Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2007

Ročník XI, číslo 2/2007

Brno 2007

Toto číslo Bulletinu Národní referenční laboratoře věnujeme naší neočekávaně zesnulé kolegyni

Ing. Lýdii Dudíkové.

Obsah

1. Stanovení kondenzátů močoviny v hnojivech s pomalu působícím dusíkem metodou HPLC 1

Lýdie Dudíková †
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Praha, Za opravnou 4, 150 06 Praha 5

2. Porovnání mineralizačních postupů na stanovení živin ve vzorcích kalů 15

Eva Čižmárová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO, Hroznová 2, 656 06 Brno

Jiří Zbíral
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL, Hroznová 2, 656 06 Brno

3. Stanovení NEL metodou plynové chromatografie 35

Pavla Tieffová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

4. Využití přístroje GPC pro multireziduální analýzy 41

Pavla Tieffová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno

5. Zavedení metod pro stanovení aktivit ureázy a ß-glukosidázy jako parametrů aktivity půdních mikroorganizmů 52

Stanislav Malý
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno

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 kondenzátů močoviny v hnojivech s pomalu působícím dusíkem metodou HPLC

Lýdie Dudíková †
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Praha, Za opravnou 4,
150 06 Praha 5 – Motol

1 Souhrn

Tato práce vznikla na základě požadavku mezinárodní normalizační komise CEN/TC 260 TF, která požádala ÚKZÚZ o validaci metody a zúčastnění se mezinárodního kruhového testu na stanovení isobutylidendimočoviny (IBDU) a krotonylidendimočoviny (CDU).

Vzhledem k tomu, že uvedené látky jsou deklarovány v zákoně 156/1998 Sb. jako hnojiva, která jsou v členských zemích označovaná jako „hnojiva ES“ (směrnice Rady ES č.76/116/EEC), je třeba tuto metodu ověřit a zařadit do příslušné vyhlášky MZe ČR 474/2000 Sb. ze dne 13.12. 2000 o odběrech a chemických rozborech vzorků hnojiv.

Cílem práce bylo navrženou metodu stanovení odzkoušet, optimalizovat podmínky metodou HPLC a po ověření zahrnout do metod zkoušení a Standardních operačních postupů ÚKZÚZ.

Testovanými přípravky byly vzorky dodané v rámci mezinárodního kruhového testu Landesbetrieb Hessisches Landeslabor Standort Kassel-Harleshausen.

Vzorek Flor 1 obsahoval asi 19,0 % IBDU;

Vzorek Triab obsahoval asi 32,0 % CDU.

Kondenzační produkty močoviny s aldehydy (formaldehydem, isobutyraldehydem, krotonaldehydem) jsou používány v rozsáhlém množství jako řízeně se uvolňující hnojivo pro zeleň a trávníky. Reakcí aldehydu s močovinou vzniká methylmočovina a následně dimethylmočovina. Isobutylidendimočovina a krotonylidendimočovina se pomalu rozkládá na močovinu, amoniak, odpovídající aldehydy a oxid uhličitý.

2 Stanovení isobutyliden a krotonyliden dimočoviny metodou HPLC

2.1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu isobutylidendimočoviny a krotonylidendimočoviny v hnojivech. Obě látky se používají jako hnojivo s pomalu se uvolňujícím dusíkem. Chemicky se jedná o

Krotonylidendimočovina - (CDU) - $C_6H_{12}N_4O_2$ – M_r: 172,2
Jde o kondenzační produkt kroton aldehydu (2-butenalu) s močovinou.

Isobutylidendimočovina - (IBDU) - $C_6H_{14}N_4O_2$ – M_r: 174,2
Jde o kondenzační produkt isobutylaldehydu (2-methyl propanalu) s močovinou.

2.2 Princip

Obsah isobutylidendimočoviny a krotonylidendimočoviny se stanoví po extrakci vodou metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s UV detekcí při 200 nm.

2.3 Chemikálie

1 Isobutylidendimočovina – standardní látka
2 Krotonylidendimočovina – standardní látka
3 Destilovaná voda, HPLC grade
4 Acetonitril, HPLC grade
5 Mobilní fáze – acetonitril/voda (5/95 v/v)

2.4 Přístroje a pomůcky

1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí
2 Analytické váhy s přesností 0,1 mg
3 Ultrazvuková lázeň
4 Elektromagnetická míchačka
5 Membránový filtr 0,45 μm

2.5 Pracovní postup

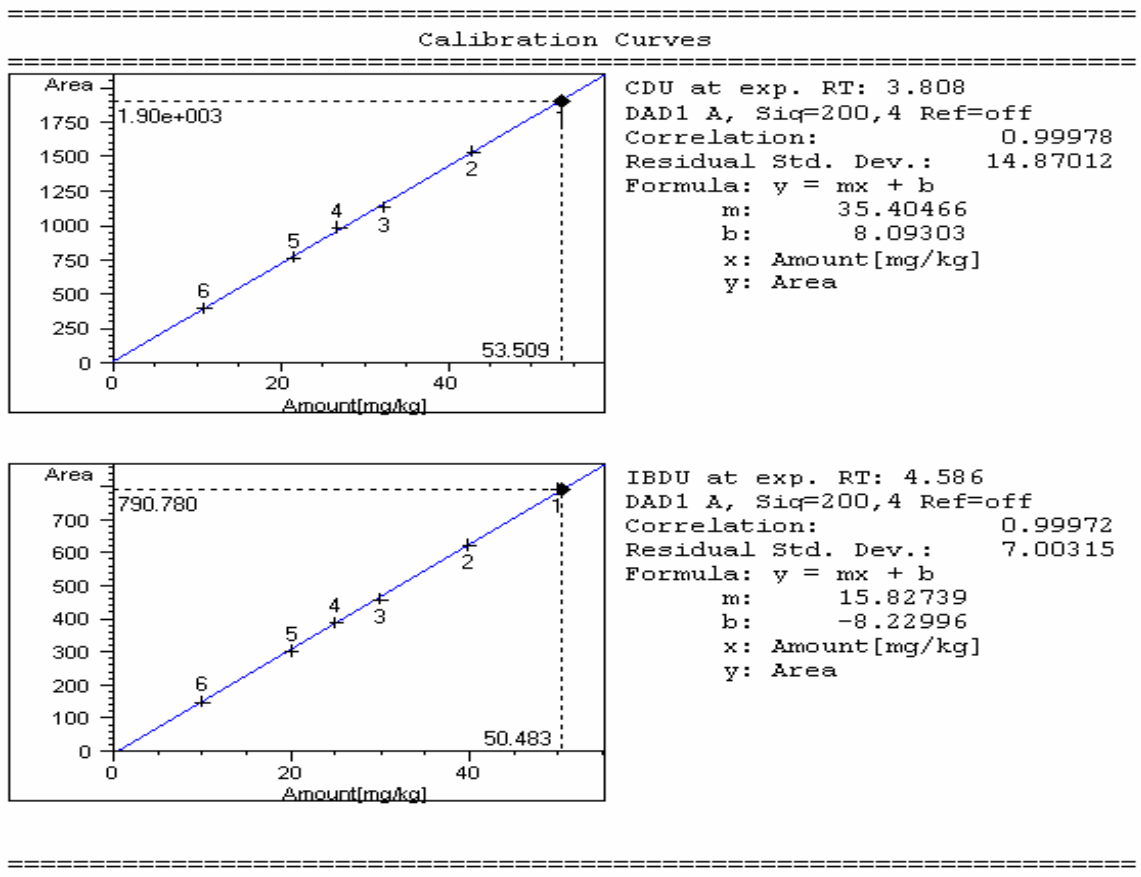
2.5.1 Extrakce

Do odměrné baňky o obsahu 1000 ml se odváží 1 g vzorku. Naplníme baňku asi 900 ml vody (3) a rozpouštíme 10 minut v ultrazvukové lázni. Než doplníme obsah po značku vodou, extrahujeme vzorek 1 hod. na magnetické míchačce. Extrahovaný vzorek se doporučuje přečistit před nástřikem na kolonu přístroje na membránovém filtru 0,45 μm.

2.5.2 Kalibrace

Základní standardní roztok isobutylidendimočoviny a krotonylidendimočoviny (1) a (2). Do odměrné baňky na 250 ml se naváží asi 25 mg standardních látek s přesností na 0,1 mg, rozpustí v ultrazvukové lázni a doplní se po značku vodou (3).
1 ml tohoto základního roztoku obsahuje asi 0,1 mg isobutylidendimočoviny; 0,1 mg krotonylidendimočoviny.

Do sady odměrných baněk na 10 ml se postupně pipetuje (0,5; 1,0; 3,0; 5,0) ml obou základních standardů, doplní vodou po značku a promíchá. Takto připravená sada odpovídá koncentracím (5,0; 10,0; 30,0; 50,0) μg/ml isobutylidendimočoviny a krotonylidendimočoviny.

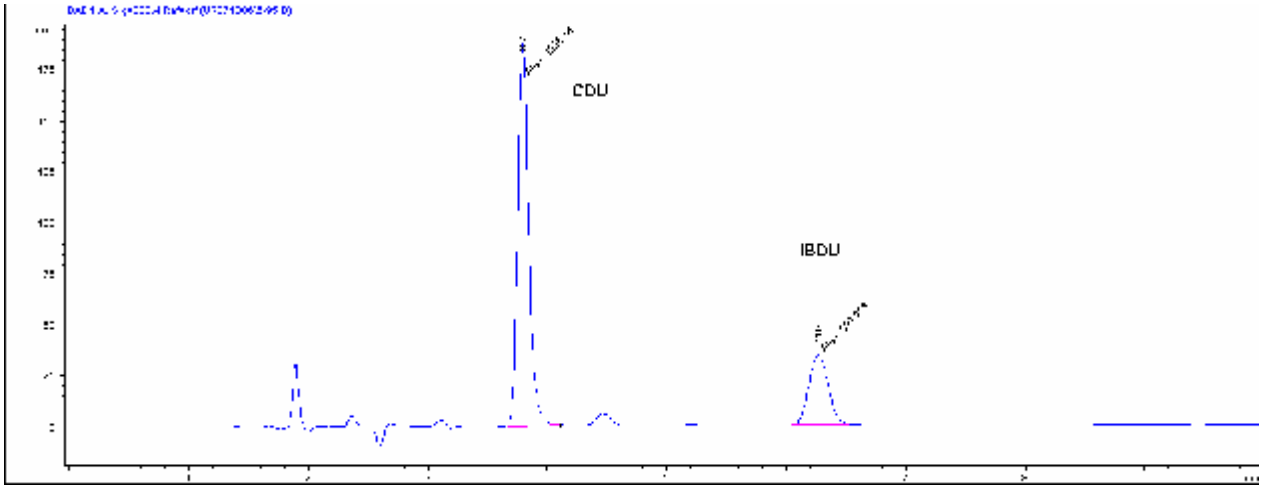


Obr. 1. Ukázka kalibračních křivek CDU a IBDU

2.5.3 Chromatografické podmínky stanovení

Vlastní měření kalibračních roztoků a extraktů zkušebních vzorků se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Analytická separační kolona:	Zorbax Eclipse C 18 Agilent 4,6 × 150 5µm	
UV detektor:	200 nm	
Teplota kolony:	22 ^{o}C	
Mobilní fáze:	acetonitril/voda (5/95 v/v)	
Průtok:	0,6 ml/min	
Objem nástřiku:	10 µl	
Retenční čas:	krotonylidendimočoviny (CDU)	3,8 min
	isobutylidendimočoviny (IBDU)	6,3 min
Čas analýzy:	15 min	



Obr. 2. Ukázka chromatogramu

2.6 Výpočet

Obsah jednotlivých kyselin (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{c \times V \times R}{m_a}$$

c je koncentrace jednotlivých kyselin odečtených z kalibračního grafu v mg/l

V objem extraktu v ml

m_a hmotnost zkušebního vzorku v g

R faktor ředění

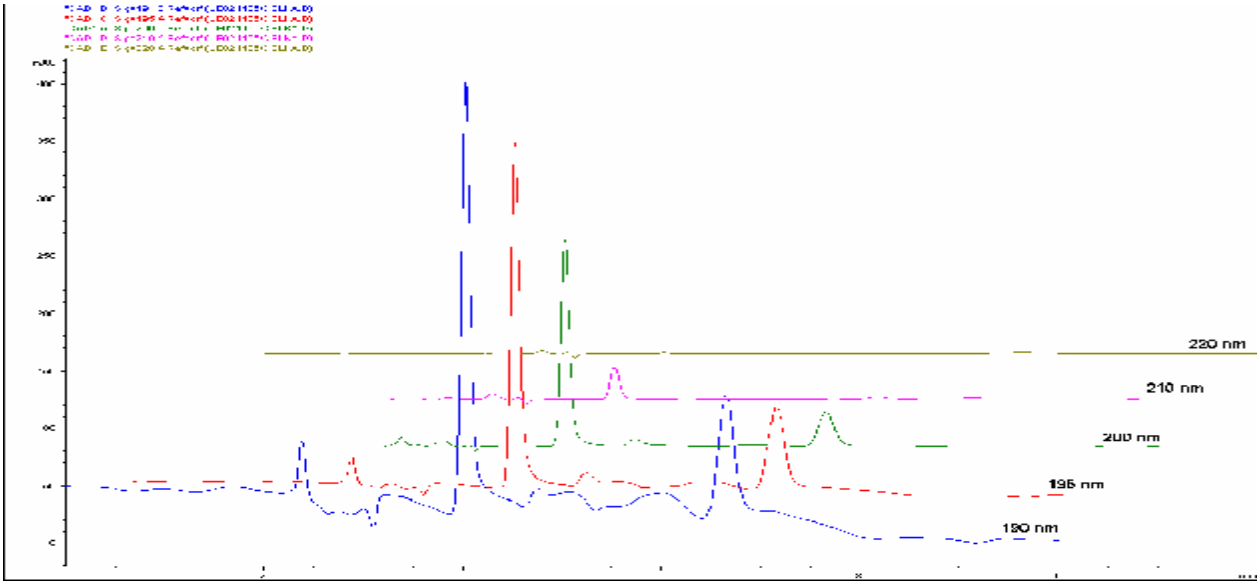
3 Interpretace validačních parametrů

3.1 Optimalizace parametrů pro HPLC stanovení

3.1.1 Vliv vlnové délky

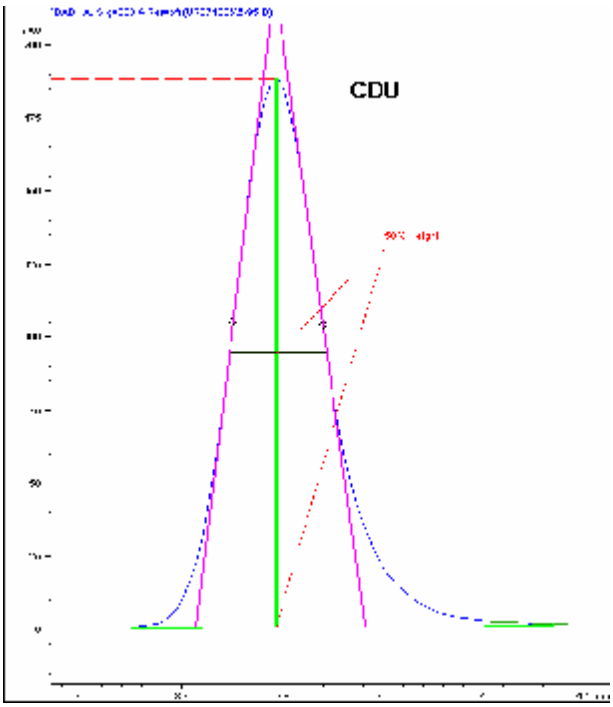
Jako první faktor, který byl ověřován, byl vliv vlnové délky na velikost a tvar stanovovaných píků. Pomocí spektrální analýzy bylo zjištěno, že neabsorbuje UV/VIS záření nad 220 nm. V proměřovaném rozmezí (190 – 220) nm vykazují stanovované látky největší odezvu pro nejkratší vlnovou délku (190 nm). Při této vlnové délce se však také projeví zvýšená absorbce ostatních složek mobilní fáze a dochází k výraznému šumu. Jako optimální byla

vybrána vlnová délka 200 nm, protože představuje dobrý kompromis mezi intenzitou signálu analytu a šumem mobilní fáze.

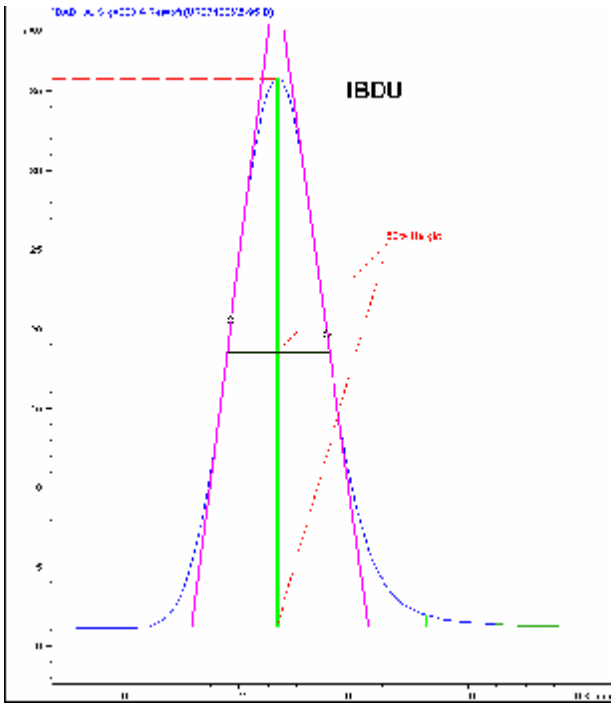


Obr.3. Vliv vlnové délky

Na obrázcích č. 4 a č. 5 je ukázána detailní informace o pících krotonylidendimočoviny a isobutylidendimočoviny, které vypovídají o podmínkách chromatografického systému. Některé parametry jsou shrnuty v tabulce 1.



Obr. 4. Pík CDU



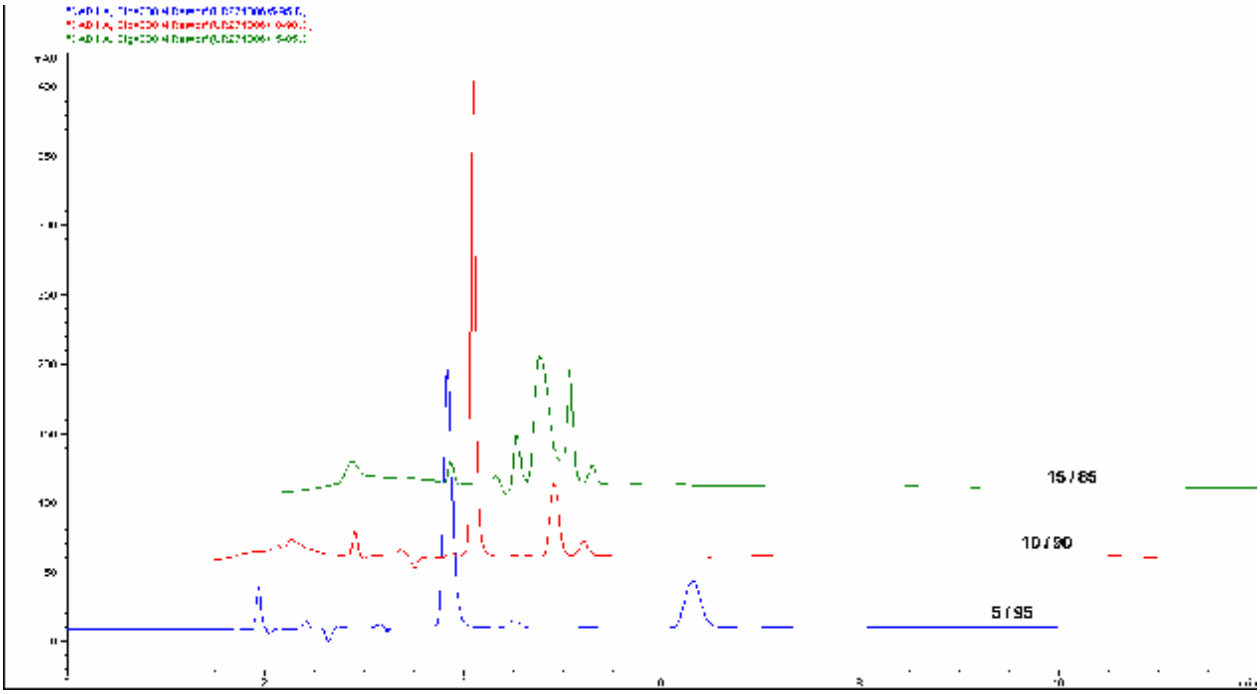
Obr. 5. Pík IBDU

Tabulka 1

Parametr	Doporučeno	Krotonylidendimočovina	Isobutylidendimočovina
Faktor chvostování	< 2	1,237	1,109
Počet teor. pater/metr	> 2000	38 449	45 895
Rozlišení	> 1,5	10,571	10,614
Poměr signál/šum	> 10	2063,5	7281,9

3.1.2 Vliv složení mobilní fáze

Na obr. 6 je znázorněn vliv složení mobilní fáze. Jako nejvýhodnější se ukázalo složení mobilní fáze acetonitril/voda v poměru 5/95 (v/v). Dobré výsledky byly i pro mobilní fázi v poměru 10/90 (v/v). Při větším obsahu acetonitrilu 15/85 (v/v) nedochází za uvedených podmínek k optimální separaci a dochází ke koeluci více látek v jednom píku, což znemožňuje jejich správnou identifikaci.

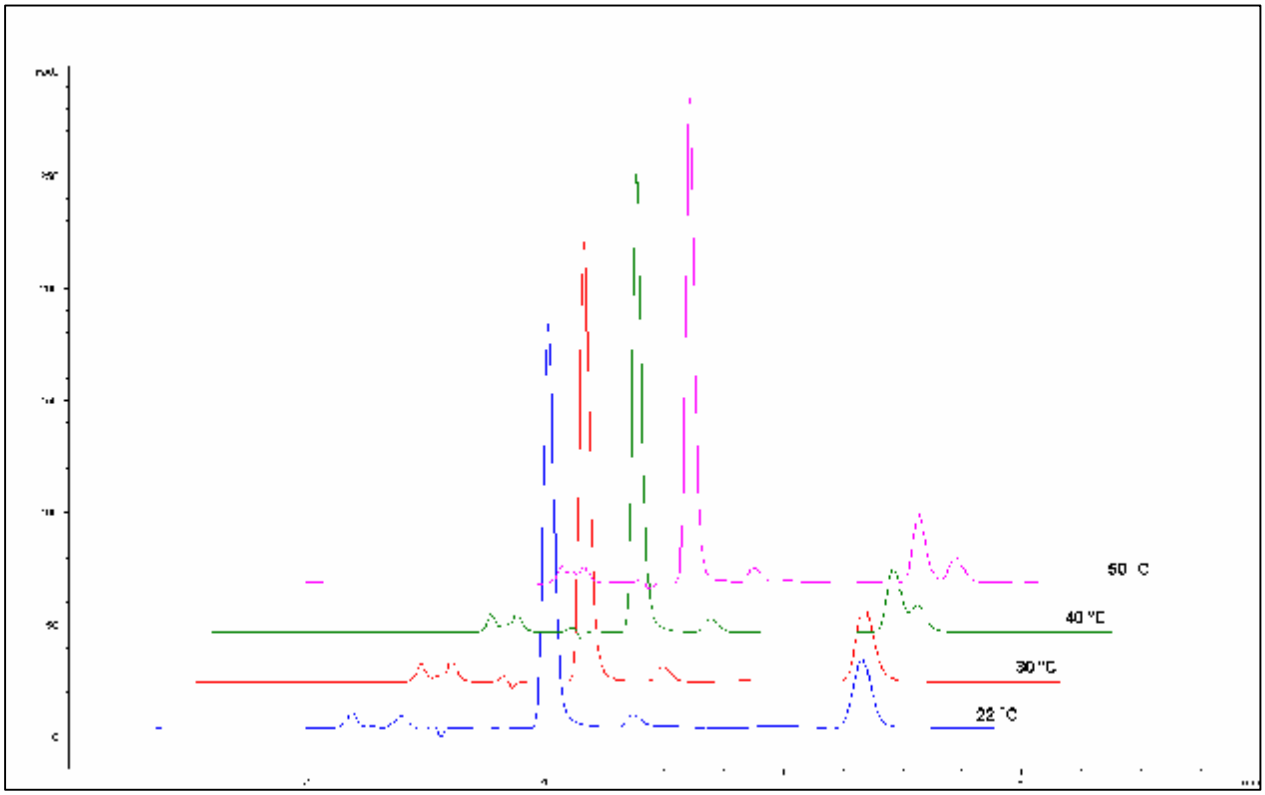


Obr.6. Vliv složení mobilní fáze

3.1.3 Vliv teploty

Při zachování základních podmínek: vlnová délka λ = 200 nm, nástřik 10 µl, průtok mobilní fáze 0,6 ml/min, složení mobilní fáze acetonitril/voda v poměru 5/95 (v/v), byl testován vliv teploty na kvalitu separace obou látek v rozmezí (22 – 50) ^{o}C. Velmi dobrá separace byla při

teplotě 22 °C a 30 °C. Při vyšších teplotách 40 °C a 50 °C docházelo ke štěpení píku IBDU. Zvolili jsme teplotu 22 °C , která byla doporučena v původní metodě.



Obr. 7. Vliv teploty

3.1.4 Výběr kolony

Bylo použito 5 kolon od různých výrobců na bázi reverzní fáze:

8A: Zorbax Eclipse XDB – C18, 4,6 x 150 mm, 5 µm – firmy Agilent

8B: Zorbax Eclipse XDB – C18, 4,6 x 250 mm, 5 µm – firmy Agilent

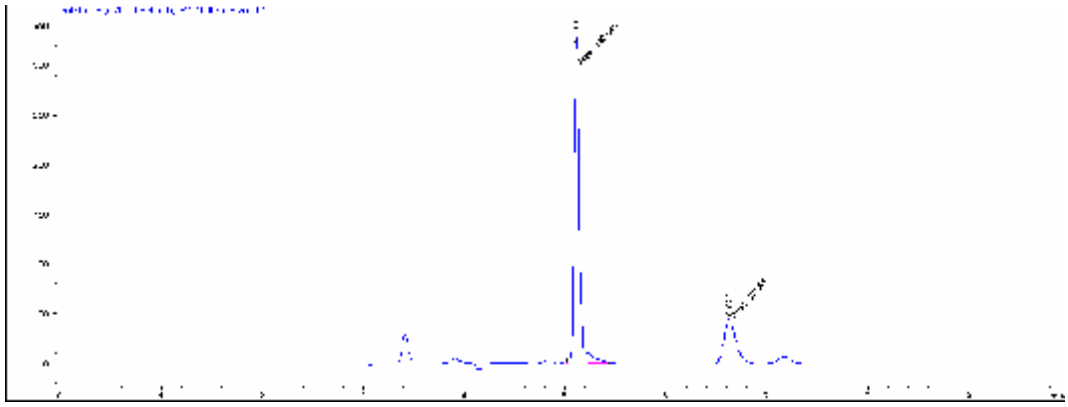
8C: Symmetry Shield RP8, 3,9 x 150 mm, 5 µm – firmy Waters

8D: Symmetry Shield RP8, 3,9 x 250 mm, 5 µm – firmy Waters

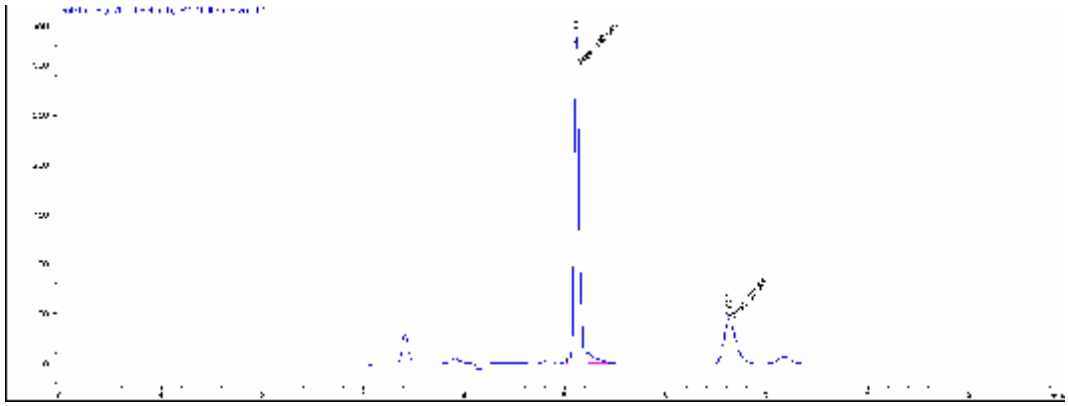
8E: Nova Pack C18, 3,9 x 150 mm, 5 µm – firmy Waters

Ukázky chromatogramů jsou na obr. 8.

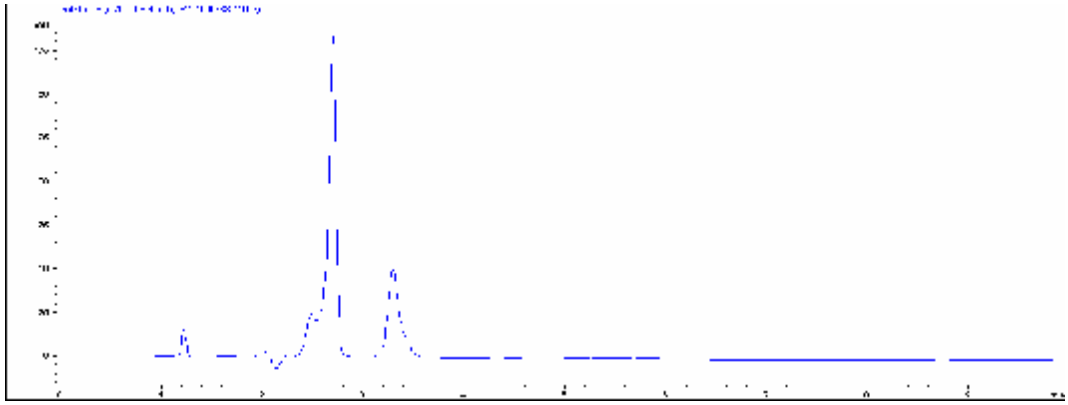
Jako naprosto nevyhovující se prokázala kolona na Nova Pack C18 (obr. 8E). Zvoleným požadavkům na separaci naopak nejlépe vyhovovala kolona Zorbax Eclipse XDB C18 (obr. 8A), která byla použita k validaci metody.



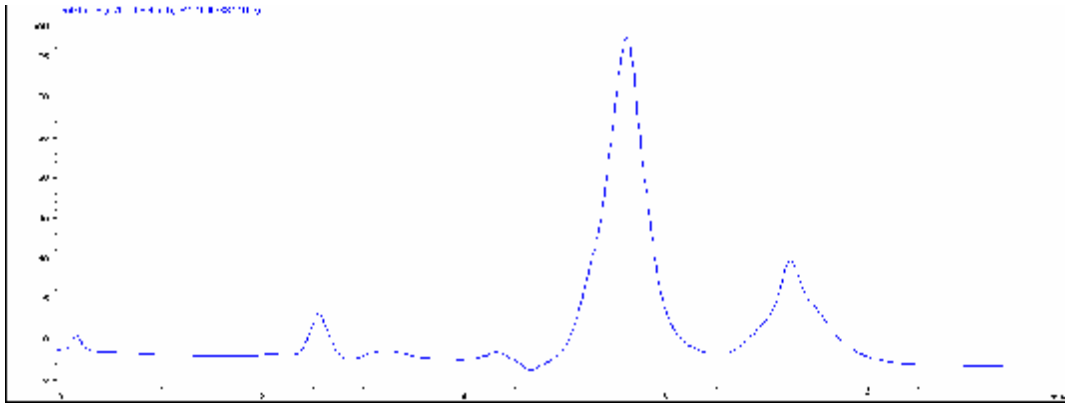
Obr. 8A



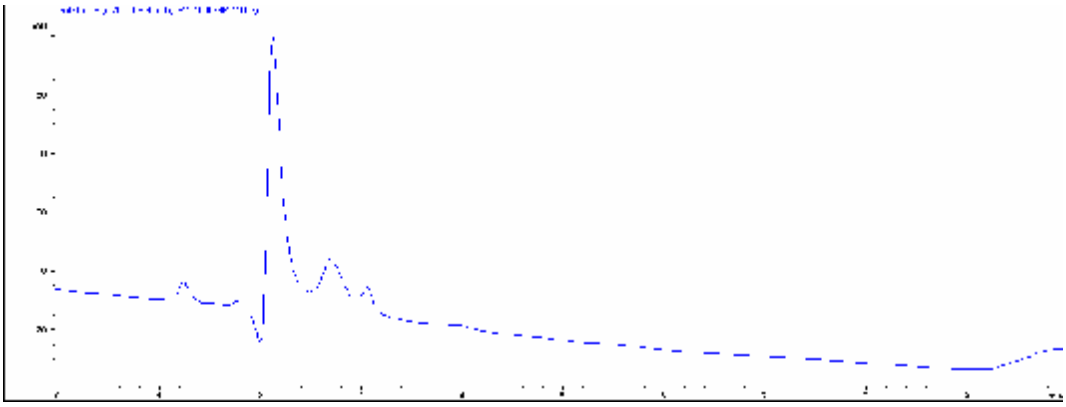
Obr. 8B



Obr. 8C



Obr. 8D



Obr. 8E

3.2 Citlivost

Citlivost je podle IUPAC dána změnou signálu, vyvolanou změnou validované vlastnosti (tj. směrnice kalibrační přímky). V tabulce 2 jsou uvedeny naměřené hodnoty kalibrační přímky.

Tabulka 2. Hodnoty kalibračních přímek

Kalibrační úroveň	Krotonylidendimočovina		Isobutylidendimočovina	
	µg/ml	plocha	µg/ml	plocha
1	10,73	395,51	9,984	148,37
2	21,45	762,38	19,968	301,73
3	26,81	980,51	24,960	386,69
4	32,18	1128,01	29,952	458,44
5	42,90	1532,68	39,936	621,74
6	53,63	1902,58	49,920	790,78

Citlivost analytické metody daná směrnicí kalibrační přímky je pro jednotlivé analyty tato:

Pro krotonylidendimočovinu (CDU) je hodnota 0,0284 (plocha/mg).

Pro isobutylidendimočovinu (IBDU) je hodnota 0,0622 (plocha/mg).

3.3 Linearita

Linearita, podobně jako citlivost, byla určena z hodnot naměřených v kalibrační přímce uvedených v tabulce 2. Ke statistickému vyhodnocení linearity bylo použito QC testu. Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Vyhodnocení linearity

Parametr	**Krotonylidendimočovina**	**Isobutylidendimočovina**
Vypočtený R	0,99967	0,99979
R k testování	0,9900	0,9900
Vypočtený QC	1,27	1,0
QC k testování	5,0	5,0

U obou látek byla na základě hodnot korelačního a QC koeficientu prokázána linearita metody.

3.4 Mez stanovitelnosti a mez detekce

Mez detekce je úroveň, nad kterou lze odezvu vzorku odlišit od odezvy slepého pokusu. Mez stanovitelnosti je úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení. Tyto hodnoty byly vypočteny programem EffiValidation z hodnot uvedených v tabulce 2.
Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4. Hodnoty meze stanovitelnosti a meze detekce

	Krotonylidendimočovina (mg/kg)	**Isobutylidendimočovina (mg/kg)**
Mez detekce	123,29	40,54
Mez stanovitelnosti	222,07	73,01
Rozsah	120 – 450 000	40 – 300 000

3.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty, které způsobují náhodné chyby. Stanovení opakovatelnosti bylo provedeno na jednom vzorku hnojiva z osminásobného měření. Naměřené hodnoty jsou v tabulce 5.

Tabulka 5. Stanovení opakovatelnosti

Měření číslo	Krotonylidendimočovina (mg/kg)	Isobutylidendimočovina (mg/kg)
1	319 324	192 240
2	321 260	192 681
3	319 993	192 443
4	320 189	194 087
5	319 089	195 327
6	317 582	192 536
7	320 680	193 486
8	323 396	192 910

Po vyhodnocení programem EffiValidation 3.0 jsou hodnoty opakovatelnosti pro:

krotonylidendimočovinu (CDU) 0,58 % relativních;

isobutylidendimočovinu (IBDU) 0,53 % relativních.

U obou analytů byla potvrzena hypotéza o normalitě dat.

3.6 Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s deklarovanou referenční hodnotou. Správnost byla dále zjišťována testem výtěžnosti, kdy k přesné navážce vzorku se zjištěným obsahem určované látky bylo postupně přidáváno stanovované množství čisté látky ve třech různých hladinách přídavku (4; 8; 12) % a zpětně vypočítaná výtěžnost. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 6 a č. 7.

Tabulka 6. Ověření výtěžnosti krotonylidendimočoviny

Úroveň	Předloženo (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	n	t-výpočet	t-kritické
1	319 039	319 310	100,09	3	0,25416	4,303
2	320 421	323 307	100,90	3	2,19827	4,303
3	321 803	329 357	102,35	3	3,36332	4,303
4	323 185	337 862	104,54	3	4,14697	4,303

Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Tabulka 7. Ověření výtěžnosti isobutylidendimočoviny

Úroveň	Předloženo (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	Výtěžnost (%)	n	t-výpočet	t-kritické
1	192 234	193 738	100,78	3	1,7611	4,303
2	194 000	196 790	101,44	3	1,1960	4,303
3	194 775	202 882	104,16	3	3,8672	4,303
4	195 565	211 602	108,20	3	3,0095	4,303

Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

4 Souhrnné výsledky validace

Validační parametr	Validační hodnota	
	Krotonylidendimočovina	Isobutylidendimočovina
Opakovatelnost	0,58 % relat.	0,53 % relat.
Reprodukovatelnost (vnitrolaboratorní odhad)	1,16 % relat.	1,06 % relat.
Správnost	Správnost metody prokázána	
Linearita	Linearita metody prokázána	
Rozsah	(120 – 450 000) mg/kg	(40 – 450 000) mg/kg
Mez detekce	123,3 mg/kg	40,5 mg/kg
Mez stanovitelnosti	222,1 mg/kg	73,0 mg/kg
Selektivita	Selektivita metody prokázána	
Citlivost	0,028 (plocha/mg)	0,062 (plocha/mg)
Nejistota	2,5 % relat.	2,2 % relat.

5 Závěr

Byly stanoveny tyto validační parametry

a) opakovatelnost
b) správnost
c) selektivita
d) linearita
e) citlivost
f) mez stanovitelnosti
g) mez detekce
h) nejistota

Zjištěné validační parametry a zároveň výsledky mezinárodního kruhového testu prokázaly způsobilost ověřované metody k používání v rámci Národní referenční laboratoře a její zahrnutí do Standardních operačních postupů ÚKZÚZ.

6 Literatura

1 Eckschläger K.,Horsák I., Kodejš Z.: Vyhodnocování statistických výsledků a metod 38, SNTL Praha **1980**
2 Validace analytických metod, interní materiál, ÚKZÚZ, Brno **2000**-03-01
3 Centner V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0,EffiChem, **1999 – 2002**
4 Pracovní dokument připravený technickou komisí CEN/TC 260 (TC 260 WI 062
5 Jahns T., Ewen H., Kaltwasser H.: Journal Of Polymers And The Environment **2003**, 11(4), pp 155 – 159

Porovnání mineralizačních postupů na stanovení živin ve vzorcích kalů

Eva Čižmárová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
eva.cizmarova@ukzuz.cz

Jiří Zbíral
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL, Hroznová 2, 656 06 Brno
jiri.zbiral@ukzuz.cz

1 Cíl práce

Dosavadní způsob stanovení fosforu, draslíku, hořčíku a vápníku ve vzorcích kalů z ČOV po extrakci 20% kyselinou chlorovodíkovou je značně časově náročný a v současné době již bývá právě z důvodu své pracnosti často nahrazován jinými vhodnějšími extrakčními postupy. Rozdíl mezi oběma postupy je především v rozpustnosti a uvolnitelnosti jednotlivých prvků. Lučavka královská se řadí mezi postupy klasického rozkladu vzorků, zatímco 20% kyselina chlorovodíková vychází ve svém postupu ze stanovení spalitelných látek a následného loužení popela, jehož výsledkem je získání výluhu. Proto zde spíše hovoříme o vyluhovatelnosti živin ze vzorku. Kyselina chlorovodíková 20% byla zvolena právě z důvodu, že tato koncentrace HCl je z chemického pohledu azeotrop o maximálním bodu varu (vznikne přibližně ředěním 37% koncentrované HCl 1 : 1 (v/v)) a nelze připravit tuto kyselinu o jiné koncentraci s vyšším bodem varu. Rozbor půd 20% kyselinou chlorovodíkovou se v dřívější době často používal pro zjištění celkových zásob uvolnitelných prvků v půdním profilu. Tato metoda byla využívána zejména pro sledování krátkodobé vyluhovatelnosti makroprvků a jejich posunu v okamžité zásobenosti půd. Později byla metoda využívána v rámci chemického a fyzikálního rozboru vzorků kalů z ČOV. Lučavka královská extrahuje širokou škálu prvků a patří mezi univerzální a dnes také nejčastěji používaná extrakční resp. rozkladná činidla. Obecně je považován obsah prvků uvolnitelný horkou lučavkou královskou za uzanční celkový obsah, ale ve skutečnosti hovoříme o tvz. pseudototálním rozkladu vzorků. V žádném případě nelze hovořit o totálním rozkladu lučavkou královskou, poněvadž některé prvky (železo, fosfor, vápník apod.) vázané zejména na silikáty přítomné v půdách je možné stanovit pouze totálním rozkladem s kyselinou fluorovodíkovou. Můžeme předpokládat, že

v případě jemně mletých vzorků kalů však lučavka královská extrahuje prvky vázané na silikáty lépe než ze vzorků půd, poněvadž kaly neobsahují z geologického pohledu běžné silikátové formy, které jsou v půdách dosti typické.

Cílem práce bylo zjištění korelace mezi metodou extrakce vápníku, hořčíku, draslíku a fosforu 20% kyselinou chlorovodíkovou a lučavkou královskou. Důvodem přechodu na stanovení makroprvků v lučavce královské byla také skutečnost, že v tomto mineralizátu se již běžně stanovují obsahy rizikových prvků, které jsou z hlediska kontroly kalů ČOV určených k aplikaci na zemědělskou půdu velmi významné. Navrhovaný postup extrakce kalů by umožňoval měření všech sledovaných parametrů – hliníku, arsenu, berylia, kadmia, kobaltu, chromu, mědi, železa, manganu, molybdenu, niklu, olova, vanadu, zinku, fosforu, draslíku, hořčíku, vápníku a sodíku – v jednotném extraktu lučavkou královskou.

2 Materiál a metody

Pro ověření byly použity vzorky kalů sledované v rámci programu "Kontrola kalů ČOV s možností aplikace na zemědělskou půdu", vzorky byly odebrané a analyzované v laboratoři ÚKZÚZ NRL- RO Brno.

Vzorky kalů ČOV byly po odebrání hygienizovány. Do laboratoře ÚKZÚZ byly dodány v čerstvém stavu a před dalším laboratorním zpracováním zamraženy.

Před vlastní analýzou byly čerstvé vzorky kalů upravovány sušením v laboratorní sušárně do 60 ºC, mletím pomocí laboratorního mlýnku s achátovou miskou a konečnou homogenizací dle postupu ČSN 46 5735 Průmyslové komposty, kapitola 5.11.1 (1991). Všechny vzorky kalů byly navažovány v suchém stavu. Výsledky uváděné v této práci byly přepočteny na sušinu stanovenou při 105 ºC dle postupu ČSN 46 5735 Průmyslové komposty, kapitola 5.11.2 (1991).

Odebrané vzorky kalů byly mineralizovány a analyzovány dle Jednotných pracovních postupů ÚKZÚZ (1985, 2003).

V připravených mineralizátech vzorků kalů byl obsah jednotlivých prvků (draslík, vápník, hořčík a fosfor) po příslušném zředění stanoven metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP-OES. Měřilo se na simultánním optickém emisním spektrometru IRIS Intrepid Radial, který je vybaven koncentrickým zmlžovačem typu Meinhard, zvlhčovačem argonu, Scottovou mlžnou komorou a peristaltickou pumpou. Při vyhodnocování obsahu jednotlivých prvků metodou ICP-OES se postupovalo metodou

externí kalibrační přímky. Kalibrační závislosti pro uvedené parametry byly ve všech případech lineární.

2.1 Přístroje a zařízení

1 Mineralizační zařízení vícemístné se vzduchovými chladiči, MB 422 BH, UNI ELEKTRO, Hradec Králové, ČR

2 Dilutor Gilson 401, Gilson, Francie

3 Vícemístná vodní lázeň

4 Muflová pec, VEB ELEKTRO BAD Rankenhausen

5 Optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem, IRIS Intrepid Radial, Thermo Elemental, USA

6 Laboratorní mlýnek Pulverisette 2 s achátovou miskou, typ 201, Fritsch, SRN

7 Statistické zpracování výsledků bylo provedeno za pomoci programů Excel 2000 (Microsoft, Redmont, USA), STATISTICA verze 6.0, NCSS 2001, EffiValidation verze 3.0

2.2 Extrakce vzorků kalů

Vzorky kalů byly mineralizovány oběma dále uvedenými postupy vždy v paralelním stanovení. Každá série mineralizace se skládala z vhodného počtu vzorků dle typu použitého mineralizačního zařízení, z 1 vzorku interního referenčního materiálu a 1 až 2 slepých pokusů.

2.2.1 Extrakce lučavkou královskou

Reprezentativní vzorek kalu se rozkládá směsí koncentrované kyseliny chlorovodíkové a koncentrované kyseliny dusičné v poměru (3 : 1) za varu.

Upravené vzorky kalů byly mineralizovány dle Jednotných pracovních postupů ÚKZÚZ Analýza půd II (2003) dle kapitoly 3.2.1. Extrakce půd lučavkou královskou, v mírně modifikovaném postupu, viz poznámka č. 7 a č. 12 této kapitoly JPP (vycházelo se z navážky 2 g vzorku kalu).

Ve filtrátu byl pro lučavku královskou stanoven obsah fosforu, draslíku, vápníku a hořčíku metodou ICP-OES. Před měřením byly extrakty kalů ředěny 10 × roztokem 2M kyseliny dusičné.

Pracovní postup mineralizace vzorku lučavkou královskou

Do mineralizační trubice se naváží 2 g upraveného suchého vzorku kalu s přesností ± 0,001 g. Ke vzorku se přidá 7 ml kyseliny dusičné koncentrované a směs se nechá stát nejméně 12 hodin, nejlépe přes noc. Druhý den se přidá ke vzorku 20 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a po mírném promíchání se trubice umístí do mineralizačního bloku a nasadí se zpětné chladiče (vzduchové nebo vodní). Pozvolným zvyšováním teploty se směs přivede k bodu varu a mírný var se udržuje 2 hodiny tak, aby kondenzace probíhala v první třetině chladiče. Rychlost zvyšování teploty závisí na snaze vzorku pěnit. Po ochlazení se obsah trubice převede kvantitativním vypláchnutím přes nálevku do odměrné baňky o objemu 100 ml a po vytemperování se doplní demineralizovanou vodou po značku. Po důkladném promíchání se obsah odměrné baňky filtruje přes středně hustý kvantitativní filtr (např. Filtrak) do suchých uzavíratelných plastových nádobek.

2.2.2 Extrakce 20% kyselinou chlorovodíkovou

Reprezentativní vzorek kalu se mineralizuje varem s 20% kyselinou chlorovodíkovou. Ze získaného výluhu se po oxidaci organických látek odstraní kyselina křemičitá a objem výluhu se vhodně upraví.

Upravené vzorky kalů byly extrahovány dle převzaté metodiky ÚLPA Praha, později JPP ÚKZÚZ Brno. Extrakce se prováděla v mírně modifikovaném postupu, který vycházel ze spalování 5 g vzorku při 550 ºC na stanovení organických látek a následné extrakce popela 20% kyselinou chlorovodíkovou. Ve filtrátu byl pro 20% kyselinu chlorovodíkovou stanoven obsah fosforu, draslíku, vápníku a hořčíku metodou ICP-OES. Před měřením byly extrakty kalů ředěny 10 × demineralizovanou vodou.

Pracovní postup přípravy výluhu v 20% HCl

Do předem vyžíhaného a zváženého spalovacího porcelánového kelímku se naváží 5 g upraveného a vysušeného (sušina stanovena při 105 ºC do konstantní hmotnosti, vzorek přechováván v exsikátoru) vzorku kalu s přesností ± 0,0001 g. Postupným zvyšováním teploty se vzorek spálí v muflové peci. Volí se nárůst teploty 200 ºC 1 hodinu, 300 ºC 1 hodinu, 550 ºC 6 až 7 hodin. Po skončení žíhání a vychladnutí v exsikátoru se kelímek s vyžíhaným vzorkem opět zváží a z úbytku hmotnosti se stanoví ztráta žíháním a obsah organických látek. Popel vzorku se převede do porcelánové misky, přidá se 50 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové 1 : 1 (v/v) a miska se umístí na vodní lázeň do dobře táhnoucí digestoře. Po odpaření vzorku dosucha se přidá 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a vzorek

se znovu odpařuje dosucha. Poté se porcelánová miska umístí do sušárny a suší se asi 30 minut při (105 – 125) °C. Po vychladnutí se ke vzorku přidá 5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a horkou destilovanou vodou se vzorek převede do odměrné baňky o objemu 250 ml přes kvantitativní filtr střední hustoty (např. Filtrak). Vzorek na filtru se dále promývá horkou slabě okyselenou demineralizovanou vodou (zřeď. HCl) a pak také samotnou horkou demineralizovanou vodou. Po vytemperování se odměrná baňka doplní demineralizovanou vodou po značku.

2.3 Chemikálie a roztoky

Všechny používané chemikálie pro mineralizaci, ředění i měření vzorků byly čistoty p.a. (Lachema, ČR). Pro přípravu všech roztoků byla používána vysoce čistá demineralizovaná voda s kontrolovaným obsahem stanovovaných složek o měrném odporu (resistivitě) 18,2 MΩ.cm (Millipore, Bedford, USA). Kalibrační standardní roztoky pro měření byly připraveny postupným ředěním certifikovaných základních standardních roztoků o koncentraci 1 g/l (Analytika Praha, ČR). Koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků použitých při měření jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tabulka č.1.

Kalibrační standardní roztoky použité v metodě ICP-OES pro měření extraktů 20% kyselinou chlorovodíkovou, matrice roztoků 0,2M HCl.

Standard/ Prvek	Draslík (mg/l)	Fosfor (mg/l)	Hořčík (mg/l)	Vápník (mg/l)
STD 1	5	10	10	10
STD 2	10	20	20	20
STD 3	20	40	40	40
STD 4	50	100	100	100

Tabulka č. 2.

Kalibrační standardní roztoky použité v metodě ICP-OES pro měření extraktů lučavkou královskou, matrice roztoků 2M HNO_3.

Standard/ Prvek	Draslík (mg/l)	Fosfor (mg/l)	Hořčík (mg/l)	Vápník (mg/l)
STD 1	2,5	2	2,5	10
STD 2	5	5	5	20
STD 3	10	10	10	40
STD 4	25	50	25	100
STD 5	50	100	50	200

3 Souhrn, výsledky a diskuse

Výsledky pro obě zkoumané metody stanovení vápníku, hořčíku, fosforu a draslíku ve vzorcích kalů byly statisticky porovnány. Pro porovnání byly vybrány vzorky kalů ČOV s předpokládanou aplikací na zemědělskou půdu v rámci kontrolních odběrů ÚKZÚZ provedených v roce 2003.

Pro statistické zpracování výsledků byly použity programy STATISTICA verze 6.0 a NCSS 2001.

Popisná statistika: výsledky popisné statistiky celého souboru dat uvádí tabulka č. 4. Z porovnání aritmetických průměrů a hodnot kvartilů je zřejmé, že metody dávají výsledky prakticky shodné pro vápník a draslík. Pro hořčík jsou hodnoty stanovené v extraktu lučavkou královskou asi o 11 % vyšší a pro fosfor asi o 7 % vyšší.

Párový test: párový test byl vypočítán pro všechny analyzované vzorky (tabulka č. 5). Z výsledků párového testu vyplývá, že rozdíly mezi metodami pro vápník a draslík jsou statisticky nevýznamné a pro hořčík a fosfor statisticky významné. Párový test byl proveden i po vyloučení odlehlých a extrémních hodnot (tabulky č. 6 a č. 7). Výsledky testu byly stejné jako pro celý soubor dat.

Porovnání extrakčních postupů bylo provedeno metodou lineární regrese. Hodnota R^2 udává spolehlivost regrese (koeficient, který po vynásobení 100 udává procento vzorků, které splňují uvedenou regresní rovnici).

Lineární regrese: pro výpočet byla použita metoda nejmenších čtverců a výpočty byly provedeny pro rovnici $Y = a + bX$ a pro rovnici $Y = bX$, v obou případech pro celý soubor i pro soubor po vyloučení odlehlých a extrémních bodů, které by mohly významně ovlivnit výsledky regrese (tabulky č. 8 a č. 9). Z hodnot R^2 vyplývá, že mezi metodami je lineární vztah a vypočtené regresní rovnice jsou platné pro více než 95 % případů. Všechny výpočty byly provedeny pro interval spolehlivosti 95 %.

Pro rovnici s úsekem bylo zjištěno, že metody stanovení vápníku a draslíku dávají statisticky významné hodnoty pro úsek i směrnici. Oproti tomu pro hořčík a fosfor byly hodnoty úseku statisticky nevýznamné (úsek obsahoval nulu) a pro fosfor i interval hodnot pro směrnici obsahoval jedničku. Pro rovnici $Y = bX$ pak byly výsledky odlišné. Pro draslík a vápník nebyla směrnice statisticky odlišná od jedničky, ale pro hořčík z rovnice vyplývalo, že hodnoty v lučavce královské jsou asi o 11 % vyšší než ve 20 % HCl a pro fosfor asi o 7 % vyšší. Rozdíl v hodnocení výsledků lineární regrese s úsekem a bez úseku nebyl objasněn, ale z hlediska konečného porovnání metod není závažný.

Na obrázcích 1 až 16 jsou uvedeny průběhy jednotlivých regresních přímek s regresními rovnicemi pro každý parametr. Průběhy regresních přímek byly graficky vytvořeny v programu Excel 2000. Regresní přímky a rovnice jsou znázorněny jednak jako přímky procházející bodem 0 a také jako přímky s nenulovým úsekem na ose Y. Pro každý parametr jsou uvedeny regresní přímky pro celý soubor všech dat a pro soubor po vyloučení odlehlých hodnot.

V rámci vyhodnocení výsledků z paralelních stanovení obou způsobů mineralizací byla stanovena v programu EffiValidation verze 3.0 také relativní opakovatelnost stanovení všech parametrů u obou testovaných metod . Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 3.

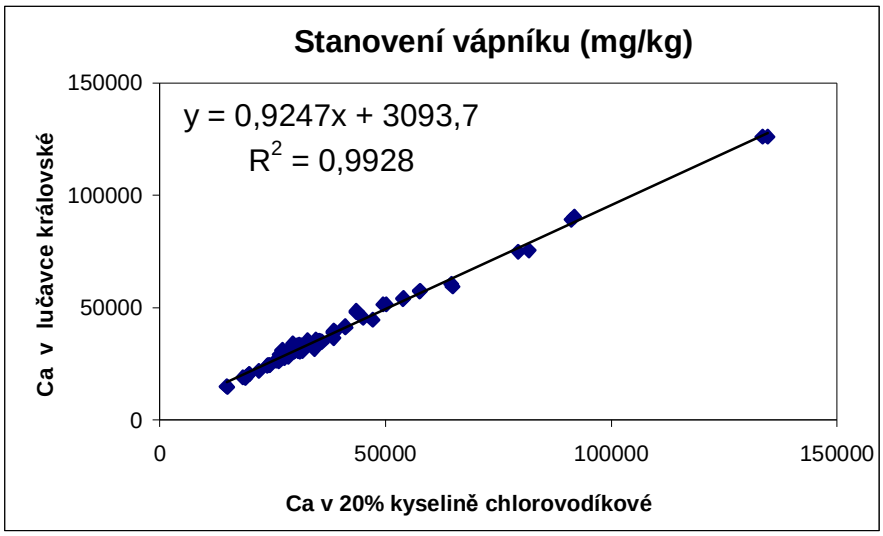
4 Závěr

Sledování obsahu parametrů fosfor, draslík, vápník a hořčík v rámci kontroly kalů z ČOV je možné provádět po extrakci vzorků v lučavce královské. Lučavka královská vykazuje poněkud vyšší extrakční účinnost než 20% kyselina chlorovodíková pro hořčík a fosfor, ale rozdíly nejsou z hlediska běžných chyb odběru vzorků a následného hodnocení významné. Poměrně pracnou metodu extrakce kalů 20% roztokem HCl lze tedy bez problémů nahradit extrakčním postupem s lučavkou královskou, který je standardizovaný, široce používaný a osvědčený. Tento krok přispěje k vyšší efektivitě laboratorní práce a k lepší porovnatelnosti výsledků stanovení s analýzami půd.

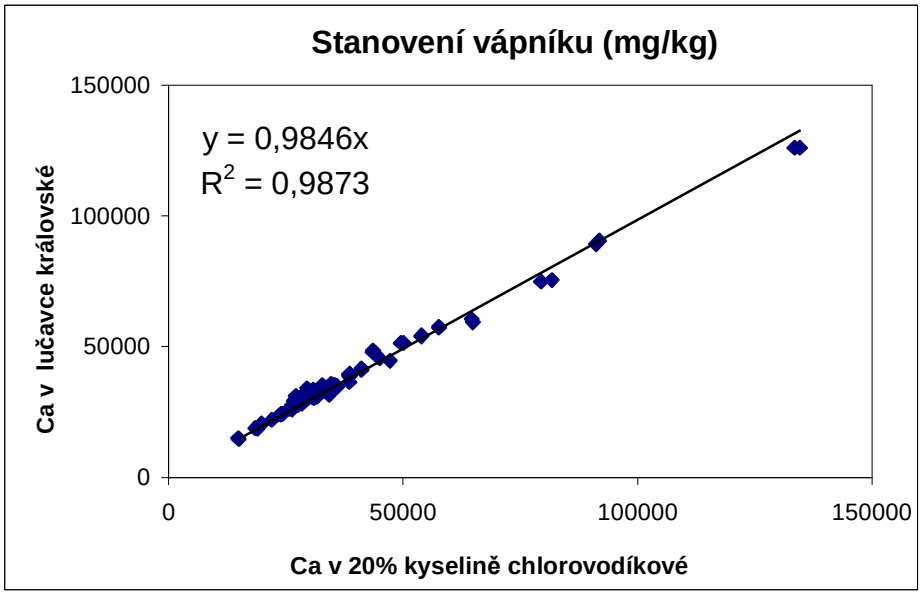
Zjištěný stupeň korelace mezi oběma metodami je možné využít ke zpětnému přepočtu obsahu vápníku, draslíku, hořčíku a fosforu, pokud by bylo nutné provést statistické porovnání výsledků.

5 Literatura

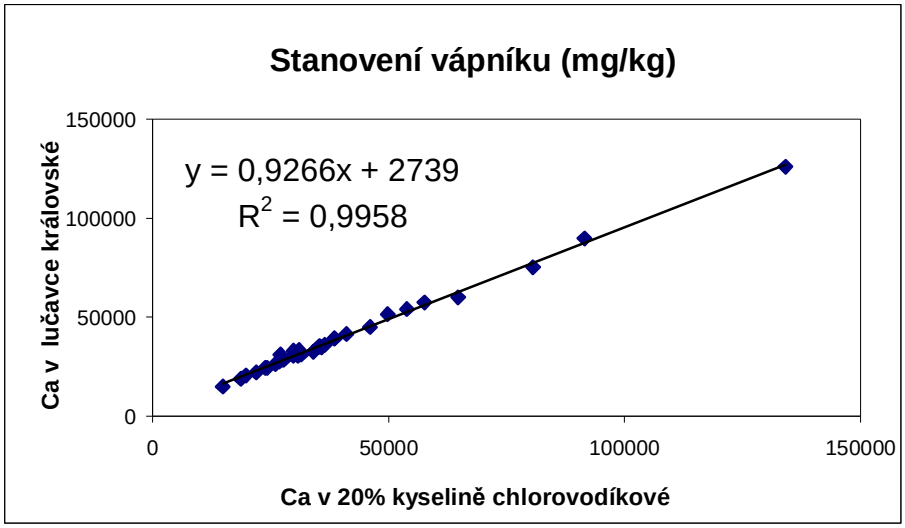
1 Zbíral J., **2003**, JPP ÚKZÚZ Analýza půd II, ÚKZÚZ Brno
2 Rozbory půd, ÚLPA Praha, **1957**
3 Uživatelská příručka EffiValidation, verze 3.0, **2003**
4 ČSN 46 5735 Průmyslové komposty, **1991**



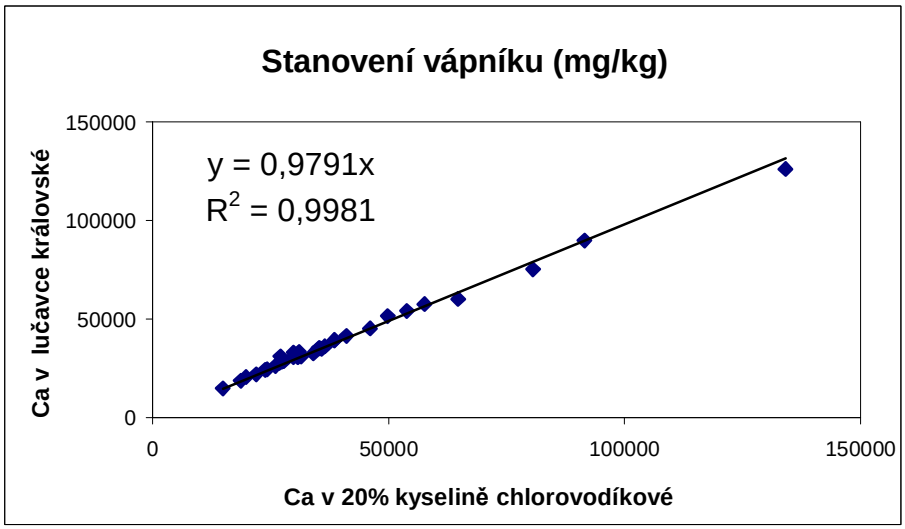
Obrázek č. 1. Lineární regrese stanovení vápníku, Y = a + bX, celý soubor dat.



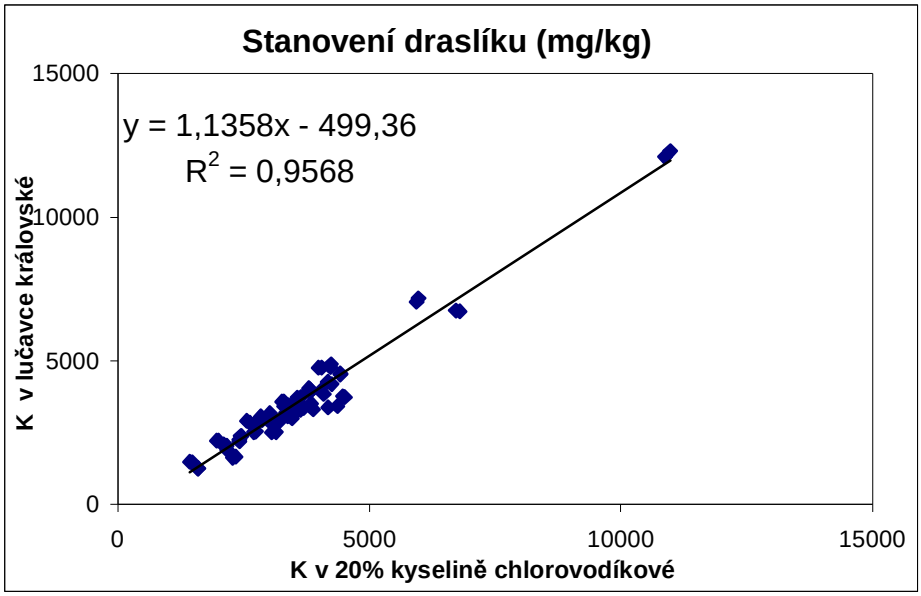
Obrázek č. 2. Lineární regrese stanovení vápníku, Y = bX, celý soubor dat.



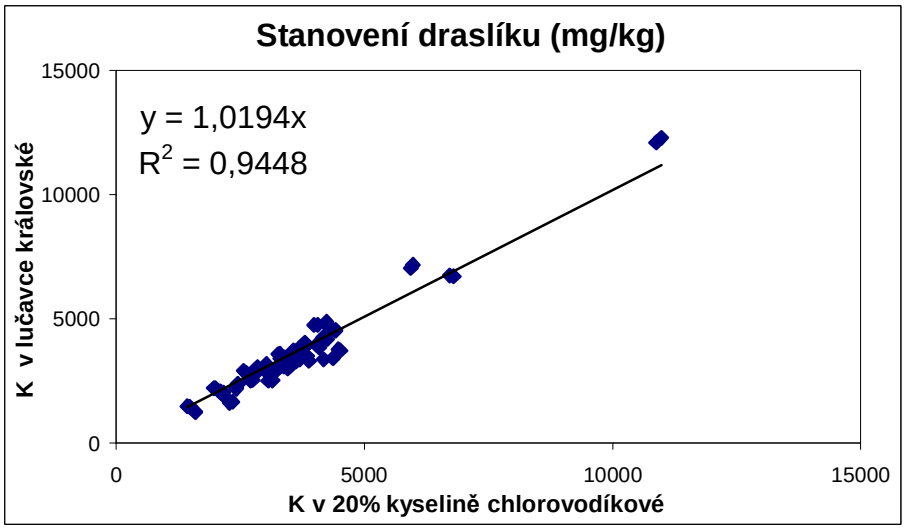
Obrázek č. 3. Lineární regrese stanovení vápníku, Y = a + bX, po vyloučení 2 odlehlých hodnot.



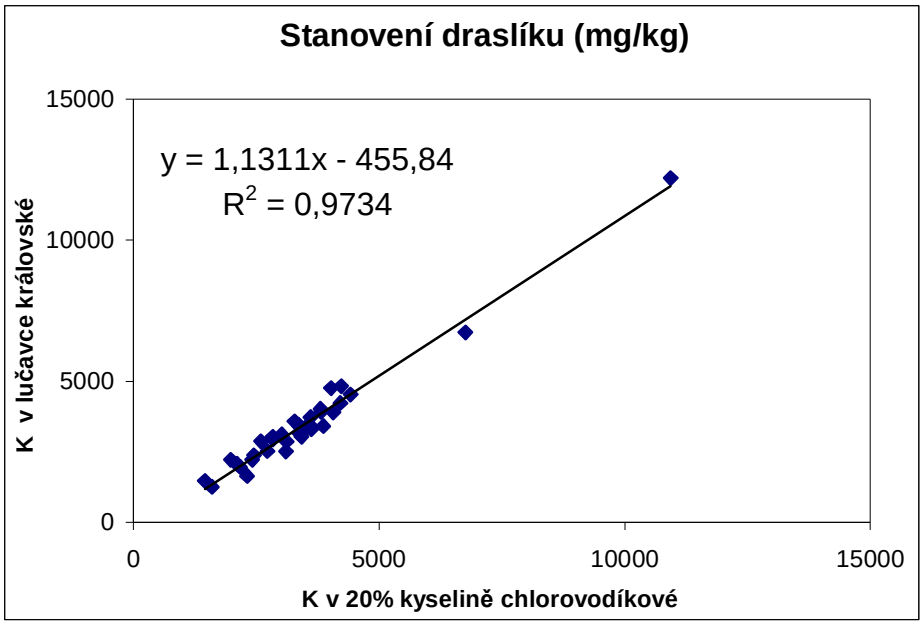
Obrázek č. 4. Lineární regrese stanovení vápníku, Y = bX, po vyloučení 2 odlehlých hodnot.



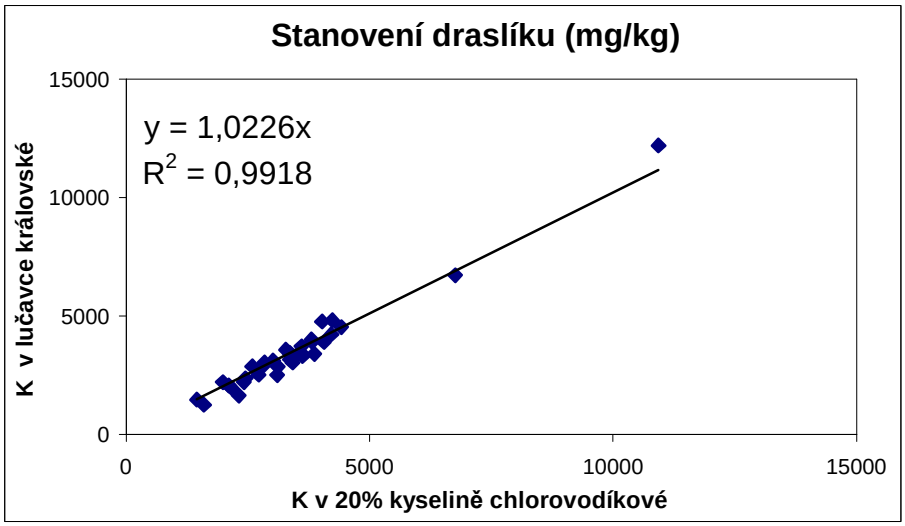
Obrázek č. 5. Lineární regrese stanovení draslíku, Y = a + bX, celý soubor dat.



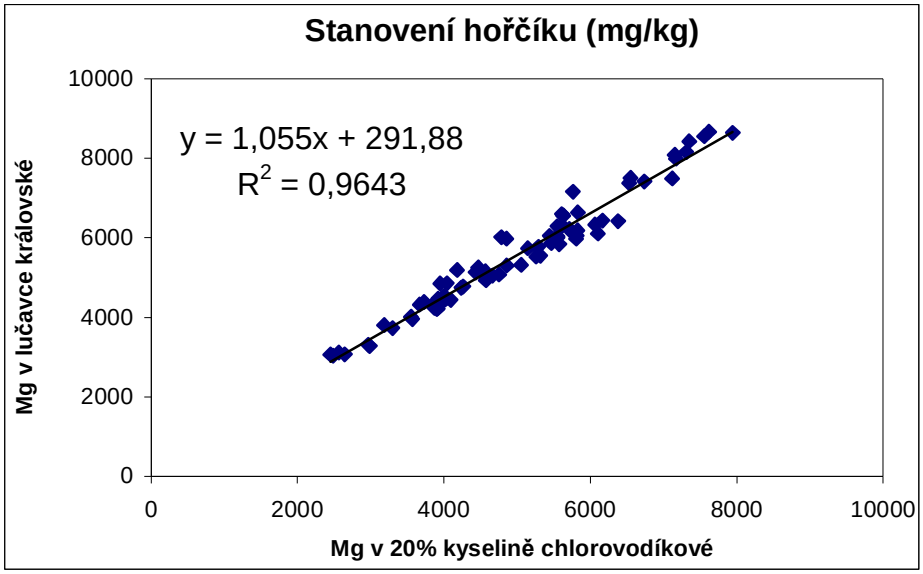
Obrázek č. 6. Lineární regrese stanovení draslíku, Y = bX, celý soubor dat.



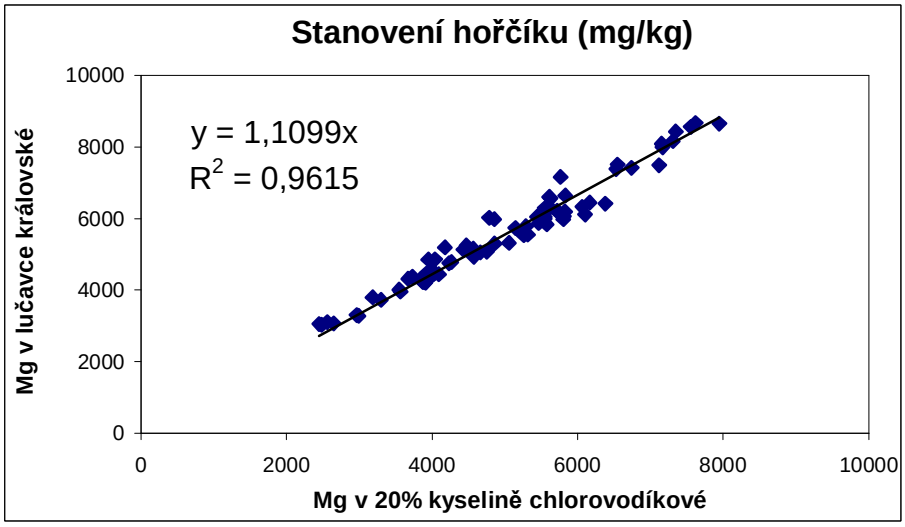
Obrázek č. 7. Lineární regrese stanovení draslíku, Y = a + bX, po vyloučení 3 odlehlých hodnot.



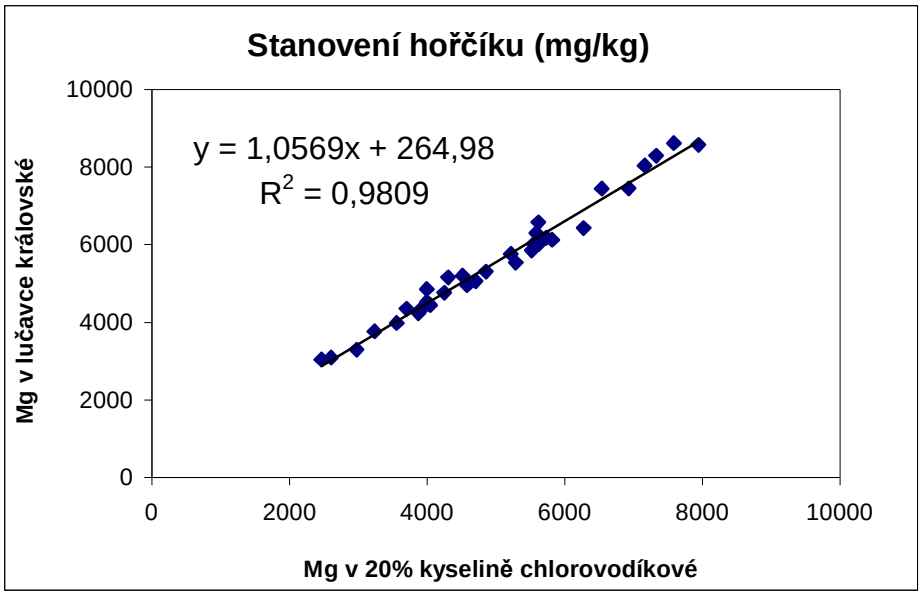
Obrázek č. 8. Lineární regrese stanovení draslíku, Y = bX, po vyloučení 3 odlehlých hodnot.



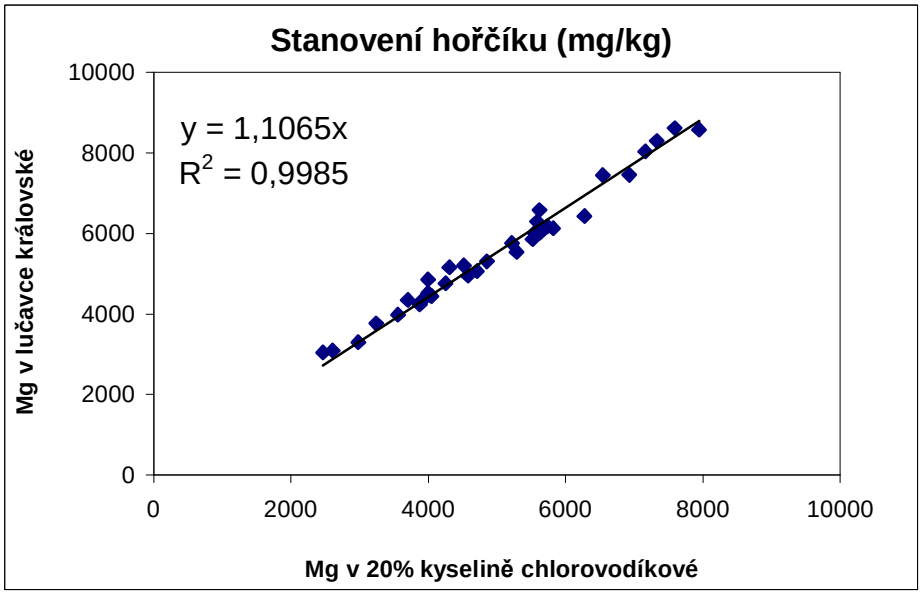
Obrázek č. 9. Lineární regrese stanovení hořčíku, Y= a + bX, celý soubor dat.



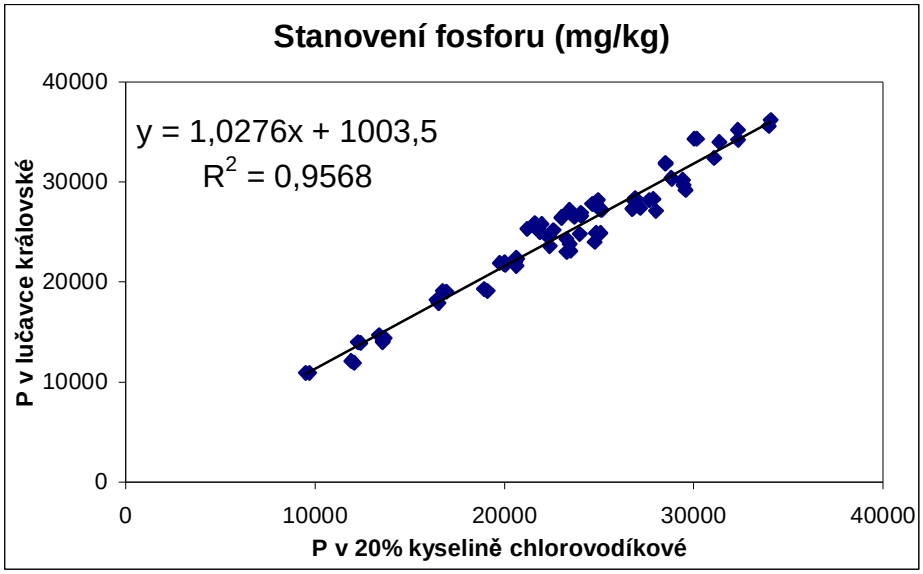
Obrázek č. 10. Lineární regrese stanovení hořčíku, Y = bX, celý soubor dat.



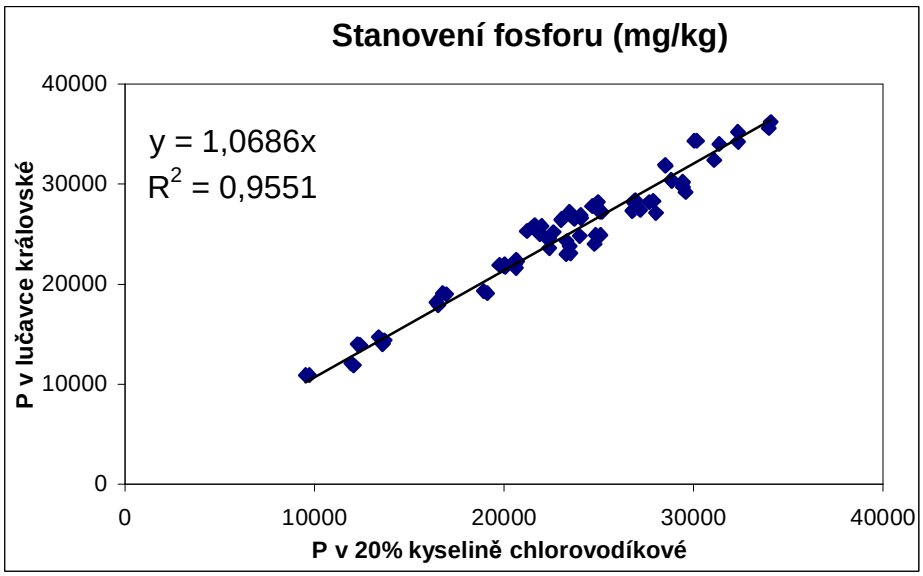
Obrázek č. 11. Lineární regrese stanovení hořčíku, Y = a + bX, po vyloučení 3 odlehlých hodnot.



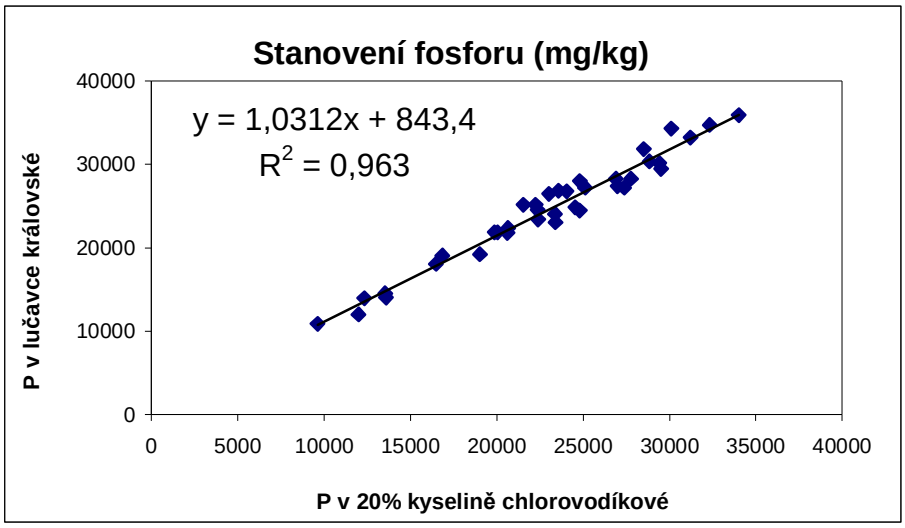
Obrázek č. 12. Lineární regrese stanovení hořčíku, Y = bX, po vyloučení 3 odlehlých hodnot.



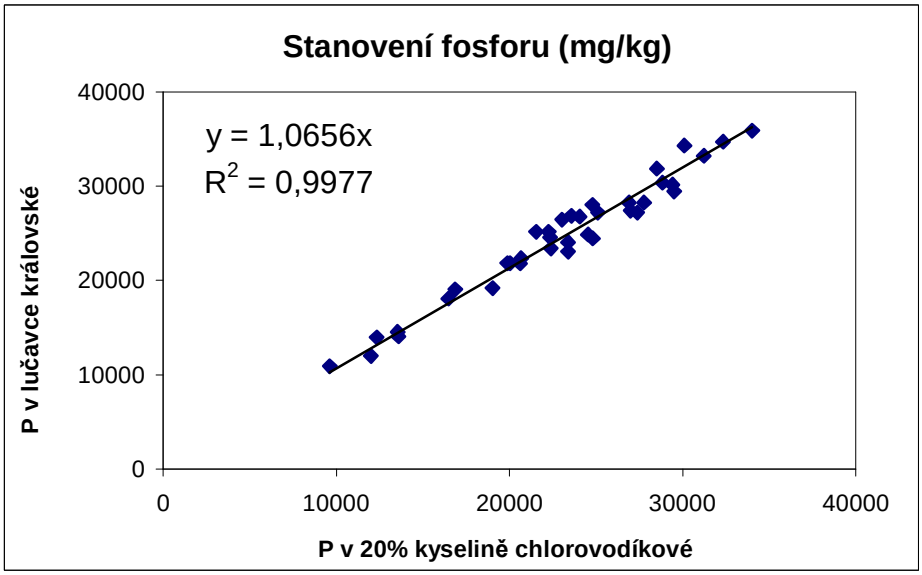
Obrázek č. 13. Lineární regrese stanovení fosforu, Y = a + bX, celý soubor dat.



Obrázek č. 14. Lineární regrese stanovení fosforu, Y = bX, celý soubor dat.



Obrázek č. 15. Lineární regrese stanovení fosforu, Y = a + bX, po vyloučení 1 odlehlé hodnoty.



Obrázek č. 16. Lineární regrese stanovení fosforu, Y = bX, po vyloučení 1 odlehlé hodnoty.

Tabulka č. 3.

Relativní opakovatelnost z paralelních měření

	Metoda	Relativní opakovatelnost (%)
Fosfor	20% HCl	1,08
	Lučavka královská	1,23
Draslík	20% HCl	1,52
	Lučavka královská	1,47
Vápník	20% HCl	1,79
	Lučavka královská	1,06
Hořčík	20% HCl	1,64
	Lučavka královská	1,60

Legenda:

Celkový počet stanovení n = 38

Hladina spolehlivosti 95,0 %

Tabulka č. 4

Popisná statistika celého souboru dat (v mg/kg)

Analyt	Počet vzorků	Aritmet. průměr	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	Směrodat. odchylka	Šikmost	Špičatost
Ca_HCL	38	38833,7	31169,9	14877,5	134076,3	27335,0	41095,0	22459,0	2,6594	8,5644
Ca_AR	38	38953,9	32725,0	14850,0	126000,0	28500,0	41400,0	20869,1	2,5407	7,9962
K_HCL	38	3581,6	3383,5	1453,8	10930,7	2724,1	4020,9	1615,1	2,7706	11,2776
K_AR	38	3568,6	3347,5	1255,0	12200,0	2530,0	3905,0	1875,5	2,9319	11,8980
Mg_HCL	38	4997,9	4837,3	2467,0	7945,0	3994,8	5797,5	1378,6	0,2709	-0,5009
Mg_AR	38	5565,0	5425,0	3045,0	8615,0	4445,0	6295,0	1474,5	0,3915	-0,3730
P_HCL	38	23012,2	23382,5	9612,5	34017,5	20030,0	27382,5	5895,4	-0,4226	-0,2078
P_AR	38	24640,8	25150,0	10900,0	35900,0	21850,0	28250,0	6194,5	-0,4478	-0,0767

Legenda:

HCL – 20% kyselina chlorovodíková

AR – lučavka královská

Tabulka č. 5
Párový test celého souboru bez vyloučení odlehlých a extrémních hodnot (mg/kg)

Pár metod 1 × 2	Aritmet. průměr 1	Aritmet. průměr 2	Počet vzorků	Rozdíl mezi průměry	Směrodatná odchylka rozdílu	t - statistika	Stupně volnosti	Vypočtená hladina významnosti	Významnost graficky
Ca_AR × Ca_HCL	38953,9	38833,7	38	-120,29342	2358,80213	-0,31437	37	0,755005	-
Mg_AR × Mg_HCL	4997,9	5565,0	38	-567,14474	263,52379	-13,26679	37	0,000000	++
K_AR × K_HCL	3568,6	3581,6	38	13,00658	444,19426	0,18050	37	0,857744	-
P_AR × P_HCL	24640,8	23012,2	38	-1628,61842	1270,54756	-7,90169	37	0,000000	++

Tabulka č. 6
Párový test celého souboru po vyloučení odlehlých hodnot (mg/kg)

Pár metod 1 × 2	Aritmet. průměr 1	Aritmet. průměr 2	Počet vzorků	Rozdíl mezi průměry	Směrodatná odchylka rozdílu	t - statistika	Stupně volnosti	Vypočtená hladina významnosti	Významnost graficky
Ca_AR × Ca_HCL	38841,7	38961,1	36	119,38889	2180,04087	0,32859	35	0,744426	-
Mg_AR ×Mg_HCL	5495,7	4949,2	35	-546,48571	224,03589	-14,43096	34	0,000000	++
K_AR × K_HCL	3466,9	3468,0	35	1,17143	369,68942	0,01875	34	0,985153	-
P_AR × P_HCL	24608,1	23045,5	37	-1562,64865	1220,98271	-7,78489	36	0,000000	++

Tabulka č. 7
Párový test celého souboru po vyloučení odlehlých a extrémních hodnot (v mg/kg)

Pár metod 1 × 2	Aritmet. průměr 1	Aritmet. průměr 2	Počet vzorků	Rozdíl mezi průměry	Směrodatná odchylka rozdílu	t - statistika	Stupně volnosti	Vypočtená hladina významnosti	Významnost graficky
Ca_AR × Ca_HCL	34777,9	34618,1	34	-159,82353	1723,46354	-0,54073	33	0,592327	-
K_AR × K_HCL	3103,2	3142,2	33	39,00000	305,45836	0,73345	32	0,468625	-

Legenda:
Hodnocení významnosti rozdílu graficky
++ rozdíl statisticky vysoce významný, p = 0,01
+ rozdíl statisticky významný, p = 0,05
- rozdíl statisticky nevýznamný
HCL- 20% kyselina chlorovodíková
AR- lučavka královská

Tabulka č. 8
Lineární regrese, Y = lučavka královská, X = 20% HCl, jednoduchý lineární model Y = a + bX

	n	a	a_{min}	a_{max}	b	b_{min}	b_{max}	R^2
Vápník	36	2739,0	1798,4	3679,7	0,9266	0,9058	0,9475	0,9958
Vápník	34	- 2712,5	- 42473	- 1177,6	1,0734	1,0318	1,1150	0,9979
Draslík	35	- 455,8	- 708,6	- 203,1	1,1311	1,0649	1,1973	0,9734
Draslík	33	622,3	287,6	957,1	0,8120	0,7083	0,9158	0,8915
Hořčík	35	264,9	- 3,4	533,4	1,0569	1,0047	1,1091	0,9809
Fosfor	37	843,4	-805,5	2492,3	1,0312	0,9619	1,1005	0,9630

Legenda:

n - počet vzorků po vyloučení odlehlých, případně odlehlých a extrémních hodnot

R^2 - koeficient determinace

Tabulka č. 9
Lineární regrese, Y = lučavka královská, X = 20% HCl, jednoduchý lineární model Y = bX

	n	b	b_{min}	b_{max}	R^2
Vápník	36	0,9791	0,9644	0,9938	0,9981
Vápník	34	1,0042	0,9879	1,0205	0,9886
Draslík	35	1,0226	0,9903	1,0549	0,9918
Draslík	33	0,9975	0,9637	1,0313	0,9912
Hořčík	35	1,1065	1,0917	1,1213	0,9985
Fosfor	37	1,0656	1,0484	1,0827	0,9977

Legenda:

n - počet vzorků po vyloučení odlehlých, případně odlehlých a extrémních hodnot

R^2 - koeficient determinace

Tabulka č. 10

Souhrnná tabulka porovnání výsledků obsahů prvků ve výluhu lučavkou královskou a 20% HCl ve vzorcích kalů ČOV (výsledky uvedeny v sušině)

		Vápník	Vápník	Draslík	Draslík	Hořčík	Hořčík	Fosfor	Fosfor
Č. vzorku Labsystém	Označení vzorku	20% HCl (mg/kg)	lučavka (mg/kg)	20% HCl (mg/kg)	lučavka (mg/kg)	20% HCl (mg/kg)	lučavka (mg/kg)	20% HCl (mg/kg)	lučavka (mg/kg)
96	6203A-1	133501	126000	1433	1480	2562	3110	23010	26400
96	6203A-1	134651	126000	1475	1470	2648	3070	23040	26500
97	6105A-1	29506	34100	3617	3330	4471	5250	23440	27200
97	6105A-1	29616	33200	3625	3290	4565	5160	23700	26500
98	6113A-1	27126	31200	4037	3960	7620	8670	21970	25800
98	6113A-1	27141	30800	4092	3850	7555	8560	21610	25900
99	6115A-1	29296	32800	3368	3160	4435	5130	21870	25000
99	6115A-1	30485	33200	3368	3200	4179	5190	21200	25300
100	6211A-1	43536	48600	2619	2840	5630	6560	24645	27800
100	6211A-1	43506	48000	2565	2910	5610	6600	24945	28200
105	8115A-1	30836	33500	2106	2060	2449	3060	12400	13900
105	8115A-1	31231	33200	2104	2090	2486	3030	12265	14000
106	8117A-1	26806	28100	3303	3420	5145	5740	24060	26600
106	8117A-1	28016	28800	3422	3420	5290	5780	24040	26900
107	8119A-1	53881	53900	1595	1260	2965	3310	30165	34300
107	8119A-1	53931	54300	1592	1250	2989	3280	30035	34300
109	5209C-1	28400	28100	6795	6720	3915	4220	16945	19000
109	5209C-1	27310	28900	6720	6750	3843	4310	16755	19100
110	5214A-1	64600	60600	2341	1660	4584	4980	9520	10900
110	5214A-1	64850	59400	2285	1630	4576	4930	9705	10900
111	5312A-1	41115	41100	3460	3000	3567	3960	22310	24500
111	5312A-1	41075	41700	3382	3080	3549	4010	22380	24600
112	5313A-1	81750	75500	3024	3180	3730	4380	28505	31900
112	5313A-1	79400	74900	3004	3060	3671	4320	28515	31800
113	6102A-1	24196	24400	3295	3590	5715	6220	20625	22400
113	6102A-1	24316	24300	3265	3580	5750	6140	20690	22300
115	5105A-1	27596	28800	2161	2040	3923	4470	31075	32400
115	5105A-1	27646	28500	2174	1890	3904	4210	31350	34000
120	4215A-1	19796	20500	1998	2220	4005	4540	19985	21800
120	4215A-1	19781	20500	1967	2220	3986	4510	19755	21900
122	5101A-1	38581	39700	4236	4880	7350	8430	32325	35200
122	5101A-1	38526	38700	4228	4780	7310	8160	32340	34200
123	4214A-1	91831	90500	5975	7180	5550	6040	23295	24300
123	4214A-1	91181	89200	5935	7050	5550	6000	23460	23800
124	4213A-1	38496	36400	2416	2250	4040	4860	16420	18200
124	4213A-1	34616	35800	2419	2190	3950	4850	16520	17900
129	2110A-5	50146	51400	3327	3460	5765	7160	28855	30300
129	2110A-5	49491	51400	3393	3460	5830	6640	28810	30400
130	2112A-4	38751	39300	2872	2940	4021	4450	27175	27400
130	2112A-4	38411	39300	2799	2950	4037	4480	26810	27400
131	2107A-3	18445	18900	3824	3930	3183	3800	13380	14700
131	2107A-3	18930	18600	3810	3910	3296	3730	13675	14400
132	2102A-2	57646	57600	4251	4190	4264	4780	13575	14000
132	2102A-2	57596	57300	4172	4270	4236	4750	13590	14100

		Vápník	Vápník	Draslík	Draslík	Hořčík	Hořčík	Fosfor	Fosfor
Č. vzorku Labsystém	**označení vzorku**	**20% HCl** (mg/kg)	**lučavka** (mg/kg)	**20% HCl** (mg/kg)	**lučavka** (mg/kg)	**20% HCl** (mg/kg)	**lučavka** (mg/kg)	**20% HCl** (mg/kg)	**lučavka** (mg/kg)
133	2101A-1	31266	31700	3818	4000	7170	7990	29405	30100
133	2101A-1	31346	31700	3796	4040	7155	8090	29425	30200
134	3105A-1	23801	24100	3568	3720	4855	5980	20050	21700
134	3105A-1	23951	24300	3639	3740	4785	6020	20010	22000
135	3108A-1	29941	30800	3199	2880	4095	4440	22600	25200
135	3108A-1	29681	30500	3030	2860	4000	4450	21900	25100
136	3109A-1	30569	31000	2831	3020	5815	6060	33965	35600
136	3109A-1	30889	31100	2844	3060	5825	6190	34070	36200
137	3111A-1	35259	35300	2460	2370	5315	5550	27655	28200
137	3111A-1	35259	35000	2446	2390	5260	5530	27870	28300
138	3112A-1	30659	30600	4054	4770	6550	7510	26905	28400
138	3112A-1	30979	30400	3988	4760	6530	7380	26875	28100
139	3202A-1	21954	21900	4420	4520	7945	8500	22390	23200
139	3202A-1	21954	22000	4420	4560	7945	8650	22390	23600
140	3205A-1	35444	35200	3523	3380	4860	5300	25070	27200
140	3205A-1	35315	35400	3504	3390	4850	5320	25145	27200
141	4105A-1	31474	31200	10983	12300	5620	6300	20585	22000
141	4105A-1	31594	30800	10878	12100	5550	6290	20630	21600
172	7107A-1	45010	45500	3536	3440	5445	6050	26755	27300
172	7107A-1	47165	44600	3698	3370	5805	5980	28010	27100
175	7109A-1	35880	34600	2746	2540	5575	5840	29570	29200
175	7109A-1	35840	35000	2702	2520	5465	5870	29450	29700
186	3202A-2	26260	27500	4181	3380	6740	7420	23980	24800
186	3202A-2	27565	27700	4363	3420	7120	7490	25085	24900
187	3202B-1	14790	15000	3344	3190	3869	4240	11920	12100
187	3202B-1	14965	14700	3455	3090	3877	4240	12060	11900
188	3205A-2	34225	31600	3884	3310	6105	6110	24770	24000
188	3205A-2	34015	33300	3846	3510	6065	6330	24835	24900
189	3210A-2	26345	26100	4475	3770	6165	6440	23280	23000
189	3210A-2	25745	26300	4513	3730	6380	6420	23495	23100
190	3215A-1	26600	29200	3062	2510	4662	5050	19110	19100
190	3215A-1	28070	29400	3147	2520	4754	5080	18925	19300

Stanovení NEL metodou plynové chromatografie

Pavla Tieffová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
pavla.tieffova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Pro stanovení nepolárních extrahovatelných látek (NEL) metodou plynové chromatografie jsou k dispozici normované postupy ČSN EN 14039 pro stanovení obsahu uhlovodíků C_{10} až C_{40} v odpadních kalech, ISO 16703 pro stanovení obsahu minerálních olejů v půdách a sedimentech a ČSN EN ISO 9377-2 pro stanovení obsahu NEL ve vodě. Princip stanovení je u těchto metod shodný. Pevné vzorky se extrahují do směsi acetonu a nepolárního rozpouštědla (heptan, petroléter, cyklohexan nebo hexan) a vodné vzorky jen do čistého nepolárního rozpouštědla. Extrakt se přečistí na sloupci Florisilu a alikvotní podíl vyčištěného extraktu se analyzuje plynovou chromatografií s plamenoionizační detekcí (GC/FID). Postup je vhodný pro kvantitativní stanovení uhlovodíků s bodem varu od 175 °C do 525 °C v koncentračních hladinách (0,1 – 10) g/kg sušiny vzorku, pro vody v koncentraci vyšší než 0,1 mg/l vzorku. Postupem se stanoví nepolární alifatické, alicyklické, polycyklické nebo alkylované aromatické uhlovodíky s dlouhými nebo rozvětvenými řetězci, jejichž retenční čas na nepolární kapilární koloně leží mezi chromatografickými píky dekanu ($C_{10}H_{22}$) a tetrakontanu ($C_{40}H_{82}$). Stanovení mohou rušit vysoké koncentrace polárních a povrchově aktivních látek, z nepolárních sloučenin ruší především halogenované uhlovodíky.

2 Úvod

Doposud se v laboratořích NRL-RO Brno stanovoval obsah minerálních olejů ve vzorcích půd, sedimentů a čistírenských kalů metodou infračervené spektrometrie po extrakci vzorku do freonu, jehož výroba a používání jsou s ohledem na životní prostředí nežádoucí. Výhledově proto bude IR metoda nahrazena metodou GC/FID.

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty vhodné pro daný účel. Dostatečnost kvality chemikálií se kontroluje analýzou slepého vzorku.

1 Rozpouštědla- aceton, heptan (resp. hexan nebo petroléter), destilovaná voda.
2 Florisil (0,15 – 0,25) mm; aktivace 16 hodin při 140 °C, uchovávat v exsikátoru.
3 Bezvodý síran sodný, Na_2SO_4; aktivace 6 hod při 550 °C.
4 Stearylstearan, $C_{36}H_{72}O_2$; zkušební roztok pro ověření účinnosti Florisilu, koncentrace 1 mg/ml heptanu.
5 Silanizovaná křemenná vata.

3.2 Standardy

1 Referenční sloučeniny
n-Dekan, $C_{10}H_{22}$; *n*-Eikosan, $C_{20}H_{42}$; *n*-Tetrakontan, $C_{40}H_{82}$

2 RTW standard pro určení okna retenčních časů
Dekan ($C_{10}H_{22}$) + tetrakontan ($C_{40}H_{82}$); roztok v heptanu o koncentraci 21 µg/ml + 30 µg/ml.
Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se naváží 30,0 mg tetrakontanu, úplně se rozpustí v přiměřeném objemu heptanu, přidá se 30 µl (tj. asi 21 mg) dekanu, dobře se promíchá, doplní heptanem po rysku a opět promíchá.

3 Kalibrační standard
Smíchají se stejné hmotnosti dvou různých druhů minerálních olejů. První druh oleje by měl poskytovat rozlišené píky, vhodná je motorová nafta bez aditiv. Druhý druh olej s vyšším rozsahem bodů varu než první druh může poskytovat nerozlišené signály na chromatogramu. Příkladem tohoto druhu je mazivo bez aditiv. Jako kalibrační standard je možné použít směs motorové nafty a destilační frakce ropy HC-22, (Koramo Kolín, ČR), nebo BAM 5004 (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Německo).
Příprava: Odváží se přesně směs kalibračního standardu a přidá se roztok RTW standardu (2) tak, aby výsledná koncentrace uhlovodíků byla (8 – 10) g/l. Dalším ředěním tohoto zásobního roztoku RTW roztokem (2) se připraví nejméně pět koncentračních úrovní, např. (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0) mg/ml.

4 Směs *n*-alkanů ke zkoušce funkčnosti systému
Připraví se směs stejných hmotností alkanů se sudým počtem uhlíků od C_{10} do C_{40} (C_{20} a nejméně tři další) rozpuštěných v heptanu tak, aby koncentrace jednotlivých *n*-alkanů byla přibližně 50 mg/ml. Tento roztok se použije k ověření vhodnosti chromatografické sestavy a k ověření odezvy detektoru a k získání informace o retenčních časech *n*-alkanů za účelem charakterizování uhlovodíků ve vzorku.

3.3 Přístroje a pomůcky

1 Plynový chromatograf s nediskriminujícím nástřikovým systémem a plamenoionizačním detektorem (GC/FID);
2 PC s vyhodnocovacím systémem pro zpracování chromatografických dat, schopným integrovat celkovou plochu chromatogramu a kompenzovat ji na změnu základní linie vlivem úniku stacionární fáze při vysoké teplotě;
3 Křemenná kapilární kolona s nepolární zakotvenou fází
stacionární fáze: 100 % dimethylpolysiloxan (DMPS) nebo 95 % DMPS/ 5 % difenyl PS;
tloušťka filmu: 0,25 µm až 1,0 µm;
délka: nejméně 5 m;
vnitřní průměr: 0,10 mm až 0,32 mm;
4 Laboratorní horizontální třepačka;
5 Magnetická míchačka;
6 Odstředivka;
7 Ultrazvuková lázeň;
8 Rotační vakuová odparka;
9 Mikroseparátor;
10 Skleněné kolonky pro sloupcovou chromatografii;
11 Dělicí nálevka se zábrusovou zátkou, 500 ml;
12 Skleněné vzorkovnice s teflonovým nebo skleněným uzávěrem, 250 ml a 1000 ml;
13 Skleněné extrakční nádoby s teflonovým nebo skleněným uzávěrem, 100 ml;
14 Skleněné zkumavky se zábrusovou zátkou, 25 ml;
15 Centrifugační zkumavky, 100 ml;
16 Běžné laboratorní sklo.

3.4 Pracovní postup

S každou řadou vzorků se provede slepé stanovení s použitím stejných objemů činidel a všech kroků přípravy vzorku.

3.4.1 Pevné vzorky půd, sedimentů a kalů

Extrakce

Do skleněné extrakční nádobky se odváží 20,0 g homogenizovaného vzorku, přidá se 40 ml acetonu a 20,0 ml roztoku RTW standardu (3.2.2), intenzivně se protřepe a vzorek se vloží na 1 hodinu do třepačky nebo ultrazvukové lázně. Supernatant se převede do dělicí nálevky a organická fáze se dvakrát protřepe se 100 ml vody. Organická vrstva se převede do skleněné zkumavky a přidá se dostatečné množství síranu sodného k vyčeření fáze. Odebere se alikvotní podíl 10 ml, který se dále čistí na kolonce naplněné florisilovým sorbentem.

Čištění na Florisilu

Na dno skleněné kolonky se umístí smotek silanizované křemenné vaty, nasype se vrstva 2 g aktivovaného Florisilu a převrství se 2 g bezvodého síranu sodného. Na čerstvě připravenou kolonku se nanese 10 ml extraktu vzorku a jímá se všechen eluát. Z něj se odebere podíl do vialky k analýze na plynovém chromatografu.

Poznámky

1 Je možné použít alternativní extrakční postupy, např. zrychlenou extrakci rozpouštědlem ASE.

2 Lze upravit velikost analytické navážky vzorku na 5 g až 30 g podle povahy vzorku. Menší navážka pro vzorky silně kontaminované nebo značně adsorbující přidané rozpouštědlo, větší vzorek umožní zvýšit citlivost stanovení.

3 Separaci vodné a organické fáze lze urychlit odstředěním vzorku.

4 Pro čištění na kolonce je důležité, aby Florisil byl aktivovaný a kolonka čerstvě naplněná. Pro dobré odstranění polycyklických aromatických uhlovodíků (PAHs) z extraktu je zvlášť důležité, aby nanesený extrakt vzorku neobsahoval aceton (méně než 0,1 objemového %), jinak dojde k vymývání PAHs z kolonky.

5 Účinnost florisilového sorbentu lze ověřit zkušebním roztokem stearylstearanu. Je vhodné ověřit každou šarži sorbentu. 2 g Florisilu musí zadržet minimálně 99 % z 10 mg stearylstearanu naneseného na kolonu v 10 ml heptanu. Nevyhovující sorbent musí být reaktivován.

3.4.2 Kapalné vzorky

Vzorky vody správně odebrané a uschované (6) se analyzují vychlazené (T < 10 °C), aby se zabránilo ztrátám extrakčního činidla těkáním. Upraví se pH vzorku přídavkem anorganické kyseliny na pH 2. Vzorkovnice se naplní vzorkem asi z 90 %, těsně se uzavře a zváží (m_1). Přidá se 50 ml RTW roztoku v heptanu, vloží se magnetické míchadlo, nádobka se uzavře a míchá se intenzivně 30 minut na magnetické míchačce. Místo zátky se nasadí zábrusový nástavec (mikroseparátor), přidá se dostatečné množství destilované vody, aby bylo možno odebrat organickou vrstvu extrakčního činidla. V případě tvorby emulze je nutné převést organickou vrstvu do centrifugační zkumavky a odstředit. Celý objem organické fáze se nanese na florisilovou kolonku, připravenou stejně jako pro pevné vzorky (3.4.1). Kolonka se nakonec promyje 10 ml extrakčního činidla a spojené eluáty se zakoncentrují na odparce na objem přibližně 6 ml a odpařování na objem 1 ml se dokončí proudem dusíku. Určí se přesný objem koncentrovaného extraktu a alikvotní podíl se přenese do vialky k chromatografické analýze.

Poznámky

6 Zakoncentrování extraktu je možné vynechat, očekávají-li se vysoké koncentrace NEL. Také v případě možnosti nástřiku velkých objemů vzorku (Large Volume PTV) není nutné pracovat s celým objemem organické fáze a lze vyčistit pouze alikvotní podíl, který se bez dalšího zkoncentrování zanalyzuje.

4 Chromatografické stanovení a vyhodnocení

4.1 Zkoušky vhodnosti chromatografického systému

Plynový chromatograf musí umožnit nástřik vzorku za takových podmínek, aby nedocházelo k diskriminaci sloučenin s vysokým bodem varu. Nutný je přístroj s možností regulace tlaku v nástřikovém prostoru a průtoku nosného plynu během analýzy. Výhodný je přímý nástřik vzorku na kolonu nebo PTV injektor. Kapilární kolona musí dělit píky standardu *n*-alkanů (3.2.4) na základní linii. Relativní odezva tetrakontanu vzhledem k eikosanu by měla být alespoň 0,8. Reprodukovatelnost nástřiku nesmí překročit 5 %.

4.2 Kalibrace

Kalibrace se provádí analýzou nejméně pěti koncentračních úrovní, získaných naředěním zásobního roztoku směsného standardu uhlovodíků (3.2.3). Lineární regresní analýzou se spočtou parametry kalibrační přímky a stanoví se mez detekce a mez stanovitelnosti. Platnost kalibrace se ověřuje s každou řadou vzorku proměřením jedné koncentrační hladiny ze středu kalibračního rozsahu a tento bod musí ležet v rozsahu ± 10 % referenční hodnoty. Není-li tato podmínka splněna, je třeba vytvořit novou kalibraci.

4.3 Integrace

Chromatogram se integruje mezi píky dekanu a tetrakontanu. Start integrace se zvolí hned za píkem dekanu na úrovni signálu před píkem rozpouštědla a ukončí se právě před začátkem píku tetrakontanu na téže úrovni rozpouštědla. Od plochy píku se odečte hodnota pozadí, způsobená změnou základní linie při nárůstu teploty, získaná měřením nástřiku čistého rozpouštědla (heptanu). Pík tetrakontanu se integruje samostatně pro kontrolu výtěžnosti. Správnost integrace se u všech vzorků kontroluje vizuálně a provede se případná korekce počátku a konce integrace.

4.4 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah uhlovodíků ve vzorku se udává v mg/kg sušiny vzorku, pro kapalné vzorky v mg/l.
Výsledky se zaokrouhlují na dvě platné číslice. Obsah NEL pro pevné vzorky se vypočte podle rovnice 1, pro kapalné podle rovnice 2:

$$w = p \times \frac{V_h}{m} \times \frac{100}{100 - w_w} \qquad (1)$$

$$u = p \times \frac{V_h}{m_1 - m_2} \times f \times r \qquad (2)$$

kde w je obsah NEL (minerálních olejů) v sušině vzorku, (mg/kg)

u obsah NEL (minerálních olejů) v kapalném vzorku, (mg/l)

p koncentrace uhlovodíků v extraktu vypočtená z kalibrační přímky, (mg/ml)

V_h objem heptanu použitý k extrakci, (ml)

m hmotnost vzorku použitého pro analýzu, (g)

m_1 hmotnost naplněné vzorkovnice, (g)

m_2 hmotnost prázdné vzorkovnice, (g)

w_w obsah vody v původním vzorku, (%)

ρ hustota kapalného vzorku, (g/l)

5 Závěr

Stanovení nepolárních extrahovatelných látek metodou plynové chromatografie vyžaduje poměrně náročnou přípravu vzorku se značnou spotřebou organických rozpouštědel. Pro koncové stanovení je třeba plynový chromatograf s nediskriminujícím nástřikem, který zajistí dobré odezvy a dostačující citlivost pro všechny stanovované uhlovodíky. Ke stanovení nelze využít starších přístrojů, které nejsou vybaveny elektronickou regulací tlaku v nástřikovém prostoru a regulací průtoku nosného plynu během analýzy. Pro tyto analýzy by bylo nutné zakoupit nový plynový chromatograf (GC/FID), vyčleněný pro toto stanovení. Vzhledem k malému počtu požadovaných stanovení NEL je vhodné vzorky analyzovat doposud používanou metodou infračervené spektrometrie, která je přesnější a jednodušší na přípravu vzorku a použité rozpouštědlo regenerovat.

6 Literatura

1 ČSN EN 14039 Charakterizace odpadů - Stanovení obsahu uhlovodíků C_{10} až C_{40} plynovou chromatografií, Český normalizační institut, květen **2005**.

2 ČSN EN ISO 9377-2 Jakost vod - Stanovení nepolárních extrahovatelných látek - Část 2: Metoda plynové chromatografie po extrakci rozpouštědlem, Český normalizační institut, říjen **2001.**

3 ČSN 75 7505 Jakost vod - Stanovení nepolárních extrahovatelných látek metodou infračervené spektrometrie (NEL_{IR}).

4 ISO/DIS 16703 Soil quality - Determination of mineral oil content by gas chromatography.

5 EN 14345 Characterisation of waste - Determination of hydrocarbon content by gravimetry.

6 ČSN EN ISO 5667-3:1996 Jakost vod - Odběr vzorků - Část 3: Pokyny pro konzervaci vzorků a manipulaci s nimi.

Využití přístroje GPC pro multireziduální analýzy

Pavla Tieffová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
pavla.tieffova@ukzuz.cz

Petra Kosubová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
petra.kosubova@ukzuz.cz

Pro zabezpečení kontroly reziduí pesticidů v krmných směsí a surovinách pro jejich výrobu byly odzkoušeny postupy přípravy vzorků k analýze a optimalizovány podmínky pro stanovení obsahu vybraných pesticidních látek. Byla zavedena metoda GC/MS stanovení počátečního souboru 20 pesticidů a ověřena výtěžnost postupu na vzorcích obilovin a luskovin, obohacených přídavkem směsného standardu pesticidů. Vzorky byly extrahovány do acetonu a zkoncentrovaný extrakt byl vyčištěn pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) a zanalyzován metodou plynové chromatografie s hmotnostně selektivní detekcí (GC/MS) v SIM režimu měření. Touto metodou byly změřeny vzorky obilovin a luštěnin z programu monitoringu nežádoucích a zakázaných látek v krmivech za rok 2004 a 2005.

Jednotný a závazný postup pro stanovení reziduí běžně používaných pesticidů v různých matricích dosud není k dispozici a pro sledování široké škály účinných látek pesticidních přípravků se používají různé metody. S rozvojem přístrojového vybavení laboratoří se mění postupy přípravy i koncového stanovení, v současné době k nejpoužívanějším patří kombinace plynové nebo kapalinové chromatografie s hmotnostně selektivní detekcí (GC/MS a HPLC/MS). Obě metody mají své přednosti i nevýhody. Hlavním omezením pro většinu laboratoří je ale pořizovací cena přístrojů. V laboratořích NRL-RO Brno jsou k dispozici oba typy chromatografů s hmotnostně selektivním detektorem. Většina látek stanovitelných metodou plynové chromatografie se stanovuje postupem GC/MS. Pro sloučeniny nerozpustné v nepolárních rozpouštědlech nebo pro termolabilní látky je třeba použít techniku LC/MS.
Důležitá je příprava vzorku k analýze. Žádná z dosavadních metod není zcela ideální a neumožňuje zahrnout stanovení všech používaných pesticidních látek do jednoho postupu. Požadované analyty je nutné vyextrahovat ze vzorku, odstranit z roztoku co nejvíce nežádoucích koextraktů a převést zájmové látky do chromatograficky vhodného rozpouštědla.
Prvním publikovaným multireziduálním postupem (MRM) byla Millsova metoda z roku 1963 (1). Po extrakci do acetonitrilu a přídavku vody následovalo přečištění vytřepáním do nepolárního rozpouštědla (petroléter). Postup byl vhodný pro organochlorové pesticidy. Polárnější látky, zejména organofosfáty, poskytovaly nízkou výtěžnost.

V 70. letech byly vyvinuty postupy, které byly schopny pokrýt větší rozsah polarity stanovovaných látek (organochlorové pesticidy, organofosfáty a dusíkaté heterocyklické sloučeniny). Na rozdíl od Millsovy metody tyto MRM používaly k extrakci aceton. Extrakt s přídavkem nasyceného roztoku chloridu sodného byl opět čištěn rozdělením kapalina-kapalina (LL) vytřepáním vysolené vodné fáze do nepolárního rozpouštědla. První MRM tohoto typu publikoval Becker (2). Podle Lukovy (3) a Spechtovy metody (4) se pro lepší výtěžnost polárních analytů přidával pevný NaCl. Beckerova metoda se stala německou oficiální metodou DFG-S8, Spechtova metoda je základem postupu DFG-S19 (5). Lukova metoda nahradila původní Millsův postup a stala se oficiálním FDA postupem PAM 302 E1 (6) a také AOAC metodou 985.22 (7).

Po roce 1980 snahy o zlepšení stavu životního prostředí vedly k omezení používání chlorovaných rozpouštědel a v postupech pro (LL) rozdělení byl dichlormetan nahrazen směsí nepolárních rozpouštědel, například Specht (8) a Anastassiades (9) použili směs cyklohexan-etylacetát v poměru 1 : 1.

V devadesátých letech se objevilo množství prací, které zahrnují alternativní přístupy k řešení extrakce a čištění vzorku s využitím moderních analytických postupů: nadkritická fluidní extrakce - SFE (12), zrychlená extrakce rozpouštědlem - PLE/ASE (13), mikrovlnný rozklad - MAE (14), přímá extrakce vzorku naneseného na sorbent - MSPD (15, 16) a mikroextrakce ze vzorku na povrch vlákna - SPME (17, 18, 19). Žádná z těchto technik však není univerzálně využitelná jako ideální MRM. Postupy SFE, MSPD a SPME nemají dostatečně široký rozsah použití při určitém nastavení podmínek, MAE a PLE zase nejsou dostatečně selektivní a extrakty je nutné následně dočistit pomocí adsorpční chromatografie (SPE kolonky) nebo metodou gelové permeační chromatografie (GPC).

Výsledkem dosavadních snah o vývoj jednoduché, rychlé, levné, robustní a bezpečné metody přípravy vzorků potravin a krmiv pro analýzu reziduí pesticidních přípravků je tzv. QuEChERS metoda, kterou v roce 2002 publikoval Anastassiades se svými spolupracovníky (10, 11). Metoda spočívá v extrakci vzorku do acetonitrilu v přítomnosti bezvodého $MgSO_4$, NaCl a pufru. Po odstředění je podíl z organické vrstvy vyčištěn dispersní SPE, přídavkem sorbentu PSA (primární/sekundární amin) a dalšího podílu bezvodého $MgSO_4$. Takto připravený extrakt lze přímo použít ke GC/MS analýze širokého spektra pesticidů, od slabých organických kyselin až po látky náchylné k rozkladu v basickém prostředí.

Náš postup vychází z německé metody DFG-S19 (5) a využívá poznatků uvedených ve studii H.J. Stana (20).

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly čistoty minimálně p.a. nebo v kvalitě pro reziduální analýzu. Dostatečná čistota sorbentů a rozpouštědel byla kontrolována analýzou slepého vzorku.

1 Rozpouštědla aceton, cyklohexan, chloroform, etylacetát (EA), toluen;
2 Síran sodný bezvodý, aktivace 6 hod. při 550 °C;
3 Hydrofilní křemelina Spe-ed Matrix, (Applied Separations);
4 Vnitřní standard (IS) Aldrin (Supelco), pracovní roztok 3 µg/ml acetonu;
5 Standardy stanovovaných analytů; zásobní roztok o koncentraci (1 – 2) mg/ml acetonu;
6 Směsné standardy: pracovní roztoky naředěné ze zásobních roztoků individuálních standardů, kalibrační řada (0,01 – 10) µg analytu/ml toluenu s 1 µg IS/ml toluenu.

3.2 Přístroje a pomůcky

1 Plynový chromatograf s MS detektorem
HRGC 8000/MD 800 (Fisons Instruments)
CP 3800/V 1200 (Varian);
2 Kapilární kolona s nepolární, chemicky vázanou fází
DB XLB, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, (J&W Scientific);
DB5 MS, 60 m × 0,25 mm × 0,25 µm, (J&W Scientific);
3 Sestava pro GPC
pumpa HP 1050 (Agilent);
nástřikový ventil (Rheodyne) 7725i s dávkovací přeplňovanou smyčkou (1 ml);
sběrač frakcí FC 203B (Gilson);
kovová separační kolona (500 × 8) mm; náplň BioBeads SX 3; (200 – 400) mesh.
4 Mobilní fáze pro GPC:
Chloroform; průtok 0,6 ml/min;
EA/cyklohexan 1:1, průtok 0,8 ml/min;
5 SPEC disky pro odstranění mechanických nečistot (Teflon), (0,25 – 0,45) µm;
6 Rotační vakuová odparka (RVO);
7 Muflová pec;
8 Ultrazvuková lázeň;
9 Laboratorní sklo.

3.3 Pracovní postup

Do 250 ml zábrusové baňky navážit 30 g vzorku, přidat 60 ml acetonu a 1 ml pracovního roztoku vnitřního standardu, uzavřít a 15 minut extrahovat v ultrazvukové lázni. Extrakt přefiltrovat přes kolonku naplněnou 10 g síranu sodného a 1 g křemeliny. 40 ml filtrátu převést do 50ml baňky (srdcovky) a odpařit téměř k suchu. Odparek rekonstituovat do 2 ml chloroformu, zfiltrovat přes SPEC disk a celý objem nastříknout do dávkovací smyčky GPC. Spustit analýzu a jímat podíl od 16. do 30. minuty, obsahující sledované pesticidy.

Chromatografické podmínky	**1. MD 800/DB XLB**	**2. V1200/DB5 MS**
Teplota injektoru	270 °C	270 °C
Teplota detektoru (source/interface)	200/275 °C	200/275 °C
Teplotní program pece	100/200/240/280 °C	100/220/300 °C
Nárůst teploty	30/3/10 °C/min	30/10 °C/min
Časové prodlevy	1/0/15/15 min	2/15/20 min
Průtok He	0,9 ml/min	1,4 ml/min
SSL nástřik	1 µl	1 µl

Podmínky pro hmotnostní spektrometrii

Ionizace nárazem (EI) při 70 eV, měření v režimu FS, resp. SIM pro vybrané hmotnostní fragmenty. Relativní retenční časy RRT, sledované ionty a dosažené detekční limity pro základní výběr 20 pesticidů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Chromatografické údaje pro základní soubor sledovaných pesticidů

Analyt	CAS číslo	RRT 1 (DB XLB)	RRT 2 (DB5 MS)	m/z (SIM metoda)	LOQ (mg/kg) (Varian 1200)
Aldrin (IS)	309-00-2	1,00	**1,00**	263, 186	**0,006**
Bitertanol A	55179-31-2	2,95	**2,01**	170, 112	**0,009**
Bitertanol B	55179-31-2	2,98	**2,02**	170, 112	**0,003**
Bromuconazol A	116255-48-2	2,13	**1,80**	173, 295, 115	**0,003**
Bromuconazol B	116255-48-2	2,37	**1,85**	173, 295, 115	**0,002**
Carbofuran	1563-66-2	0,69	**0,69**	164, 149	**0,005**
Carboxin	5234-68-4	1,42	**1,44**	143, 187	**0,003**
Difenoconazol A	119446-68-3	3,79	**2,34**	265, 323, 325	**0,005**
Difenoconazol B	119446-68-3	3,82	**2,35**	265, 323, 325	**0,002**
Epoxiconazol	106325-08-0	1,98	**1,76**	192, 138, 115	**0,010**
Fludioxonil	131341-86-1	1,34	**1,32**	248, 127	**0,003**
Fuberidazol	3878-19-1	0,92	**0,87**	184, 155	**0,003**
Imazalil	35554-44-0	1,36	**1,33**	215, 173	**0,003**
Prochloraz	67747-09-5	3,07	**1,15**	180, 308, 310	**0,003**
Procymidon	32809-16-8	1,18	**2,04**	96, 283	**0,003**
Propiconazol A	60207-90-1	1,73	**1,66**	173, 259, 191, 115	**0,003**
Propiconazol B	60207-90-1	1,76	**1,68**	173, 259, 191, 115	**0,003**
Tebuconazol	107534-96-3	1,88	**1,72**	125, 250, 138, 115	**0,003**
Thiabendazol	148-79-8	1,22	**1,16**	201, 174	**0,003**
Thiamethoxam	153719-23-4	1,13	**1,06**	212, 132, 182, 99	**0,003**
Triadimefon	43121-43-3	1,03	**0,99**	208, 85	**0,003**
Triadimenol A	89482-17-7	1,19	**1,15**	112, 168	**0,003**
Triadimenol B	82200-72-4	1,22	**1,18**	112, 168	**0,003**
Triazoxid	72459-58-6	2,22	**1,76**	247, 203, 115	**0,003**
Triticonazol	131983-72-7	2,47	**1,89**	235, 115	**0,003**
Vinclozolin	50471-44-8	0,86	**0,84**	212, 285	**0,003**

3.4 Výsledky a diskuse

3.4.1 Metody

Souhrny normovaných postupů a pokynů pro multireziduální metody stanovení reziduí pesticidů jsou uvedeny v ČSN pro potraviny s nízkým (21, 22, 23) a vysokým obsahem tuku (24). Normované postupy jsou i pro stanovení reziduí organofosforových pesticidů v krmivech (25) a pro stanovení N-methyl karbamátových pesticidů (26) a fungicidů skupiny benomylu (27, 28, 29) v potravinách s nízkým obsahem tuku. Žádnou z těchto metod však nelze přímo použít, vytváří jen rámec pro tvorbu vlastního postupu.

3.4.2 Výběr stanovovaných analytů

Původní výběr účinných látek fungicidních a insekticidních přípravků byl proveden na základě seznamu přípravků povolených v ČR k moření obilovin a luštěnin, uvedený v Bulletinu LO 2000 (30). Z tohoto výběru byly sledovány látky stanovitelné plynovou chromatografií ve vzorcích obilovin a luštěnin pro monitoring krmiv 2000 až 2005. Do výběru analytů pro multireziduální postupy bude třeba zařadit i další pesticidy, uváděné v doporučeních Komise EU pro koordinovaný program monitoringu Společenství (31, 32). Tento výběr vychází z četnosti pozitivních nálezů za předcházející roky monitoringu. Podle posledního doporučení se mají sledovat rezidua 70 převážně fungicidních a insekticidních látek v plodinách, typických pro stravovací návyky v evropských zemích. Přehled je uveden v tabulce 2.

Základní výběr analytů pro GC/MS multireziduální metodu bude potřeba rozšířit zejména o insekticidní organofosfáty a pyretroidy. K látkám, pro které je vhodnější stanovení pomocí kapalinové chromatografie, patří především skupina karbamátů, neonikotinoidy a kvarterní soli. Thiokarbamidanové sloučniny (skupina maneb) se zatím stanovují samostatnou metodou kvantifikace uvolněného sirouhlíku po rozkladu v kyselém prostředí.

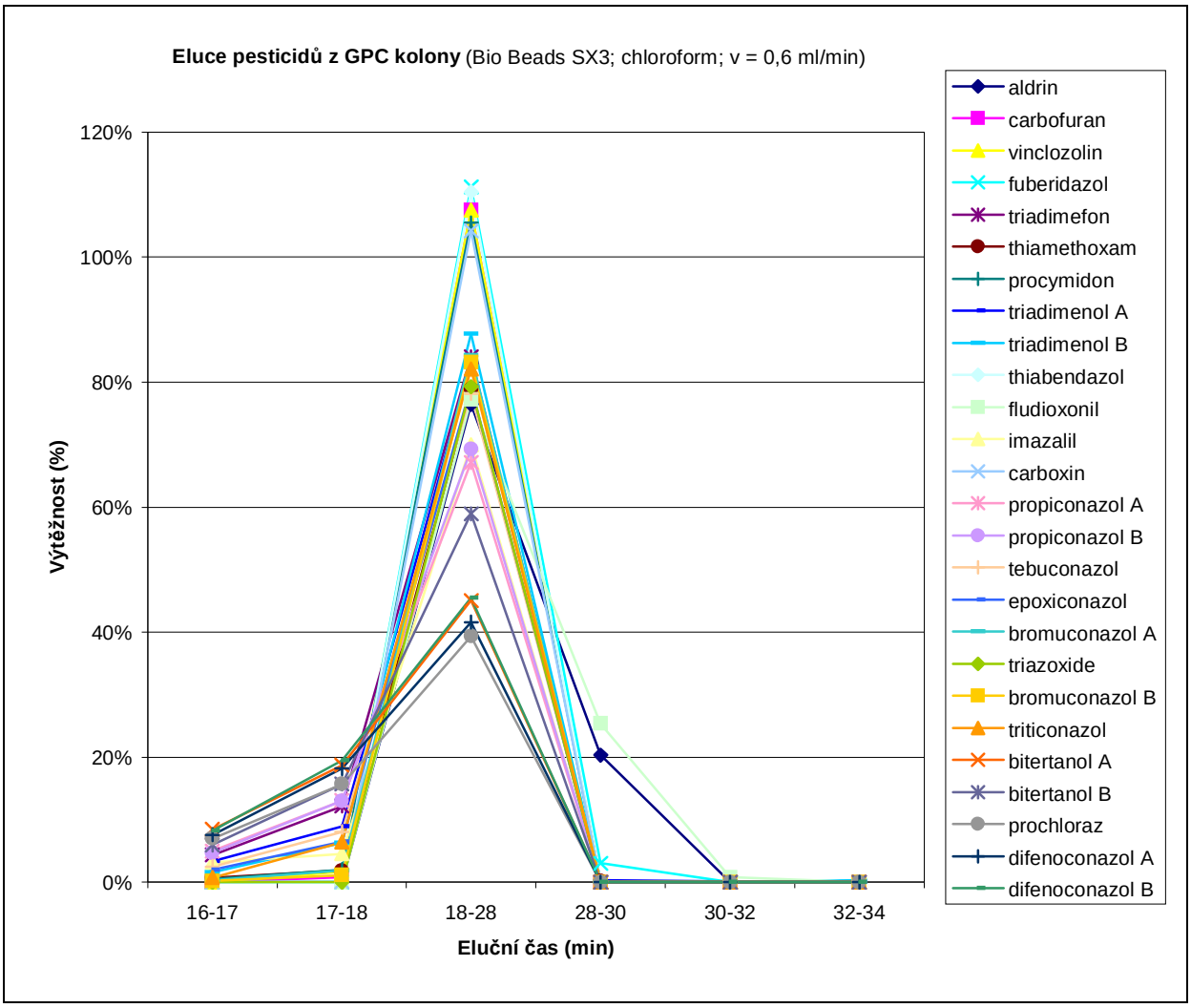
Tabulka 2: Seznam doporučených pesticidů pro monitoring EU na období 2006 – 2008

Zařazení pesticidu	Klasifikace sloučeniny	Účinná látka
Fungicid	anilinopyrimidin	cyprodinyl, mepanipyrim, pyrimethanil
	benzimidazol	benomyl-skupina, thiabendazol
	dikarboximid	iprodion, procymidon, vinclozolin
	ftalimid/sulfamid	captan, folpet/dichlofluanid, tolylfluanid
	triazol/imidazol	myclobutanil, penconazol, tebuconazol, triadimefon, triadimenol/imazalil, prochloraz
	thiokarbamidan	maneb-skupina
	jiné	azoxystrobin, bupirimát, chlorotalonil, difenylamin, fenhexamid, iprovalicarb, kresoxim-methyl, metalaxyl, quinoxifen, spiroxamin, tolcofos-methyl,
Insekticid/akaricid	karbamát	aldicarb, methiocarb, methomyl, pirimicarb,
	organofosfát	acefát, azinfos.methyl, diazinon, dichlorvos, domethoat/omethoat, fenitrothion, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, malathion, methamidofos, methidation, oxydemeton-methyl, parathion, phosalon, pirimifos-methyl, profenofos
	pyretroid	bifentrin, cypermetrin, deltametrin, lambda-cyhalotrin, pyretrin
	neonikotinoid	acetamiprid, imidacloprid
	jiné	bromopropylát, buprofezim, dicofol, endosulfan, hexythiazox, indoxacarb, propargit, pyriproxyfen, tebufenozid
Regulátor růstu	karbamát	chlorpropham, carbaryl
	kvarterní amin	chlormequat
Vzorkované plodiny	2006	baklažány, hrozny, hrášek (vyluštěná zrna čerstvá nebo mražená), květák, papriky, pšenice, okurky
	2007	jablka, jahody, citrusová šťáva, hlávkové zelí, pórek, rajčata, salát, žito/oves
	2008	banány, brambory, broskve/nektarinky, fazolky (čerstvé nebo mražené), hrušky, mrkev, pomeranče/mandarinky, rýže, špenát (čerstvý nebo mražený)

3.4.3 Optimalizace GPC podmínek

Optimalizace podmínek pro čištění extraktu vzorku před koncovou analýzou byla provedena pro dvě kolony naplněné sorbentem BioBeads SX 3 v různých mobilních fázích (tabulka 3). Na GPC kolonu byl nastříknut směsný standard pesticidů a byly jímány eluční frakce mezi 16. až 24. minutou, eluáty s přídavkem vnitřního standardu byly převedeny do isooktanu, proměřeny v SIM režimu měření a byl vyhodnocen obsah složek v daném retenčním intervalu. Účinnost odstranění nežádoucích koextraktů a eluční profil zájmových látek a jejich výtěžnosti v obou mobilních fázích byly srovnatelné. S ohledem na další využití GPC kolony v laboratoři byl zvolen chloroform jako vhodnější mobilní fáze. Průběh elučních křivek pro jednotlivé analyty je graficky znázorněn na obrázku 1.

Obrázek 1: Eluční profil pesticidů na koloně Bio Beads SX3 v chloroformu



Tabulka 3: Eluční profil pesticidů na koloně Bio Beads SX3

	Výtěžnost (%)											
	EA/cyklohexan (1 : 1); v = 0,8 ml/min						**Chloroform**; v = 0,6 ml/min					
Eluční čas (min)	17-18	18-19	19-29	29-30	3-32	**suma 16-32**	16-17	17-18	18-28	28-30	30-34	**suma 18-34**
Aldrin (IS)	-	-	-	-	-	-	-	-	76	20	-	**96**
Bitertanol A	-	-	82	-	-	**82**	8	19	45	-	-	**72**
Bitertanol B	-	-	81	-	-	**81**	6	16	59	-	-	**81**
Bromuconazol A	-	-	86	-	-	**86**	-	2	84	-	-	**86**
Bromuconazol B	-	-	85	-	-	**85**	-	1	83	-	-	**84**
Carbofuran	-	-	107	1	1	**110**	-	1	107	-	-	**108**
Carboxin	-	-	72	5	4	**80**	-	-	104	-	-	**104**
Difenoconazol A	-	-	69	-	-	**69**	8	18	42	-	-	**68**
Difenoconazol B	-	-	67	-	-	**67**	8	20	46	-	-	**72**
Epoxiconazol	-	-	87	-	-	**87**	2	6	79	-	-	**88**
Fludioxonil	3	12	81	-	-	**96**	-	-	77	25	-	**102**
Fuberidazol	-	-	95	3	1	**98**	-	-	111	3	-	**114**
Imazalil	-	-	103	-	-	**103**	3	5	70	-	-	**78**
Prochloraz	-	-	72	-	-	**72**	7	16	39	-	-	**63**
Procymidon	-	-	86	3	3	**92**	1	2	105	-	-	**108**
Propiconazol A	-	-	97	-	-	**97**	5	13	67	-	-	**85**
Propiconazol B	-	-	95	-	-	**95**	5	13	69	-	-	**87**
Tebuconazol	-	4	87	-	-	**91**	3	8	78	-	-	**89**
Thiabendazol	5	6	95	5	-	**105**	-	-	110	-	-	**110**
Thiamethoxam			86	3	3	**92**	1	2	79			**82**
Triadimefon	-	3	100	-	-	**103**	4	12	84	-	-	**100**
Triadimenol A	4	11	108	-	-	**124**	3	9	83			**95**
Triadimenol B	-	18	95	-	-	**113**	2	6	88			**96**
Triazoxide	-	-	86	-	-	**86**	-	-	79	-	-	**79**
Triticonazol	-	-	82	-	-	**82**	1	6	82	-	-	**89**
Vinclozolin	-	-	98	-	-	**98**	-	2	108	-	-	**110**

3.4.4 Identifikace a kvantifikace

Každý analyt ze směsného standardu pesticidů byl nejprve proměřen ve FS režimu měření, podle hmotnostního spektra a retenčního času byla provedena prvotní identifikace látky. Pro každou látku byly vybrány nejintenzivnější fragmenty alespoň ze dvou izotopických klastrů a z těchto fragmentů byly vybrány 2 až 3 hmoty pro vytvoření SIM metody stanovení

požadovaných pesticidů. Kvantifikace byla provedena z plochy diagnostického fragmentu, metodou tříbodové kalibrační přímky s použitím vnitřního standardu.

3.4.5 Výsledky monitoringu 2000 až 2005

V roce 2000 a 2001 bylo na stanovení reziduí pesticidů odebráno 70 vzorků obilovin a luskovin, v dalších letech byl jejich počet snížen na 10. Všechny vzorky odebrané v rámci monitoringu nežádoucích a zakázaných látek v krmivech byly negativní a neobsahovaly měřitelné obsahy sledovaných pesticidních přípravků.

Byla zavedena metoda stanovení počátečního souboru 20 pesticidů ve vzorcích obilovin a luskovin. Celá semena byla extrahována do acetonu a extrakt byl vyčištěn pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) a zanalyzovány metodou plynové chromatografie s hmotnostně selektivní detekcí (GC/MS) ve SIM a FS režimu měření. Touto metodou byly proměřeny vzorky obilovin pro potřeby monitoringu nežádoucích a zakázaných látek v krmivech v roce 2004 až 2005.

Pro stanovení reziduí pesticidních přípravků i v krmných směsích a dalších rostlinných matricích bude třeba zavést robustnější multireziduální metodu.

4 Literatura

1 Mills, P.A., Onley, J.H., Guither, R.A., (**1963**) J. Assoc. Off. Anal. Chem 46, 186 – 191

2 Becker, G. (1**971**) Dtsch. Lebensm. Rundsch. 67, 125 – 126

3 Luke, M., Froberg, J.E., Masumoto, H.T. (**1975**) J. Assoc. Off. Anal. Chem 58, 1020 – 1026

4 Specht, W.,Tilkes, M. (**1980**) Fresenius Z. Anal. Chem. 301, 300 – 307

5 DFG Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, VCH: Weinheim, **1991**, Německo, S8, DFG-S19

6 U.S.Food and Drug Administration (**1994**) Pesticide Analytical Manual, Vol. I, Multiresidue Methods, 3rd Ed., FDA, Washington, DC, USA

7 Official Methods of Analysis (**2000**) 17th Ed., AOAC International, Gaitsburg, MD, USA

8 Specht, W., Pelz, S., Gilsbach, W. (**1995**) Fresenius J. Anal. Chem. 353, 183 – 190

9 Anastassiades, M., Scherbaum, E. (**1997**) Dtsch. Lebensm. Rundsch. 93, 316 – 327

10 Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J., J. AOAC Int. 86, **2003**, 412 – 431

11 Lehotay, S.J., Maštovská, K.,Lightfield, a.R., J. AOAC Int. **2005**, 88, 615 – 629

12 Lehotay, S.J. (**1997**) Analyst 122, 429 – 435

13 Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N.,Pohl, C., (**1996**) Anal. Chem. 68, 1033 – 1039

14 Polypiw, H.M., et al. J. Agric. Food Chem. 45, **1997**, 3522 – 3528

15 Barker, S.A. J. Chromatogr. A, 885, **2000**, 15 – 127

16 Chu, X.G., Hu, X.Z., Yao, H.Y., J. of Chromatography A, 1063, **2005**, 201 – 210

17 Pawlishin, J. Solid Phase Microextraction Theory and Practice, Wiley-VCH: New York, NY, USA
18 Katuoka, H., Lord, H.L., Pawlishin, J. J. Chromatogr. A, 880, **2000**, 35 – 62
19 Mills, G.A., Walker, V. J. Chromatogr. A, 902, **2000**, 267 – 287
20 Stan, H.J., Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A, 892, **2000**, 347 – 377
21 ČSN EN 12393-1 Potraviny s nízkým obsahem tuku - Multireziduální metody pro stanovení reziduí pesticidů plynovou chromatografií, část 1: Všeobecně, Český normalizační institut, Praha, říjen **1999**
22 ČSN EN 12393-2 Potraviny s nízkým obsahem tuku - Multireziduální metody pro stanovení reziduí pesticidů plynovou chromatografií, část 2: Metody extrakce a přečištění, Český normalizační institut, Praha, říjen **1999**
23 ČSN EN 12393-3 Potraviny s nízkým obsahem tuku - Multireziduální metody pro stanovení reziduí pesticidů plynovou chromatografií, část 3: Postupy stanovení a konfirmační zkoušky, Český normalizační institut, Praha, říjen **1999**
24 ČSN EN 1528-3 Potraviny s vysokým obsahem tuku – Stanovení pesticidů a polychlorovaných bifenylů (PCB), část 3: Metody přečišťování, Český normalizační institut, Praha, únor **1998**
25 ČSN EN ISO 14182 Krmiva - Stanovení reziduí organofosforových pesticidů - Metoda plynové chromatografie, Český normalizační institut, Praha, listopad **2000**
26 ČSN EN 14185-1 Potraviny s nízkým obsahem tuku - Stanovení reziduí N-metyl karbamatu - Metoda HPLC s přečištěním extrakcí do tuhé fáze, Český normalizační institut, Praha, listopad **2003**
27 ČSN EN 14333-1 Potraviny s nízkým obsahem tuku - Stanovení benzimidazolových fungicidů: karbendazimu, thiabendazolu a benomylu (jako karbendazim) - Část 1: HPLC metoda s přečištěním extrakcí na pevnou fázi, Český normalizační institut, Praha, květen **2005**
28 ČSN EN 14333-2 Potraviny s nízkým obsahem tuku - Stanovení benzimidazolových fungicidů: karbendazimu, thiabendazolu a benomylu (jako karbendazim) - Část 2: HPLC metoda s přečištěním na gelové chromatografii, Český normalizační institut, Praha, květen **2005**
29 ČSN EN 14333-3 Potraviny s nízkým obsahem tuku - Stanovení benzimidazolových fungicidů: karbendazimu, thiabendazolu a benomylu (jako karbendazim) - Část 3: HPLC metoda s přečištěním na rozhraní kapalina/kapalina, Český normalizační institut, Praha, květen **2005**
30 Tieffová, P. Přípravky na ochranu rostlin a možnosti sledování jejich reziduí v krmivech. Bulletin Laboratorního Odboru, **2000**, IV(3), 47 – 56
31 Doporučení Komise 2004/74/ES týkající se koordinovaného monitorovacího programu Společenství pro rok 2004 s cílem zajistit dodržování MLR pesticidů v obilovinách a v některých dalších produktech rostlinného původu, 9.1. **2004**
32 Doporučení Komise 2006/26/ES týkající se koordinovaného monitorovacího programu Společenství pro rok 2006 s cílem zajistit dodržování MLR pesticidů v obilovinách a v některých dalších produktech rostlinného původu a vnitrostátních monitorovacích programů pro rok 2007, 18.1. **2006**

Zavedení metod pro stanovení aktivit ureázy a ß-glukosidázy jako parametrů aktivity půdních mikroorganismů

Stanislav Malý
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno
stanislav.maly@ukzuz.cz

1 Souhrn

Byly zavedeny metody ke stanovení β-glukosidázové a ureázové aktivity v orných půdách a půdách trvalých travních porostů (TTP). Způsob obhospodařování signifikantně ovlivňoval obě enzymatické aktivity. β-glukosidázová aktivita byla vyšší v půdách trvalých travních porostů, ureázová v půdách orných. β-glukosidáza vykazovala pozitivní korelaci s parametry charakterizujícími obsah půdní organické hmoty a její akumulaci v mikrobiální biomase, ureáza byla signifikantně ovlivněna hodnotami pH.

2 Úvod

Mikrobiální parametry představují účinný nástroj v systému hodnocení kvality půdy. Díky značné druhové pestrosti půdních mikrobiálních společenstev a velkému množství procesů, které půdní mikroorganizmy zajišťují, nelze stav mikrobiálního společenstva v půdě nikdy popsat vyčerpávajícím způsobem. Pokud se k tomuto cíli chceme alespoň vzdáleně přiblížit, musíme použít sadu metod zahrnující postupy pro popis biomasy, aktivity a diverzity půdních mikrobiálních společenstev.

V případě měření mikrobiologické aktivity se nejčastěji používají inkubační metody charakterizující určitý proces v půdě, který se sestává ze sledu metabolických reakcí (např. respirace, N mineralizace). Obvyklá doba inkubace se v těchto případech pohybuje ve dnech nebo týdnech. Enzymatické metody naproti tomu umožňují stanovení rychlosti jednotlivé reakce katalyzované daným enzymem při optimalizaci koncentrace substrátu, teploty a pH. Doba stanovení probíhá řádově v hodinách. Výhodou těchto metod je skutečnost, že lépe než v případě inkubačních metod známe povahu analyzované reakce a z praktického hlediska potom kratší doba analýzy. Nevýhodou je fakt, že podmínky, za kterých stanovení probíhá, jsou velmi vzdálené od podmínek v reálném půdním ekosystému. Interpretace dat z hlediska

hodnocení, zda změny aktivity nalezené v laboratoři se projeví ve fungování ekosystému, se jeví jako problematické. Hodnocení enzymatických dat dále komplikuje skutečnost, že některé enzymy mohou dlouhou dobu přetrvávat v půdě v aktivním stavu i po smrti a rozkladu buňky (extracelulární enzymy); naměřená aktivita v tomto případě neodráží aktuální aktivitu živé biomasy. Přes uvedené problémy byla publikována řada prací, kdy enzymatické aktivity byly úspěšně využity k detekci vlivu způsobu obhospodařování půdy nebo stresových podmínek na mikrobiální společenstvo.

Pro rutinní aplikace v rámci hodnocení kvality půdy (bazální monitoring, monitoring kontaminovaných ploch) a zjištění vlivu agrotechnických zásahů na půdní mikrobiální společenstvo (stacionární pokusy) byly vybrány dvě enzymatické metody: aktivita β-glukosidázy a ureázy. Aktivita prvního enzymu souvisí s koloběhem uhlíku, druhého s koloběhem dusíku. β-glukosidáza představuje klíčový enzym v procesu mikrobiálního rozkladu celulózy na glukózu. Literatura uvádí, že její aktivita koreluje s hodnotami celkové mikrobiální biomasy (Alef a Nannipieri, 1995b). Ureáza je enzym katalyzující rozklad urey na oxid uhličitý a vodu. Jedná se o enzym, který je velmi stabilní a ureázová aktivita je pouze vzácně ovlivněna tak razantními zásahy jako je např. sušení vzorku nebo skladování při teplotách v rozmezí – 60 ^{o}C až 22 ^{o}C. Ureázová aktivita nevykazuje korelaci s mikrobiální biomasou, její hodnoty jsou ovlivňovány dostupností dusíku (Alef a Nannipieri, 1995a).

Cílem práce bylo

(i) zavedení metod pro stanovení aktivity β-glukosidázy a ureázy,

(ii) stanovení opakovatelnosti pro uvedené metody a

(iii) nalezení vztahu mezi těmito enzymatickými aktivitami a půdními abiotickými a dalšími mikrobiálními parametry.

Pro první a třetí část byly použity půdní vzorky odebrané z 55 ploch půdního bazálního monitoringu ÚKZÚZ. Opakovatelnost byla stanovena ve vzorku orné půdy odebraném na stanici ÚKZÚZ v Lednici na Moravě.

3 Materiál a metody

3.1 Odběr, úprava a skladování půd

Pro účely práce byly použity vzorky odebrané v rámci monitoringu půdních mikrobiálních vlastností orných půd a půd trvalých travních porostů v říjnu 2004. Vzorky byly odebírány z vrstvy 0 cm až 15 cm. Po dopravení do laboratoře byly zhomogenizovány a poté uskladněny v ledničce při 4 ^{o}C. Analýza byla provedena během následujících třech měsíců. Vzorky pro

stanovení opakovatelnosti byly odebrány na stanici ÚKZÚZ v Lednici na Moravě 24.8. 2005 (β-glukosidáza) resp. 1.12.2004 (ureáza). Vzorky byly po homogenizaci a prosévání (2 mm) zamraženy při – 20 °C. Před analýzou byly rozmražovány minimálně týden při 4 °C.

3.2 Fyzikálně-chemické půdní vlastnosti

Stanovení půdních fyzikálních a chemických vlastností (obsah jílu, pH v 1 M KCl, celkový dusík N_{tot}, kationtová výměnná kapacita CEC) bylo provedeno na pracovištích NRL-OSAP Liberec a NRL-RO Brno. Stanovení organického uhlíku C_{org} a maximální vodní kapacity WHC bylo provedeno v laboratoři půdní mikrobiologie NRL-OMB. Jako extrahovatelný uhlík (C_{ext}) byly vzaty hodnoty organického uhlíku stanovené v extraktech nefumigovaných půd při stanovení mikrobiální biomasy. Analýzy byly provedeny dle Jednotných pracovních postupů (JPP) - Analýza půd I (2002) a Analýza půd III (2004).

3.3 Mikrobiologické parametry

Níže uvedené mikrobiologické analýzy byly provedeny v rámci monitoringu mikrobiologických parametrů půd ČR v laboratoři NRL-OMB Brno. Zkratky uvedené v závorce jsou použity v ordinačním diagramu. Analýzy byly provedeny dle Jednotných pracovních postupů (JPP) - Analýza půd III (2004).

1 Uhlík a dusík mikrobiální biomasy fumigačně-extrakční metodou (MBC, MBN).
2 Bazální respirace titračně (RES).
3 Měření růstových respiračních křivek s vyhodnocením lag fáze a maximální růstové rychlosti (LAG, MAX).
4 Anaerobní N mineralizace týdenním inkubačním pokusem (AMO).
5 Krátkodobá nitrifikační aktivita (SNA) stanovená jako rychlost produkce nitritů při optimalizaci koncentrace substrátu a pH 7,2. Druhý stupeň nitrifikace byl inhibován chlorečnanem, stanovovaly se pouze dusitanové ionty.

3.4 Aktivita b-glukosidázy

Stanovení byla provedena dle Alefa a Nannipieriho (1995b).

3.4.1 Princip

Metoda je založena na stanovení uvolněného p-nitrofenolu po inkubaci půdního vzorku s p-nitrofenyl-β-D- glukosidem 1h při 37 °C.

3.4.2 Přístroje a pomůcky

1 Termostat
2 pH metr
3 Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 400 nm.
4 Erlenmeyerovy baňky, 50ml
5 Filtrační papír vhodný k filtrování půdní suspenze, např. typ MN 40619G018WA, Macherey – Nagel.

3.4.3 Chemikálie

1 Tris (hydroxymetyl)aminometan, dále Tris
2 Kyselina maleinová
3 Kyselina boritá
4 Kyselina citronová, monohydrát
5 Hydroxid sodný
6 Kyselina chlorovodíková
7 Chlorid vápenatý, dihydrát
8 p-nitrofenol (PNF)
9 p-nitrofenyl-β-D-glukosid (PNG)
10 Toluen

3.4.4 Roztoky

1 Hydroxid sodný, c(NaOH) = 1 $mol.l^{-1}$; 10,0 g NaOH se rozpustí ve vodě a po převedení do 250 ml odměrné baňky se baňka doplní vodou po značku.

2 Hydroxid sodný, c(NaOH) = 0,5 $mol.l^{-1}$; 10,0 g NaOH se rozpustí ve vodě a po převedení do 500 ml odměrné baňky se baňka doplní vodou po značku.

3 Kyselina chlorovodíková, c(HCl) = 0,1 mol.l^{-1}; 8,77 ml HCl (35 %) se přidá do vody a roztok se doplní vodou na celkový objem 1000 ml.

4 MUB (modified universal buffer), zásobní roztok. V přibližně 250 ml 1M NaOH se rozpustí 6,05 g Tris, 5,8 g kyseliny maleinové, 7,66 g monohydrátu kyseliny citronové, 3,15 g kyseliny borité. Roztok se doplní vodou na celkový objem 500 ml.

5 MUB pufr, pracovní, pH 6,0; 100 ml zásobního MUB pufru se titruje za konstantního míchání kyselinou chlorovodíkovou (0,1 mol.l^{-1}) na pH 6,0. Poté se roztok se doplní vodou na celkový objem 500 ml.

6 Chlorid vápenatý, c($CaCl_2$) = 0,5 mol.l^{-1}; 40,76 g $CaCl_2.2H_2O$ se rozpustí ve vodě a roztok se doplní vodou na celkový objem 500 ml.

7 Tris pufr, c(Tris) = 0,1 mol.l^{-1}, pH 10; 6,1 g Tris se rozpustí ve 400 ml vody a roztok se doplní vodou na celkový objem 500 ml.

8 Tris pufr, c(Tris) = 0,1 mol.l^{-1}, pH 12; 6,1 g Tris se rozpustí ve 400 ml vody a pH se adjustuje roztokem NaOH (0,5 mol.l^{-1}) na hodnotu 12. Poté se roztok se doplní vodou na celkový objem 500 ml.

9 Standard p-nitrofenolu (1 g.l^{-1}); 0,2500 g p-nitrofenolu se rozpustí ve vodě a roztok se doplní na celkový objem 250 ml. Roztok se uchovává se při 4 ºC. Rozpouštění trvá asi 3 h.

10 p-nitrofenyl-β-D-glukosid, c(PNG) = 25 mmol.l^{-1}; rozpustí se 0,377 PNG ve 40 ml pracovního MUB pufru a roztok se doplní tímže pufrem na celkový objem 50 ml. Roztok se uchovává se při 4 ºC.

3.4.5 Pracovní postup

Do 50 ml Erlenmeyrových baněk se naváží 1 g čerstvé půdy ve čtyřech opakováních. Tři navážky slouží ke stanovení vlastní β-glukosidázové aktivity, jedna jako blank.

Vzorky

K naváženému půdnímu vzorku se přidá:

0,25 ml toluenu

4 ml MUB pufru, pH 6

1 ml roztoku PNG

Půdní suspenze se promíchá, baňka se uzavře zátkou a vzorek se inkubuje 1h při 37 °C. Po skončení inkubace se přidá 1 ml roztoku $CaCl_2$ a 4 ml Tris pufru (pH 12). Obsah se promíchá a zfiltruje.

Blank

Postup je stejný jako v případě vzorku s výjimkou přídavku substrátu. Roztok PNG (1 ml) se přidává až po skončení inkubace, těsně před přídavkem roztoku $CaCl_2$.

Kalibrační křivka

Pracovní roztok p-nitrofenolu se připraví zředěním 4 ml zásobního roztoku p-nitrofenolu (1 $g.l^{-1}$) vodou na celkový objem 100 ml (PNF, pracovní roztok). Kalibrační křivka se připraví v 50 ml Erlenmeyerových baňkách dle tabulky 1.

Tabulka č.1. Příprava standardů pro stanovení uvolněného p-nitrofenolu.

PNF, pracovní roztok [ml]	**Voda [ml]**	**Obsah PNF [µg]**
0	5,0	0
0,2	4,8	8
1,0	4,0	40
2,0	3,0	80
3,0	2,0	120
4,0	1,0	160
5,0	0,0	200

PNF – p-nitrofenol

Meření

Měří se absorbance standardů a vzorků při 400 nm. Pokud je hodnota absorbance vzorku mimo rozsah kalibrační křivky, vzorek se ředí Tris pufrem (pH 10,0). Z kalibrační křivky se odečte hodnota µg PNF. Zbarvení vzorků a standardů je stabilní 24 h.

3.4.6 Výpočet

$$GLU = 1{,}025 \times (PNF_V - PNF_B) \times \frac{w+100}{100}$$

PNF_V - hodnota vzorku odečtená z kalibrační křivky (g PNF)

PNF_B - hodnota blanku odečtená z kalibrační křivky (g PNF)

GLU - aktivita β - glukosidázy (uvolněný $PNF.g_{sus}.h^{-1}$)

w - obsah vody vyjádřený jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy

1,025 - korekce na objem toluenu přidaného do vzorků a blanků

3.5 Aktivita ureázy

Stanovení byla provedena dle Alefa a Nannipieriho (1995a).

3.5.1 Princip

Aktivita ureázy se stanovuje jako množství uvolněných amonných iontů během 2h inkubace půdního vzorku s ureou při 37 °C.

3.5.2 Přístroje a pomůcky

1 Termostat

2 pH metr

3 Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 400 nm.

4 Lahve o objemu přibližně 125 ml.

5 Centrifuga

3.5.3 Chemikálie

1 Urea (močovina); navážka 2,4 g urey se rozpustí v 400 ml vody a roztok se doplní vodou na celkový objem 500 ml. Roztok se připravuje denně čerstvý.

2 Chlorid draselný (2,5 mol.l^{-1}) – Ag_2SO_4 (100 mg.l^{-1}); naváží se 100 mg Ag_2SO_4, přidá se 700 ml H_2O, dále se přidá 186 g KCl a roztok se doplní do 1000 ml vodou.

3 Hydroxid sodný, c(NaOH) = 20%; 20 g NaOH se rozpustí ve vodě a roztok se doplní vodou na celkový objem 100 ml.

3.5.4 Roztoky

Borátový pufr, pH 10, navážka 28,43 g $Na_2B_4O_7.10\ H_2O$ se rozpustí v 750 ml vody, pH se upraví na hodnotu 10 přídavkem 20% NaOH a pufr se doplní vodou na celkový objem 1000 ml.

3.5.5 Pracovní postup

Naváží se 5 g čerstvé půdy v šesti opakováních do 125 ml lahví. Tři navážky slouží ke stanovení vlastní ureázové aktivity (vzorek), tři jako blank. Do lahví se vzorky se přidá 20 ml borátového pufru a 2,5 ml roztoku urey a suspenze se promíchá. Do lahví s blanky se přidá pouze 20 ml borátového pufru. Vzorky se inkubují 2 h při 37 ºC. Poté se jak do vzorků, tak blanků přidá 30 ml roztoku KCl-Ag_2SO_4 a suspenze se nechá třepat 30 minut. Do blanků se bezprostředně po přídavku roztoku KCl-Ag_2SO_4 přidá 2,5 ml roztoku urey. Suspenze se odstřeďuje 30 minut a v supernatantu se stanoví koncentrace amonných iontů dle Jednotných pracovních postupů (JPP) - Analýza půd III (2004). Kalibrační křivka v rozsahu (0 – 8) µg NH_4^+-N.ml^{-1} se připraví v roztoku získaného smícháním 250 ml roztoku KCl-Ag_2SO_4 a 165 ml borátového pufru. Případný zákal se odstředí (10 min, 4000 ot.min^{-1}). Stanovení amonných iontů je nutno provést tentýž den, vzorky nelze skladovat při 4 ºC. Při pipetování činidel je nutno dodržet stejné časové odstupy při přidávání vzorku do reakčního roztoku, při přidávání roztoku chlornanu a při měření absorbancí. Měří se 75 minut po napipetování roztoku chlornanu.

Výpočet

$$\text{URE} = \frac{C_V - C_B}{2}$$

URE - aktivita ureázy (µg NH_4^+ - N . g_{sus}^{-1} . h^{-1})

C_V - koncentrace NH_4^+ - N (µg . g_{sus}^{-1}) ve vzorku

C_B - koncentrace NH_4^+ - N (µg . g_{sus}^{-1}) v blanku

Při výpočtu koncentrace amonných iontů v roztoku se počítá s celkovým objemem extrakčního činidla 52,5 ml.

4 Statistické vyhodnocení

Naměřená data byla zpracována v programu OpenOffice.org 2.0 (Sun Microsystems, 2005) a statisticky vyhodnocena pomocí programů Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) a Canoco 4.5 (Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA).

5 Výsledky a diskuse

β-glukosidázová a ureázová aktivita byly měřeny dle metod uvedených v části Materiál a metody. V prvním případě nebylo nutno provést žádné úpravy vzhledem k postupu uvedeném v literatuře (Alef, 1995b). V případě metody pro stanovení ureázy byl zvýšen počet navážek sloužících jako blank z jedné na tři. Důvodem je skutečnost, že rozdíl mezi koncentracemi amonných iontů v extraktech vzorků a blanků je v půdách s nízkou aktivitou malý - (1 – 1,5) μg NH_4^+-N.ml^{-1}, což vyžaduje přesné stanovení obou hodnot. V opačném případě i malá odchylka od správné hodnoty vede k velkému rozdílu v celkové aktivitě. Kinetické měření absorbance při stanovení amonných iontů prokázalo, že vývoj zbarvení je ve srovnání se standardně používaným roztokem KCl (1 mol.l^{-1}) jako extraktantu pomalejší a zbarvení není stálé. Proto doporučujeme provést měření až po 75 minutách po přídavku chlornanu a dodržet stejné časové intervaly mezi přídavky jednotlivých činidel a mezi měřením jednotlivých vzorků.

Ke stanovení opakovatelnosti byly použity půdní vzorky vkládané do analyzovaných sérií jako interní referenční materiál. Získané výsledky shrnuje tabulka 2. Variační koeficienty 13,3 % a 6,68 % pro β-glukosidázu resp. ureázu odpovídají hodnotám pro jiné půdně-mikrobiální parametry. Nižší hodnota v případě ureázy potvrzuje značnou robustnost aktivity tohoto enzymu.

Tabulka č. 2. Stanovení opakovatelnosti aktivity b-glukosidázy a ureázy.

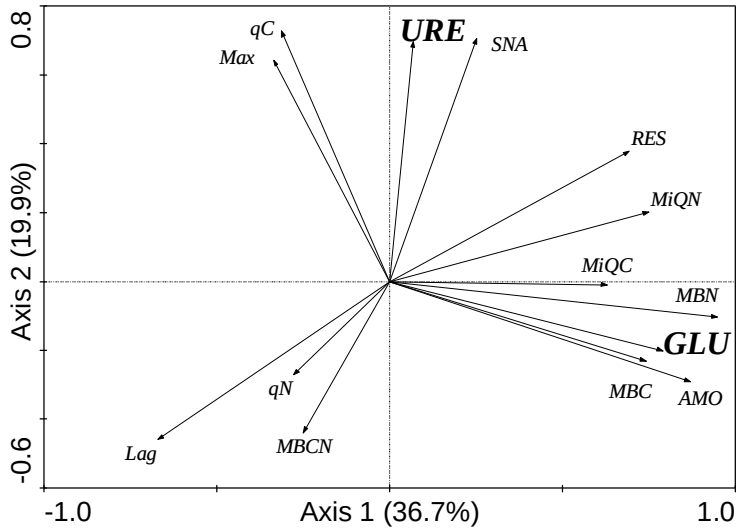
Parametr	**b-glukosidáza**	**Ureáza**
Počet měření	13	11
Průměr	186	53
Směrodatná odchylka	24,8	3,54
Variační koeficient (%)	13,3	6,68

Aktivita β–glukosidázy je uvedena v $\mu gPNF.g_{sus}.h^{-1}$, aktivita ureázy v $\mu gNH_4^+\text{-}N\ .g_{sus}^{-1}.\ h^{-1}$.

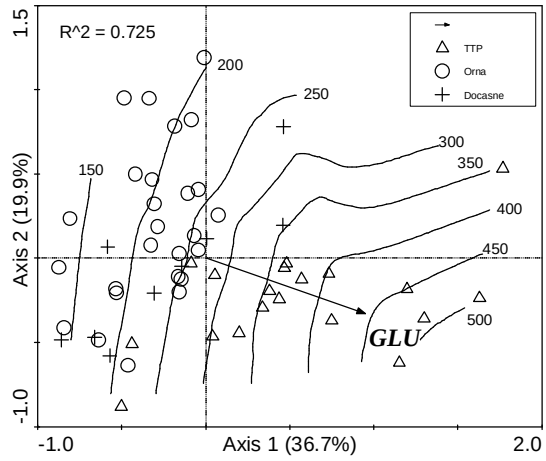
Vzhledem k plánovanému rutinnímu použití obou metod v rámci monitoringu mikrobiálních parametrů je nutné znát vztah těchto aktivit ke standardně používaným a ověřeným půdním mikrobiálním vlastnostem. Rovněž je nutné definovat abiotické půdní vlastnosti, které významným způsobem ovlivňují tyto enzymatické aktivity. Vztah enzymatických aktivit a vybraných mikrobiálních parametrů shrnuje obrázek 1. Z ordinačního diagramu analýzy hlavních komponent (PCA) vyplývá, že hodnoty β-glukosidázové aktivity vykazují vysokou korelaci s parametry, které charakterizují akumulaci C a N v mikrobiální biomase, zejména s hodnotami mikrobiálního C, N a anaerobní N mineralizací. Pro interpretaci výsledků z tohoto zjištění vyplývá, že uvedená metoda doplní standardně používanou fumigační metodu ke stanovení mikrobiální biomasy. Tento parametr představuje základní charakteristiku z hlediska hodnocení kvality půdy. Je známo, že různé parametry, popisující stejnou nebo podobnou vlastnost půdního mikrobiálního společenstva, nemusejí vždy stejným způsobem reagovat na změnu agrotechnických zásahů nebo stresových faktorů. Z tohoto pohledu se rozšíření sady metod o β-glukosidázovou aktivitu jeví jako vhodné. Ureázová aktivita vykazovala vysokou korelaci s hodnotami krátkodobé nitrifikační aktivity (SNA). Vzájemný vztah obou parametrů může souviset se skutečností, že finální substrát ureázou katalyzované reakce, amonné ionty, jsou substrátem pro nitrifikační bakterie. Významnou měrou se na uvedeném vztahu ale bez pochyby podílí fakt, že obě aktivity jsou silně závislé na hodnotách pH.

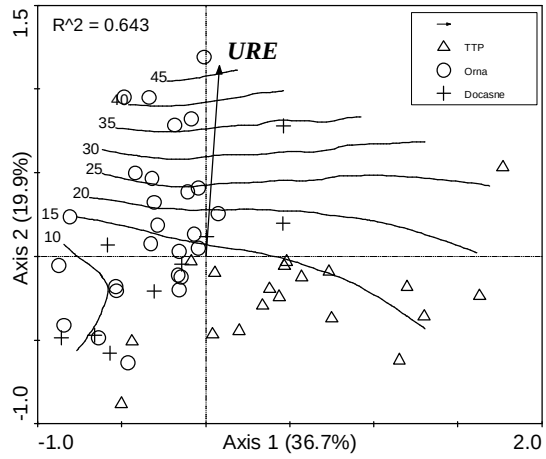
Z hlediska využitelnosti enzymatických aktivit jako indikátorů kvality půdy je důležité, jakým způsobem jejich hodnoty odrážejí rozdílné způsoby obhospodařování půdy. Ordinační PCA diagram s tzv. izočárami (contour plot) ukazuje, že aktivita β-glukosidázy je vyšší v půdách TTP než v půdách orných. Půdy, kde došlo během posledních deseti let ke změně způsobu obhospodařování se z tohoto hlediska chovají spíše jako půdy orné. To naznačuje, že akumulace organické hmoty je relativně pomalý proces ve srovnání s její mineralizací poté,

co jsou trvalé travní porosty přeměněny na ornou půdu. Uvedené rozdíly v β-glukosidázové aktivitě v závislosti na způsobu obhospodařování potvrzují výsledky t-testu uvedené v tabulce 3. Půdy, kde došlo ke změně obhospodařování, nebyly do statistické analýzy zahrnuty, neboť jejich počet je relativně nízký (9). V případě ureázové aktivity byly nalezeny signifikantně vyšší hodnoty v orných půdách (obr. 2, tabulka 3), vliv způsobu obhospodařování je ale méně výrazný než je tomu v případě β-glukosidázy. Uvedené rozdíly zřejmě souvisejí se skutečností, že orné půdy vykazovaly vyšší hodnoty pH než půdy travní.



Obrázek 1 Ordinační PCA diagram zobrazující vztahy b **- glukosidázy (GLU) a ureázy (URE) s dalšími půdními mikrobiálními vlastnostmi. Zkratky jednotlivých parametrů jsou uvedeny v části materiál a metody. MiQC – MBC/C_{org}, MiQN – MBN/N_{tot}, qC – RES/C_{bio}, qN – AMO/MBN.**





Obrázek 2 Ordinační PCA diagramy zobrazující vliv způsobu obhospodařování na aktivitu b **- glukosidázy a ureázy. Izočáry byly spočteny metodou lokálně vážené regrese. Čísla na jejich okraji udávají vypočtené hodnoty enzymatických aktivit. TTP – trvalé travní porosty, Docasne – plochy, kde v minulých deseti letech došlo ke změně způsobu obhospodařování.**

Tabulka č. 3. Výsledky t-testu ukazující vliv způsobu ohospodařování na enzymatické aktivity.

Obhospodařování	**N**	**Ureáza [μgNH_4^+-N .g_{sus}^{-1} . h^{-1}]**	**b-glukosidáza [μgPNF.g_{sus}.h^{-1}]**
TTP	19	13,2	357
Orná	26	21,4	209
p	-	0,021	< 0,001

TTP – trvalé travní porosty

Mnohonásobná regrese byla použita pro nalezení abiotických půdních vlastností, které signifikantním způsobem ovlivňují enzymatické aktivity. Jako vysvětlující proměnné byly vzaty parametry C_{org}, C_{ext}, pH, WHC, obsah jílu (částice < 0,001 mm) a CEC. Pro výběr statisticky významných proměnných byla zvolena metoda postupného výběru (forward selection). Výsledky analýzy shrnují tabulky 4 a 5.

Tabulka č. 4. Výsledky mnohonásobné regrese popisující závislost b-glukosidázové aktivity na abiotických půdních vlastnostech.

Parametr	b	**B**	**p**	**R^2 podmíněný**	**R^2 marginální**
C_{org}	0,799	8,57	< 0,001	0,587	0,587
pH	0,183	20,6	0,044	0,032	0,002

Podmíněný R^2 - koeficient determinace spočtený na reziduálních hodnotách po předchozím provedení regrese za použití parametrů s větší vysvětlovací schopností.

Marginální R^2 - koeficient determinace spočtený pro danou vysvětlující proměnou bez ohledu na ostatní proměnné.

β - regresní koeficient vypočtený ze standardizovaných hodnot spočtených odečtením průměru a dělením směrodatnou odchylkou.

B - regresní koeficient.

Tabulka č. 5. Výsledky mnohonásobné regrese popisující závislost ureázové aktivity na abiotických půdních vlastnostech.

Parametr	b	B	p	R^2 podmíněný	R^2 marginální
pH	0,588	7,494	< 0,001	0,428	0,428
jíl	0,496	0,805	< 0,0011	0,128	0,336
Cext	0,280	0,151	0,013	0,053	0,050

Zkratky viz. tabulka 3.

Obsah organického uhlíku vysvětluje 58,7 % variability β-glukosidázové aktivity. Příspěvek pH byl mnohem nižší, což je patrné jednak z porovnání hodnot regresních koeficientů spočtených ze standardizovaných dat β, jednak z porovnání hodnot R^2. Zjištěné závěry jsou v souladu s nalezeným pozitivním vztahem této aktivity a parametrů charakterizujících celkovou mikrobiální biomasu. Aktivita ureázy byla rozhodující měrou ovlivněna hodnotami pH a obsahem jílu. Závislost aktivity ureázy na jílu může souviset se skutečností, že ureáza dlouhou dobu přetrvává v aktivním stavu půdě jako exoenzym. Fixace enzymů na jílovité částice se výrazným způsobem podílí na stabilizaci volných enzymů v půdě (Alef a Nannipieri, 1995a).

6 Závěr

Výsledky dosažené v práci prokázaly, že aktivity β-glukosidázy a ureázy představují vhodné nástroje pro stanovení biologické aktivity v půdách orných a půdách trvalých travních porostů jako indikátorů kvality půdy. Obě aktivity jsou signifikantně ovlivňovány způsobem obhospodařování. První doplňuje metody charakterizující akumulaci organické hmoty v mikrobiální biomase, druhá odráží zásahy související se změnami pH. Akceptovatelná hladina opakovatelnosti, jednoduchost a rychlost analýzy patří k přednostem uvedených metod.

7 Literatura

1 Alef, Kassem; Nannipieri Paolo. Urease Activity. In *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Alef, Nannipieri, Eds.; Academic Press Ltd.: London, **1995a**; 316 – 320.

2 Alef, Kassem; Nannipieri Paolo. β-Glucosidase Activity. In *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Alef, Nannipieri, Eds.; Academic Press Ltd.: London, **1995b**; 350 – 352.

3 Dick Richard P. Soil Enzyme Activities as Integrative Indicators of Soil Health. In *Biological Indicators of Soil Health*. Pankhurst, Doube, Gupta, Eds.; CAB International.: Wallingford, **1997**; 121 – 156.
4 Tabatabai Ali. Soil Enzymes. In *Methods of Soil Analysis, Part 2 Microbiological and Biochemical Properties*. Mickelson, Ed.; Soil Science Society of America, Inc.: Madison, Wisconsin, USA, **1994**; 775 – 834.
5 Zbíral J. *Jednotné pracovní postupy, Analýza půd I.*, 2.vydání; Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský: Brno, **2002**.
6 Zbíral J. *Jednotné pracovní postupy, Analýza půd III.*, 2.vydání; Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský: Brno, **2004**.

Bulletin Národní referenční laboratoře XI 2007/2

Ročník:	XI, č. 2
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2007
Odpovědný redaktor:	RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.
Technická spolupráce:	Ing. Iva Strížová
Náklad:	150 výtisků
Počet stran:	66
Tisk:	ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111
	e-mail: ukzuz@ukzuz.cz

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196