deskami o tloušťce 3 cm. Přední část je odnímatelná pro lepší přístup a umístění extrakčních nádobek. V horní části extraktoru pod víkem jsou na konzole umístěny infračervené žárovky (100 W) ve dvou řadách po čtyřech. Intenzita žárovek

je regulovatelná reostatem. Vzdálenost mezi infračervenými žárovkami a nerezovým platem s otvory pro extrakční nádobky je 50 cm. V nerezovém platu pro extrakční nádobky je vykrouženo 25 otvorů o průměru 8 cm a jeho výška je nastavitelná. Plato je zespodu izolováno také polystyrenovými deskami proti zvyšování teploty ve spodní části extrakčního zařízení. Na dně extrakčního zařízení je umístěna chladicí deska. Vzdálenost mezi chladicí deskou a platem je 10 cm. Chladicí deska je tvořena nerezovým plechem a zespodu je stočená plastová hadička ve tvaru šnečí ulity. V této hadičce koluje studená voda chlazená v chladicím zařízení primárně určeným do restauračních zařízení. Teplota vody je regulovatelná na tomto zařízení. Voda je v chladicím okruhu hnaná malým čerpadlem. Pokud je pozice pro extrakční nádobku v platě během extrakce neobsazená, je zaslepena polystyrenovou zátkou.

- 14 Lux-metr.
- 15 Počítadlo, štěteček.
- 16 Nastavitelné automatické pipety 0,2 ml až 1 ml; 1 ml až 5 ml.
- 17 Parafilm.
- 18 Synchronizovaná kultura roztoče *Hypoaspis aculeifer*.
- 19 Plastové krabičky s pevně uzavíratelnými víky libovolné velikosti průměru asi 10 cm.

3.2 Chemikálie

- 1 Artificiální půda ("bílá" vrchní rašelina – velikost částic $2\text{ mm} \pm 1\text{ mm}$, křemenný písek – 50 % velikosti zrněk v rozmezí 0,05 mm – 0,2 mm, kaolín - Sigma, CaCO_3 – úprava pH).
- 2 Zásobní roztok testované látky (testovaná půda).
- 3 Destilovaná voda na ovlhčení.
- 4 Pálená sádra.
- 5 Aktivní uhlí.
- 6 Chlorid draselný, $c(\text{KCl}) = 1\text{ mol/l}$.
Příprava: 74,6 g KCl se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1000 ml.
- 7 Denaturovaný líh ředěný vodou v poměru (4 : 1), (v/v).

- 8 Dusičnan draselný, KNO_3 , nasycený roztok.
- 9 Sušené rozdrobené pivovarské kvasnice.

4 Pracovní postup

Postup je založen na standardizované metodě OECD 226.

4.1 Příprava umělé půdy (AP)

Umělá půda se skládá z křemenného písku o velikosti zrn 0,05 mm – 0,2 mm, kaolínu (Sigma), přesáté rašeliny o velikosti částic $2 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ a CaCO_3 , který slouží k úpravě pH umělé půdy na $6 \pm 0,5$. Přesátá rašelina (pro testování s roupicemi se používá světlá rašelina) se defaunizuje hlubokým zamražením na -80°C nebo třikrát nechá zmraznout při -20°C a při laboratorní teplotě se nechá opakovaně rozmraznout. Křemenný písek, kaolín, rašelina se smíchají v hmotnostním poměru (74 : 20 : 5). Umělá půda se nechá den odležet v laboratorních podmínkách a změří se pH. Pokud je potřeba, pH se upraví uhličitanem vápenatým na hodnotu $6 \pm 0,5$. Nechá se další 3 dny odležet a pak se znovu ověří hodnota pH. V AP se změří také WHC (maximální vodní kapacita) a sušina.

4.2 Příprava synchronizace

Do testu je potřeba nasadit stejně staré jedince, a proto se provádí synchronizace. *Hypoaspis aculeifer* se chová v plastových krabičkách o průměru asi 10 cm. Chovný substrát tvoří směs sádky (4) a aktivního uhlí (5) v hmotnostním poměru (8 : 1) až (10 : 1). Chovný substrát ve formě prášku se ovlhčí destilovanou vodou (3) až do úplné saturace (např. 240 g sádky (4), 30 g aktivního uhlí (5) a 200 ml vody (3)). Poté se opatrně přeleje do chovné nádoby (asi po 60 g). Směs by měla tvořit asi 1 cm vrstvu na dně. Chovný substrát je nutné udržovat dostatečně vlhký. Do substrátu se po zatvrdnutí udělají dvě řady dírek po obvodu (substrát se nesmí úplně propíchnout), kam roztoči kladou vajíčka. K ovlhčení se použije pasturova pipeta a destilovaná voda (3). Voda se přikapává, dokud se rychle vsakuje. Na nový ovlhčený substrát se přemístí vlhkým štětečkem dospělí jedinci (180 samic a 20 samců = založení synchronizace). Dospělci se v průběhu kladení vajíček nekrmí. Po 2 dnech se dospělí jedinci odstraní. Po odstranění dospělců zůstávají v kultivační nádobě jen vajíčka. Asi 2 dny po založení synchronizace se líhnou první juvenilové. Zaznamená se den vylíhnutí (objevení)

prvních juvenilů. Pokus se zakládá 28 až 35 dní od doby, kdy dospělé samice začaly klást vajíčka.

4.3 Experimentální uspořádání

Test slouží ke zjištění mortality dospělých jedinců a vlivu na reprodukci. Test trvá 2 týdny. Na konci testu se hodnotí mortalita a vliv na reprodukci. Vypočítá se množství AP, které se bude potřebovat na test. Při přípravě koncentrační řady se nedoporučuje volit ředící krok vyšší než 2.

1. Pro NOEC (No observed effect concentration – koncentrace, při které není pozorován nežádoucí efekt) přístup by se mělo použít alespoň 5 koncentrací v geometrických sériích po 4 opakováních + 8 kontrol.
2. Pro EC_x (Effect concentration – účinná koncentrace, při které se projeví účinek u x % sledované populace) přístup se použije až 12 koncentrací po 2 opakováních + 6 kontrol.
3. Pro smíšený přístup by se mělo použít 6 až 8 koncentrací v geometrických řadách po 5 opakováních + 5 kontrol.

Na každé opakování je potřeba 20 g suché AP. Od každé koncentrace a kontroly se zakládá ještě jedno opakování pro měření pH a aktuální vlhkosti. Spotřeba AP se vypočte podle zvoleného designu.

4.4 Stanovení WHC

Pokud není známa maximální vodní kapacita (WHC) dané artificiální půdy, musí se před testem zjistit (viz JPP AP III, Stanovení maximální vodní kapacity).

4.5 Stanovení pH

pH se měří na začátku a konci testu. pH se měří v suspenzi půdy a KCl ($c = 1 \text{ mol/l}$) v objemovém poměru 1 : 5.

4.6 Rozdělení AP do testovacích nádob, předvlhčení

Jeden až tři dny před začátkem testu se ovlhčí celkové množství AP na 20 % až 50 % WHC (ovlhčuje se jen v případě, kdy se netestuje žádná toxická látka, pokud se testuje toxická látka, postup dále). V den pokusu se zváží nádoby s celkovým množstvím AP a doplní

se případný úbytek vody. Připravená AP se rozvažuje po 20 g suché hmotnosti do skleněných testovacích nádob. Od každé varianty se zakládá také nádoba pro kontrolu konečného pH a vlhkosti. Všechny nádoby se uzavřou a umístí do růstové komory. Půda v testovacích nádobách by neměla být udusaná kvůli volnému pohybu živočichů.

4.7 Rozdělení AP do testovacích nádob, předvlhčení

Jeden až tři dny před začátkem testu se připraví zásobní roztok testované látky (= nejvyšší koncentrace) a ředící řadou se získá nižší koncentrace testované látky. Podle rozpustnosti testovaných látek se musí lišit jejich aplikace na AP (rovnoměrně se pipetou zakapává AP ve skleničkách):

1. Ve vodě rozpustné látky se rozpustí v destilované vodě. Množství roztoku se spočítá tak, aby se dosáhlo požadované koncentrace a výsledné vlhkosti půdy (dovlhčení na 20 % až 50 % WHC).
2. Pro látky nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v organických rozpouštědlech, se použije těkavé rozpouštědlo (dichlormetan, cyklohexan, aceton, hexan). Roztokem rozpouštědla a testované látky se rovnoměrně zakápně AP ve skleničkách a nechá se přes noc odpařit v digestoři. Aplikace se tedy provádí den před začátkem testu. Nepředvlhčuje se, půda se ovlhčí najednou na 20 % až 50 % WHC až po odpaření rozpouštědla. V každém opakování musí být stejné množství rozpouštědla, aby nedošlo k ovlivnění výsledků. Je také nutné založit kontrolní sadu na použité rozpouštědlo, aby se zjistilo, zda samo rozpouštědlo není pro rouspice toxické.
3. Pro látky nerozpustné ve vodě ani v organických rozpouštědlech se testovaná navážka může vmíchat přímo do testovacího substrátu, pokud to povaha testované látky dovolí. Pokud není možné přímé vmíchání, použije se směs 10 g jemně mletého industriálního křemenného písku nebo 10 g suchého půdního substrátu a množství testované látky potřebné k získání požadované koncentrace. Pečlivě se vše promíchá. Dovlhčí se na 20 % až 50 % WHC.

4.8 Vlastní postup testu

26 až 33 dnů po objevení juvenilů v synchronizaci se pomocí vlhkého štětečku přemístí 10 samic do skleničky s ovlhčenou půdou. Do středu skleničky se přidá malé množství krmných roztočů. Nádobky se označí lihovým fixem, zváží se a zapíše se hmotnost kvůli úbytku vody. Testovací nádoby se váží bez parafilmu. Nádobka se uzavře parafilmem nebo

potravinářskou fólií a gumičkou a proděraví kvůli výměně plynů. Skleničky se uloží v náhodném uspořádání do růstové komory vytemperované na $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, s osvětlením 400 luxů – 800 luxů. Světelný režim je nastaven na poměr (16 : 8), (světlo : tma). Potrava se dodává do testu stejně jako v chovech v podobě krmných roztočů. Krmné roztoči se přidávají do skleniček s dravými roztoči každý týden. V průběhu testu se každý týden převažují testovací nádoby kvůli úbytku vody. Nejprve se přidají krmné roztoči a pak teprve se doplní úbytek vody mimo krmné roztoče. Provětrává se každý týden při dovlhčování. Testovací nádoby opět se umístí v náhodném uspořádání zpět do růstové komory.

4.9 Kontrola vlhkosti

Úbytek vody se sleduje vážením nádob při založení a následně každý týden. Při úbytku vody se voda doplní.

4.10 Vyhodnocení testu, počítání dospělců a juvenilů

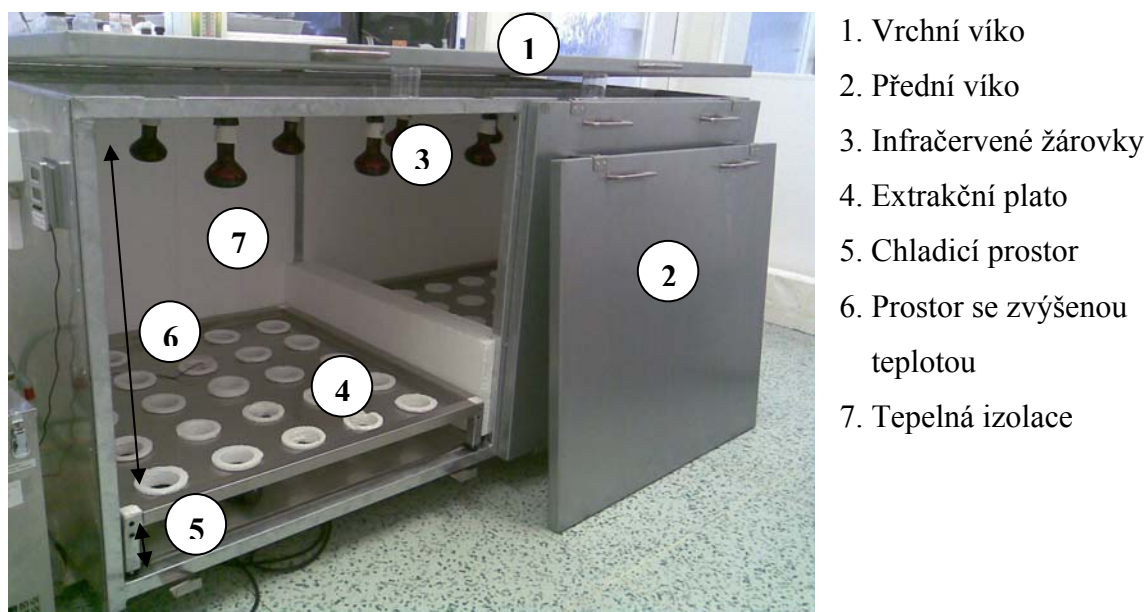
Test se vyhodnotí 14 dnů po jeho založení. Vyhodnocuje se mortalita dospělců a reprodukce prostřednictvím počtu nově vylíhnutých juvenilů. K tomuto účelu se používá teplotní extrakční metoda. Jedinci roztočů se přemísťují z prostoru s vyšší teplotou do prostoru o nižší teplotě, kde se jímají. Obsah testovací nádoby se vysype do extrakční nádoby opatřené sítkem vespod, aby roztoči mohli prolézat v důsledku teplotního gradientu (obr. 1). Testovací nádobka se vypláchne 70% alkoholem (7), čímž se usmrtí a zafixují roztoči přichycení na stěnách nádoby a uzavře se víčkem. Tito roztoči se přičtou k vyextrahovaným roztočům. Extrakční nádobky se umístí do extraktoru (obr. 2) a zapne se chlazení ve spodní části a infračervené žárovky umístěné v horní části extraktoru nad extrakčními nádobkami s testovanou půdou. Teplota ve spodní části extraktoru by se měla pohybovat v rozmezí $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

První teplotní krok je $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 h, teplota se měří teplotním čidlem v extrakční nádobce s testovacím substrátem bez roztočů. Následně se teplota zvýší na $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 h. Poslední teplotní krok je zvýšení teploty na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 4 h. V průběhu zvyšování teploty roztoči přecházejí z teplejšího prostředí do chladnějšího prostředí, kde je umístěna jímací nádobka na roztoče. Po ukončení extrakce (48 h) se do jímací nádobky přidá 70% alkohol (7), uzavře se víčkem po dobu 1 h a tím se zafixují a usmrtí roztoči. Pomocí dokumentačního zařízení se pořídí snímky a spočtou se dospělci

a poté juvenilní stádia roztočů. Důležitou podmínkou extrakce je její efektivnost, která by se měla pohybovat nad 90 %. Efektivnost extrakce se testuje minimálně 1 × ročně. Z předem určené kontroly (bez organismů, bez testovací látky) se změří pH a aktuální vlhkost umělé půdy.



Obrázek 1. Extrakční nádoba.



Obrázek 2. Extrakční komora.

4.11 Vyhodnocení dat

Data se vyhodnotí dle postupu pro vyhodnocení ekotoxikologických testů. Data se statisticky vyhodnocují a graficky zpracovávají pomocí programu ToxRAT (ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Německo). Vypočte se EC_{20} , EC_{50} , LOEC a NOEC. EC_{50} se stanovuje logit regresí.

4.12 Referenční látka

Jednou ročně se roztoči testují na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testovaných organismů. Referenční látkou je dimethoát nebo kyselina boritá. EC_{50} (reprodukce) by se měla pohybovat v rozmezí 3,0 mg dimethoátu/kg až 7,0 mg dimethoátu/kg sušiny a pro kyselinu boritou 100 mg/kg až 500 mg/kg kyseliny borité na sušinu.

4.13 Laboratorní chov roztoče (*Hypoaspis aculeifer*)

4.13.1 Pracovní postup

Hypoaspis aculeifer se chová v plastových krabičkách o průměru asi 10 cm. Chovný substrát se připraví dle kapitoly 4.2. Chovné nádoby musejí být pevně uzavřeny dvěma víky. Chovné nádoby s roztoči se uchovávají ve tmě v termostatu při cca 20 °C. Chovný substrát se vyměňuje jednou za šest týdnů. Kvůli pevně uzavřeným nádobám je nutné chov větrat minimálně dvakrát týdně. Chov se krmí dvakrát až třikrát týdně malým množstvím krmných roztočů *Tyrophagus putrescentiae* nebo roupicemi a chvostoskoky. Aby nedošlo k přemnožení krmných roztočů, měla by být potrava aplikovaná v malém množství v častějších intervalech (dvakrát až třikrát týdně).

4.13.2 Kontrola vlhkosti

Pasteurovou pipetou se na povrch substrátu kápne destilovaná voda. Pokud dojde k okamžitému vsáknutí vody do substrátu, přikapává se voda do substrátu, dokud se voda vsakuje. Povrch substrátu by se neměl lesknout.

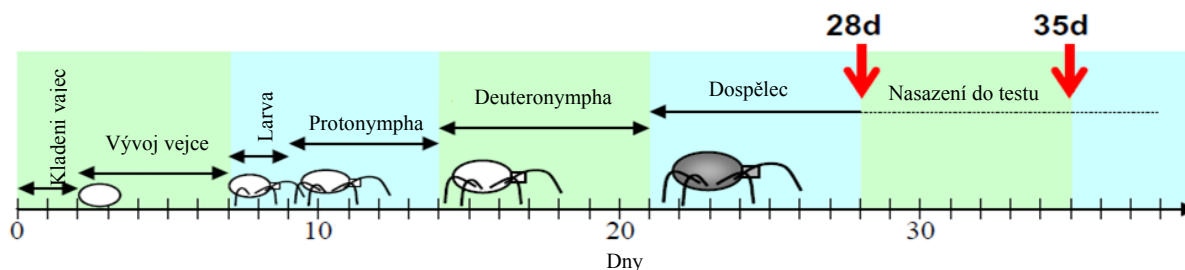
4.13.3 Chov krmného roztoče *Tyrophagus putrescentiae*

Tyrophagus putrescentiae se chová ve skleněných nádobkách o průměru asi 10 cm. Tyto nádobky jsou umístěné ve větší nádobě a prostor mezi nádobami vyplňuje nasycený roztok KNO₃ (překážka proti úniku). Krmní roztoči se krmí dvakrát týdně a jednou za tři týdny se jejich množství zredukuje na polovinu. Chovné nádoby s roztoči se uchovávají ve tmě v termostatu při cca 20 °C. Chov se krmí sušenými drcenými pivními kvasnicemi (doplněk stravy pro drůbež a zvířata).

5 Výsledky a diskuse

5.1 Zavedení chovů *Hypoaspis aculeifer* a *Tyrophagus putrescentiae*

Základem úspěchu u veškerých testů s živočichy jsou zdravé, prospívající a reprodukce schopné chovy. Chovy roztočů byly získány z laboratoří ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim v Německu. Roztoči *Hypoaspis aculeifer* (obr. 3, 4) se chovají ve stejných podmínkách jako již dříve zavedené chovy s chvostosky *Folsomia candida*. Nejobtížnější při zavádění chovů bylo nalézt vhodné krmení pro krmné roztoče *Tyrophagus putrescentiae*. V laboratořích ECT se používaly pro krmení krmných roztočů nedrcené pivovarské kvasnice používané jako doplněk lidské stravy. V ČR nebylo možné tyto kvasnice koupit. Z toho důvodu byly jako vhodný ekvivalent zvoleny krmné sušené drcené pivovarské kvasnice sloužící jako doplněk stravy pro hospodářská zvířata, které se svým složením a obsahem vitamínů podobají kvasnicím z laboratoří ECT. Po namnožení a rozšíření chovu dravých roztočů bylo úspěšně vyzkoušeno založení několika synchronizovaných kultur potřebných pro začátek testování.



Obrázek 3. Vývoj roztoče *Hypoaspis aculeifer*.



Obrázek 4. Vývojová stádia *Hypoaspis aculeifer*.

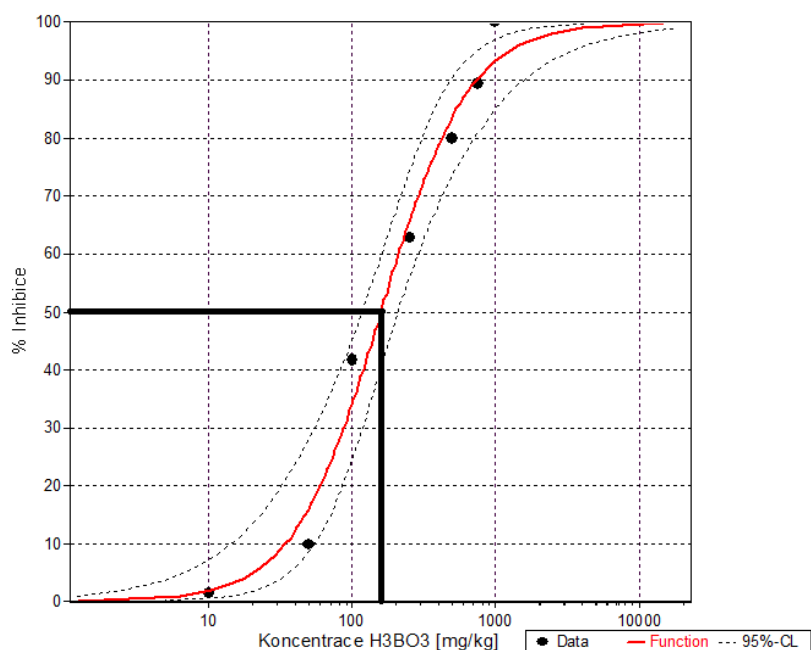
5.2 Optimalizace extrakčních teplot a výtěžnosti extrakce

Klíčovým krokem testu je extrakce roztočů z testovacího substrátu. Extrakce probíhá na základě teplotního gradientu. Roztoči prolézají z extrakčních nádob s testovacím substrátem do jímacích nádobek při postupně se zvyšující teplotě 25 °C až 47 °C v průběhu 3 dnů, přičemž spodní část extrakční komory je kontinuálně chlazena v rozmezí teplot 15 °C až 20 °C. V laboratorních podmínkách bylo nutné vyzkoušet nastavení extrakční komory a proměřit teploty v jednotlivých krocích extrakce nastavením intenzity osvětlení infračervenými žárovkami. K dosažení správných extrakčních teplot bylo nutné zvolit správnou pozici víka tak, aby se vnitřní prostor extrakční komory nepřehříval. Pro zvýšení teploty se zvýší intenzita osvětlení infračervenými žárovkami a zároveň zmenší mezera mezi víkem a okrajem extrakční komory. Po optimalizaci nastavení extrakčních teplot se přistoupilo k extrakci roztočů. Extrakce proběhla ve dvou bězích vždy v 5 opakováních. Do 5 testovacích nádob s umělé půdou bylo zavedeno po 50 jedincích. Výsledky extrakce se pohybovaly v stanoveném rozmezí 90 % až 100 %.

5.3 Test referenční látky

Pro ověření funkčnosti celé metody byl proveden test s kyselinou boritou. Pro tuto referenční látku je EC₅₀ (reprodukce) stanovena v rozmezí 100 mg/kg až 500 mg/kg kyseliny borité na sušinu testované půdy. Kyselina byla aplikována na umělou půdu v koncentrační řadě (10; 50; 100; 250; 500; 750; 1000) mg/kg kyseliny na sušinu půdy. Z důvodů menšího množství jedinců v synchronizovaných kulturách byl snížen počet opakování

na 3 z doporučených 5. Po vyhodnocení testu byla EC_{50} vypočtena pomocí software ToxRat, hodnota činila 159 mg/kg kyseliny borité na sušinu půdy (obr. 5, tab. 1). Naměřená hodnota EC_{50} se nacházela v mezích stanoveného intervalu.



Obrázek 5. Statistické vyhodnocení H_3BO_3 s dravým roztočem *Hypoaspis aculeifer* s vyznačenou hodnotou EC_{50} .

Tabulka 1. Souhrnná tabulka ekotoxikologických indexů.

Parameter	EC_{10}	EC_{20}	EC_{50}
Hodnota (mg/kg)	34,0	60,0	159
Dolní 95%-konfidenční interval	14,3	32,3	117
Horní 95%-konfidenční interval	54,4	86,0	209
Dolní 99%-konfidenční interval	9,80	24,5	99,6
Horní 99%-konfidenční interval	79,5	113	246

Stanovená hodnota NOEC byla 10 mg/kg, LOEC 50 mg/kg.

6 Závěr

Byla zavedena metoda pro testování chemikálií pomocí testu s využitím dravého roztoče *Hypoaspis aculifer*. Metoda bude použita pro testování vlivu agrochemikálií na zemědělskou půdu.

7 Literatura

1. OECD 226, Predatory Mite (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *Aculeifer*) Reproduction Test in Soil, 2008.

Využití metody gelové permeační chromatografie pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků

Šárka Plhalová, Miloš Rychlý, Ivana Veverková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Opava, Jaselská 16, 746 23 Opava

sarka.plhalova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) se po extrakci vzorků acetonem a přečištění na SPE kolonkách (extrakce na pevné fázi) stanovují metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí. Důvodem odzkoušení techniky gelové permeační chromatografie byla špatná průchodnost a v některých případech až neprůchodnost SPE kolonek u problematických matric jako jsou kaly a některé typy rostlinného materiálu. Cílem práce bylo vyzkoušet přečišťovací postup pomocí gelové permeační chromatografie s využitím sběrače frakcí na souboru vzorků půd, kalů a rostlin.

2 Úvod

Gelová chromatografie (gel permeation chromatography GPC, size exclusion chromatography SEC) je speciální druh kolonové kapalinové chromatografie. Je to metoda separační a čisticí. Stacionární fáze je tvořena porézními gelovými částicemi s definovanou velikostí pórů. Princip separace na gelové koloně je založen na distribuci molekul analytu v závislosti na své velikosti (svých stérických rozměrech) a velikosti pórů gelu. Zatímco velké molekuly nemohou proniknout do pórů gelu a jsou unášeny mobilní fází, malé molekuly difundují do pórů gelu a jsou tak zpomalovány oproti molekulám velkým. Látky se eluují z kolony podle klesající molekulové hmotnosti. Na vlastnosti gelu jsou velmi vysoké požadavky. Matrice gelu musí být vůči chromatografovaným látkám inertní, musí být také inertní vůči mobilní fázi a odolná při zvýšené pracovní teplotě. Během chromatografie se nesmějí rozkládat a uvolňovat produkty rozkladu. Gely využívané pro chromatografii jsou v zásadě

dvojího typu – xerogely a aerogely. Xerogely jsou tvořeny makromolekulami s póry určité velikosti. V použitém rozpouštědle tyto gely bobtnají na objem, který je mnohonásobně větší než původní. Jejich nevýhodou je, že při změně rozpouštědla může dojít ke zhroucení původně nabobtnalého gelu. Z komerčně dodávaných xerogelů je to např. Sephadex G, Bio-Gel, Bio-Beads. Aerogely jsou tvořeny maticí s pevnou inertní strukturou, jež obsahuje póry určité velikosti, které jsou v suchém stavu naplněné vzduchem. Aerogely lze použít v kombinaci s jakýmkoliv rozpouštědlem, které nebude atakovat jejich skelet. Při naplnění kolony nedochází k objemovým změnám, rozpouštědlo vytěsňuje vzduch z pórů gelu, přičemž vlastní matrice nebobtná. Představitelem tohoto typu gelu jsou různě modifikované silikagely nebo pórovitá skla.

Dalším kritériem při klasifikaci gelů je jejich afinita k vodě. Z tohoto hlediska se gely rozdělují na hydrofilní (např. dextranový gel Sephadex G, agarósové gely, polyakrylamidové gely), které se využívají pro separaci látek rozpustných ve vodě, a na hydrofobní, které jsou vhodné pro práci v prostředí organických rozpouštědel a používají se k analýzám syntetických makromolekulárních látek. Představitelé tohoto typu náplní jsou styren-divinylbenzenové gely (Styragel, Poragel, Bio-Beads S), zesíťované akrylátové gely a polyvinylacetátové gely.

Gelová permeační chromatografie je vysoce efektivní post-extrakční čisticí metoda. Umožňuje separovat látky, jako jsou pesticidy, polychlorované bifenylly či polyaromatické uhlovodíky od interferujících přírodních látek – lipidů, polymerů, proteinů, přírodních pryskyřic, buněčných komponent a steroidů. Je ideálním řešením pro předčištění vzorků z širokého spektra matic, jako jsou potraviny, tkáně, rostlinný materiál či materiál z oblasti kontroly kvality životního prostředí.

3 Materiál a metody

3.1 Princip metody

Polycyklické aromatické uhlovodíky v půdách, kalcích a rostlinách se stanoví po extrakci acetonem. Vysokomolekulární a lipofilní složky se odstraní z extraktu např. pomocí SPE nebo gelové permeační chromatografie (GPC). Prečištěný extrakt se zakoncentruje a analyzuje se metodou HPLC na reverzní fázi s gradientovým průběhem eluce a fluorescenční detekcí.

3.2 Chemikálie

- 1 Acetonitril, HPLC grade.
- 2 50% acetonitril, ACN : H₂O, (1 : 1), (V/V).
- 3 20% acetonitril, ACN : H₂O, (20 : 80), (V/V).
- 4 Aceton, HPLC grade.
- 5 Propanol, HPLC grade.
- 6 50% metanol, (MeOH : H₂O), (1 : 1), (V/V).
- 7 Metanol, HPLC grade.
- 8 Tetrahydrofuran (THF), HPLC grade.
- 9 Chloroform, HPLC.
- 10 20% propandiol v 2-propanolu.
- 11 Standard PAHs MIX v acetonitrilu, 100 µg/ml, Absolute Standards.
- 12 Pracovní standard PAHs v tetrahydrofuranu, 2 µg/ml.

3.3 Přístroje a pomůcky

- 1 Kapalinový chromatograf Agilent 1100 s fluorescenčním a DAD detektorem.
- 2 Analytická kolona Waters PAH C18, 5 µm, (4,6 × 250) mm.
- 3 Vakuový manifold.
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Horizontální třepačka.
- 6 Rotační třepačka.
- 7 Odstředivka.
- 8 Rotační vakuová odparka Heidolph (RVO).
- 9 Sběrač frakcí Gilson.
- 10 Gelová kolona Tessek, Bio Beads SX3, (8 × 500) mm.
- 11 SPE kolonky Strata C8, 500 mg/3 ml, Phenomenex.
- 12 Nástřikový teflonový filtr, 13 mm, 0,45 µm.

3.4 Pracovní postup

Postup extrakce a čištění extraktu na SPE u vzorků půd (kalů) je podrobně popsán v JPP Analýza půd II.

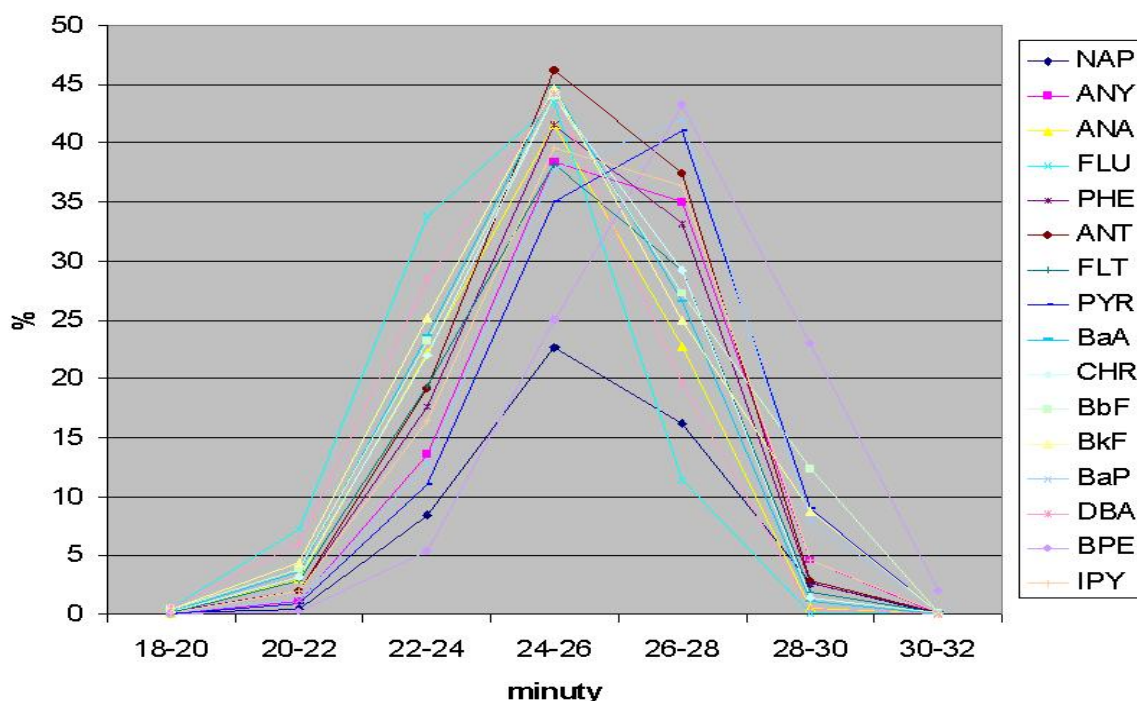
Postup čistícího kroku pomocí GPC: 10 ml acetonového extraktu s přidavkem činidla (10)

se odpaří k suchu a rozpustí se ve 2 ml chloroformu (9). Tento chloroformový extrakt se přefiltruje přes teflonový nástříkový filtr, aby se odstranily mechanické nečistoty. 1 ml chloroformového extraktu se nastříkne na GPC kolonu. Pomocí sběrače frakcí se jímá frakce PAHs, ta se odpaří na RVO k suchu a převede se do 3 ml tetrahydrofuranu (8). Po naředění 20% acetonitrilem (3) je vzorek připraven k nástřiku na HPLC kolonu.

3.4.1 Určení elučního profilu pro sběr frakce PAHs

Od 10. do 38. minuty bylo po 2 min odebráno 14 frakcí o objemu 1,6 ml. Na základě vyhodnocených elučních profilů byla pro sběr PAHs stanovena frakce mezi 18. až 32. minutou (obr. 1).

Obrázek 1. Eluční profily pro 16 PAHs na koloně Bio-Beads SX3 v chloroformu.



3.4.2 Výtěžnost GPC kolony

Pomocí směsného standardu PAHs byla ověřena výtěžnost dané gelové kolony (10) na třech koncentračních úrovních.

Tabulka č. 1. Výtěžnost GPC kolony pro PAHs.

PAH	0,06 ppm (%)	0,2 ppm (%)	0,4 ppm (%)
NAP	95,0	97,5	97,0
ANY	86,7	98,0	94,0
ANA	90,0	100,0	100,0
FLU	95,0	101,5	101,0
PHE	95,0	97,5	98,0
ANT	93,3	97,5	97,5
FLT	103,3	97,0	102,5
PYR	95,5	97,5	98,3
BaA	95,0	96,5	97,5
CHR	95,0	97,5	98,0
BbF	95,0	98,0	98,0
BkF	95,0	97,5	97,5
BaP	93,3	93,5	95,0
DBA	95,0	98,5	98,8
BPE	96,7	98,5	98,5
IPY	95,0	98,0	97,5

Výtěžnost PAHs na GPC pro tři koncentrační úrovně se pohybuje od 86,7 % do 103,3 %.

4 Výsledky

4.1 Půdy

Čistící krok pomocí GPC byl odzkoušen na vnitrolaboratorním referenčním materiálu a CRM (tabulky č. 2 a 3) a byl porovnán s přečištěním na SPE kolonkách.

Tabulka č. 2. Půda VRM 934.

PAH	SPE (µg/kg)	RSD (%)	GPC (µg/kg)	RSD (%)
NAP	6,550	9,5	6,060	12,6
ANY	< 20	–	< 20	–
ANA	< 5	–	< 5	–
FLU	< 4	–	< 4	–
PHE	25,32	6,3	25,57	12,7
ANT	6,130	7,6	5,690	13,3
FLT	49,30	2,7	48,34	9,2
PYR	39,21	3,2	37,62	7,1
BaA	18,10	4,9	18,57	3,5
CHR	23,66	5,8	23,66	9,5
BbF	20,44	4,7	20,34	1,8
BkF	11,53	3,3	11,00	2,4
BaP	20,88	7,5	21,02	3,4
DBA	3,040	3,1	3,375	–
BPE	15,70	6,5	15,89	2,9
IPY	17,41	12,6	16,78	5,2
Suma	262,0		257,8	

Získané výsledky z SPE a GPC byly porovnány ve statistickém programu EffiValidation 3.0 pomocí t-testu na rozdíl výsledků. Srovnávané čisticí kroky SPE a GPC poskytují statisticky stejné výsledky.

Tabulka č. 3. Půda CRM 30.

PAH	GPC (µg/kg)	GPC (µg/kg)	GPC (µg/kg)	GPC (µg/kg)	GPC (µg/kg)	Průměr (µg/kg)	Smod (µg/kg)	RSD (%)
ANA	78,44	78,40	76,64	85,28	83,73	78,44	3,370	4,3
FLU	124,8	102,7	109,9	119,4	114,9	114,9	7,620	6,6
PHE	635,6	666,6	667,3	629,9	624,5	635,6	18,44	2,9
ANT	318,8	296,0	315,6	310,3	304,4	310,3	8,140	2,6
FLT	1467	1423	1619	1572	1641	1572	85,31	5,4
PYR	1116	1148	1303	1234	1237	1234	67,24	5,5
BaA	747,4	819,1	739,2	737,0	887,3	747,4	59,06	7,9
CHR	909,5	784,0	871,7	793,4	813,2	813,2	48,38	6,0
BbF	909,6	1008	893,5	968,9	974,4	968,9	42,75	4,4
BkF	454,0	425,6	434,6	413,3	407,0	425,6	16,59	3,9
BaP	713,9	747,1	792,1	714,0	835,1	747,1	47,07	6,3
DBA	125,2	130,3	109,5	125,4	124,3	125,2	7,040	5,6
BPE	657,1	589,8	592,5	609,2	546,5	592,5	35,67	6,0
IPY	721,8	679,1	803,9	705,6	787,9	721,8	48,17	6,7
Suma	8979	8897	9328	9018	9381	9087		

Poznámka: Hodnoty NAP a ANY nejsou v CRM 30 deklarovány.

Naměřené hodnoty pro půdu CRM 30 byly vloženy do statistického programu EffiValidation a porovnány s referenčními hodnotami. Analytická metoda poskytuje pro referenční materiál statisticky správné výsledky.

4.2 Kaly

Kaly jsou podle základní definice suspenzí nerozpuštěných látek ve vodě. Čistírenské kaly vznikají během procesu čištění odpadních vod. Hlavní podíl kalu vzniká v městských

čistírnách odpadních vod (ČOV) při mechanickém (primárním) a biologickém (sekundárním) čištění odpadní vody. Primární a sekundární kal se v ČOV mísí a dále se zpracovává ve formě směsi. Zpracování směsi kalu je založeno na jeho biologické stabilizaci. Stabilizované odvodněné čistírenské kaly představují typ hnojiva pro zemědělskou půdu. Hnojivý účinek kalů spočívá v obsahu organické hmoty, makroprvků (N a P), obsahu stopových prvků a biologicky aktivních látek. Hlavním limitujícím faktorem využívání kalů v zemědělství je obsah cizorodých látek v kalech a přítomnost patogenních mikroorganismů. Z cizorodých látek to jsou především těžké kovy. Další nebezpečnou skupinou cizorodých látek jsou PCB, dioxiny, PAH, farmaceutika, endokrinní disruptory, chemikálie pro domácnost a další. Z toho vyplývá, že kaly jsou velmi složitou matricí pro chemickou analýzu.

Na rozdíl od vzorků půd vzorky kalů obsahují velká množství lipidických a vysokomolekulárních složek. Vzhledem ke složitosti této matrice byla použita k extrakci technika ASE – zrychlená extrakce za zvýšeného tlaku a teploty, která poskytuje vyšší výtěžnost extrakčního postupu.

GPC čistící technika byla ověřena na reálných vzorcích kalů (tab. č. 4 až 6).

Tabulka č. 4. Kal, vzorek č. 953/2008.

PAH	SPE (µg/kg)	RSD (%)	GPC (µg/kg)	RSD (%)
NAP	33,16	22,6	32,26	3,8
ANY	< 20	–	< 20	–
ANA	116,8	5,6	136,2	1,4
FLU	65,29	22,2	71,42	1,4
PHE	217,4	8,0	260,5	0,5
ANT	75,23	13,8	64,96	1,8
FLT	734,0	4,6	887,5	0,8
PYR	683,6	0,4	791,2	1,3
BaA	308,9	8,4	318,0	1,6
CHR	393,8	8,0	434,8	0,8
BbF	415,3	7,2	457,7	0,1
BkF	200,3	7,6	216,6	0,6
BaP	367,6	12,4	396,8	0,2
DBA	59,49	9,5	63,85	1,8
BPE	350,2	3,3	384,9	0,4
IPY	358,9	9,5	363,6	6,3
Suma	4385		4900	

Získané výsledky byly porovnány ve statistickém programu EffiValidation 3.0 pomocí t-testu na rozdíl výsledků. Srovnávané čisticí kroky SPE a GPC neposkytují statisticky stejné výsledky. Metoda GPC poskytuje vyšší výsledky.

Tabulka 5. Kal, vzorek č. 1014/2009.

PAH	SPE (µg/kg)	RSD (%)	GPC (µg/kg)	RSD (%)
NAP	52,18	1,7	51,09	5,0
ANY	9,420	23,3	10,69	13,9
ANA	29,79	1,4	32,99	6,4
FLU	35,28	3,5	29,46	6,4
PHE	166,5	2,7	190,1	5,8
ANT	49,52	4,1	43,52	7,3
FLT	389,50	5,5	478,1	5,9
PYR	382,7	3,5	427,7	4,0
BaA	92,12	5,4	86,76	8,3
CHR	197,2	5,2	206,9	6,0
BbF	161,7	1,1	184,6	3,0
BkF	76,31	4,0	88,24	4,4
BaP	156,5	4,3	198,1	4,3
DBA	19,78	4,6	20,22	13,0
BPE	160,6	1,1	188,0	4,8
IPY	135,5	8,4	138,7	5,4
Suma	2115		2375	

Získané výsledky byly porovnány ve statistickém programu EffiValidation 3.0 pomocí t-testu na rozdíl výsledků. Srovnávané čisticí kroky SPE a GPC neposkytují statisticky stejné výsledky. Metoda GPC poskytuje vyšší výsledky.

Tabulka 6. Kal, vzorek č. 1869/2009.

PAH	SPE (µg/kg)	GPC (µg/kg)	Průměr (µg/kg)	RSD (%)
NAP	19,46	17,00	18,23	6,8
ANY	< 20	< 20	–	–
ANA	21,98	35,64	28,81	23,7
FLU	56,38	78,75	67,57	16,6
PHE	293,3	409,2	351,2	16,5
ANT	124,3	155,9	140,1	11,3
FLT	901,1	1202	1052	14,3
PYR	760,2	938,7	849,5	10,5
BaA	250,9	268,0	259,5	3,3
CHR	420,5	510,0	465,3	9,6
BbF	409,1	523,2	466,2	12,2
BkF	222,7	276,6	249,7	10,8
BaP	409,7	516,5	463,1	11,5
DBA	55,54	75,37	65,46	15,2
BPE	331,7	401,1	366,4	9,5
IPY	391,6	493,9	442,8	11,6
Suma	4677	5920	5299	11,7

Získané výsledky byly porovnány ve statistickém programu EffiValidation 3.0 pomocí t-testu na rozdíl výsledků. Srovnávané čisticí kroky SPE a GPC neposkytují statisticky stejné výsledky. Metoda GPC poskytuje vyšší výsledky.

Po zjištění, že přechišťovací krok GPC poskytuje vyšší výsledky než použití SPE, byla metoda GPC ověřena pomocí CRM (tab. č. 7). Bylo analyzováno 8 reálných vzorků kalů současně s CRM (tab. č. 8).

Tabulka 7. Kal CRM 31 (analýza provedena v osmi opakováních).

PAH	Průměr (µg/kg)	RSD (%)	Výtěžnost (%)
NAP	346,4	8,2	105
ANA	92,50	11	92,5
FLU	185,8	8,6	97,8
PHE	1013	12,2	97,4
ANT	172,2	12,9	101,3
FLT	1754	10	96,9
PYR	1620	9,9	105,9
BaA	695,0	9,4	105,3
CHR	854,0	6,9	101,7
BbF	784,5	7,2	82,6
BkF	415,9	9,8	92,4
BaP	628,8	7,5	106,6
BPE	671,1	5,9	108,2
IPY	560,2	8,9	96,6

Získané výsledky obsahů PAHs certifikovaného materiálu CRM 31 byly zpracovány statistickým programem EffiValidation 3.0. Hypotéza o přesnosti a správnosti byla přijata. Analytická metoda s použitím čisticí techniky GPC poskytuje statisticky správné výsledky.

Tabulka 8. Výsledky průměrných obsahů PAHs (µg/kg) v reálných vzorcích kalů.

PAH	vz.1221	vz.1222	vz.1223	vz.1224	vz.1225	vz.1120	vz.1121	vz.1122
NAP	126,88	99,30	76,00	67,00	160,6	101,6	69,58	51,84
ANY	< 20	< 20	221,5	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
ANA	41,77	130,6	57,40	45,60	47,75	135,7	117,5	64,33
FLU	120,0	216,9	175,4	133,7	165,1	120,4	230,3	211,5
PHE	610,6	866,8	772,7	621,0	765,7	782,3	703,8	1133
ANT	1912	295,4	927,0	191,3	186,8	291,0	242,2	483,7
FLT	1238	1340	1317	1214	1285	1891	1133	2768
PYR	1086	1192	1163	1249	1294	1618	936,7	2222
BaA	488,6	467,6	479,9	442,4	428,9	622,0	375,2	987,3
CHR	676,5	561,7	614,6	613,9	636,1	951,7	503,2	1335
BbF	573,5	474,0	536,4	566,8	669,2	972,9	461,3	1203
BkF	335,3	293,1	342,1	337,6	351,9	447,6	236,1	638,8
BaP	563,4	526,0	555,5	525,8	608,4	951,7	512,2	1272
DBA	78,19	70,80	96,80	79,77	83,52	57,89	47,92	74,86
BPE	443,6	375,9	472,3	422,4	493,3	728,3	415,7	945,8
IPY	516,2	390,7	523,4	478,0	479,0	685,5	403,4	925,4

Tabulka 9. Statistické parametry pro analýzu PAHs v kalech s čisticí technikou GPC.

PAH	Průměrný obsah (µg/kg)	Stand.rozšířená nejistota (µg/kg)	Rel.rozšířená nejistota (%)	Opakovatelnost (%)
NAP	94,10	9,160	9,7	5,0
ANA	80,08	17,75	22,2	11,3
FLU	172,0	23,98	14,0	7,1
PHE	781,7	95,24	12,2	6,2
ANT	566,2	104,5	18,5	9,4
FLT	1523	214,9	14,1	7,2
PYR	1345	171,9	12,8	6,5
BaA	536,5	69,41	12,9	6,6
CHR	736,5	92,85	12,6	6,4
BbF	682,1	116,2	17,0	8,7
BkF	372,8	45,80	12,3	6,3
BaP	689,3	88,40	12,8	6,5
DBA	73,72	13,34	18,1	9,2
BPE	537,1	67,93	12,7	6,5
IPY	550,2	59,31	10,8	5,5

Poznámka: Průměrný obsah je průměrný obsah jednotlivých analytů u vzorků uvedených v tabulce 8.

4.3 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál (borovicové jehličí) se extrahuje acetonem vytřepáváním na rotační třepačce. Acetonový extrakt se odpaří k suchu, odparek se rozpustí v chloroformu (9) a dávkuje se na GPC kolonu. Po přečištění se chloroformový eluát opět odpaří na rotační

vakuové odparce k suchu a rozpustí se v tetrahydrofuranu (8). Po naředění 20% acetonitrilem (3) se vzorek nastříkuje na HPLC kolonu.

Správnost metody byla ověřována pomocí standardního přídatku v několika hladinách. Výsledky jsou uvedeny v tab. č. 10 až 12.

Tabulka 10. Borovicové jehličí, vzorek č. 1110/2010.

PAH	LQ	Průměr bez std. příd.	Průměr se std. příd. 9,68 µg/kg	Výtěžnost	Průměr se std. příd. 19,96 µg/kg	Výtěžnost	Průměr se std. příd. 39,87 µg/kg	Výtěžnost
	(µg/kg)	(µg/kg)		(%)		(%)		(%)
NAP	5	5,170	14,36	95,0	24,37	96,2	32,33	68,1
ANY	< 20	< 20	< 20	–	< 20	–	–	–
ANA	5	0,490	9,781	96,0	18,03	87,9	32,42	80,1
FLU	4	4,340	13,84	98,2	22,31	90,0	39,97	89,4
PHE	4	24,96	31,58	68,4	50,16	126,2	58,23	83,5
ANT	2	2,880	10,38	77,5	18,43	77,9	30,975	70,5
FLT	2	17,09	25,93	91,3	37,27	101,1	48,98	80,0
PYR	2	10,79	17,95	74,0	30,50	98,8	42,51	79,6
BaA	4	2,190	9,639	77,0	18,07	79,6	31,63	73,8
CHR	4	7,000	14,52	77,7	24,72	88,8	36,63	74,3
BbF	3	4,140	12,23	83,5	21,28	85,9	33,06	72,5
BkF	2	2,200	9,629	76,8	17,19	75,1	30,79	71,7
BaP	3	2,480	10,12	78,9	18,65	81,0	31,53	72,9
DBA	3	0,530	7,939	76,5	14,88	71,9	28,69	70,6
BPE	5	2,250	10,21	82,2	20,04	89,1	30,84	71,7
IPY	10	1,700	12,00	106,4	18,15	82,4	33,65	80,2

Poznámka: LQ – mez stanovitelnosti.

Tabulka 11. Borovicové jehličí, vzorek č. 1115/2010.

PAH	Průměr bez std. příd. (µg/kg)	Průměr se std. příd. 37,35 µg/kg	Výtěžnost (%)	Průměr se std. příd. 75,15 µg/kg	Výtěžnost (%)
NAP	40,23	75,71	94,98	107,55	89,58
ANY	27,91	67,64	106,37	76,19	64,24
ANA	10,34	43,53	88,85	72,88	83,22
FLU	33,08	72,81	106,36	102,87	92,86
PHE	143,07	179,50	97,55	208,2	86,67
ANT	9,75	42,91	88,79	68,32	77,94
FLT	50,93	89,32	102,77	115,3	85,65
PYR	35,98	72,04	96,55	97	81,19
BaA	5,51	38,90	89,41	68,55	83,89
CHR	17,58	51,21	90,04	79,855	82,87
BbF	8,98	42,51	89,76	70,17	81,42
BkF	4,62	36,57	85,55	66,29	82,06
BaP	5,06	39,52	92,26	67,235	82,74
DBA	1,46	33,43	85,61	64,315	83,65
BPE	4,13	35,61	84,28	65,29	81,38
IPY	1,72	37,53	95,86	61,96	80,15

Tabulka 12. Borovicové jehličí, vzorek č. 1155/2010.

PAH	Průměr bez std. příd. (µg/kg)	Průměr se std. příd. 18,68 µg/kg	Výtěžnost (%)	Průměr se std. příd. 37,5 µg/kg	Výtěžnost (%)
NAP	42,51	60,725	97,51	77,745	93,96
ANY	< 20	17,665	–	33,545	–
ANA	5,426	21,79	87,60	42,23	98,14
FLU	52,43	70,365	96,01	90,08	100,40
PHE	174,8	189,65	79,50	211,2	97,07
ANT	21,77	38,905	91,73	58,53	98,03
FLT	79,63	99,865	108,32	118,3	103,12
PYR	49,79	68,965	102,65	87,585	100,79
BaA	8,881	27,16	97,85	46,525	100,38
CHR	21,1	40,145	101,95	59,445	102,25
BbF	12,45	30,485	96,55	50,27	100,85
BkF	5,745	24,35	99,60	43,94	101,85
BaP	8,808	27,78	101,56	47,455	103,06
DBA	1,288	18,905	94,31	38,665	99,67
BPE	8,193	28,24	107,32	47,09	103,73
IPY	5,784	24,08	97,94	44,755	103,92

5 Shrnutí a diskuse

Při stanovení PAHs je důležitá nejen izolace analytů z matrice, ale zpravidla je nutné extrakty přechistit a odstranit tak koextrahované složky, které analýzu ruší. U kalů a rostlinného materiálu nelze ve většině případů oddělit lipidické a vysokomolekulární složky oddělit pomocí SPE (extrakce na pevné fázi). Dochází k ucpávání sorbetu, a proto byla hledána cesta

nahradit tento přečišťovací způsob vhodnějším. Byla odzkoušena dostupná metoda přečištění pomocí GPC (gelové permeační chromatografie).

Nejprve byl stanoven eluční profil jednotlivých polycyklických aromatických uhlovodíků. Bylo odebráno 14 frakcí o objemu 1,6 ml. Z elučních profilů (obr. č. 1) byla stanovena frakce pro sběr PAHs, tj. 18. až 32. minuta.

Výtěžnost GPC kolony pro jednotlivé polyaromatické uhlovodíky stanovená pomocí směšného standardu se pohybuje ve vyhovujícím rozmezí od 86,7 % do 103,3 % pro koncentrační úrovně 0,06 ppm, 0,2 ppm a 0,4 ppm (tab. 1).

Využití GPC techniky při přečišťování extraktů bylo v úvodu práce odzkoušeno na vzorcích reálných půd, na vnitrolaboratorním referenčním materiálu VRM 934 a na certifikovaném materiálu CRM 30. Získané výsledky obsahů PAHs v reálných půdách a VRM 934 byly porovnány s hodnotami naměřenými s použitím stávající přečišťovací techniky SPE. Porovnání bylo provedeno statistickým programem EffiValidation 3.0 pomocí t-testu na rozdíl výsledků. Bylo prokázáno, že čisticí techniky SPE a GPC poskytují u půd statisticky stejné výsledky. Čisticí krok GPC byl dále aplikován u certifikovaného materiálu CRM 30 a získané hodnoty byly porovnány s referenčními hodnotami. Bylo prokázáno, že analytická metoda za použití čisticího kroku GPC poskytuje statisticky správné výsledky.

U reálných vzorků kalů (vz. č. 953, 1014 a 1869) byla odzkoušena GPC čisticí technika a porovnána s hodnotami po následném přečištění na SPE kolonkách. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 4 až 6. Statistické porovnání ukazuje na rozdílnost výsledků, metoda GPC poskytuje výsledky vyšší. Za použití GPC techniky byl analyzován další soubor vzorků kalů 1221 až 1225, 1120 až 1122 a zároveň certifikovaný materiál CRM 31 (tab. č. 7 a 8). Získané výsledky obsahů PAHs certifikovaného materiálu CRM 31 byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu EffiValidation 3.0. Hypotéza o přesnosti a správnosti byla přijata. Z toho vyplývá, že analytická metoda stanovení PAHs u kalů s použitím čisticí techniky GPC poskytuje statisticky správné výsledky (tab. 8). Výtěžnost jednotlivých analytů se pohybovala v rozmezí od 82,6 % až 108,2 %. Polycyklické aromatické uhlovodíky lze v kalech stanovit s průměrnou relativní rozšířenou nejistotou 14,9 % (tab. 9). Stanovení zahrnuje GPC čisticí techniku a měření na HPLC.

Z rostlinného materiálu bylo k odzkoušení GPC techniky vybráno borovicové jehličí, které obsahuje silice (terpeny – pinen, felandren, limonem...), pryskyřice, vosky a další látky. Protože není k dispozici certifikovaný materiál, bylo nutné u této matrice ověřit GPC techniku

pomocí standardního přídatku. Vzorek 1110 (tab. č. 10) byl odebrán v lokalitě Ostrava-Dubina u parkoviště a vzorek 1115 (tab. č. 11) byl odebrán v lokalitě Ostrava-Dubina v parku. Standardní přídatek PAHs byl pipetován k více navážkám jednotlivých vzorků. Výťažnost PAHs u vzorku borovicového jehličí 1110 se pohybovala v rozmezí od 68,1 % (NAP – tab. č. 10) do 126,2 % (PHE – tab. č. 10). Výťažnost PAHs u vzorku borovicového jehličí 1115 se pohybovala od 64,2 % (ANY – tab. č. 11) do 106,4 % (FLU – tab. č. 11). Poměrně velký rozptyl výtěžností se vysvětluje tak, že u těchto biotických matric nelze zajistit homogenitu vzorku. Jednotlivé extrakty stejného vzorku měly i různou intenzitu zabarvení. Proto byl odebrán další vzorek borovicového jehličí ze zátěžové oblasti Vratimov (vzorek 1155), který byl extrahován paralelně a každý extrakt byl rozdělen na tři části. Jedna část byla přečištěna a analyzována bez standardního přídatku a k dalším dvěma částem byl přidán standardní přídatek (tab. č. 12). Výťažnost se pohybovala v rozmezí od 79,5 % (PHE) do 107,3 % (BPE), viz. tab. č. 12.

6 Závěr

Byla ověřena metoda stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků za použití čisticí techniky gelové permeační chromatografie u matric půdy, kalu a rostlinného materiálu. Správnost metody byla potvrzena analýzou certifikovaného materiálu půdy a kalu. Vzhledem k tomu, že obě čisticí techniky GPC a SPE jsou srovnatelné, bude u vzorků půd vhodnější používat původně zavedenou čisticí techniku na SPE kolonkách, která není tak časově a finančně náročná jako GPC technika. Bylo ověřeno, že metoda s použitím GPC jako čisticího kroku u vzorků kalů poskytuje správné výsledky. U rostlin, kde není CRM k dispozici, byla správnost metody ověřena pomocí standardního přídatku.

Prokázalo se, že při analýze polycyklických aromatických uhlovodíků GPC je vhodným přečišťovacím krokem extraktů problematických matric kalů a rostlinného materiálu.

7 Literatura

1. Jaroslav Churáček a kolektiv: Analytická separace látek, SNTL Praha, 1990; 276-284.
2. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lst/literature/Bulletin_9142.pdf.
3. <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13660/06.pdf>.
4. Kosubová, P.: Zavedení metody GPC a její využití při analýze kalů a krmných směsí. Závěrečná zpráva VÚ L3/2005. NRL-RO Brno, ÚKZÚZ, Brno.
5. <http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM%20GPC%20092007.pdf>.
6. http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_10_777-783.pdf.
7. EPA method 3640A. Gel-permeation cleanup. US Environmental Protection Agency, Washington, D.C., September 1994.

Využití HPLC pro stanovení kyseliny močové

Alena Žalmanová, Václav Ryppl

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,
Regionální oddělení Plzeň, Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň

alena.zalmanova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Na základě požadavku Odboru bezpečnosti krmiv a půdy na rozlišení původu organických hnojiv byl vypracován postup stanovení kyseliny močové v organických hnojivech metodou HPLC.

2 Úvod

Někteří výrobci granulovaného hnojiva z trusu skotu údajně přidávají do granulátu i trus drůbeží a tuto směs deklarují jako čistý hovězí hnůj. Jednalo by se o klamání spotřebitele a vznikla tedy potřeba zjišťovat původ organických hnojiv. Při určování původu hnojiva se využívá skutečnosti, že metabolismus ptáků se zbavuje dusíku ve formě téměř nerozpustné kyseliny močové (bílý potah na trusu), zatímco metabolismus savců ve formě dobře rozpustné močoviny (moč). Ptačí exkrementy tedy obsahují vysoké koncentrace kyseliny močové, zatímco exkrementy savců téměř žádnou kyselinu močovou neobsahují. Proto byla kyselina močová zvolena jako ukazatel při zjišťování původu organických hnojiv.

3 Materiál a metody

3.1 Princip metody

Jedná se o HPLC stanovení za izokratických podmínek na reverzní fázi s UV detekcí. Vzorek se extrahuje roztokem Li_2CO_3 a k rozdělení dojde na koloně s reverzní fází. Jako mobilní fáze se používá fosfátový pufr. Vyhodnocení bylo provedeno formou externí kalibrace a odečítány byly plochy píků.

3.2 Chemikálie

Používají se chemikálie čistoty p.a., pokud není uvedeno jinak.

- 1 Extrakční činidlo, Li_2CO_3 , roztok, $c(\text{Li}_2\text{CO}_3) = 10 \text{ mmol/l}$.

Příprava: Naváží se 1,4777 g Li_2CO_3 a rozpustí se v ultrazvukové lázni ve 2 l destilované vody.

- 2 Kyselina močová, základní standard, $c = 100 \text{ mg/l}$.

Příprava: Naváží se 10 mg kyseliny močové a rozpustí se v ultrazvukové lázni ve 100 ml extrakčního činidla (1).

- 3 Metanol G Chromasolv (Sigma-Aldrich).

- 4 Deionizovaná voda, redestilována s KMnO_4 .

- 5 KH_2PO_4 , roztok $c(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 1 \text{ mol/l}$.

Příprava: Naváží se 68 g KH_2PO_4 , do 0,5 l vody, rozpouští se za tepla a v ultrazvukové lázni.

- 6 Mobilní fáze (fosfátový pufr).

Příprava: Do 1000ml baňky se pipetuje 50 ml roztoku KH_2PO_4 (5), přidá se 500 ml destilované vody (4), přidá se 50 ml metanolu (3) a doplní vodou (4) po značku. Pak se vloží na 15 min do ultrazvukové lázně (odstranění vzduchu).

3.3 Přístroje a pomůcky

- 1 HPLC Waters – detektor Waters 486, autosampler Waters 717 plus, Waters 515 HPLC Pump, Waters in-line degaser.
- 2 UV-VIS spektrometr HP 8453.
- 3 Automatická pipeta (0,1 – 5) ml.
- 4 Centrifuga 5000 ot/min.
- 5 Centrifuga 13000 ot/min.
- 6 Ultrazvuková lázeň.
- 7 Třepačka horizontální.
- 8 Laboratorní analytické váhy – Sartorius A 200 S.
- 9 Laboratorní mlýnek – Retsch Grindomix GM 200.

4 Postup

4.1 Úprava a extrakce vzorku

Vzorek se usuší při 60 °C, pomele na mlýnku a proseje přes 0,5mm síto. Na analytických vahách se naváží 0,5 g vzorku a pomocí 100 ml extrakčního činidla (1) se převede do uzavíratelných PE lahvíček o objemu asi 250 ml. Nádobky se uzavřou, vloží na 5 min do ultrazvukové lázně a poté na 30 min do horizontální třepačky. Vzorek se dále odlije do centrifugační kyvety (podle velikosti kyvety 10 ml až 50 ml) a hrubé nečistoty se odstředí 15 min při 5000 ot/min. Pak se do 1,5ml zkumavky eppendorf odebere alikvot a zkumavka se vloží do odstředivky na 5 min při 13000 ot/min. Takto upravený extrakt je možné přelit do vialek a vložit do HPLC. Vzhledem k vysokým obsahům kyseliny močové ve vzorcích ptačího trusu je nutné extrakt naředit 20 ×. Tedy 0,5 ml extraktu vzorku se pipetuje do 10ml baňky a doplní se extrakčním činidlem (1) po značku.

4.2 Příprava standardů

Ze základního standardu (2) se do 25ml baněk automatickou pipetou pipetuje (0,25; 1,25; 2,50; 3,75; 5,00) ml a doplní se po značku extrakčním činidlem (1). Výsledné koncentrace kalibračních standardů jsou (1; 5; 10; 15; 20) mg/l.

4.3 Chromatografické podmínky

Průtok mobilní fáze:	1 ml/min,
Injektáž vzorku:	20 µl,
Teplota kolony:	30 °C,
Vlnová délka:	286 nm,
Kolona:	Atlantis T3 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm, C18, reverzní fáze).
Vlastní eluce:	za izokratických podmínek,
Retenční čas:	6,28 min,
Kapacitní faktor:	1,73.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Optimalizace postupu

Byly připraveny fosfátové pufrы o různém pH. V nich byla rozpuštěna kyselina močová o koncentraci 20 mg/l a byla proměřena spektra těchto roztoků na UV-VIS spektrometru HP 8453. Byla nalezena tři absorpční maxima, a to v oblastech kolem 202 nm, 234 nm a 290 nm. Poloha maxim je závislá na pH, neboť při snižujícím se pH klesá i vlnová délka maxima takto:

pH = 7 → max = 292 nm,

pH = 5,7 → max = 289 nm,

pH = 4,55 → max = 286 nm.

Pro potřeby práce se využilo maxima v oblasti 290 nm, protože na této vlnové délce neabsorbují ostatní analyty přítomné v matrici a odpadají tak možné spektrální interference. Je třeba podotknout, že při snižujícím se pH klesá i rozpustnost kyseliny močové a práci při vysokém pH zase neumožňuje kolona, která je použitelná v rozsahu pH 2 až 8. Mobilní fázi byl fosfátový pufr (6), tj. 50 mM KH_2PO_4 v 5% metanolu. Kolona Atlantis T3 (250 mm × 4,6 mm), 5 μm umožňuje použití až 100% vodných mobilních fází, a HPLC Waters. Přídavek metanolu do mobilní fáze sice zkrátí retenční čas a zhorší tak selektivitu celé metody, ale poněkud se zlepší stabilita retenčního času a kolona je lépe ochráněna proti vymývání silanolové báze 100% vodnou mobilní fází. Vzhledem k použité mobilní fázi s pH cca 5 byla vybrána vlnová délka 286 nm. Vzorek byl extrahován roztokem Li_2CO_3 (1), v němž byly připraveny i standardy. Vlastní měření bylo provedeno externí kalibrací.

5.2 Výsledky analýz reálných vzorků

Byly analyzovány dva vzorky organických hnojiv: drůbeží trus (analytické číslo 125) a trus skotu (analytické číslo 129). Na vzorku 125 byla zkoumána výtěžnost metody tak, že byly použity různé navážky a dosažené výsledky pak byly porovnány (tab. 1).

Tab. 1. Vliv navážky na celkový obsah kyseliny močové, vzorek č. 125, ředění 20 ×.

Vzorek č.	Navážka (g)	Objem extrakčního činidla (ml)	Obsah ve zředěném extraktu (mg/l)	Koncentrát (mg/l)	Obsah kys. močové v hnojivu (mg/kg)
125	0,1	100	2,81	56,3	56260
	0,2	100	6,02	120,3	60160
	0,3	100	9,49	189,8	63260
	0,4	100	13,40	268,0	67005
	0,5	100	15,75	315,0	62992

Z tabulky č. 1 vyplývá, že extrakční podmínky jsou dostačující pro kvantitativní převedení kyseliny močové do roztoku (1). Variabilita výsledků se přičítá nehomogenitě materiálu vzhledem k nízké navážce vzorku. Obsah kyseliny močové ve vzorku 129 se pohyboval pod mezí stanovitelnosti metody tj. pod 0,2 mg/l, což při přepočtu 0,5 g/100 ml znamená méně než 40 mg/kg. Byly vyzkoušeny i vyšší navážky a obsah kyseliny močové ve vzorku 129 byl odhadnut na cca 5 mg/kg. Tento postup nelze doporučit pro rutinní stanovení kvůli nebezpečí poškození kolony. Vzhledem k relativně velkým nepřesnostem v těchto oblastech je pro kvantitativní analýzu vhodnější nepoužívat výsledky nižší než 1 mg/l.

Dále byly tyto dva vzorky smíchány v různých poměrech, aby byly simulovány reálné podmínky (modelování matrice) a tyto směsi byly analyzovány (tab. 2 a tab. 3).

Tabulka 2. Porovnání výsledků směsí vzorků 125 a 129.

	Vz. 125 navážka	Vz. 129 navážka	Celková navážka	Výsledek	Extrakční činidlo objem	Ředění	Kys. močová obsah
Poměr vzorků	(g)	(g)	(g)	(mg/l)	(ml)	(x krát)	(mg/kg)
1 + 9	0,05	0,45	0,5	1,392	100	20	5568
1 + 9	0,05	0,45	0,5	1,457	100	20	5828
2 + 8	0,1	0,4	0,5	3,006	100	20	12024
2 + 8	0,1	0,4	0,5	3,037	100	20	12148
5 + 5	0,25	0,25	0,5	8,245	100	20	32980
5 + 5	0,25	0,25	0,5	8,186	100	20	32744
7 + 3	0,35	0,15	0,5	11,76	100	20	47040
7 + 3	0,35	0,15	0,5	11,07	100	20	44280

Tabulka 3. Výpočet obsahu vzorku 125 ve směsi vzorků 125 a 129.

Poměr vzorků	Obsah vz. 125 ve směsi (%)	Vypočtený obsah vz. 125 ve směsi (%)	Kys. močová obsah (mg/kg)
1 + 9	10	9,0	5698
2 + 8	20	19,2	12086
5 + 5	50	52,2	32862
7 + 3	70	72,5	45660
10+0	100	100	62992

Vzhledem k nízkému obsahu kyseliny močové ve vzorku 129 byl příspěvek k celkovému obsahu kyseliny močové ve zkoumaných směsích zanedbán. Z výsledků vyplývá, že při znalostech obsahů kyseliny močové v jednotlivých složkách směsi lze určit, jak tato směs byla namíchána.

Kyselina močová je nestabilní sloučenina, relativně rychle se rozkládá. Proto se musejí před každou analýzou připravovat čerstvé standardy včetně základního standardu. V literatuře se uvádí možnost skladování tohoto roztoku ve zmraženém stavu. Když je standard ponechán v tekutém stavu, je už druhý den patrný její úbytek. Tato skutečnost by měla být brána v úvahu i při využívání této metody pro analýzu reálných vzorků. Je třeba věnovat pozornost způsobu skladování, odběru vzorku atd.

Během analýz na HPLC dochází k driftům retenčního času, i když ty byly omezeny přidavkem metanolu do mobilní fáze, nicméně nebyly zcela odstraněny. Byla pozorována i určitá nereprodukovatelnost v plochách píků u standardů tj. korelační koeficient křivky 0,996 a při přeměření 0,9999 (vždy v kombinaci s driftem retenčních časů), na proložení byl přitom vždy použit polynom druhého stupně. Čím menší drift, tím vyšší korelační koeficient. Může to být způsobeno vysoce vodnou mobilní fází (i při použití kolony určené pro tyto podmínky), která může vymývat silanolovou bázi kolony, tak i interakcí analytu s touto bází.

6 Závěr

Systém měření na reverzní fázi (RPLC – reversed-phase chromatography) umožňuje kvantitativní stanovení kyseliny močové. Alternativou k měření na reverzní fázi by mohl být systém HILIC (hydrophilic interaction chromatography), který je určen pro stanovování malých polárních sloučenin na polární stacionární fázi, (viz. lit. 3). Tento systém umožňuje oproti normální fázi použít jako mobilní fázi směs organického rozpouštědla např. acetonitril a vody (nebo pufru např. mravenčan amonný). Je možné, že tímto způsobem by mohly být odstraněny některé nestability v systému.

Zkoumaná HPLC metoda je použitelná pro stanovení obsahu kyseliny močové v organických hnojivech. Použití kyseliny močové jako ukazatele složení směsi organických hnojiv je možné.

7 Literatura

1. M. A. Eiteman, R. M. Gordillo, M. L. Cabrera: Analysis of oxonic acid, uric acid, creatine, allantoin, xanthine and hypoxanthine in poultry litter by reverse phase HPLC, *Frensenius J Anal Chem* (1994) 348: 680–683
2. B. Pekić, B. Slavica, Z. Zeković: High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Uric Acid in Feces of Egg-Laying Hens, *Chromatographia* Vol. 27, No. 9/10, May 1989, 467–468
3. Noel S. Quiming, Nerissa L. Denola, Yoshihiro Saito, Alicia P. Catabay, Kiyokatsu Jinno: Chromatographic Behavior of Uric Acid and Methyl Uric Acids on a Diol Column in HILIC, *Chromatographia* 2008, 672 April (No. 7/8) 507–515.

Bulletin Národní referenční laboratoře XV 2011/2

Ročník: XV, č. 2
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2011
Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová
Náklad: 140 výtisků
Počet stran: 53
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196