

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



**Bulletin 2010**

**Ročník XIV, číslo 2/2010**

**Brno 2010**



## Obsah

1. **Stanovení polybromovaných POP metodou GC-MS (literární rešerše)** 1  
Petra Kosubová  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2,  
656 06 Brno
  
2. **Optimalizace stanovení PBDE s využitím GC/MS** 14  
Petra Kosubová, \*Sami Huhtala, Pavla Tieffová, \*Anne Markkanen,  
Eva Niedobová, Barbora Kozová  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno, Hroznová 2,  
656 06 Brno  
\* Hakuninmaantie 6, Helsinki, P.O.Box 140, FI-00251 Helsinki
  
3. **Stanovení obsahu 3-methylpyrazolu v hnojivech** 31  
Radmila Varmužová, Pavel Šíma, Iva Křivánková  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Praha,  
Za opravnou 4, 150 06 Praha 5
  
4. **Zavedení metod pro stanovení aktivit půdních enzymů dle ISO/TS 22939 pomocí fluorogenních substrátů** 41  
Stanislav Malý  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OMB, 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 polybromovaných POP metodou GC-MS (literární rešerše)

*Petra Kosubová*

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

## 1 Souhrn

Bromované zpomalovače hoření (BFR = brominated flame retardants) jsou látky, které jsou kvůli svým environmentálním vlastnostem, výskytu a celosvětové produkci doporučovány ke sledování v rámci různých monitorovacích programů. V současnosti se připravují podklady pro zařazení vybraných BFR mezi persistentní organické polutanty (POP) v rámci Stockholmské úmluvy. Cílem práce bylo shromáždit informace o výskytu, analytickém stanovení a legislativních podkladech týkající se BFR. V závěru práce byly zhodnoceny testovací vzorky pro výběr GC-MS přístroje vhodného pro analýzu zástupců BFR.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Úvod

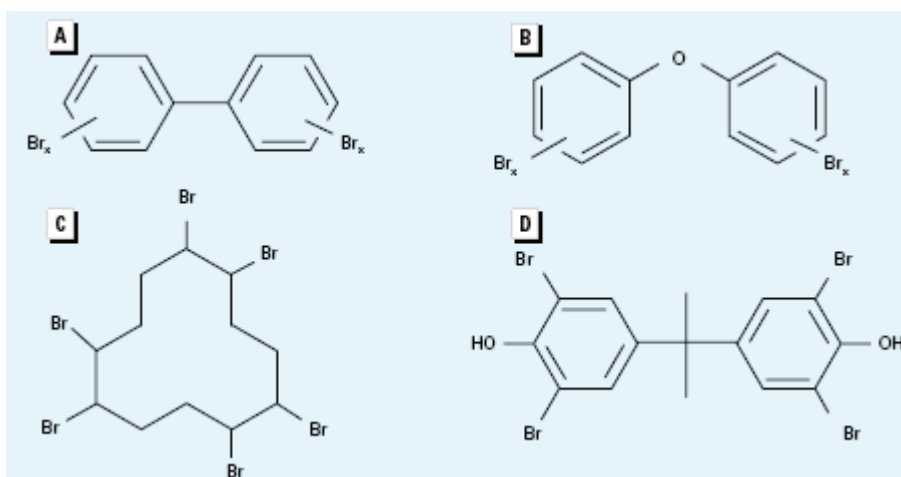
Zpomalovače hoření jsou antropogenní látky, které se používají při výrobě různých materiálů pro elektrické zařízení, nábytek a textilie pro zvýšení jejich odolnosti vůči hoření. Celkově se rozlišuje více než 175 různých typů zpomalovačů hoření, z toho nejširší skupinu představují bromované látky (BFR). Podle současné produkce existují tři hlavní skupiny BFR:

1. tetrabromobisphenol A (TBBPA) a jeho deriváty,
2. polybromované difenylethery (PBDE),
3. hexabromocyklododekan (HBCD) (obr. č.1).

Dalšími zástupci jsou polybromované fenoly a ftaláty (1). V minulosti se používaly jako BFR také polybromované bifenyle (PBB), které se vyráběly ve třech formách (hexabromobifenyl, oktabromobifenyl a decabromobifenyl), přičemž hexabromobifenyl představoval téměř 100 % produkce. Výroba PBB byla zastavena v USA v roce 1975, krátce po případu neúmyslné kontaminace krmiva, kdy došlo k velkým ztrátám hospodářských zvířat a dlouhodobým

vlivům na zdraví zemědělských rodin v Michiganu. Následně došlo k zastavení výroby PBB také v Evropě (2).

BFR se podle způsobu spojení s danou polymerní látkou dělí na látky aditivní a reaktivní. TBBPA se primárně řadí k reaktivním BFR, zatímco PBDE a HBCD se používají jako aditivní BFR. TBBPA se kovalentně váže prostřednictvím fenolické hydroxy skupiny na polymer na rozdíl od aditivních BFR, které jsou s polymerem spojeny pouze fyzikálními silami. Kovalentní spojení reaktivních BFR pak snižuje jejich únik do okolního prostředí oproti aditivním BFR (1).



Obrázek č. 1. Strukturní vzorce PBB (A), PBDE (B), HBCD (C) a TBBPA (D).

## 2.2 Tetrabromobisfenol A

TBBPA je celosvětově nejrozšířenější BFR, který se primárně používá v tištěných základních počítačových deskách. V porovnání s ostatními BFR jsou hladiny TBBPA v environmentálních složkách nižší díky kovalentnímu navázání TBBPA v polymeru. Jedná se o fenolickou sloučeninu, která může vykazovat nepříznivé účinky v živých organismech a která se označuje za potenciální endokrinní disruptor. Informace o výskytu a hladinách v biotických složkách životního prostředí jsou velice omezené. Vzhledem k nízké rozpustnosti ve vodě a hodnotám rozdělovacích koeficientů se TBBPA kumuluje v sedimentech a půdách (3). TBBPA byl také stanoven v odpadních kalech, ve kterých podléhá anaerobní degradaci (4). Významné hladiny TBBPA byly stanoveny ve vzorcích pracovního ovzduší odebraných z recyklačních závodů elektronických zařízení. Tyto hladiny byly několikrát vyšší než hladiny ve vzorcích z ostatních pracovišť vybavených elektronickými zařízeními, například z kanceláří nebo montážních hal pro obvodové desky (5).

TBBPA se stanoví pomocí plynové chromatografie s hmotnostně-spektrickou detekcí (GC-MS) nebo kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrickou detekcí (LC-MS). Při GC-MS analýze je nezbytná derivatizace, například pomocí acetanhydridu nebo diazomethanu. Měření probíhá nejčastěji v režimu negativní chemické ionizace (NCI), kdy se sledují dva ionty,  $m/z$  79 a 81, odpovídající atomu bromu ( $\text{Br}^-$ ). GC-NCI-MS poskytuje nízké detekční limity, ale zároveň vykazuje nižší selektivitu. Při použití GC-NCI-MS není možné odstranit interference dalších bromovaných sloučenin a nelze pro kvantifikaci využít metodu isotopového ředění (5, 6). V případě využití LC-MS přístupu není nutná derivatizace před finální analýzou a lze přidat  $^{13}\text{C}$ -TBBPA jako vnitřní standard. J. Tollback vypracovala LC-MS/MS metodu s využitím trojnásobného kvadrupólu pro stanovení vzorků ovzduší s nízkými detekčními limity. Hlavní pozornost byla zaměřena na studium chování TBBPA za různých ionizačních a fragmentačních podmínek (6). P. Guerra využila pro stanovení BFR systému LC-QqLIT-MS s lineární iontovou pastí a studovala citlivost různých režimů nastavení, které tento systém umožňuje (7).

### 2.3 Hexabromocyclododekan

HBCD je nearomatický bromovaný cykloalkan používaný primárně jako aditivní BFR v termoplastických polystyrenových materiálech používaných při tepelné izolaci budov. Nejvyšší produkce a použití HBCD je zaznamenána v Evropě. V závislosti na podmínkách bromace cyklododeka-1,5,9-trienů může technická směs HBCD teoreticky obsahovat 16 stereoisomerů, avšak v praxi byly identifikovány 3 diastereomery ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -) a 2 mesoformy ( $\delta$ -,  $\epsilon$ -). Pomocí chirální kolony s  $\beta$ -cyklodextrinovou fází lze  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -HBCD rozdělit na 6 enantiomerů. Hlavní složkou technické směsi je  $\alpha$ -HBCD, který je zároveň dominantní v abiotických složkách. V biotických složkách je díky transformačním mechanismům dominantní  $\beta$ -isomer. Informace o toxicitě HBCD jsou v současnosti nekompletní a rozporuplné. Hlavními sledovanými efekty HBCD v organismech je neurotoxicita, endokrinní disrupce a karcinogenita indukovaná nemutagenním mechanismem (8).

HBCD lze stanovit s využitím obou chromatografických přístupů, pomocí LC-MS i GC-MS. V současnosti se však přednostně používají LC-MS metody, které umožňují stanovení jednotlivých isomerů HBCD (9). Měřit lze v obou ionizačních módech, s negativní chemickou ionizací za atmosférického tlaku ( $-APCI$ ) (10) nebo s negativním elektrosprejem ( $-ESI$ ) (11, 12). V případě použití MS s trojnásobným kvadrupólem lze pracovat v režimu sledování vybraných iontů (SIM) nebo v režimu sledování vybraného reakčního přechodu

(SRM). U obou ionizačních technik se v SIM sleduje  $m/z$  641 odpovídající  $[M-H]^-$  a v SRM přechod  $m/z$  641  $\rightarrow$  79 a 641  $\rightarrow$  81 odpovídající  $[M-H]^- \rightarrow Br^-$ . Podobně jako při stanovení TBBPA lze využít ke kvantifikaci metodu izotopového ředění a sledovat vnitřní standard pomocí přechodu  $m/z$  653  $\rightarrow$  79 a 653  $\rightarrow$  81 (10, 11, 12). Pro stanovení celkového obsahu HBCD lze využít GC-MS techniky, které neumožňují dostatečnou chromatografickou separaci jednotlivých isomerů a poskytují široký, nerozdělený, difúzní pík. Příčinami jsou rozklad HBCD při teplotách vyšších než 230 °C a termální izomerizace při teplotě vyšší než 160 °C. Stanovení metodou GC-NCI-MS vykazuje stejné nedostatky jako v případě TBBPA (9).

## 2.4 Polybromované difenylethery

### 2.4.1 Charakteristika

PBDE představují skupinu 209 kongenerů s analogickým označením jako PCB. Avšak díky sklonu k debromaci obsahují komerční směsi výrazně nižší počet kongenerů než je teoreticky možné. Hlavním komerčním produktem je Dekabromodifenylether, který obsahuje více než 97 % BDE 209, méně než 3 % nona-BDE (NBDE) a stopy okta-BDE (OBDE). Nejčastěji se používá v elektrických a elektronických zařízeních a textiliích. Složitější směsí je Oktabromodifenylether, který obsahuje více než 40 % heptabromodifenyletherů (HpBDE) a téměř 35 % OBDE. Používá se při výrobě malých plastových součástek, například kancelářských potřeb. Třetí směs, Pentabromodifenylether, se používá především v textiliích a polyuretanových pěnách a obsahuje téměř 60 % penta-BDE (PeBDE) a téměř 40 % tetra-BDE (TBDE). Ve směsi jsou hlavně zastoupeny kongenery BDE 47, 99, 100, 153, 154, přičemž obsah BDE 99 je dvojnásobný oproti BDE 47, zatímco BDE 153 a 154 jsou zastoupeny rovnocenně (1).

**Tabulka č. 1. Charakteristiky komerčních produktů.**

| Název                       | Pentabromodifenyl ether | Oktabromodifenyl ether | Dekabromodifenyl ether |
|-----------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| Molekulová hmotnost (g/mol) | 564,66                  | 801,5                  | 959,22                 |
| Sumární vzorec              | $C_{12}H_5Br_5O$        | $C_{12}H_2Br_8O$       | $C_{12}Br_{10}O$       |
| Log $K_{ow}$                | 6,46 – 6,97             | 6,29 – 8,90            | 9,97                   |

Díky fyzikálně-chemickým vlastnostem řadíme PBDE k persistentním environmentálním kontaminantům jako jsou PCB, PCDD/F, aj. PBDE jsou vysoce hydrofobní látky, u nichž se vzrůstajícím stupněm bromace klesá rozpustnost ve vodě a v plynné fázi. Následkem je silnější sorpce výše bromovaných PBDE na pevné částice v ovzduší, v sedimentech a půdách. Dálkový transport ovzduším je typický pro níže bromované PBDE (1).

PBDE jsou stabilní látky, avšak u některých výše bromovaných kongenerů byla zaznamenána fotodegradace působením UV záření vedoucí k nížebromovaným PBDE a bromovaným dibenzofuranům. V laboratorních podmínkách bylo zjištěno, že rychlost fotodegradace PBDE je výrazně nižší v půdách, sedimentech a písku než v organických rozpouštědlech a závisí na stupni bromace (1).

Akutní toxicita PBDE je relativně nízká, přičemž nížebromované kongenery vykazují vyšší toxicitu než výše bromované. Z hlediska chronické expozice PBDE byla u myši prokázána vývojová neurotoxicita. PBDE ovlivňují produkci hormonů štítné žlázy a považují se za potenciální endokrinní disruptory (1).

#### **2.4.2 Výskyt**

PBDE se silně adsorbují na půdní matrice a sedimenty. Jejich profily v těchto matricích odpovídají profilům PBDE v komerčních směsích. V kalech dochází ke změnám profilů PBDE, avšak závěry autorů o transformacích PBDE v kalech jsou rozporuplné. Zastoupení PBDE v biotických složkách je odlišné oproti komerčním směsím díky rozdílné metabolizaci jednotlivých kongenerů. V organismech se nacházejí převážně tetra- až hexabromované kongenery, konkrétně BDE 47, 99, 100, 153 a 154. Hladiny PBDE v různých environmentálních matricích se podle řady autorů exponenciálně zvyšují (1, 13, 14).

#### **2.4.3 Legislativa**

Výroba, nakládání a zacházení s PBDE jsou v současnosti upravovány v rámci Evropského společenství pouze Směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2003/11/ES, která mění směrnici Rady 76/769/EHS týkající se omezení uvádění na trh a používání některých nebezpečných látek a přípravků. Pentabromodifenylether a oktobromodifenylether se nemohou uvádět na trh a používat jako látka či přípravek s koncentrací vyšší než je 0,1 hmot % (15).

PBDE vykazují vlastnosti a environmentální chování POP. V současnosti se zpracovávají návrhy na jejich zařazení do seznamů POP dvou mezinárodních úmluv, do Protokolu o POP k Úmluvě o dálkovém znečišťování ovzduší přesahujícím hranice státu a do Stockholmské úmluvy o POP. Opatření vyplývající z Protokolu o POP pro látky uvedené

v příloze I se v současnosti vztahují pouze na jediný BFR, hexabromobifenyl (16). Dalšími kandidáty jsou oktabromodifenylether pro zařazení do seznamu Protokolu POP a hexabromobifenyl, pentabromodifenylether a oktabromodifenylether do seznamu POP Stockholmské konvence (17).

Dále Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) zpracoval návrh na sledování vybraných BFR v rámci evropského monitorovacího programu pro potraviny a krmiva. Hlavní skupinu BFR představují PBDE (BDE kongenery 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183 a 209), HBCD a PBB 153. EFSA dále doporučuje sledovat v rámci monitoringu následující BFR, označované jako volitelné: další PBDE, dekabromodifenyl ethan, hexabromobenzen a bis(2,4,6-tribromofenoxy)ethan (18).

#### **2.4.4 Analýza**

PBDE vykazují podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako ostatní persistentní organohalogenové sloučeniny, a proto lze využít principiálně stejných extrakčních a čisticích postupů, které se používají v případě analýzy organochlorových pesticidů (OCP) a PCB (19). Hlavními úskalími při stanovení PBDE jsou degradace výše bromovaných difenyletherů (zvláště BDE 209) působením vysokých teplot a UV záření, interference při chromatografické separaci a nedostatek standardů a referenčních materiálů (20). Při analýze BDE 209 je nutné přijmout v laboratoři speciální opatření, tj. instalovat UV filtry, používat elektrostatické čističe vzduchu pro odstranění prachových částic aj. (21).

V současnosti existují dva oficiální postupy pro stanovení PBDE. ISO 22032:2006 zahrnuje metodu pro stanovení vybraných PBDE v sedimentech a odpadních kalech pomocí nízkorozlišovací GC-MS v režimu elektronové (EI) a negativní chemické ionizace (NCI) (22). EPA 1614 popisuje stanovení PBDE ve vodných a pevných vzorcích, tkáních a ostatních komplexních maticích metodou vysokorozlišovací GC-MS (HRGC-HRMS). Metoda je založená na EPA metodě 1668A a byla revidována v roce 2007 (23).

##### **2.4.4.1 Příprava vzorku**

K extrakci PBDE se nejčastěji používají směsi nepolárního a polárního rozpouštědla (hexan-aceton), případně toluen nebo dichlormethan. Klasickou metodou využívanou pro extrakci půd, sedimentů, kalů a biotických vzorků je Soxhletova extrakce. Dále lze využít tlakovou extrakci rozpouštědlem (PLE), superkritickou fluidní extrakci (SFE), případně mikroextrakci pomocí pevné fáze (SPME) aj. Vhodnost zvolené extrakční techniky je nutné ověřit hlavně

pro výšebromované PBDE s tendencí degradovat za vysokých teplot a působení UV záření (21, 24).

Rušivé koextrakty (lipidy, vysoce polární intereferenty, huminové kyseliny, síra) se nejčastěji odstraní pomocí adsorpční kolonové chromatografie pomocí různých sorbentů (silikagel, florisil, alumina), pomocí gelové permeační chromatografie (GPC), koncentrované kyseliny sírové, saponifikací hydroxidem draselným aj. Frakcionaci lze provést pomocí silikagelu. PCB, PBB a BDE 209 se eluují v první nepolární frakci a PBDE v druhé polárnější frakci spolu s pesticidy. Při zpracování vzorku dochází k adsorpci PBDE na laboratorní sklo mnohem intenzivněji než u PCB a v případě odpaření extraktu do sucha nemusí dojít k úplnému zpětnému rozpuštění BDE 209 ani použitím toluenu (21, 24).

#### **2.4.4.2 Finální stanovení**

PBDE se téměř výhradně stanovují pomocí GC-MS technik. Okrajově se využívají GC-ECD (detektor elektronového záchytu), GC × GC s MS-TOF (dvourozměrná GC s MS detekcí založenou na měření doby letu), nebo LC-MS/MS metody (20, 25, 26).

Při GC-MS stanovení je nejčastěji používanou nástřikovou technikou splitless (nástřik bez děliče toku) a on-column (přímý nástřik na kolonu). Splitless nástřik se provádí při teplotách (250 – 300) °C. S prodlužující se dobou setrvání v injektoru mohou okta- až dekaBDE podléhat degradaci, proto by měla být doba setrvání v injektoru co nejnižší, ideálně zkrácena tlakovým pulsem. Při přímém nástřiku na kolonu nebyly pozorovány žádné významné ztráty u výšebromovaných PBDE, včetně BDE 209. Avšak tato technika je vhodná pouze pro velmi čisté vzorky, v opačném případě dochází ke znečištění GC kolony a následné degradaci PBDE v této části kolony (20, 21).

GC separace PBDE (BDE 28, 47, 99, 100, 153, 154 a 183) se nejčastěji provádí na kolonách s nepolární nebo středně polární fází (DB-1, DB-5, DB-XLB) o délce 25 m až 60 m, které umožňují dostatečné chromatografické rozlišení těchto kongenerů. Nejméně koelucí bylo zaznamenáno u kolony DB-XLB, která je však zcela nevhodná pro stanovení BDE 209 kvůli delším retenčním časům. BDE 209 se musí stanovit zvlášť za speciálních chromatografických podmínek (krátká kolona, tenký film aj.), aby byla doba setrvání na koloně za vysoké teploty co nejkratší (21). Optimalizaci GC nastavení prezentoval Dr. Krumwiede (Thermo, Brémy, Německo) (27). Avšak selektivita stanovení daného BDE a úroveň koelucí jsou výsledkem kombinace více faktorů (přečištění vzorku, stupeň celkové kontaminace vzorku, chromatografické podmínky, detekční metoda). Chromatografické koeluce PBDE s nejčastěji

stanovovanými polutanty jsou v současnosti identifikovány a popsány pro jednotlivé chromatografické fáze (20).

GC-MS stanovení PBDE může probíhat pomocí vysokorozlišovacích (HR) i nízkorozlišovacích (LR) přístrojů. HRMS detekce probíhá výhradně v režimu elektronové ionizace (EI). Při LRMS detekci se využívají oba režimy, EI a NCI (20, 21). Při EI-MS vznikají hlavně ionty  $M^+$  a  $[M-2Br]^+$ , které se využívají při identifikaci a kvantifikaci PBDE (28). Další výhodou této techniky je možnost použít izotopově značených standardů pro zajištění kontroly celého stanovení sledováním jejich výtěžnosti. V LRMS uspořádání je NCI citlivější metodou oproti EI, ale neposkytuje dostatečnou selektivitu. U všech tri- až nonabromových kongenerů se při použití NCI sleduje  $Br^-$  a u BDE 209 fragment  $[C_6Br_5O]^-$ . Zároveň při NCI nelze ke kvantifikaci použít metodu izotopového ředění. Vysokou selektivitu a citlivost poskytuje EI-HRMS detekce, avšak jedná se o metodu všestranně nákladnou (20, 21).

Zajímavou alternativou pro selektivní a citlivou detekci PBDE je využití tandemových technik (MS/MS), které umožňují MS s analyzátozem typu iontové pasti nebo trojnásobného kvadrupólu. Při MS/MS experimentu se jako prekursor využívají ionty  $M^+$  a  $[M-2Br]^+$ , které při následné disociaci poskytují fragment odpovídající ztrátě COBr nebo Br. Prekursor  $M^+$  poskytuje přednostně fragment odpovídající ztrátě dvou a více Br a v případě fragmentace prekursoru  $[M-2Br]^+$  dochází přednostně ke ztrátě COBr (29-33).

#### **2.4.5 Mezilaboratorní studie**

První mezilaboratorní porovnávací studii zaměřenou na stanovení PBDE pořádal holandský institut RIVO (Netherlands Institute for Fisheries Research) na přelomu roku 1999 a 2000. Cílem studie bylo porovnat instrumentální techniky pomocí kalibračních parametrů a zároveň porovnat metody pro stanovení PBDE pomocí 7 vzorků zahrnující biologické matrice a sedimenty. Měřicí metody založené na vysokorozlišovací (HR) MS nebo nízkorozlišovací (LR) MS poskytovaly porovnatelné výsledky vyžadující zlepšení kalibračních parametrů. Vzhledem k hladinám v testovaných vzorcích byly uspokojivé výsledky dosaženy u BDE 47, 100, 153 a 154. Nejproblematičtějším BDE je kongener 209, u něhož byl pozorován největší rozptyl výsledků kvůli nestabilitě za zvýšených teplot a působení světla. BDE 209 vyžaduje náročnější podmínky stanovení v porovnání s ostatními PBDE (34). V následujících letech proběhly další mezilaboratorní studie pořádané v Japonsku, Norsku a UK. Jejich cílem bylo zlepšit spolehlivost stanovení PBDE v environmentálních matricích (35–37).

### **3 Praktická část**

Byl navržen test pro porovnání různých GC-MS systémů s cílem zakoupení vhodného přístroje pro stopovou analýzu PBDE a dalších kontaminantů v krmivech a abiotických matricích.

#### **3.1 Materiál a metody**

Pro porovnání byl vybrán vzorek rybí moučky a připraven podle postupu SOP 30 (38), který zahrnoval extrakci třepáním do ethylacetátu, čištění pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) a pomocí adsorpční chromatografie na silikagelu. Konečný obsah matrice v testovacích vzorcích matricových standardů byl 20 %. Zároveň byly připraveny rozpouštědlové standardy o stejné koncentraci kongenerů PBDE (5/25 ng/ml isooktanu) pro semikvantitativní stanovení v matricových standardech.

Použitý směsný standard BDE-MXF a DBE-209 (Wellington Laboratories, Kanada) obsahoval 10 PBDE kongenerů (28, 47, 66, 85, 99, 100, 153, 154, 183, 209).

#### **3.2 Výsledky a diskuse**

V tomto testu byli osloveni 3 dodavatelé GC-MS přístrojů, Amedis, HPST a Pragolab. Úkolem bylo kvalitativní stanovení dvou vzorků a semi-kvantitativní stanovení identifikovaných PBDE.

**Tabulka č. 1 Porovnání GC-MS systémů při analýze matricových standardů**

| PBDE | Předložená c (ng/ml) | Změřená c (ng/ml) Varian 4000 | Změřená c (ng/ml) Thermo PolarisQ | Změřená c (ng/ml) Varian 1200 |
|------|----------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| 28   | 5                    | 7,2                           | 3,9                               | 4,9                           |
| 47   | 5                    | 9,6                           | 4,9                               | 5,2                           |
| 66   | 5                    | 10,8                          | 5,0                               | 5,8                           |
| 84   | 5                    | 14,4                          | -                                 | 4,4                           |
| 99   | 5                    | 17,6                          | 3,9                               | 4,5                           |
| 100  | 5                    | 21,4                          | 3,0                               | 5,0                           |
| 153  | 5                    | 24,1                          | 4,7                               | 4,4                           |
| 154  | 5                    | 27,3                          | 4,2                               | 5,3                           |
| 183  | 5                    | 38,8                          | 3,8                               | 5,7                           |
| 209  | 25                   | -                             | -                                 | -                             |

Výsledky dodaly pouze firmy Amedis (Varian 4000) a Pragolab (Thermo PolarisQ), viz. tab. č.1. V tabulce č.1 jsou zároveň uvedeny výsledky měření těchto vzorků v laboratoři NRL-RO Brno pomocí GC-MS/MS systému Varian 1200.

Nejproblematictější analytem této skupiny je PBDE 209, který vyžaduje specifické podmínky měření pro správnou kvantifikaci, tj. krátkou chromatografickou kolonu, optimalizovaný nástřík a správné naladění hmotnostního spektrometru s možností měření v rozsahu m/z do 1000. V opačném případě dochází k jeho degradaci a k výraznému zhoršení detekčních limitů.

Měření pomocí přístroje Varian 4000 bylo probíhalo za podmínek uvedených v aplikačním listu Varian č. 75 s výjimkou režimu ionizace (33). Z výsledků je zřejmý vliv matricových efektů při měření v režimu interní ionizace, která byla použita při tomto experimentu a která je nastavena v primární konfiguraci přístroje. Koncentrace PBDE v matricovém standardu byly výrazně nadhodnocené při porovnání s rozpouštědlovým standardem. Pro tyto analýzy je vhodnější měření v režimu externí ionizace, který nebyl pro tyto vzorky testován.

V NRL-RO Brno proběhlo pouze orientační měření PBDE pomocí přístroje Varian 1200. Výsledky byly uspokojivé, avšak pro spolehlivé výstupy bude nutné metodu optimalizovat a ověřit.

Na přístroji PolarisQ měřila zvolená zkušební laboratoř a měření proběhlo za podmínek optimalizovaných a validovaných v této laboratoři. Dodané výsledky odpovídaly

předpokládaným hodnotám. PolarisQ byl zvolen jako vyhovující přístroj nejen pro tyto analýzy, ale také jako nový GC-MS systém vhodný pro ostatní úkoly řešené v NRL-RO Brno.

## 4 Závěr

BFR jsou látky používané při výrobě různých materiálů pro elektrické zařízení, nábytek a textilie pro zvýšení jejich odolnosti vůči hoření. Jedním z hlavních představitelů BFR jsou PBDE. V současnosti probíhá posuzování návrhů pro zařazení vybraných zástupců PBDE do seznamu POP Stockholmské úmluvy. EFSA vydala doporučení o sledování PBDE v potravinách a krmivech. Tyto látky se v porovnání s ostatními BFR stanovují výlučně pomocí GC-MS technik.

Při porovnání různých GC-MS systémů byly nejlepší výsledky naměřeny na přístroji PolarisQ firmy Thermo. Na základě výsledků testu a našich požadavků byl vybrán a zakoupen do NRL-RO Brno nový model GC-MS systému s iontovou pastí firmy Thermo, TraceGC-ITQ1100. Jedním z prvních úkolů řešených pomocí TraceGC-ITQ1100 bude analýza vybraných kongenerů PBDE v krmivech.

## Literatura

1. Birnbaum L.S., Staskal, D.F.: Brominated Flame retardant: Cause for concern?, *Environ Health Perspect*, **2004**, *112* (1), 9–17.
2. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp68.html>
3. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc172.htm>
4. de Wit, C.A., et al.: Brominated flame retardants in sludge from 50 Swedish sewage treatment plants: Evidence of anaerobic degradation of HBCD and TBBPA, *Organohal Comp*, **2007**, *69*, 2686–2688.
5. Sjodin, A., et al.: Flame retardants in indoor air at electronics recycling plant and other work environments, *Environ Sci Technol*, **2001**, *38* (3), 448–454.
6. Tollback, J., et al.: Determination of the flame retardant tetrabispheol A in air samples by liquid chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **2006**, *1104*, 106–112.
7. Guerra, P., et al.: Identification a trace level determination of brominated flame retardants by liquid chromatography/quadrupole linear ion trap mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2008**, *22*, 916–924.
8. Law, R.J., et al.: Hexabromocyclododecane challenges scientists and regulators, *Environ Sci Technol*, **2005**, 281A–287A.
9. Eljarrat, E., Barceló, D.: Sample handling and analysis of brominated flame retardants in soil and sludge samples, *Trac Trends Anal Chem*, **2004**, *23* (10–11), 727–736.
10. Suzuki, S., Hasegawa, A.: Determination of hexabromocyclododecane diastereoisomers and tetrabromobisphenol A in water and sediment by liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal Sci*, **2006**, *22*, 469–474.
11. Dodder, N.G., et al.: Analysis of hexabromocyclododecane diastereoisomers and enantiomers by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Chromatographic selectivity and ionization matrix effects, *J Chromatogr A*, **2006**, *1135*, 36–42.

12. Kakimoto, K., et al.: Evaluation of hexabromocyclododecane in fish and marine mammal oil supplements, *Food Chem*, **2008**, *107*, 1724–1727.
13. de Wit, C.: An overview of brominated flame retardants in the nevironment, *Chemosphere*, **2002**, *46*, 583–624.
14. Law, R.J., et al.: Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment, *Chemosphere*, **2006**, *64*, 187–208.
15. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2003/11/ES, kterou se mění směrnice Rady 76/769/EHS týkající se omezení uvádění na trh a používání některých nebezpečných látek a přípravků (pentabromodifenylether, oktobromodifenylether).
16. [http://www.unece.org/env/lrtap/pops\\_h1.htm](http://www.unece.org/env/lrtap/pops_h1.htm)
17. <http://chm.pops.int>
18. Question N° EFSA-Q-2005-244. Advice of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to relevant chemical compounds in the group of brominated flame retardants for monitoring in feed and food, *The EFSA journal*, **2006**, *328*, 1–4.
19. de Boer, J., et al.: Method for the analysis of polybrominated diphenylethers in sediments and biota, *Trac Trends Anal Chem*, **2001**, *20* (10), 591–599.
20. Stapleton, H.M. Instrumental methods and challenges in quantifying polybrominated diphenyl ethers in environmental extracts: a review, *Anal Bioanal Chem*, **2006**, *386*, 807–817.
21. Covaci, A., et al.: Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples – a review. *Environ Int*, **2003**, *29*, 735–756.
22. ISO 22032:2006 Water quality – Determination of selected polybrominated diphenyl ethers in sediment and sewage sludge – Method using extraction and gas chromatography/mass spectrometry, TC 147/SC 2.
23. EPA method 1614 – Brominated diphenyl ethers in water, soil, sediment and tissue by HRGC/HRMS, U.S. EPA Washington, DC, **2007**, EPA-821-R-07-005.
24. Covaci, A., et al.: Review: Recent developments in the analysis of brominated flame retardants and brominated natural compounds, *J Chromatogr A*, **2007**, *1153*, 145–171.
25. Focant, J.F., et al.: Qualitative evaluation of thermal desorption-programmable temperature vaporization-comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the analysis of selected halogenated contaminants. *J chromatogr A*, **2003**, *1019*, 143–156.
26. Debrauwer, L., et al.: Probing new approaches using atmospheric pressure photo ionization for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by liquid chromatography–mass spectrometry. *J chromatogr A*, **2005**, *1082*, 98–109.
27. Krumwiede, D.: Polybrominated POPs on the MAT 95 XP – a routine analysis. Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany.
28. Tu, C., Prest H.F.: Determination of polybrominated diphenyl ethers in polymeric materials using the 6890 GC/5973N inert MSD with electron impact ionization, Agilent Technologies Application.
29. Grabic, R., et al.: Stanovení polybromovaných difenyletherů metodou GC-MS/MS, *Chem Listy*, **2002**, *96*, 809–812.
30. Pirard, C., et al.: New strategy for comprehensive analysis of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls by gas chromatography coupled with mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **2003**, *998*, 169–181.

31. Naert, C., van Peteghem, C.: Development and application of a simplified clean-up procedure for the determination of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in horse fat by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), *Food Additiv Contam*, **2007**, 24(9), 1018–1025.
32. Baker, D., Ragsdale, J.D.: Confirmation and quantitation of polybrominated biphenyls (PBBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by MS/MS, Thermo Scientific Application note: 10042.
33. Brittain, R.: Fast, sensitive, and selective determination of polybrominated diphenylethers by tandem mass spectrometry, *Varian GC/MS Application note*: 75, **2004**.
34. de Boer, J., Cofino, W.P.: First world-wide interlaboratory study on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), *Chemosphere*, **2002**, 46 (5), 625–633.
35. de Boer, J. et al.: BSEF/QUASIMEME interlaboratory study on brominated flame retardants, *Organohalogen Compd*, **2002**, 58, 197–200.
36. de Boer, J., Wells, D.E.: Pitfalls in the analysis of brominated flame retardants in environmental, human and food samples including results of three international interlaboratory studies, *Trac Trends Anal Chem*, **2006**, 25, 364.
37. Takahashi, S. et al.: An Intercalibration study on organobromine compounds: Brominated flame retardants and related dioxin-like compounds in waste TV cabinet and animal fat, *Organohal Comp*, **2005**, 67, 430–433.
38. Příručka kvality NRL-RO Brno, ÚKZÚZ, 2008, SOP č. 30, Stanovení PCB a OCP metodou GC-MS.

# Optimalizace stanovení PBDE s využitím GC/MS

*Petra Kosubová, \*Sami Huhtala, Pavla Tieffová, \*Anne Markkanen, Eva Niedobová, Barbora Kozová*

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

\* Hakuninmaantie 6, Helsinki, P.O.Box 140, FI-00251 Helsinki

## 1 Souhrn

V návaznosti na literární rešerši „Stanovení polybromovaných POP metodou GC-MS“ a na projekt twinning-light „Strengthening of the official control in the field of soil protection“ (CZ06/IB/AG/04-TL) bylo optimalizováno a validováno stanovení PBDE s využitím GC-MS/MS systému Varian 1200. Vzhledem k fyzikálně-chemickým vlastnostem PBDE a jejich nízkým obsahům v reálných matricích byly při stanovení vybraných kongenerů PBDE využity následující metody: nízkotlaká plynová chromatografie (LPGC), tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) a metoda isotopového ředění (ID).

## 2 Teoretická část

### 2.1 Úvod

Polybromované difenylethery (PBDE) jsou látky ze skupiny bromovaných zpomalovačů hoření (BFR), které se pro svoje fyzikálně-chemické a environmentální vlastnosti, výskyt a celosvětovou produkci řadí mezi persistentní organické polutanty (POP). Komerčně vyráběné směsi Pentabromodifenyletheru a Oktabromodifenyletheru byly zařazeny do seznamu POP Stockholmské úmluvy o perzistentních organických polutantech během 4. zasedání Konference smluvních stran Úmluvy, které proběhlo 4. až 8. května 2009 v Ženevě (1).

PBDE představují skupinu 209 kongenerů s analogickým označením jako PCB. Avšak díky sklonu k debromaci obsahují komerční směsi výrazně nižší počet kongenerů než je teoreticky možné. Hlavním komerčním produktem je Dekabromodifenylether, Oktabromodifenylether a Pentabromodifenylether. Zastoupení PBDE v těchto směsích se nachází také v abiotických matricích (sediment, půda), ve kterých dochází k silné sorpci PBDE. V kalcích dochází

ke změnám profilů PBDE. Zastoupení PBDE v biotických složkách je odlišné oproti komerčním směsím kvůli rozdílné metabolizaci jednotlivých kongenerů. V organismech se nacházejí převážně tetra- až hexabromované kongenery, konkrétně BDE 47, 99, 100, 153 a 154. Hladiny PBDE v různých environmentálních matricích se podle řady autorů exponenciálně zvyšují (2). Podrobné informace o vlastnostech, toxicitě, výskytu a použití PBDE jsou zpracovány ve výše uvedené literární rešerši (3).

## 2.2 Analýza

V současnosti existují dva oficiální postupy pro stanovení PBDE. ISO 22032:2006 zahrnuje metodu pro stanovení vybraných PBDE v sedimentech a odpadních kalech pomocí nízkorozlišovací GC-MS v režimu elektronové ionizace (EI) a negativní chemické ionizace (NCI) (4). EPA 1614 popisuje stanovení PBDE ve vodných a pevných vzorcích, tkáních a ostatních komplexních matricích metodou vysokorozlišovací GC-MS (HRGC-HRMS) (5). Při přípravě vzorku k analýze PBDE lze využít principiálně stejné extrakční metody a čisticí postupy, které se používají v případě analýzy persistentních organochlorových sloučenin. PBDE se v současnosti téměř výhradně stanovují pomocí GC-MS technik (6).

Ke GC separaci kongenerů PBDE prioritně zastoupených v technických směsích a sledovaných v environmentálních matricích s výjimkou BDE 209 (BDE 28, 47, 99, 100, 153, 154 a 183) se nejčastěji používají kolony s nepolární nebo středně polární fází (DB-1, DB-5, DB-XLB) o délce 25 m až 60 m. Stanovení BDE 209 musí probíhat za speciálních chromatografických podmínek (krátká kolona, tenký film aj.), aby čas setrvání na koloně za vysoké teploty byl co nejkratší a snížila se tím pravděpodobnost degradace BDE 209 (7). Pro stanovení všech prioritních kongenerů byla úspěšně aplikována metoda nízkotlaké chromatografie (LPGC). Tato technika umožňuje zrychlení analýzy, snížení eluční teploty a zvýšení kapacity kolony, což souvisí se zlepšením detekčních limitů. Nevýhodou je nižší separační účinnost v porovnání s konvenční GC. LPGC se především využívá pro analýzu termolabilních látek a/nebo látek s dlouhými retenčními časy, jakými jsou PBDE a také například polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) (8).

MS detekce PBDE může probíhat pomocí vysokorozlišovacích (HR) i nízkorozlišovacích (LR) přístrojů. Z mezilaboratorních studií vyplynulo, že měřicí metody založené na vysokorozlišovací HRMS nebo nízkorozlišovací LRMS poskytují porovnatelné výsledky. Největší rozptyl výsledků byl pozorován u BDE 209, u kterého za zvýšených teplot a působením světla dochází k degradaci (9). Zajímavou alternativou pro selektivní a citlivou

detekci PBDE je využití tandemových technik (MS/MS), které umožňují LRMS s analyzátozem typu iontové pasti nebo trojnásobného kvadrupólu. Při MS/MS experimentu se jako prekursor využívají ionty  $M^+$  a  $[M-2Br]^+$ , které při následné disociaci poskytují specifický fragment odpovídající ztrátě COBr nebo Br (10-14).

Cílem této práce bylo optimalizovat detekci PBDE s využitím GC-MS/MS systému Varian 1200, dále optimalizovat postupy přípravy vzorku k analýze pro jednotlivé materiály a validovat sestavené metody pomocí referenčních materiálů.

### **3 Praktická část**

#### **3.1 Materiál a metody**

PBDE byly analyzovány podle postupu, který je detailně popsán v SOP č. 40 (NRL-RO Brno) (15).

##### **3.1.1 Standardy a referenční materiály**

3.1.1.1 Směsný standard nativních PBDE (BDE-MXF) pro kvantifikaci:  
2000 ng/ml nonan (Wellington, Kanada).

3.1.1.2 Směsný standard izotopově značených PBDE (MBDE-MXFS), surrogate:  
2000 ng/ml nonan (Wellington, Kanada).

3.1.1.3 Směsný standard izotopově značených PBDE (MBDE-MXFR), recovery:  
2000 ng/ml nonan (Wellington, Kanada).

3.1.1.4 BDE\_209: 50 µg/ml toluenu (AccuStandard, USA).

3.1.1.5 Izotopově značený BDE209 (MBDE-209):  $(25 \pm 1,2)$  µg/ml (Wellington, Kanada).

3.1.1.6 SRM 2585 Organic Contaminants in House Dust (NIST, USA).

3.1.1.7 WMF-01 Reference Fish Tissue for Organic Contaminant Analysis (Wellington, Kanada).

3.1.1.8 Interní RM: Kompost 3232 (SYKE, Helsinky, Finsko).

3.1.1.9 Interní RM: Čistírenský kal 3316 (ÚKZÚZ, Brno, ČR).

##### **3.1.2 Přístroje**

3.1.2.1 Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem GC-MS/MS: CP-3800GC-1200MS Varian, vybavený kapilární kolonou Rapid-MS (10 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Varian), případně DB-XLB (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, J&W Scientific), řízený SW Workstation MS 6.4.1.

3.1.2.2 Extraktory ASE 100 (Dionex) s příslušenstvím (nerezové cely o objemu 11 ml a celulózové filtry) nebo Buchi B-811 pro Soxhletovu extrakci horkým rozpouštědlem (Buchi).

### **3.1.3 Pracovní postupy**

#### **3.1.3.1 Zrychlený postup přípravy vzorků půd, sedimentů a krmiv živočišného původu**

PBDE se z předupraveného vzorku extrahují do dichlorometanu metodou Soxhletovy extrakce horkým rozpouštědlem pomocí Buchi B-811. Extrakt se obohatí přídavkem vnitřního standardu s isotopově značenými PBDE (13C-PBDE), převede se do hexanu, přečistí se třepáním s koncentrovanou kyselinou sírovou. Po odstředění se hexanová fáze dočistí pomocí silikagelu modifikovaným kyselinou sírovou, převede se do isooktanu a analyzuje metodou plynové chromatografie s hmotnostně selektivní detekcí (GC-MS). Obsahy PBDE se vyhodnotí z kalibrační závislosti plochy diagnostického iontu jednotlivých analytů na koncentraci příslušného analytu v roztoku směšného standardu, obsahující všechny požadované látky a vnitřní standardy (15, 16).

#### **3.1.3.2 Postup pro přípravu vzorků čistírenských kalů, kompostů, průmyslových sedimentů a prachu**

PBDE se z předupraveného vzorku extrahují do dichlorometanu metodou tlakové extrakce rozpouštědlem (PLE). Extrakt se obohatí přídavkem vnitřního standardu s isotopově značenými PBDE (13C-PBDE) a převede se do hexanu. Extrakt se přečistí pomocí miniaturizované kombinované silikagelové kolony. Pro odstranění minerálních olejů z extraktu se provede frakcionace extraktu pomocí adsorpční kolonové chromatografie na alumině. Polární frakce se převede se do isooktanu a zanalyzuje metodou plynové chromatografie s hmotnostně selektivní detekcí (GC-MS). Obsahy PBDE se vyhodnotí z kalibrační závislosti stejným způsobem jako v případě postupu 3.1.3.1 (15).

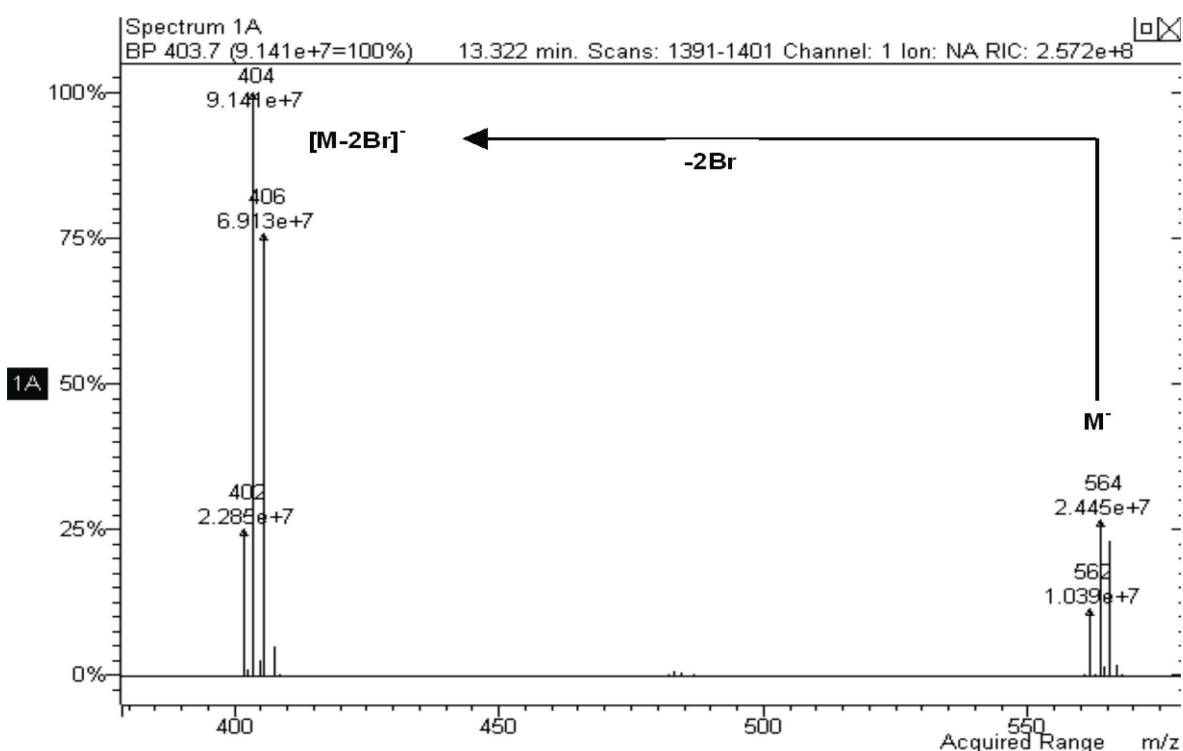
**3.1.3.3** Minerální oleje byly analyzovány na pracovišti SYKE (Helsinky, Finsko) dle akreditovaného postupu K391 (17).

**3.1.3.4** Síra ve vzorcích čistírenských kalů a kompostu byla analyzována podle akreditovaného postupu SOP 4A (18).

## 3.2 Výsledky a diskuse

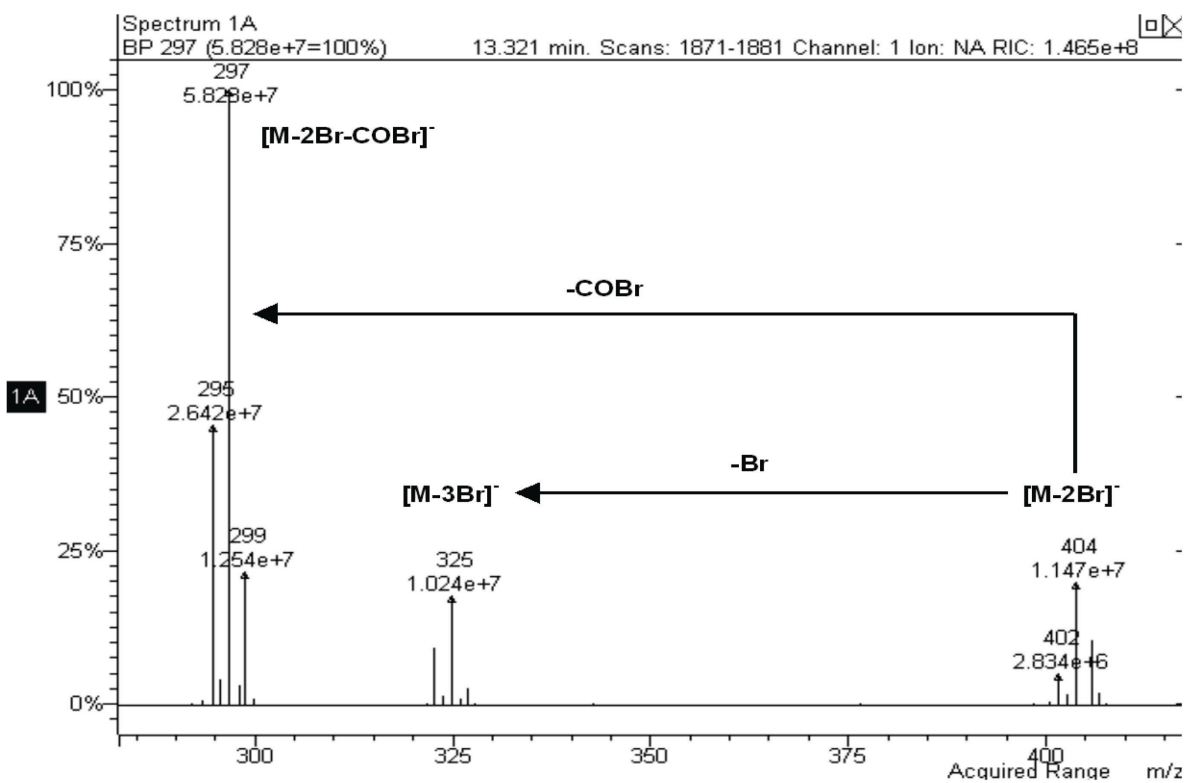
### 3.2.1 Optimalizace MS/MS

Při MS/MS experimentu se jako prekursor využívají ionty  $M^+$  a  $[M-2Br]^+$ , které při následné disociaci poskytují fragment odpovídající ztrátě COBr nebo Br. Prekursor  $M^+$  poskytuje přednostně fragment odpovídající ztrátě dvou Br a v případě fragmentace prekursoru  $[M-2Br]^+$  dochází přednostně ke ztrátě COBr (viz. obrázky č. 1 a 2). Vzhledem k omezenému skenovacímu rozsahu MS Varian 1200 ( $m/z$  10-800) nebylo možné zahrnout detekci BDE 209, který poskytuje významné přechody  $m/z$  959  $\rightarrow$  799,  $m/z$  799  $\rightarrow$  692 a  $m/z$  799  $\rightarrow$  640. Přechod z prekursoru  $m/z$  799 byl detekovatelný, ale vykazoval nízkou stabilitu.

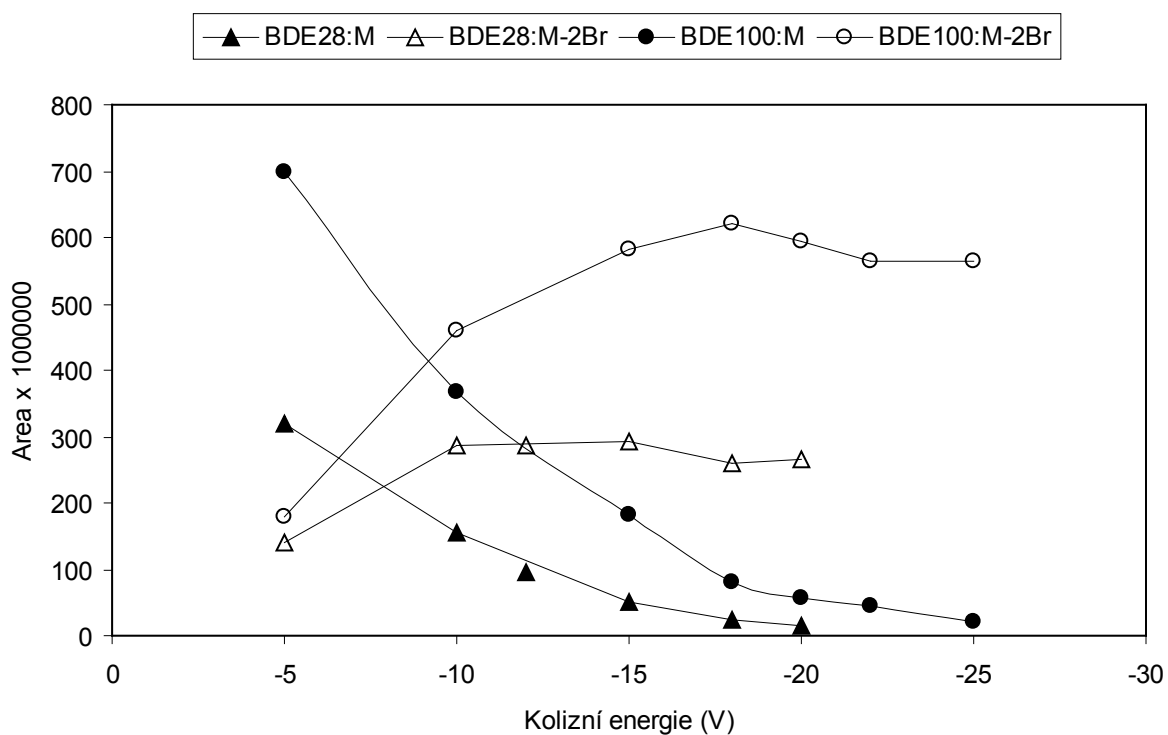


Obrázek č. 1. Produktové spektrum molekulového iontu BDE 100.

Pro každý BDE kongener byla optimalizována kolizní energie při tlaku argonu v kolizní cele 2,2 mTorr, což je hodnota tlaku argonu optimalizovaná a používaná pro analýzy ostatních POP. Optimální kolizní energie byla taková, při které byl zaznamenán maximální výtěžek produktových iontů a významný pokles intenzity prekursoru. Na obrázku č. 3 jsou uvedeny příklady optimalizace kolizní energie BDE28 a BDE100. Souhrn optimalizovaných MS/MS parametrů včetně kolizních energií pro všechny sledované BDE je uveden v tabulkách č.1 a 2.



Obrázek č. 2. Produktové spektrum fragmentového iontu  $[M-2Br]^-$  BDE 100.



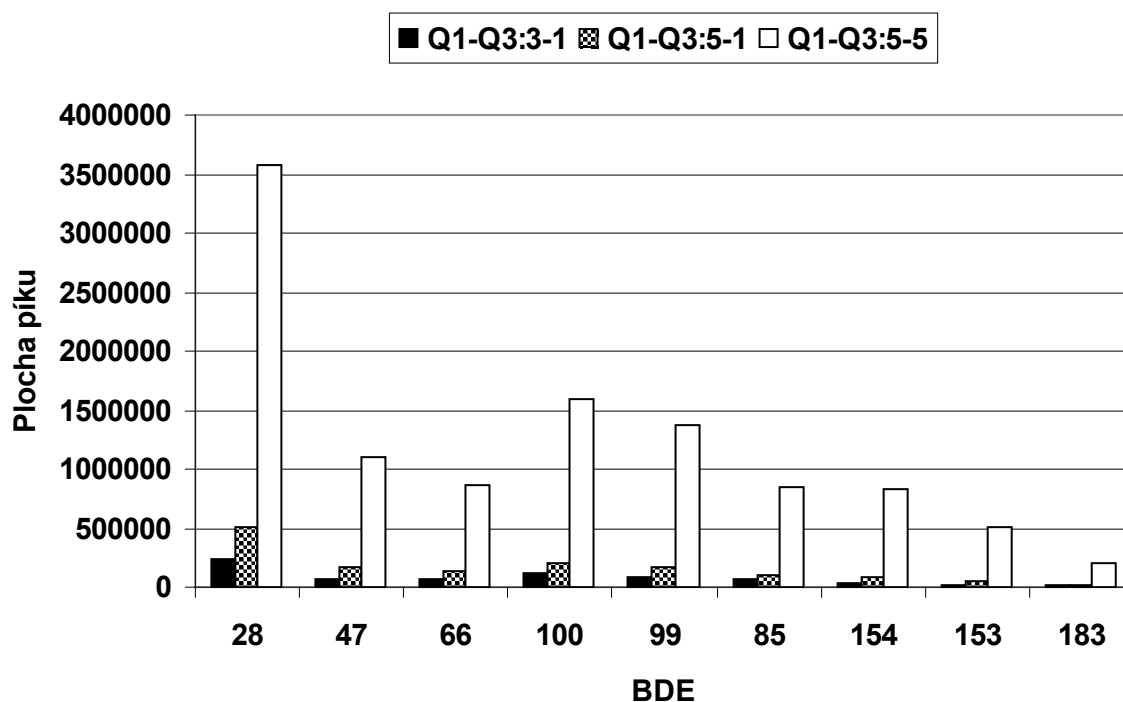
Obrázek č. 3. Závislost výtěžku produktových iontů a poklesu prekursoru BDE 28 a BDE 100 na kolizní energii.

**Tabulka č. 1. Parametry pro MS/MS stanovení nativních BDE.**

| BDE  | Prekursor 1<br>M <sup>-</sup> | Produkt 1<br>[M-2Br] <sup>-</sup> | Kolizní E1<br>(V) | Prekursor 2<br>[M-2Br] <sup>-</sup> | Produkt 2<br>[M-CO3Br] <sup>-</sup> | Kolizní E2<br>(V) | Poměr<br>produktů |
|------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 3 Br | 406                           | 246                               | - 15              | 248                                 | 139                                 | - 25              | 2,6               |
| 4 Br | 486                           | 326                               | - 15              | 326                                 | 217                                 | - 25              | 0,60/0,80         |
| 5 Br | 564                           | 404                               | - 18              | 404                                 | 297                                 | - 28              | 0,50/0,50/0,52    |
| 6 Br | 644                           | 484                               | - 22              | 484                                 | 375                                 | - 35              | 0,46/0,39         |
| 7 Br | 722                           | 562                               | - 25              | 562                                 | 455                                 | - 33              | 0,47              |

**Tabulka č. 2. Parametry pro MS/MS stanovení značených BDE.**

| BDE  | Prekursor 1<br>M <sup>-</sup> | Produkt 1<br>[M-2Br] <sup>-</sup> | Kolizní E1<br>(V) | Prekursor 2<br>[M-2Br] <sup>-</sup> | Produkt 2<br>[M-CO3Br] <sup>-</sup> | Kolizní E2<br>(V) | Poměr<br>produktů |
|------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|
| 3 Br | 418                           | 258                               | - 15              | 260                                 | 150                                 | - 28              | 2,2               |
| 4 Br | 498                           | 338                               | - 15              | 338                                 | 228                                 | - 28              | 0,62/0,39         |
| 5 Br | 576                           | 416                               | - 20              | 416                                 | 308                                 | - 28              | 0,46              |
| 6 Br | 656                           | 496                               | - 22              | 496                                 | 386                                 | - 30              | 0,43/0,35/0,29    |
| 7 Br | 734                           | 574                               | - 25              | 574                                 | 466                                 | - 33              | 0,45              |

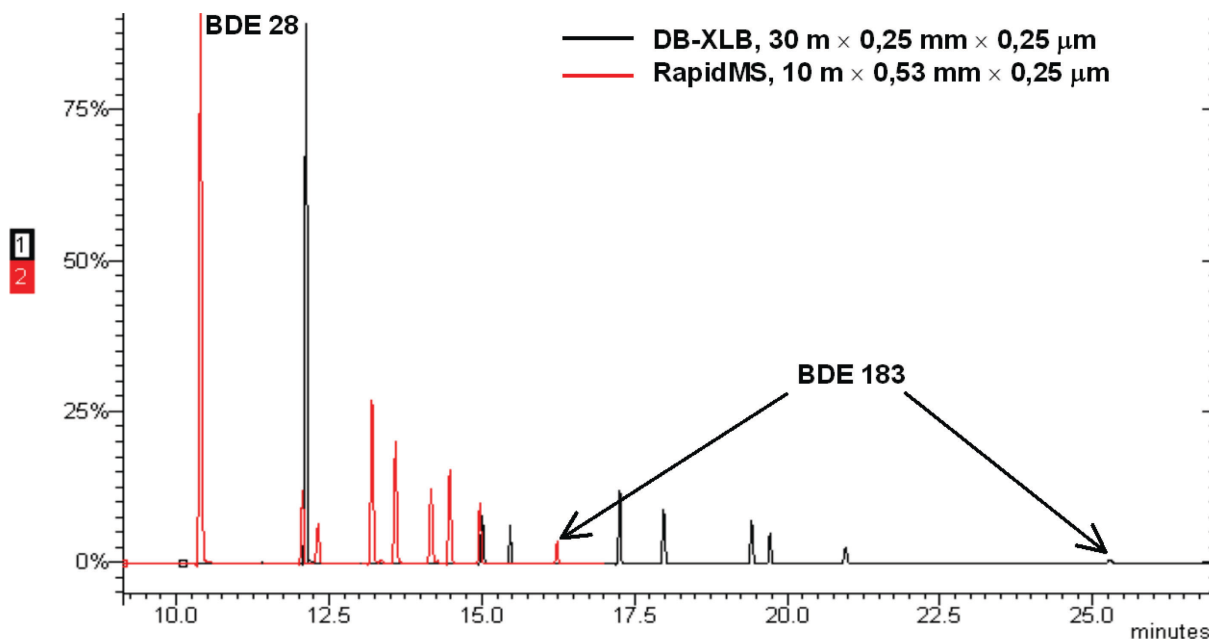


**Obrázek č. 4. Závislost odezvy detektoru na nastavení rozlišení MS.**

LRMS standardně pracují s jednotkovým hmotnostním rozlišením. Avšak při analýze PBDE lze pracovat s rozlišením horším za účelem zvýšení citlivosti detekce. Tento ústupek je možné si dovolit díky vysoké molekulové hmotnosti PBDE ( $m/z$  406-959) a vysoké selektivitě MS/MS přechodu PBDE (ztráta 2Br a COBr). Při hmotnostním rozlišení 5 kvadrupól nefiltruje jeden izotop z iontového klastru BDE, které jsou v případě výšebromovaných difenyletherů velice bohaté, ale separuje tři izotopy najednou, které v kolizní cele fragmentují a ze vzniklého klastru produktových iontů separuje třetí kvadrupól tři ionty, které jsou propouštěny na detektor. Při hmotnostním rozlišení 5 bylo pozorováno průměrně 20% zvýšení odezvy kongenerů BDE oproti standardnímu nastavení (viz. obrázek č. 4).

### 3.2.2 Nízkotlaká GC

Nízkotlaká (LPGC) nebo také vakuová plynová chromatografie je jeden z přístupů umožňující zrychlení GC analýz kontaminantů v environmentálních maticích a potravinách. Tento chromatografický systém se skládá z krátké předkolony (0,5 m – 1 m × 0,10 mm i.d.), která se instaluje do injektoru. Předkolona je spojena s krátkou analytickou kolonou (10 m × 0,53 mm i.d.), která umožňuje vyšší lineární rychlost nosného plynu a je spojena s MS detektorem (8).



**Obrázek č. 5. Porovnání chromatografické separace PBDE na konvenční (DB-XLB) a LPGC koloně (RapidMS).**

Přestože dochází ke snížení separační účinnosti GC, vyznačuje se tato technika řadou výhodných aspektů. Díky zvýšené lineární rychlosti nosného plynu a krátké koloně je možné zkrátit dobu analýzy 3 × až 5 × při teplotně programované eluci. Technika je vhodná pro teplotně labilní látky (BDE 209), neboť umožňuje snížení elučních teplot o (30 – 60) °C. Vzhledem ke zlepšení tvaru píku při LPGC oproti konvenční GC dochází ke zvýšení citlivosti stanovení a zároveň ke snížení detekčních limitů (8).

V laboratoři ÚKZÚZ byla použita komerčně dostupná kolona RapidMS (Varian). Významné snížení retenčních časů lze pozorovat zejména pro výše vroucí sloučeniny. Celková doba analýzy 9 sledovaných kongenerů BDE při průtoku 1,2 ml/min je 25 min (viz. obrázek č. 5). Zároveň došlo při tomto nastavení ke zvýšení citlivosti stanovení těchto látek (viz. kapitola č. 3.2.3). Průtok nosného plynu ovlivňuje významně tlak v MS. Při výrazném zvýšení průtoku (> 5 ml/min) dochází k překročení čerpací kapacity pumpy a významně se snižuje životnost filamentu. Při optimálním nastavení LPGC-MS systému je vhodné pracovat s průtoky do 2 ml/min.

### 3.2.3 Limity metody

Za optimalizovaných podmínek LPGC-MS/MS byly stanoveny různými přístupy detekční a kvantifikační limity metody stanovení PBDE (viz. tabulka č. 3). Z poměru signálu k šumu odečteného ze standardního roztoku o koncentraci 1 ng/ml byly získány nadhodnocené limity. Analýzou procesních blanků byly získány hodnoty LOD (0,034 – 0,085) ng/g a LOQ (0,05 – 0,10) ng/g. V LIMS byla nastavena mez stanovitelnosti 0,1 ng/g pro všechny BDE kongenery a ta odpovídá nejnižšímu kalibračnímu bodu, 1 ng/ml.

**Tabulka č. 3. Souhrn detekčních a kvantifikačních limitů pro stanovení BDE kongenerů.**

| <b>BDE</b> | <b>LOQ<br/>S/N<br/>1 ng/ml</b> | <b>LOD<br/>IUPAC-3s-<br/>Effi</b> | <b>LOQ<br/>IUPAC-10s-<br/>Effi</b> | <b>LOD<br/>IUPAC-3s-<br/>EN 15741</b> | <b>LOQ<br/>IUPAC-6s-<br/>EN 15741</b> | <b>MS<br/>LIMS<br/>ng/g</b> |
|------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 28         | 0,0008                         | 0,041                             | 0,10                               | 0,041                                 | 0,07                                  | <b>0,10</b>                 |
| 47         | 0,0004                         | 0,081                             | 0,14                               | 0,081                                 | 0,10                                  | <b>0,10</b>                 |
| 66         | 0,0013                         | 0,044                             | 0,11                               | 0,044                                 | 0,07                                  | <b>0,10</b>                 |
| 100        | 0,0010                         | 0,041                             | 0,09                               | 0,042                                 | 0,06                                  | <b>0,10</b>                 |
| 99         | 0,0012                         | 0,085                             | 0,11                               | 0,085                                 | 0,10                                  | <b>0,10</b>                 |
| 85         | 0,0014                         | 0,041                             | 0,10                               | 0,041                                 | 0,07                                  | <b>0,10</b>                 |
| 154        | 0,0007                         | 0,034                             | 0,06                               | 0,034                                 | 0,05                                  | <b>0,10</b>                 |
| 153        | 0,0011                         | 0,044                             | 0,10                               | 0,044                                 | 0,07                                  | <b>0,10</b>                 |
| 183        | 0,0012                         | 0,038                             | 0,08                               | 0,038                                 | 0,06                                  | <b>0,10</b>                 |

### 3.2.4 Analýza zrychleným postupem

Zrychlený postup (3.1.3.1) byl ověřen pomocí certifikovaného referenčního materiálu WMF-01(lyofilizovaná rybí tkáň). Tento postup byl porovnán se standardním postupem zahrnujícím kombinovanou silikagelovou kolonu. Oba postupy přípravy poskytovaly shodné výsledky (viz. tabulka č. 4). K vyhodnocení správnosti a nejistot metody byla použita vícenásobná měření WMF-01 (viz. tabulka č. 5). Metoda poskytovala správné výsledky s relativní rozšířenou nejistotou (3,81 – 8,49) %. V LIMS byla pro analýzu PBDE v krmivech nastavena rozšířená nejistota 20 % popisující zvýšenou odchylku paralelních stanovení reálných vzorků.

**Tabulka č. 4. Porovnání dvou metod přípravy pomocí WMF-01.**

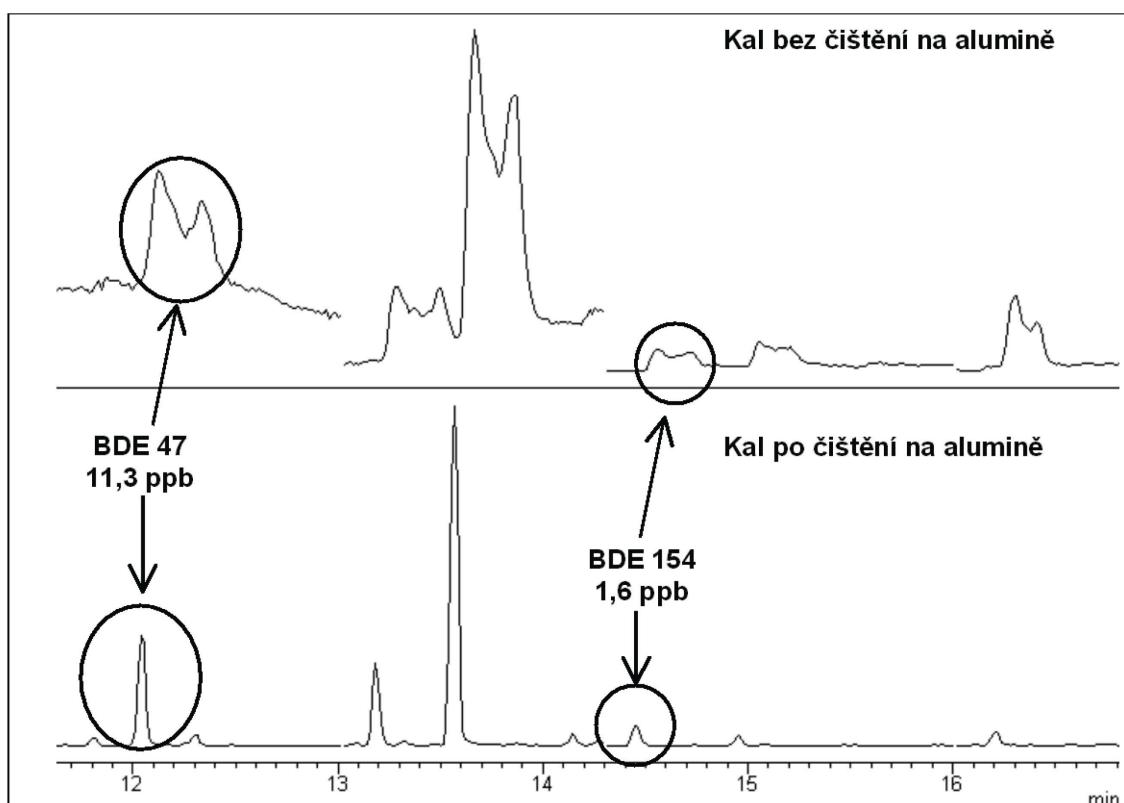
| BDE | Správnost metody<br>1 – třepání s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2 – silikagelová kolona |                                |             |            | Hypotéza<br>o správnosti |
|-----|--|--------------------------------|-------------|------------|--------------------------|
|     | Naměřená<br>hodnota 1<br>(ppb)   | Naměřená<br>hodnota 2<br>(ppb) | t-vypočtený | t-kritický |                          |
| 28  | 3,298  | 3,303                          | 0,060       | 2,776      | Přijata                  |
| 47  | 145,96   | 142,93                         | 0,728       | 2,776      | Přijata                  |
| 100 | 36,22  | 36,20                          | 0,042       | 2,776      | Přijata                  |
| 99  | 39,19  | 37,52                          | 2,050       | 2,776      | Přijata                  |
| 154 | 20,73  | 20,38                          | 1,196       | 2,776      | Přijata                  |
| 153 | 16,05  | 15,65                          | 1,184       | 2,776      | Přijata                  |
| 183 | 0,469  | 0,458                          | 0,722       | 2,776      | Přijata                  |

**Tabulka č. 5. Statistické vyhodnocení správnosti metody pomocí WMF-01.**

| BDE | Správnost metody<br>Referenční materiál WMF-01 |                   |                               |                   |                  | Hypotéza o |           |
|-----|--|-------------------|-------------------------------|-------------------|------------------|------------|-----------|
|     | Naměřená<br>hodnota<br>(ppb)                   | Přesnost<br>(ppb) | Referenč.<br>hodnota<br>(ppb) | Přesnost<br>(ppb) | Výtěžnost<br>(%) | Správnosti | Přesnosti |
| 28  | 3,34   | 0,12              | 3,124                         | 0,145             | 108              | Přijata    | Přijata   |
| 47  | 145,4  | 4,8               | 123,2                         | 12,4              | 118              | Přijata    | Přijata   |
| 100 | 36,42  | 0,66              | 35,87                         | 7,25              | 102              | Přijata    | Přijata   |
| 99  | 38,4   | 1,3               | 37,50                         | 2,11              | 102              | Přijata    | Přijata   |
| 154 | 20,39  | 0,44              | 19,79                         | 1,44              | 103              | Přijata    | Přijata   |
| 153 | 15,78  | 0,37              | 17,04                         | 4,00              | 93               | Přijata    | Přijata   |
| 183 | 0,449  | 0,019             | 0,532                         | 0,200             | 84               | Přijata    | Přijata   |

### 3.2.5 Analýza komplexních matic

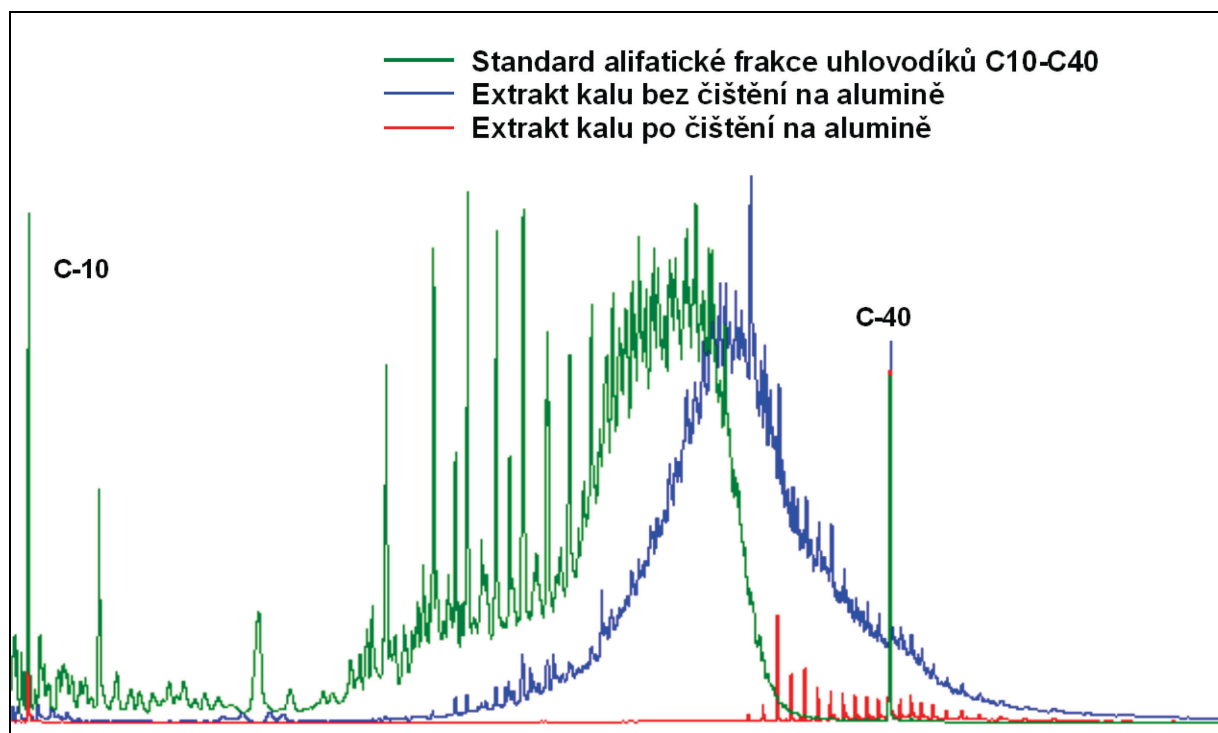
Postup pro komplexní matrice je popsán v metodě ISO 22032 a zahrnuje kombinovanou silikagelovou a aluminiovou kolonu. Díky citlivosti MS/MS detekce nebylo nutné vycházet z (5 – 10)g navážek jak doporučuje ISO norma, ale postup byl optimalizován na navážku 1 g. Následně byly miniaturizovány čisticí kroky, což mělo za důsledek úsporu chemikálií a rozpouštědel při zachování účinnosti čisticího postupu. Navážky sorbentů pro silikagelovou kombinovanou kolonu byly poloviční (18 g) oproti koloně navržené v ISO 22 032 a stejně také objemy elučních rozpouštědel. Pro aluminiovou kolonu byla navážka sorbentu 5 g, tj. 1/5 oproti ISO postupu a stejně byly zmenšeny také objemy elučních rozpouštědel. Sorbetem byl zásaditý  $\text{Al}_2\text{O}_3$  90, aktivita Super I (0,063 – 0,200) mm, aktivovaný při 600 °C/24 h a uchovávaný při 130 °C. Výtěžnost miniaturizovaného postupu byla ověřena pomocí standardů a referenčních materiálů.



Obrázek č. 6. Vliv minerálních olejů na chromatografickou separaci PBDE.

Významný interferent při analýze čistírenských kalů je frakce minerálních olejů, která negativně ovlivňuje chromatografickou separaci PBDE a zároveň snižuje ionizační účinnost při MS detekci (viz. obrázek č. 6). Pro odstranění této frakce se používá například adsorpční kolonová chromatografie na alumině. Účinnost čisticího kroku separace na alumině byla

stanovena technikou GC-FID založenou na ISO CD16703:2000 ve spolupráci s Finským environmentálním institutem (SYKE) v Helsinkách. Pomocí 5 g bazické aluminy bylo možné odstranit 98 % minerálních olejů při navážce 1 g vzorku. Zbývající 2% podíl obsahoval převážně vyšší alifatické uhlovodíky, což bylo patrné z chromatografických záznamů extraktů ošetřených různými čistícími postupy (obrázek č. 7).



**Obrázek č. 7. Porovnání GC-FID chromatografických záznamů extraktů kalů ošetřených různými čistícími postupy.**

Dalším kritickým interferentem při analýze čistírenských kalů, kompostů a kontaminovaných sedimentů je elementární síra, kterou lze z extraktu odstranit různými způsoby, například reakcí s elementární mědí nebo silikagelem modifikovaným  $\text{AgNO}_3$ . Účinnost zmiňovaných postupů byla vyhodnocena analýzou obsahu síry v různě ošetřených extraktech metodou OES-ICP (18). Z naměřených dat vyplývá, že obsah sírných sloučenin po selektivních ošetření extraktu (0,5 g elementární mědi nebo 2 g silikagelu modifikovaného  $\text{AgNO}_3$ ) klesl pod hodnotu detekčního limitu metody stanovení nebo odpovídal hodnotě slepého pokusu (viz. tabulka č. 6).

**Tabulka č. 6. Analýza síry OES-ICP v extraktech pro PBDE stanovení.**

| Vzorek   | 3232    | 3316 | 3331  |
|--|---------|------|-------|
| Matrice  | Kompost | Kal  | Kal   |
| Celkový obsah S (ppm)                                | 5625    | 9009 | 15680 |
| Obsah S před selektivním ošetřením (ppm)             | 153     | 2243 | 3871  |
| Obsah S před selektivním ošetřením (%)               | 3       | 25   | 25    |
| Obsah S po ošetření 2 g AgNO <sub>3</sub> /sil (ppm) | < BL    | 5,4  | 3,7   |
| Obsah S po sel. ošetření 0,5 g Cu (ppm)              | < BL    | < BL | 4,3   |
| Blank = 5,2 ppm, MDL = 8,3 ppm, MQL = 27 ppm         |         |      |       |

K vyhodnocení správnosti metody stanovení PBDE v komplexních matricích byla použita vícenásobná měření referenčního materiálu SRM 2585 (domovní prach). Nejprve byly s využitím tohoto referenčního materiálu porovnány postupy přípravy (čištění na kombinované silikagelové koloně a čištění na kombinované silikagelové koloně s následným čištěním na alumině). Z vyhodnocení v programu Effvalidation vyplynula shodnost výsledků získaných oběma postupy přípravy (viz. tabulka č. 7). Správnost stanovení byla prokázána u všech validovaných parametrů (viz. tabulka č. 8). Přesnost stanovení byla zamítnuta u BDE 85 a BDE 154 z důvodu velice nízké standardní nejistoty SRM 2585, přestože dosažená přesnost stanovení BDE 85 6,0 % a BDE 154 1,5 % byla porovnatelná s přesností ostatních validovaných BDE kongenerů.

**Tabulka č. 7. Porovnání dvou metod přípravy SRM 2585.**

| BDE | Správnost metody<br>1 – silikagelová kolona, 2 – silikagelová kolona + alumina |                                |             |            | Hypotéza<br>o správnosti |
|-----|--|--------------------------------|-------------|------------|--------------------------|
|     | Naměřená<br>hodnota 1<br>(ppb)   | Naměřená<br>hodnota 2<br>(ppb) | t-vypočtený | t-kritický |                          |
| 28  | 46,64  | 46,16                          | 1,780       | 2,776      | Přijata                  |
| 47  | 521,08   | 521,08                         | 0,000       | 2,776      | Přijata                  |
| 66  | 35,14  | 34,53                          | 0,346       | 2,776      | Přijata                  |
| 100 | 151,54   | 154,23                         | 0,727       | 2,776      | Přijata                  |
| 99  | 880,08   | 889,22                         | 0,779       | 2,776      | Přijata                  |
| 85  | 40,54  | 41,53                          | 0,449       | 2,776      | Přijata                  |
| 154 | 81,77  | 81,54                          | 1,886       | 2,776      | Přijata                  |
| 153 | 128,11   | 126,74                         | 1,446       | 2,776      | Přijata                  |
| 183 | 45,78  | 44,99                          | 1,237       | 2,776      | Přijata                  |

**Tabulka č. 8. Statistické vyhodnocení metody pro komplexní matrice.**

| BDE | Správnost metody<br>Referenční materiál SRM 2585 |                   |                               |                   |                  | Hypotéza o |           |
|-----|--|-------------------|-------------------------------|-------------------|------------------|------------|-----------|
|     | Naměřená<br>hodnota<br>(ppb)                     | Přesnost<br>(ppb) | Referenč.<br>hodnota<br>(ppb) | Přesnost<br>(ppb) | Výtěžnost<br>(%) | Správnosti | Přesnosti |
| 28  | 46,40  | 0,40              | 46,9                          | 2,2               | 99               | Přijata    | Přijata   |
| 47  | 521,1  | 2,6               | 497                           | 23                | 105              | Přijata    | Přijata   |
| 66  | 34,8   | 1,9               | 29,5                          | 3,1               | 118              | Přijata    | Přijata   |
| 100 | 152,9  | 4,3               | 145,0                         | 5,5               | 105              | Přijata    | Přijata   |
| 99  | 885  | 14                | 892                           | 27                | 99               | Přijata    | Přijata   |
| 85  | 41,0   | 2,5               | 43,8                          | 1,7               | 94               | Přijata    | Zamítnuta |
| 154 | 81,7   | 1,2               | 83,5                          | 1,0               | 98               | Přijata    | Zamítnuta |
| 153 | 127,4  | 1,3               | 119,0                         | 4,5               | 107              | Přijata    | Přijata   |
| 183 | 45,38  | 0,82              | 43,0                          | 1,8               | 106              | Přijata    | Přijata   |

V poslední fázi testování metody stanovení PBDE v komplexních maticích proběhlo mezilaboratorní porovnání, kterého se účastnila laboratoř ÚKZÚZ, NRL-RO Brno a laboratoř SYKE v Helsinkách. Pro porovnání byl zvolen vzorek kalu 3316/09 připravený v laboratoři

ÚKZÚZ. Výsledky obou laboratoří byly vyhodnoceny t-testem v programu Effivaldation 3.0, který potvrdil, že obě laboratoře poskytují stejné výsledky (viz. tabulka č. 9). Vzorek kalu bude dále v laboratoři veden jako IRM3316 pro kontrolu stanovení PBDE.

**Tabulka č. 9. Mezilaboratorní porovnání stanovení PBDE ve vzorku kalu 3316/09.**

| BDE | Správnost metody<br>1 – ÚKZÚZ, 2 – SYKE |                          |             |            |                       |
|-----|---|--------------------------|-------------|------------|-----------------------|
|     | Naměřená hodnota 1 (ppb)                | Naměřená hodnota 2 (ppb) | t-vypočtený | t-kritický | Hypotéza o správnosti |
| 28  | 0,78                                    | 0,77                     | 0,218       | 2,776      | Přijata               |
| 47  | 13,6                                    | 14,0                     | 0,469       | 2,776      | Přijata               |
| 66  | 0,56                                    | 0,47                     | 0,874       | 2,776      | Přijata               |
| 100 | 3,5                                     | 3,0                      | 1,292       | 2,776      | Přijata               |
| 99  | 17,1                                    | 17,1                     | 0,020       | 2,776      | Přijata               |
| 85  | 0,73                                    | 0,80                     | 1,514       | 2,776      | Přijata               |
| 153 | 2,4                                     | 1,9                      | 1,422       | 2,776      | Přijata               |
| 183 | 4,7                                     | 3,9                      | 1,256       | 2,776      | Přijata               |

#### 4 Závěr

V laboratoři ÚKZÚZ, NRL-RO Brno byla v rámci této práce úspěšně optimalizována metoda LPGC-MS/MS pro stanovení vybraných kongenerů BDE. Při optimalizaci MS/MS podmínek byly nejprve vybrány charakteristické fragmentace pro PBDE, optimalizována kolizní energie sekundární fragmentace a stanoveny poměry produktových iontů. Následovalo stanovení limitů sledovaných PBDE při použití optimalizované LPGC-MS/MS metody. Dále byly optimalizovány čisticí postupy pro jednotlivé matrice. V závěru byly stanoveny validační parametry metody s využitím certifikovaných referenčních materiálů a proběhlo úspěšně mezilaboratorní porovnání stanovení PBDE ve vzorku čistírenského kalu. V budoucnu bude metoda rozšířena také o stanovení BDE 209, který bude nutné analyzovat pomocí GC-MS systému s dostatečným skenovacím rozsahem (Thermo ITQ 1100).

## Literatura

1. <http://www.pops.int>
2. Birnbaum L.S., Staskal, D.F. Brominated Flame retardant: Cause for concern?, *Environ Health Perspect*, **2004**, *112* (1), 9–17.
3. Kosubová, P. Stanovení polybromovaných POP metodou GC-MS (literární rešerše). Závěrečná zpráva VÚ A3/2007.
4. ISO 22032:2006 Water quality – Determination of selected polybrominated diphenyl ethers in sediment and sewage sludge – Method using extraction and gas chromatography/mass spectrometry, TC 147/SC 2.
5. EPA method 1614 – Brominated diphenyl ethers in water, soil, sediment and tissue by HRGC/HRMS, U.S. EPA Washington, DC, **2007**, EPA-821-R-07-005.
6. de Boer, J., et al. Method for the analysis of polybrominated diphenylethers in sediments and biota, *Trac Trends Anal Chem*, **2001**, *20* (10), 591–599.
7. Covaci, A., et al. Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples – a review. *Environ Int*, **2003**, *29*, 735–756.
8. Ravindra, K., et al. Low-pressure gas chromatography: Recent trends and developments, *Trends Anal Chem*, **2008**, *27* (4), 291–303.
9. de Boer, J., Wells, D.E. Pitfalls in the analysis of brominated flame retardants in environmental, human and food samples including results of three international interlaboratory studies, *Trac Trends Anal Chem*, **2006**, *25*, 364.
10. Grabic, R., et al. Stanovení polybromovaných difenyletherů metodou GC-MS/MS, *Chem Listy*, **2002**, *96*, 809–812.
11. Pirard, C., et al. New strategy for comprehensive analysis of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls by gas chromatography coupled with mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **2003**, *998*, 169–181.
12. Naert, C., van Peteghem, C. Development and application of a simplified clean-up procedure for the determination of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in horse fat by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS), *Food Additiv Contam*, **2007**, *24*(9), 1018–1025.
13. Baker, D., Ragsdale, J.D. Confirmation and quantitation of polybrominated biphenyls (PBBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by MS/MS, Thermo Scientific Application note: 10042.
14. Brittain, R. Fast, sensitive, and selective determination of polybrominated diphenylethers by tandem mass spectrometry, *Varian GC/MS Application note: 75*, **2004**.
15. Příručka kvality NRL-RO Brno, ÚKZÚZ, **2009**, SOP č. 40, Stanovení PBDE metodou GC-MS/MS.
16. Jednotné pracovní postupy – Zkoušení krmiv, **2009**, metoda č. 595, Stanovení PBDE metodou GC-MS/MS.
17. SYKE Laboratorio, Helsinki, In-house method K391, solid/liquid (GC/FID), based on ISO CD16703:2000.
18. Příručka kvality NRL-RO Brno, ÚKZÚZ, **2009**, SOP č. 4, Stanovení obsahu prvků metodou OES ICP(P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Zn, Ni, Co, Pb, Cd, Be, Cr, Al, Fe, Mn, As, S, Mo, V, B).

# Stanovení obsahu 3-methylpyrazolu v hnojivech

*Radmila Varmužová, Pavel Šíma, Iva Křivánková*

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

radmila.varmuzova@ukzuz.cz

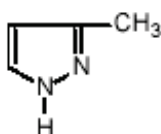
## 1 Úvod

Ztráty dusíku z půdy jsou významným faktorem, který ovlivňuje ekonomiku zemědělských podniků a současně nepříznivě zasahuje do kvality životního prostředí (1).

Půda je složitý komplex, v němž probíhají biochemické procesy tvorby různých forem dusíku. Nitrifikace je biochemický proces oxidace mineralizací vzniklého amonného dusíku  $\text{NH}_4$  na dusičnanový iont  $\text{NO}_3$ . Dusičnanový iont je přes kořeny a následnou redukci přeměňován na dusík organický, ale také může být za určitých podmínek snadno z půdy vyplavován a významně tak poškozovat životní prostředí. V důsledku rozvoje vědeckotechnických poznatků vznikalo mnoho agrotechnických postupů a technologií, jak ztráty dusíku minimalizovat. Jednou z možností bylo posunout průběh nitrifikace ve prospěch tvorby amonného dusíku a snížit tak možnost vyplavení dusičnanového dusíku z půdy, neboť amonný dusík je pevněji vázán do sorpčního půdního komplexu. Tak byly vyvinuty inhibitory nitrifikace, které snižují ztráty dusíku především z organických i anorganických hnojiv. Jednou z těchto látek je 3-methylpyrazol (2) a cílem této práce bylo ověřit jeho kvantitativní stanovení metodou HPLC (3).

## 2 Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení 3-methylpyrazolu v hnojivech, zejména v močovině a přípravcích s obsahem močoviny.



### **3 Princip**

Vzorek hnojiva se rozpustí ve vodě a stanoví metodou HPLC na reverzní fázi s UV detekcí.

### **4 Chemikálie**

- 4.1 Acetonitril, HPLC grade.
- 4.2 Methanol, HPLC grade.
- 4.3 Destilovaná voda.
- 4.4 Standard 3-methylpyrazolu PIESTERITZ.
- 4.5 Mobilní fáze: 80 % složky A + 20 % složky B.  
Složka A: destilovaná voda (4.3).  
Složka B: acetonitril (4.1).

### **5 Přístroje a pomůcky**

- 5.1 Vysokoučinný kapalinový chromatograf s UV detekcí.
- 5.2 Analytické váhy s přesností 0,1 mg.
- 5.3 Ultrazvuková lázeň.
- 5.4 100ml a 50ml odměrné baňky se zátkami.

### **6 Postup**

#### **6.1 Příprava vzorku**

Do 100ml odměrné baňky se odváží asi 5 g zhomogenizovaného vzorku s přesností 0,1 mg. Přidá se asi 80 ml vody, vzorek se rozpustí v ultrazvukové lázni a doplní vodou po značku. Vzorek se 50 × zředí, aby byl předpokládaný obsah 3-methylpyrazolu asi 8 mg/l.

## 6.2 Příprava kalibračních roztoků

### 6.2.1 Základní standardní roztok

Do 100ml odměrné baňky se odváží 1 g s přesností 0,1 mg standardu 3-methylpyrazolu a rozpustí se ve vodě (4.3).

### 6.2.2 Pracovní standardní roztok

Pro sestavení kalibrační křivky se používá základní standardní roztok (6.2.1) zředěný  $100 \times$  vodou (4.3), který obsahuje 0,01 mg/ml 3-methylpyrazolu.

### 6.2.3 Kalibrační roztoky

Do sady 100ml odměrných baněk se postupně pipetuje (0,25; 0,5; 1,25; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 4,5) ml pracovního roztoku (6.2.2) a doplní se po značku vodou. Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentracím (1,0; 2,0; 5,0; 8,0; 10,0; 12,0; 16,0; 18,0)  $\mu\text{g/ml}$  3-methylpyrazolu. Kalibrační roztoky se postupně nanášejí na chromatografickou kolonu. Z průměrných hodnot ploch píků odpovídajících jednotlivých kalibračním roztokům se sestrojí kalibrační křivka.

## 6.3 Chromatografické podmínky HPLC stanovení

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Kolona                        | SYMMETRY SHIELD TM RP 8, 5 $\mu\text{m}$ ,<br>150 mm $\times$ 3,9 mm, Waters |
| Mobilní fáze                  | Viz. 4.5   |
| Průtok                        | 1,0 ml/min   |
| Teplota                       | Laboratorní  |
| Objem nástřiku                | 20 $\mu\text{l}$   |
| Retenční čas 3-methylpyrazolu | Pro uvedenou kolonu $\approx$ 3 min  |
| Doba analýzy                  | Pro uvedenou kolonu 7,0 min  |
| Detekce                       | Uv detektor, vlnová délka 214 nm   |

## 7 Výpočet

Obsah 3-methylpyrazolu (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu

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

- c koncentrace 3-methylpyrazolu ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu (mg/l),  
V objem extrakčního činidla (ml),  
R ředění vzorku,  
m<sub>a</sub> hmotnost zkušebního vzorku (g).

## 8 Interpretace validačních parametrů

Pro vyhodnocení validačních parametrů byl použit software Effvalidation 3,0.

### 8.1 Kriteria separace

Dobrá chromatografická separace má splňovat následující kriteria:

**Kapacitní faktor**, který charakterizuje retenci analytu vzhledem k mrtvému objemu kolony má být podle FDA větší než 2.

**Faktor asymetrie**, který charakterizuje chvostování píků má být z důvodu správné integrace píku menší než 2.

**Počet teoretických pater**, který charakterizuje separační schopnosti použité chromatografické kolony má být větší než 2000.

Za uvedených chromatografických podmínek splňuje separace všechna tato kriteria a zjištěné hodnoty jsou uvedené v tabulce č. 1.

**Tabulka č. 1. Chromatografické podmínky.**

| Kriterium                | Teorie | Experiment |
|--------------------------|--------|------------|
| Kapacitní faktor         | > 2    | 8,921      |
| Faktor symetrie          | < 2,0  | 0,801      |
| Počet teoretických pater | > 2000 | 4154       |

## 8.2 Opakovatelnost - přesnost

Opakovatelnost charakterizuje rozptýlení validované vlastnosti kolem střední hodnoty, které způsobují náhodné chyby. Opakovatelnost byla stanovena z 18 navážek 1 vzorku hnojiva. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2. Stanovení opakovatelnosti.**

|                |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Navážka</b> | <b>1.</b>  | <b>2.</b>  | <b>3.</b>  | <b>4.</b>  | <b>5.</b>  | <b>6.</b>  | <b>7.</b>  | <b>8.</b>  | <b>9.</b>  |
| <b>(mg/kg)</b> | 16245      | 15922      | 16020      | 16308      | 16315      | 16228      | 15796      | 16089      | 15758      |
| <b>Navážka</b> | <b>10.</b> | <b>11.</b> | <b>12.</b> | <b>13.</b> | <b>14.</b> | <b>15.</b> | <b>16.</b> | <b>17.</b> | <b>18.</b> |
| <b>(mg/kg)</b> | 15773      | 15870      | 16136      | 15765      | 16194      | 15609      | 16143      | 16193      | 16138      |

Pro všechny výsledky byla potvrzena hypotéza o normalitě dat a použití Cochranova, Dixonova a Grubsova testu nepotvrdilo přítomnost odlehlých bodů.

**Tabulka č. 2a. Statistické parametry.**

| Obsah                           | Průměr měření | Rel. opakovatelnost (%) |
|---------------------------------|---------------|-------------------------|
| <b>3-methylpyrazolu (mg/kg)</b> | 16028         | 1,37                    |

## 8.3 Správnost

Správnost byla zjištěna testem výtěžnosti přidáním známého množství stanovované látky ke vzorku se známým obsahem (postup A) a dále ke slepému vzorku bez obsahu stanovovaného analytu (Postup B).

Výtěžnost byla vypočtena podle vztahu

$$\text{Re } \alpha(\%) = \frac{c_{\text{exp}}}{c_{\text{teor}}} \times 100$$

$c_{\text{exp}}$  výsledná hodnota obsahu analytu získaná experimentem,

$c_{\text{teor}}$  teoretická hodnota obsahu analytu přidaného do testovacího vzorku.

### 8.3.1 Postup A

K přesně známé navážce vzorku se zjištěným obsahem určované látky byl přidán čistý standard stanovované látky v množství odpovídajícímu (62; 78; 94) % obsahu analytu v původním vzorku. Na každé úrovni se měřilo 3 ×. Mírou správnosti je odchylka průměru nalezeného množství od teoretického množství přídavku vyjádřená v procentech (výtěžnost). Výtěžnost pro 3-methylpyrazolu byla určena jako průměrná výtěžnost ze všech tří úrovní (tab. 3a).

**Tabulka č. 3a1. Správnost -přídavek ke vzorku se zjištěným obsahem určované látky.**

| Popis     | Předloženo<br>(mg/kg) | Nalezeno<br>(mg/kg) | Nalezeno<br>(mg/kg) | Nalezeno<br>(mg/kg) |
|-----------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Hladina 1 | 26033                 | 26119               | 25793               | 25932               |
| Hladina 2 | 28526                 | 28590               | 28783               | 28675               |
| Hladina 3 | 31067                 | 30724               | 31455               | 31047               |

**Tabulka č. 3a2. Statistické parametry.**

| Hladina | Předloženo<br>(mg/kg) | Nalezeno<br>(mg/kg) | Výtěžnost<br>(%) | Přesnost | n | t – vyp. | t – krit. | Hypotéza |
|---------|-----------------------|---------------------|------------------|----------|---|----------|-----------|----------|
| 1       | 26033                 | 25948               | 99,67            | 163,6    | 3 | 0,90     | 4,303     | Přijata  |
| 2       | 28526                 | 28683               | 100,55           | 96,7     | 3 | 2,81     | 4,303     | Přijata  |
| 3       | 31067                 | 31075               | 100,03           | 366,3    | 3 | 0,04     | 4,303     | Přijata  |

### 8.3.2 Postup B

Srávnost byla stanovena testem výtěžnosti přidáním standardních přídavek ke slepému vzorku. Výtěžnost pro 3-methylpyrazolu byla určena jako průměrná výtěžnost ze všech přídavek ke slepému vzorku (tab. 3b).

**Tabulka č. 3b1. Správnost - přídavek ke slepému vzorku.**

| Hladina | Předloženo (mg/kg) | Nalezeno (mg/kg) | Nalezeno (mg/kg) | Nalezeno (mg/kg) |
|---------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1       | 1,0053             | 1,130            | 0,934            | 0,919            |
| 2       | 2,0106             | 1,994            | 2,013            | 1,940            |
| 3       | 5,0265             | 5,049            | 4,973            | 4,945            |
| 4       | 8,0424             | 8,339            | 7,954            | 8,022            |
| 5       | 10,053             | 10,345           | 10,009           | 9,947            |
| 6       | 12,0636            | 12,556           | 12,017           | 11,727           |
| 7       | 16,0848            | 16,318           | 16,116           | 15,688           |
| 8       | 18,0954            | 18,268           | 17,846           | 18,097           |

**Tabulka č. 3b2. Statistické parametry.**

| Hladina | Předloženo (mg/l) | Nalezeno (mg/l) | Výtěžnost (%) | Přesnost | n | t – vyp. | t – krit. | Hypotéza |
|---------|-------------------|-----------------|---------------|----------|---|----------|-----------|----------|
| 1       | 1,0053            | 0,99433         | 98,91         | 0,11773  | 3 | 0,16134  | 4,303     | Přijata  |
| 2       | 2,0106            | 1,98233         | 98,59         | 0,03787  | 3 | 1,29274  | 4,303     | Přijata  |
| 3       | 5,0265            | 4,98900         | 99,25         | 0,05381  | 3 | 1,20696  | 4,303     | Přijata  |
| 4       | 8,0424            | 8,10500         | 100,78        | 0,20548  | 3 | 0,52767  | 4,303     | Přijata  |
| 5       | 10,053            | 10,10033        | 100,47        | 0,21414  | 3 | 0,38285  | 4,303     | Přijata  |
| 6       | 12,0636           | 12,10000        | 100,30        | 0,42069  | 3 | 0,14987  | 4,303     | Přijata  |
| 7       | 16,0848           | 16,04067        | 99,73         | 0,32169  | 3 | 0,23763  | 4,303     | Přijata  |
| 8       | 18,0954           | 18,07033        | 99,86         | 0,21226  | 3 | 0,20455  | 4,303     | Přijata  |

## 8.4 Linearita a rozsah metody

Linearita byla určena z hodnot naměřených v kalibrační přímce uvedených v tabulce č. 4. Linearita kalibrační křivky byla ověřena v rozsahu koncentrací (1 – 18) mg/l v 8 kalibračních hladinách (1; 2; 5; 8; 10; 12; 16; 18) mg/l a každý kalibrační bod byl připraven 3 ×. Požadavek na linearitu křivky je dán korelačním koeficientem s hodnotou od 0,99 do 1,0 a vyhodnocením kalibrační křivky pomocí QC testu. Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 4a.

**Tabulka č. 4. Linearita stanovení 3-methylpyrazolu.**

| Hladina | Koncentrace (mg/l) | Plocha 1 | Plocha 2 | Plocha 3 | Průměr ploch |
|---------|--------------------|----------|----------|----------|--------------|
| 1       | 1,0053             | 82,27    | 69,23    | 68,24    | 73,25        |
| 2       | 2,0106             | 139,56   | 140,81   | 135,97   | 138,78       |
| 3       | 5,0265             | 342,15   | 337,12   | 335,26   | 338,17       |
| 4       | 8,0424             | 560,40   | 534,85   | 539,38   | 544,88       |
| 5       | 10,053             | 693,42   | 671,15   | 667,05   | 677,21       |
| 6       | 12,0636            | 840,11   | 804,34   | 785,08   | 809,84       |
| 7       | 16,0848            | 1089,61  | 1076,23  | 1047,80  | 1071,22      |
| 8       | 18,0954            | 1218,94  | 1190,94  | 1207,60  | 1205,83      |

**Tabulka č. 4a. Statistické parametry.**

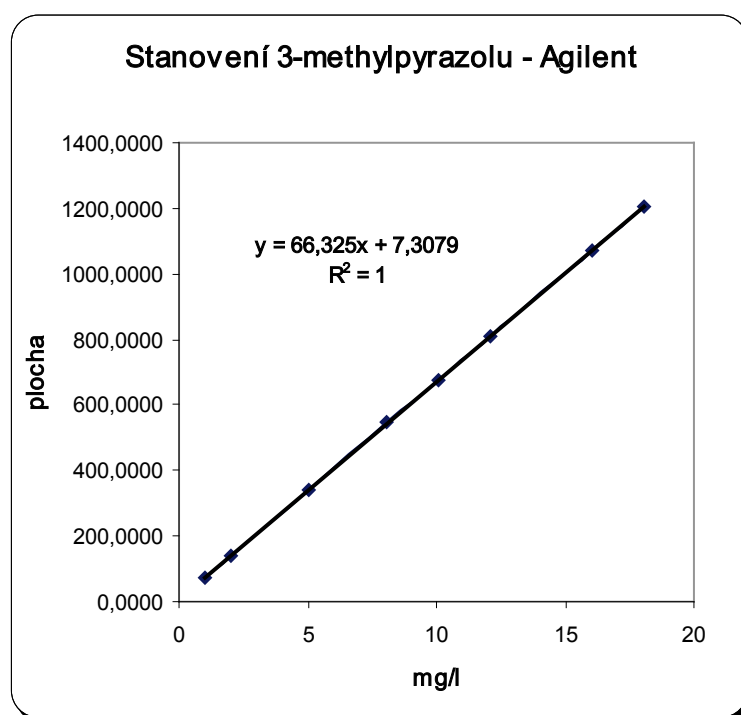
| Vypočtený korelační koeficient | Testovaný korelační koeficient | Vypočtený QC | Testovaný QC | Hypotéza |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------|--------------|----------|
| 0,99998                        | 0,99                           | 0,46         | 5,00         | Přijata  |

Na základě hodnot korelačního a QC koeficientu byla prokázána linearita metody.

## 8.5 Citlivost

Citlivost metody je definována jako rozdíl v koncentraci analytu, který odpovídá nejmenšímu rozdílu, jenž může být detekován při odezvě instrumentace metody. Matematicky se jedná o směrnici kalibrační přímky. V tabulce č. 4 jsou uvedeny naměřené hodnoty kalibrační přímky. Kalibrační přímka je uvedena na obr. 1.

Citlivost analytické metody je dána směrnici kalibrační křivky a pro 3-methylpyrazol odpovídá 66,325 (plocha/mg).



Obr. č.1. Kalibrační křivka.

## 8.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti

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 z hodnot uvedených v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5. Mez detekce a mez stanovitelnosti.

| Parametr            | Hodnota (mg/kg) |
|---------------------|-----------------|
| Mez detekce         | 0,194           |
| Mez stanovitelnosti | 0,397           |

## 9 Souhrn statistických údajů metody

| Validační parametr    | Validační hodnota          |
|-----------------------|----------------------------|
| Opakovatelnost        | 1,37 % relativních         |
| Reprodukovatelnost    | 2,72 % relativních         |
| Správnost             | Správnost metody prokázána |
| Linearita             | Linearita metody prokázána |
| Rozsah                | (0,4 – 18) mg/kg           |
| Mez detekce           | 0,194                      |
| Mez stanovitelnosti   | 0,397                      |
| Citlivost (plocha/mg) | 66,325                     |

## 10 Závěr

V rámci práce bylo vypracováno SOP a byly stanoveny tyto validační parametry: opakovatelnost, správnost, linearita, citlivost, mez stanovitelnosti. Pro ověření metody se laboratoř zúčastnila mezinárodní validace metody pro účely normalizace. Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost ověřované metody k používání v NRL a k jejímu zahrnutí do zkušebních metod ÚKZÚZ.

## 11 Literatura

1. Sborník vědeckých a odborných prací z konference Nové trendy v používání dusíkatých hnojiv, VÚRV Praha, 25. října 2006.
2. Firemní literatura firmy SKW Stickstoffwerke Piesterlitz GmbH, SRN.
3. Pracovní dokument připravený technickou komisí CEN/TC 260 (TC 260 WI 00260106 Stanovení 3-Methylpyrazolu HPLC).
5. Eckschläger K., Horsák I., Kodejš Z.: Vyhodnocování statistických výsledků a metod, SNTL Praha 1980.

# Zavedení metod pro stanovení aktivit půdních enzymů dle ISO/TS 22939 pomocí fluorogenních substrátů

*Stanislav Malý*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OMB, Hroznová 2, 656 06 Brno  
stanislav.maly@ukzuz.cz

## 1 Úvod

V biologických systémech jsou téměř všechny reakce katalyzovány enzymy. Jako indikátory kvality půdy byly navrženy různé enzymatické aktivity, neboť úzce souvisejí s klíčovými půdními vlastnostmi a procesy jako je obsah a složení organické hmoty, dekompozice polymerů rostlinného původu a koloběh živin. V současné době se v laboratoři půdní mikrobiologie NRL-OMB používají metody pro stanovení aktivity  $\beta$ -glukosidázy a ureázy pomocí chromogenních substrátů. Zavedení metody pro stanovení dalších enzymatických aktivit pomocí fluorogenních substrátů umožní širší hodnocení schopnosti půdních mikrobiálních společenstev zajišťovat vybrané procesy nutné pro fungování půdního ekosystému.

Cílem práce bylo zavedení a optimalizace metody pro stanovení sady enzymatických aktivit dle ISO/TS 2239 pomocí následujících kroků:

- (i) optimalizace nastavení zesílení na detektoru přístroje (gain),
- (ii) porovnání pufrů acetátového, MES a MUB z hlediska stability fluorescence standardů během inkubace půdní suspenze,
- (iii) optimalizace doby inkubace půdní suspenze a času odečtu fluorescence,
- (iv) stanovení opakovatelnosti metody,
- (v) aplikace metody na 12 vzorků lesních půd horizontů F, H a minerálního horizontu a na 27 zemědělských půd z registru kontaminovaných ploch. Pomocí mnohorozměrné analýzy charakterizovat schopnost metody rozlišit jednotlivé horizonty lesních půd, půdy travní a orné.

## 2 Princip

Uvedená metoda popisuje simultánní stanovení enzymatických aktivit v půdních vzorcích. Půdní suspenze připravená v acetátovém pufru je po přidavku fluorogenního substrátu inkubována 3 h při 30 °C v 96-jamkové mikrodestičce. Enzymatické aktivity jsou stanovovány měřením nárůstu fluorescence. Fluorescence se měří po 1 h, 2 h a 3 h. Po odečtu z kalibrační křivky jsou aktivity vyjádřeny jako množství uvolněného 4-methylumbeliferonu daným množstvím půdy za jednotku času.

## 3 Půdy

Půdní vzorky musejí být po prosetí ihned zpracovány nebo zamraženy.

Metoda byla optimalizována na vzorcích půd pozorovacích ploch 5018, 7013 a 7021 bazálního monitoringu ÚKZÚZ. Základní pedologické charakteristiky shrnuje tabulka 1. Data jsou převzata z analýz provedených v roce 2008. V rámci monitoringu půdních mikrobiálních parametrů byla metoda aplikována na 27 půd z registru kontaminovaných ploch a na 6 lesních půd odebraných v období duben až květen 2009. Půdy z registru kontaminovaných ploch byly odebírány z horních 15 cm. Ve třech případech lesních půd (30901, 16901, 16902) byly zvlášť odebírány horizonty F, H a minerální horizont (10 cm). Zbývající tři půdy (35901, 35902, 35903) měly velmi málo vyvinutý organický horizont, pro analýzu byl proto odebrán vzorek z horních 10 cm. Deskriptivní statistika základních pedologických charakteristik půd z registru kontaminovaných ploch je uvedena v tab. 2, data jsou vypočtena z výsledků získaných z odběru v roce 2007. V případě lesních půd byly v době přípravy závěrečné zprávy k dispozici pouze obsahy oxidovatelného uhlíku (tab. 3).

**Tabulka 1. Základní pedologické charakteristiky půd, které byly použity pro optimalizaci metody, TTP – trvalý travní porost.**

| Půda | Obhospodařování | Typ (FAO) | pH (KCl) | Obsah jílovitých částic <sup>1</sup> | C <sub>ox</sub> (%) |
|------|-----------------|-----------|----------|--------------------------------------|---------------------|
| 5018 | TTP             | Kambisol  | 4,6      | 7,9                                  | 3,36                |
| 7013 | Orná            | Černozem  | 7,6      | 26,4                                 | 1,66                |
| 7021 | Orná            | Luvizem   | 7,2      | 23,8                                 | 1,20                |

<sup>1</sup> – procentuální obsah částic menších než 0.002 mm

**Tabulka 2. Základní pedologické charakteristiky půd z reistru kontaminovaných ploch.**

| Obhospodařování | Parametr | pH (KCl) | Obsah jílovitých částic <sup>1</sup> | C <sub>ox</sub> (%) |
|-----------------|----------|----------|--------------------------------------|---------------------|
| Orná (22)       | Median   | 6,3      | 13,1                                 | 1,87                |
| Orná            | Minimum  | 4,0      | 6,05                                 | 1,28                |
| Orná            | Maximum  | 7,6      | 34,7                                 | 3,66                |
| TTP (5)         | Median   | 5,6      | 9,8                                  | 2,24                |
| TTP             | Minimum  | 5,2      | 8,5                                  | 1,53                |
| TTP             | Maximum  | 7,3      | 29,4                                 | 4,59                |

<sup>1</sup> – procentuální obsah částic menších než 0.002 mm

**Tabulka 3. Obsah C<sub>ox</sub> (%) v lesních půdách.**

|       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 30901 | 30901 | 30901 | 16901 | 16901 | 16901 | 16902 | 16902 | 16902 | 35901 | 35902 | 35903 |
| F     | H     | A     | F     | H     | A     | F     | H     | A     |       |       |       |
| 15,9  | 8,56  | 2,54  | 38,6  | 18,5  | 3,88  | 37,9  | 19,0  | 5,58  | 9,09  | 4,52  | 4,68  |

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Přístroje a pomůcky

- 4.1.1 Mikrodestičkový fluorimetr Chameleon II (Hidex, Finsko) s filtry 355 nm/460 nm, teplota při měření nastavena na 30 °C.
- 4.1.2 Dilutor Gilson 401C (Francie).
- 4.1.3 Termostat s nastavitelnou teplotou na (30 ± 2) °C se zásuvkou na připojení třepačky.
- 4.1.4 Třepačka mikrodestiček.
- 4.1.5 Mikrodestičky, 96 jamek, průsvitné.
- 4.1.6 Ultrazvuková lázeň.
- 4.1.7 Erlenmeyrovy baňky, 250 ml.

### 4.2 Chemikálie

- 4.2.1 4-methylumbeliferon (MUF).
- 4.2.2 Dimethylsulfoxid (DMSO).

- 4.2.3 Methanol.
- 4.2.4 Fluorogenní substráty (Glycosynth, UK, tab 4).
- 4.2.5 Octan sodný trihydrát.
- 4.2.6 Kyselina octová, > 99,8%.
- 4.2.7 Kyselina maleinová.
- 4.2.8 Kyselina boritá.
- 4.2.9 Kyselina citronová, monohydrát.
- 4.2.10 2-[N-morpholino]ethanesulfonová kyselina.
- 4.2.10 Sterilní voda,  $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ , 20 min.

**Tabulka 4. Fluorogenní substráty pro stanovení enzymatických aktivit.**

**MUF = 4-methylumbeliferon.**

| Enzym                 | Substrát                              | Prvek  | Cílová makromolekula   |
|-----------------------|---------------------------------------|--------|--|
| Arylsulfatáza         | MUF-sulfát                            | Síra   | Mineralizace organické síry                                      |
| $\alpha$ -Glukosidáza | MUF- $\alpha$ -D-glukopyranosid       | Uhlík  | Škrob a glykogen   |
| Celobiosidáza         | MUF- $\beta$ -D-celobiopyranosid      | Uhlík  | Celulóza   |
| $\beta$ - Xylosidáza  | MUF- $\beta$ -D-xylopyranosid         | Uhlík  | Xylan, xylobióza   |
| $\beta$ - Glukosidáza | MUF- $\beta$ -D-glulopyranosid        | Uhlík  | Celulóza   |
| Fosfodiesteráza       | bis-(MUF)- fosfát                     | Fosfor | Hydrolýza fosfátových diesterů                                   |
| Chitináza             | MUF-N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminid | Uhlík  | Štěpení $\beta$ -1-4-glykosidických vazeb v chitinu a chitobióze |

### 4.3 Roztoky

**Hydroxid sodný,  $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ .**

Příprava: 10,0 g NaOH se rozpustí ve vodě a po převedení do 250 ml odměrné baňky se baňka doplní vodou po značku.

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

Příprava: 8,77 ml 35% HCl se přidá do vody a roztok se doplní vodou na celkový objem 1000 ml.

#### **Acetátový pufr, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ , pH 5,5**

Příprava: V 600 ml vody se rozpustí 68,0 g trihydrátu octanu sodného a pH se upraví kyselinou octovou na hodnotu 5,5. Roztok se doplní vodou na 1000 ml. Pufr se 20 min sterilizuje v autoklávu při  $(121 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ . Skladuje se v ledničce nejvýše 2 týdny. V případě, že se před analýzou připravuje čerstvý, nesterilizuje se.

#### **MES pufr**

Příprava: Ve vodě se rozpustí 22,1 g 2-[N-morpholino]ethanesulfonové kyseliny, pH se upraví na hodnotu 6,1 a roztok se doplní vodou na celkový objem 1000 ml.

#### **MUB (modified universal buffer), zásobní roztok**

Příprava: V přibližně 250 ml roztoku 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.

#### **MUB pufr, pracovní, pH 6,0**

Příprava: 100 ml zásobního MUB pufru se titruje za konstantního míchání HCl ( $0,1 \text{ mol/l}$ ) na pH 6,0. Poté se roztok se doplní vodou na celkový objem 500 ml.

#### **Standardní roztok MUF, $c = 6,67 \text{ mmol/l}$ (S\_MUF)**

Příprava: 0,0294 g MUF se rozpustí v DMSO a doplní na celkový objem 25 ml. Připravuje se vždy čerstvý. Daná navážka platí pro bezvodý MUF (Sigma, k.č. M1381-25G, m.h. 176,17).

#### **Poznámka**

*Na trhu se prodává i monohydrát (Fluka, k.č. 69580,  $M_r = 194,18 \text{ g/mol}$ ), v tomto případě navážka činí 0,0324 g. Skutečnost, že se jedná o monohydrát, není uvedena v názvu produktu. Složení standardu je třeba ověřit pomocí molekulové hmotnosti a ve vzorcí.*

#### **Roztoky substrátů**

Rozpuštěním navážek dle tabulky 5 ve 300  $\mu\text{l}$  DMSO a doplněním na celkový objem 10 ml sterilní vodou se připraví roztoky o koncentraci 10 mmol/l. Pracovní roztok se připraví ředěním zásobního roztoku, k 0,80 ml substrátu se přidá 11,2 ml acetátového pufru. Finální koncentrace substrátu v jamce je 0,5 mmol/l. Pro přípravu roztoků se používají hnědé odměrné baňky a během celého procesu je třeba maximálně dbát o co nejmenší expozici roztoků přímým slunečním světlem. Roztoky jsou při skladování v ledničce stále přibližně 2 týdny. Před každou analýzou se změří fluorescence substrátů (150  $\mu\text{l}$  substrátu, 50  $\mu\text{l}$  pufru)

a ověří se, že nedošlo k jejich rozkladu. Některé substráty se při skladování v ledničce vysráží, při ředění na pracovní roztok se ale rozpustí.

**Tabulka 5. Fluorogenní substráty pro stanovení enzymatických aktivit.**

**MUF = 4-methylumbeliferon.**

| Substrát                               | Navážka (g) | Zkratka <sup>1</sup> |
|--|-------------|----------------------|
| MUF-sulfát                             | 0,0294      | SUL                  |
| MUF- $\alpha$ -D-glukopyranosid        | 0,0338      | AGL                  |
| MUF- $\beta$ -D-celobiopyranosid       | 0,0501      | DCB                  |
| MUF- $\beta$ -D-xylopyranosid          | 0,0308      | XPN                  |
| MUF- $\beta$ -D-glukopyranosid         | 0,0338      | BGL                  |
| bis-(MUF)- fosfát                      | 0,0414      | B4F                  |
| MUF-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide | 0,0379      | AGM                  |

<sup>1</sup> – uvedené zkratky jsou použity v následujícím textu a grafech

#### 4.4 Statistické vyhodnocení a grafické zpracování dat

Data byla statisticky vyhodnocena a graficky zpracována pomocí programu R 2.9 (R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vídeň, Rakousko), mnohorozměrná analýza programem Canoco 4.5 (Centre for biometry, Wageningen, Nizozemí). Hlavní komponenty (PCA) byly analyzovány na datech standardizovaných v rámci jednotlivých vzorků a bez standardizace enzymatických aktivit.

#### 4.5 Pracovní postup

Postup je založen na standardizované metodě ISO/TS 22939 (2009), která vychází z prací Marxe et al. (2001) a Niemi a Vepsäläinen (2005).

##### 4.5.1 Kalibrační křivka

Kalibrační křivka se připravuje pro každý vzorek zvlášť. Standardní roztoky MUF se připraví tak, aby finální koncentrace v jamkách mikrodestičky byly (0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 3,5 4,0)  $\mu\text{mol/l}$ . Postup ředění pracovním acetátovým pufrem udává tabulka 6. Pro ředění

se používá autosampler, rychlost pipetování se nastaví na 1 ml/min. Kalibrační křivka se vždy připravuje čerstvá. Při pipetování je třeba zabránit přímé expozici roztoků denním světlem, zkumavky jsou proto obaleny alobalem. Do mikrodestičky se pipetuje 50 µl půdní suspenze (viz níže) a 150 µl daného standardu, vše 1 × pro každé ze 4 opakování daného vzorku. Před napipetováním půdní suspenze se se suspenzí důkladně zakrouží a ihned provede odběr.

**Tabulka 6. Příprava standardů pro stanovení enzymatických aktivit. Použité koncentrace (0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5, 2,5, 3,5; 4,0) µmol MUF/l, uvedené koncentrace odpovídají finálním koncentracím v jamce mikrodestičky.**

| Pipetovaný roztok (µmol/l) | Standard (µl) | Pufř (µl) | Výsledná koncentrace (µmol/l) |
|----------------------------|---------------|-----------|-------------------------------|
| S_MUF <sup>1</sup>         | 100           | 1900      | 250                           |
| 250                        | 160           | 3840      | 10                            |
| 10                         | 1600          | 2400      | 4                             |
| 10                         | 1400          | 2600      | 3,5                           |
| 10                         | 1000          | 3000      | 2,5                           |
| 10                         | 600           | 3400      | 1,5                           |
| 10                         | 400           | 3600      | 1                             |
| 10                         | 200           | 3800      | 0,5                           |
| 10                         | 40            | 3960      | 0,1                           |

<sup>1</sup> – viz 4.3 Roztoky

#### 4.5.2 Příprava půdní suspenze a inkubace vzorků

Naváží se 1 g půdy ve 4 opakováních, přidá se 100 ml pufru a suspenze se vloží na 120 s na ultrazvukovou lázeň. Při porovnávání různých pufrů byla suspenze připravována ve vodě, aby se snížila variabilita mezi navážkami. Do mikrodestičky se pipetuje 50 µl půdní suspenze a 150 µl roztoku substrátu. Z každého opakování se pipetuje pro každý enzym dvakrát. Pokud vzorky obsahují rostlinné zbytky (např. vzorky F horizontu lesních půd), je třeba kontrolovat, že během pipetování nedošlo k ucpání špičky a napipetování menšího objemu. Vzorky se inkubují 3 h při 30 °C. Před napipetováním půdní suspenze se se suspenzí důkladně zakrouží a ihned provede odběr. Během inkubace se mikrodestičky třepají při frekvenci 500/min.

### 4.5.3 Posloupnost jednotlivých kroků

Vzhledem k citlivosti standardů a substrátů na světlo a skutečnosti, že půdní suspenze by měla být co nejdříve napipetována do jamek, je důležité pořadí jednotlivých kroků analýzy.

Doporučené pořadí kroků:

Příprava kalibrační křivky,

Příprava pracovních roztoků substrátů,

Příprava půdní suspenze,

Pipetování roztoků do jamek.

### 4.5.4 Měření

Měří se fluorescence standardů a vzorků v časech 1 h, 2 h a 3 h. Excitační vlnová délka je nastavena na 355 nm, emisní na 460 nm. Na přístroji Chameleon II se měří při nastavené hodnotě zesílení (gain) 1.

### 4.4.5 Výpočet

Pro výpočet se použijí hodnoty naměřené po 1 h a 3 h. V případě, že hodnota naměřená po 3 h je vyšší než odpovídá koncentraci standardu 3,5 mol/l, pro výpočet se použijí hodnoty získané po 1 h a 2 h inkubace.

Pro závislost fluorescence na koncentraci standardu platí vztah

$$\text{Fluor} = a + b \times \text{MUF} + c \times \text{MUF}^2$$

kde

Fluor je fluorescence,

MUF koncentrace MUF ( $\mu\text{mol/l}$ ),

a, b, c parametry regresní křivky.

Koncentrace uvolněného MUF z naměřených hodnot fluorescencí standardů a vzorků se vypočtou v ovládacím programu fluorimetru MikroWin.

$$A = \frac{MUF_T - MUF_P}{t} \times 400 \times \frac{w + 100}{100}$$

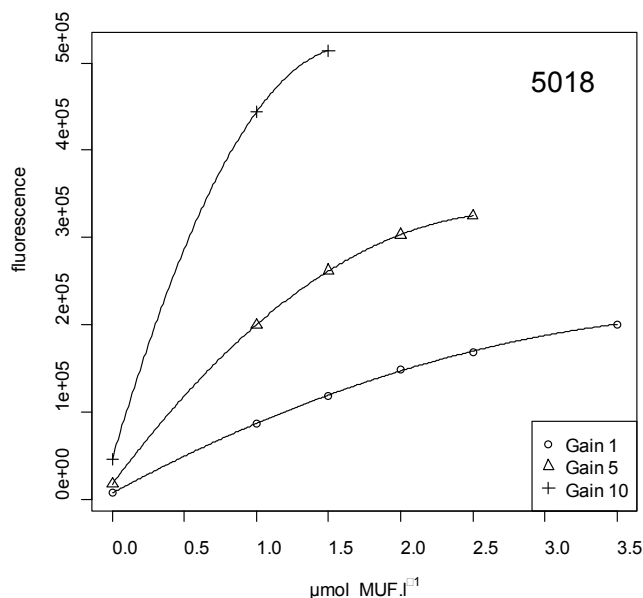
kde

- A je enzymatická aktivita, nmol MUF/g/h,  
MUF<sub>T</sub> koncentrace MUF (μmol/l) na konci měření,  
MUF<sub>P</sub> koncentrace MUF (μmol/l) na počátku měření,  
t doba mezi měřeními (h),  
w obsah vody vyjádřený jako procentuální poměr hmotnosti vody k hmotnosti suché půdy.

## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Optimalizace nastavení zesílení detektoru přístroje

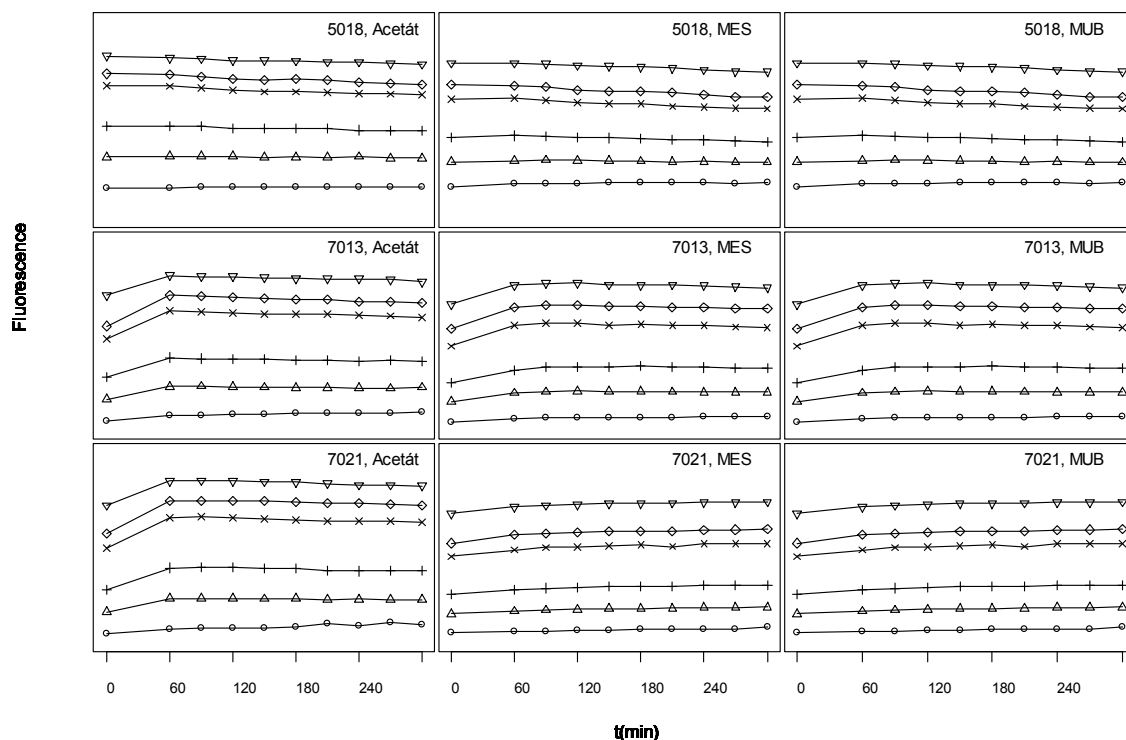
Klíčový parametr fluorimetru, který ovlivňuje citlivost stanovení a dynamický rozsah kalibrační křivky, je zesílení na detektoru. Fluorimetr Chameleon II je konstruován tak, že i při nejnižším zesílení, gainu 1, lze měřit pouze do koncentrace 4,0 MUF/l. ISO/TS 22939 (2009) přitom doporučuje maximální koncentraci standardu 6,0 μmol MUF/l. Porovnání kalibračních křivek při nastaveném zesílení 1, 5 a 10 v acetátovém pufru ukazuje obrázek 1. Pro další práci bylo měření prováděno při hodnotě zesílení 1.



**Obr. 1. Porovnání fluorescencí kalibrační křivky v acetátovém pufru při různých hodnotách zesílení detektoru přístroje-**

## 5.2 Porovnání pufrů acetátového, MES a MUB

Aktivity enzymů obecně závisejí na hodnotě pH prostředí s odezvou ve tvaru zvonovité křivky. Postup ISO/TS 2239 doporučuje pro stanovení aktivit sedmi uvedených enzymů MES pufr s hodnotou pH 6.1. Jako další možnosti jsou uvedeny acetátový pufr (pH 5.5) a MUB pufr, který umožňuje nastavení pH v daném rozmezí a provedení analýzy při pH půdy. Z praktického hlediska je toto možné pouze v případě, kdy se analyzuje více vzorků z jedné lokality. Kinetická měření během 6 h inkubace ukázala, že stabilita fluorescence závisí na druhu pufru a dané půdy (obr. 2).

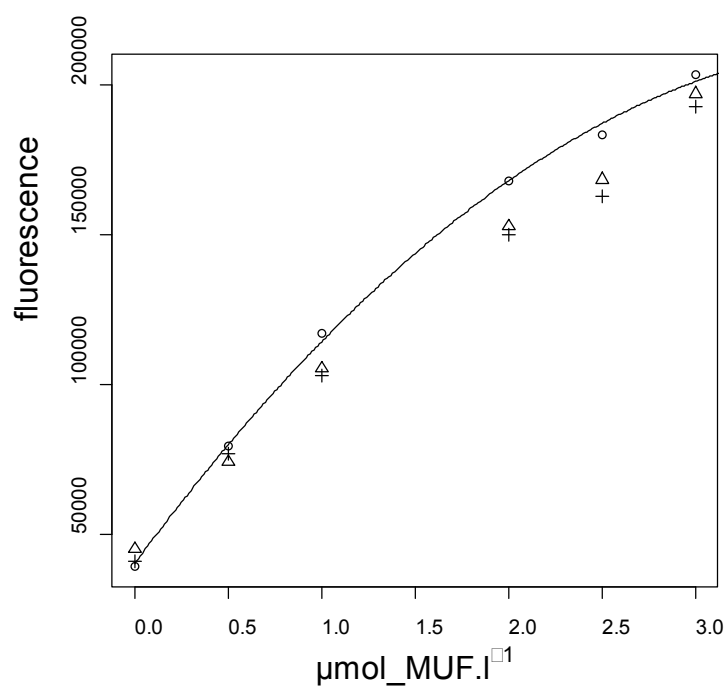


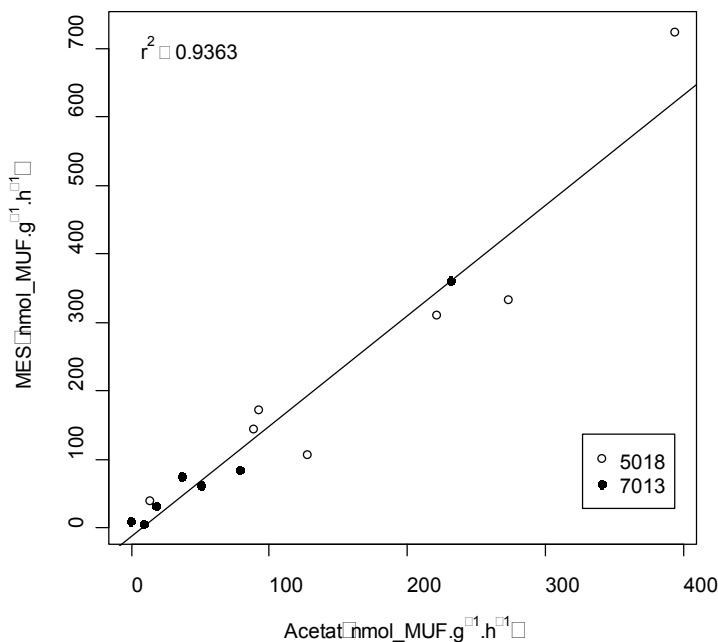
**Obr. 2. Stabilita fluorescence v závislosti na použitém pufru a daném půdním vzorku. Byly použity standardy MUF o koncentracích (0; 0,5; 1; 2; 2,5; 3)  $\mu\text{mol/l}$ .**

V případě půd 7013 a 7021 byla na počátku měření třeba určitá doba k ustálení hodnot fluorescence standardů, což pravděpodobně souvisí s pH půdy. Největší rozdíly mezi fluorescence na počátku a po 1 h inkubace byly nalezeny u půdy 7013, která má nejvyšší pH. Fluorescence byla stabilní od počátku inkubace u půdy 5018, jejíž pH je nižší než pH použitých pufrů. Rozdíly v pH půdy, obsahu jílovitých částic a půdní organické hmoty (SOM) nemohou vysvětlit rozdílné trendy ve fluorescence standardů o koncentracích 2  $\mu\text{mol MUF/l}$  a 2,5  $\mu\text{mol MUF/l}$  v pufrch MES a MUB během inkubace (obr. 2). Ukazuje se tak, že stabilita fluorescence standardů je ovlivňována i jinými, neidentifikovanými faktory.

Pro další práci byl zvolen acetátový pufr. V případě půdy 5018 byl sice zaznamenán pokles fluorescence s časem, byl ale nižší než v případě ostatních dvou pufrů.

Kromě stability fluorescence druh pufru ovlivňuje i zakřivení kalibrační křivky (obr. 3). Kalibrační křivka v acetátovém pufru vykazuje při vyšších koncentracích větší zakřivení v porovnání s křivkami v MES a MUB pufru, což vede ke snížení přesnosti stanovení.

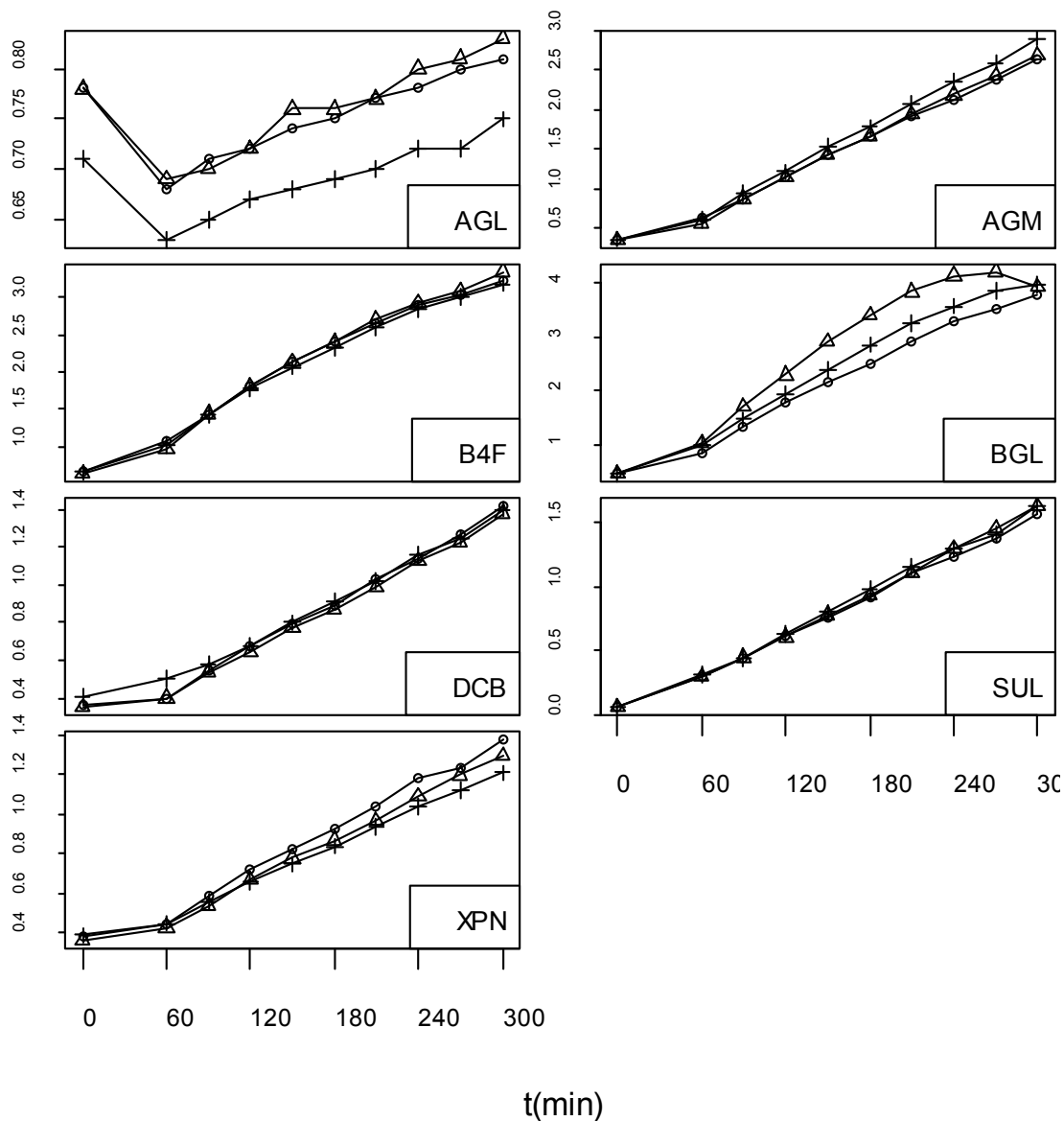




**Obr. 4. Porovnání enzymatických aktivit naměřených při inkubaci vzorků v pufrách acetátovém a MES.**

### 5.3 Optimalizace doby inkubace půdní suspenze a času odečtu fluorescence

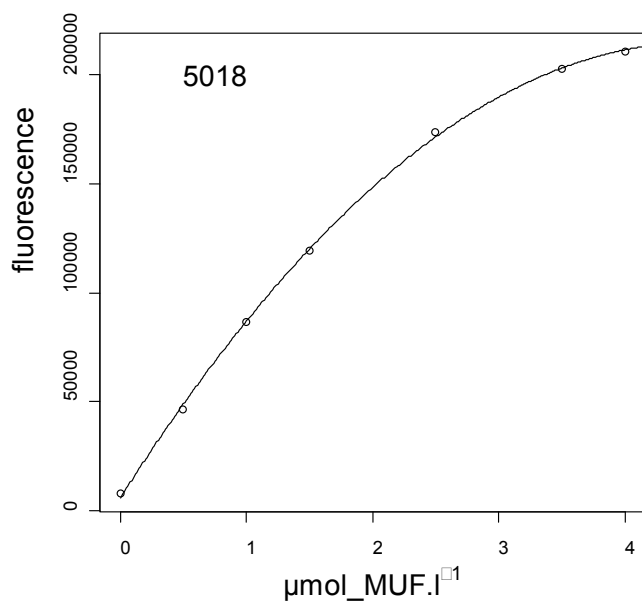
Z důvodu malého rozsahu kalibrační křivky bylo nutné optimalizovat časový interval vhodný pro měření. Podle metody ISO/TS 2239 jsou vzorky inkubovány 3 h a fluorescence se odečítá na počátku a konci inkubace. Výše uvedené měření standardů prokázalo, že měření fluorescence ihned po napipetování roztoků do jamek mikrodestičky zkresluje výsledné hodnoty enzymatických aktivit. Nárůst koncentrace MUF během inkubace vzorků se substráty byl lineární od 1. hodiny po zahájení reakce do 6. hodiny (obr. 5). Pokles fluorescence v jamkách s AGL během 1. hodiny inkubace ukazuje, že počáteční nelinearita je artefakt. Přibližně platí, že stanovení koncentrací MUF v rozmezí 3,5  $\mu\text{mol/l}$  až 4,0  $\mu\text{mol/l}$  nejsou již dostatečně přesná z důvodu nelinearity kalibrační křivky (obr. 6). Hodnoty odpovídající vyšším hodnotám než 4,0  $\mu\text{mol/l}$  mohou být artefakty, přičemž se vzrůstající koncentrací MUF dochází ke snížení fluorescence (data nejsou ukázána). To vysvětluje naměřený pokles koncentrace MUF v 6. hodině v případě BGL (obr. 5).



**Obr. 5. Časový průběh sledovaných enzymatických reakcí, vzorek 5018. Hodnoty na ose y udávají množství uvolněného MUF v  $\mu\text{mol/g}$ .**

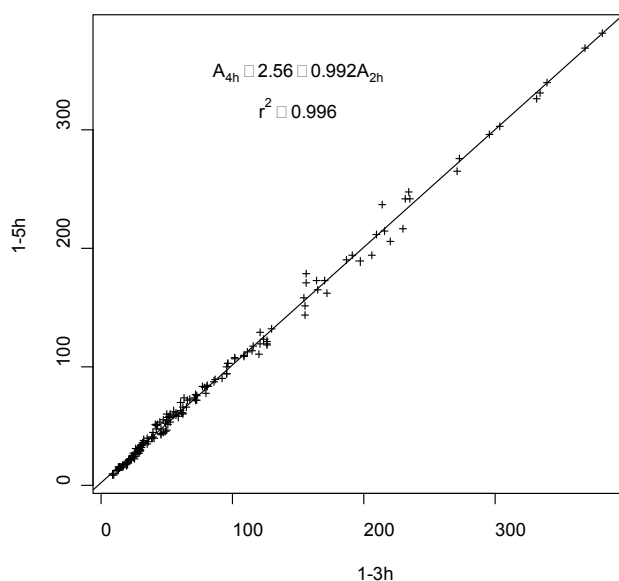
Vzhledem k nízkým aktivitám některých enzymů v určitých půdách byla stanovení provedena jak během časového intervalu (1 – 3) h, tak během intervalu (1 – 6) h. Předpokládalo se, že delší doba analýzy povede k přesnějším výsledkům a nižší variabilitě. Tento předpoklad se nepotvrdil, průměrný variační koeficient se snížil z 24,5 % na 22,4 % ( $p < 0,001$ ). Hlavní zdroj variability je pravděpodobně nehomogenita půdní suspenze pipetovaná do jamky a nikoliv nepřesnost měření. Regresní analýza (obr. 7) ukázala těsný vztah mezi výsledky získanými při obou dobách inkubace. Interval spolehlivosti směrnice regresní přímky

závislosti enzymatických aktivit naměřených během 4 h inkubace na hodnotách aktivit naměřených



**Obr. 6. Kalibrační křivka vzorku 5018 v acetátovém pufru.**

Během 2 h inkubace zahrnoval hodnotu jedna, v případě úseku byl odlišný od nuly (1,41 – 3,71). Nalezené mírné zvýšení hodnot enzymatických aktivit při delší inkubaci může být z praktického hlediska významné pouze v případě velmi nízkých aktivit. Každopádně je nutné provádět stanovení ve vzorcích, které budou vzájemně porovnávány při stejné době inkubace. V případě půd s nízkými enzymatickými aktivitami je možno prodloužením doby inkubace až na 6 h zvýšit citlivost stanovení. Dalšího zvýšení citlivosti je možno dosáhnout pravidelným odečtem fluorescence během inkubace, např. po 30 min.



**Obr. 7. Porovnání enzymatických aktivit stanovených odečtem fluorescence po 1 h a 3h s hodnotami stanovenými odečtem po 1 h a 5h. Hodnoty aktivit jsou uvedeny v nmol MUF/g/h.**

#### 5.4 Stanovení opakovatelnosti

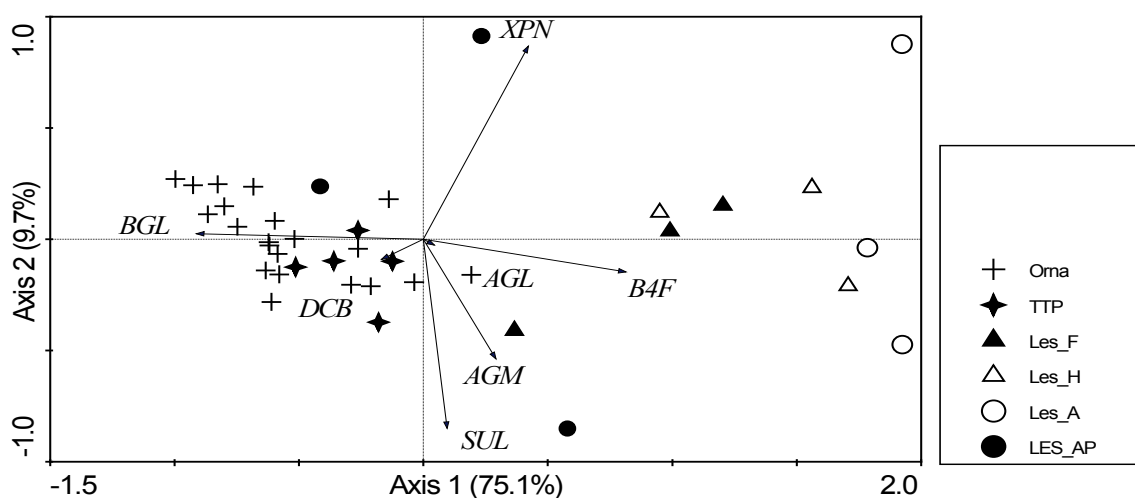
Opakovatelnost byla stanovena jako variační koeficient opakovaných analýz vzorku 5018. Výsledky shrnuje tabulka 7. Stanovené hodnoty variačních koeficientů se pohybovaly v rozmezí 7,89 % až 24,4 %.

**Tabulka 7. Průměrné hodnoty a variační koeficienty opakovaných stanovení enzymatických aktivit (n = 4) ve vzorku 5018.**

| Substrát | Průměr<br>(nmol MUF/g/h) | Variační koeficient<br>(%) |
|----------|--------------------------|----------------------------|
| AGL      | 14,3                     | 27,1                       |
| AGM      | 221                      | 20,8                       |
| B4F      | 268                      | 12,6                       |
| BGL      | 414                      | 7,89                       |
| DCB      | 86,0                     | 24,4                       |
| SUL      | 131                      | 16,39                      |
| XPN      | 83,3                     | 12,2                       |

## 5.5 Stanovení enzymatických aktivit v půdách z registru kontaminovaných ploch a v půdách lesních

Uvedená sada enzymatických aktivit byla stanovena v 27 půdních vzorcích z registru kontaminovaných ploch a v 6 lesních půdách. Vzhledem ke standardizaci dat v rámci vzorků odráží PCA ordinační diagram (obr. 8) relativní zastoupení jednotlivých enzymatických aktivit v těchto vzorcích. První osa vysvětlující 75,1 % variability sleduje gradient obsahu organické hmoty (tab. 2, 3). Zřetelnou výjimku tvoří vzorky minerálních horizontů lesních půd nacházející se pod humusovým horizontem.



**Obr. 8. Ordinační diagram PCA analýzy půdních enzymatických profilů. Les\_F – lesní půda, fermetační horizont, Les\_H – lesní půda, humusový horizont, Les\_A – lesní půda, minerální horizont pod humusovým horizontem, Les\_AP – lesní půda, povrchový minerální horizont.**

V půdách s nižším obsahem SOM byla naměřena relativně vyšší hodnota  $\beta$ -glukosidázové aktivity, která odráží celkovou biomasu aktivních mikroorganismů. Zvýšení xylosidázové aktivity v lesních půdách zřejmě souvisí s vysokým obsahem xylanu, jedné ze součástí hemicelulózy nacházející se v buněčných stěnách rostlin. Dalším charakteristickým jevem je relativně vyšší aktivita fosfodiesterázy v lesních půdách. Ordinační diagram ukazuje schopnost rozlišení zemědělských a lesních půd na základě profilů enzymatických aktivit. Travní půdy tvoří homogenní skupinu, která se částečně překrývá s půdami ornými. Vzorky organických horizontů lesních půd tvoří ohraničenou skupinu, podobně jako vzorky minerálních horizontů nacházející se pod humusovým horizontem. Vysoká variabilita byla

typická pro minerální horizonty lesních půd, které se nacházely na povrchu půdního profilu. Tato skutečnost může souviset se širokým spektrem organických sloučenin pocházejících z rozložených rostlinných zbytků.

## 6 Závěr

V rámci práce byla zavedena metoda pro stanovení sedmi enzymatických aktivit v orných, travních a lesních půdách. Metoda bude použita v rámci monitoringu mikrobiálních parametrů půd ČR a v rámci studií pro hodnocení vlivu agrotechnických zásahů na půdní mikrobiální společenstva (aktuálně stacionární pokus v Závišíně).

## 7 Literatura

1. ISO (International Organization for Standardization), ISO/TS 22939 Soil quality Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates, **2009**
2. Marx,
- 3.
4. M.-C.; Wood, M.; Jarvis, S.C. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **2001**, *33*, 1633–1640
5. Niemi, R. M.; Vepsäläinen, M. Stability of the fluorogenic enzyme substrates and pH optima of enzyme activities in different Finnish soils. *Journal of Microbiological Methods*, **2005**, *60*, 195–205





---

**Bulletin Národní referenční laboratoře XIV 2010/2**

Ročník: XIV, č. 2  
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2010  
Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová  
Náklad: 140 výtisků  
Počet stran: 57  
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111  
e-mail: [ukzuz@ukzuz.cz](mailto:ukzuz@ukzuz.cz)

Texty neprošly jazykovou úpravou.

**ISSN 1801-9196**