

### Laboratorní cvičení 13. A 17.10. – Moderní metody v ekotoxikologii (část Hodnocení expozice)

- 1) Stanovení biodostupné frakce pomocí XAD metody
- 2) Stanovení biodostupné frakce (volně rozpuštěné koncentrace –  $C_{free}$ ) pomocí SPME metody
- 3) Stanovení celkové koncentrace v půdě (pouze demonstračně)
- 4) Stanovení bioakumulačního koeficientu v žízálech (pouze demonstračně)

#### 1) Stanovení biodostupné frakce p,p-DDE pomocí XAD metody

##### **Princip:**

V systému půda-voda-XAD sorbent dochází k cílenému přenosu polutantů z půdy přes vodní fázi do XAD sorbentu. Polutant navázaný na XAD tedy předtím musí být rozpuštěn v pórové vodě, která je považována za nejdůležitější expoziční cestu pro biotu (tedy cesty půda-voda-biota). XAD ve vzorku postupně vychytává volně rozpuštěné analyty z pórové vody (podobně jako by je postupně degradoval přítomný mikroorganismus), a tím stimuluje desorpci dalších analytů z půdy do vody. Desorpční proces však není nekončený, postupně přijdou na řadu analyty, které jsou natolik pevně asociovány s půdou, že jejich desorpce nebude za daných podmínek možná. Tak dojde k základnímu rozdělení mezi dostupnou (pomocí XAD desorbovatelnou) a nedostupnou (v půdě zůstávající) frakci. Zjištění velikosti dostupné frakce může sloužit např. k odhadu množství polutantu, jež je z dané kontaminované lokality odstranitelné bioremedičními technikami nebo k odhadu mobility polutantů v prostředí (např. splachu z kontaminovaných polí). V laboratoři se navíc dají simulovat různé podmínky (např. zvýšení kyselosti půd v důsledku kyselých dešťů nebo zvýšení teploty v důsledku klimatických změn) a jejich vliv na změny v dostupnosti polutantů pro přechod z půdy do jiné složky životního prostředí (např. bioty nebo povrchových vod).

##### **Postup:**

- a) Do **teflonové zkuševky** (50 mL) navažíme 3g suché **půdy** a 3g přečištěného<sup>1</sup> **XAD** sorbentu. Přidáme 25 mL roztoku **NaN<sub>3</sub>** (10 mM,  $M(\text{NaN}_3) = 65 \text{ g/mol}$ ) – roztok si sami připravte do **100 ml odměrné baňky**, na rozpouštění použijte destilovanou vodu. Směs třepeme po dobu 15 dnů<sup>2</sup> při 110 rpm. Po stanovené době směs zcentrifugujeme (1 000 rpm, 1 min) – k tomuto účelu si připravte vyvažovací vialku do centrifugy, která bude obsahovat pouze vodu, ale její celková hmotnost bude stejná jako testovací vialky se vzorkem.
- b) Po centrifugaci odsajeme XAD pomocí **pumpy** (nezapomeňte mezi pumpu a vzorek umístit promývačku na záchyt roztoku ze vzorku, aby se nedostal do pumpy) do **5 ml špičky** opatřené **na dně vatou** (XAD se zachytí ve špičce, roztok proteče do promývačky). Není třeba odsát veškeré XAD.
- c) Odebrané XAD ve špičce vysušíme lyofilizací<sup>3</sup>. XAD zvážíme, přesypeme do **extrakční patrony**, napipetujte k XAD 50  $\mu\text{L}$  z nachystaného **recovery standardu** ("PCB 155, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ") a poté extrahujeme na Soxhletově extraktoru pomocí směsi **hexan:aceton (1:1)** v programu 1 (1 hod ponoření, 1 hodina proplach, 30 min odpařování). Více o Soxhletově extrakci najdete v úloze 3.
- d) Po extrakci převedeme zahuštěný extrakt do 22 mL vialky pomocí Pasteurovy pipety a objem upravíme na 10 mL (použijte nachystanou rýsku). Nachystáme si kolonu na přečištění vzorku metodou kolonové chromatografie: 1) konec kolony opatříme vatou a dosypeme cca 1-cm sloupec nemodifikovaného silikagelu z nádoby označené "**nemodif. silikagel**", 2) z nádoby ("**Silikagel + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**")

do skleněné kolony přisypeme 5g přečištěného silikagelu modifikovaného kys. sírovou<sup>4</sup>. Na vrchol silikagelu nepipetujeme 1 mL vzorku. Vzorek eluujeme **30 mL DCM** do **40 mL vialky** a zkoncentrujeme pod proudem dusíku na 1 mL<sup>5</sup>.

e) Zkoncentrovaný vzorek převedeme Pasteurovou pipetou do **2mL GC vialky** a přidáme **50 µL vnitřního standardu** (PCB 121, 50 µg/mL). Vzorek zanalyzujeme metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS).

## **2) Stanovení biodostupné frakce (volně rozpuštěné koncentrace – $c_{free}$ ) pomocí SPME metody**

### **Princip:**

SPME (z ang. Solid phase microextraction) je založena na použití skleněného vlákna pokrytého tenkou vrstvou hydrofobního polymeru (často polydimethylsiloxanu-PDMS), které má podobné vlastnosti jako tuky v organismech. V systému půda-voda-SPME vlákno dochází k cílenému přenosu polutantů z půdy přes vodní fázi do SPME vlákna. Polutant navázaný na SPME vlákno tedy předtím musí být rozpuštěn v pórové vodě, která je považována za nejdůležitější expoziční cestu pro biotu (tedy cesty půda-voda-biota). Na rozdíl od XAD extrakce je sorpční kapacita vlákna malá (extrahované množství tak tvoří jen malý zlomek z celkového množství polutantu přítomného ve vzorku) a desorpce z půdy není podněcována soustavným odstraňováním polutantů z vodné fáze. Tímto tedy dojde jen k nevýznamnému přerozdělení polutantu z půdy a vody do vlákna a po určité době k ustavení rovnovážných koncentrací polutantů ve všech třech fázích. Pro zjištění volně rozpouštěné koncentrace by tedy stačilo změřit přímo koncentraci polutantů ve vodě, což je ale u hydrofobních kontaminantů prakticky nemožné z důvodu jejich velmi nízké rozpustnosti. Lepší je změřit koncentraci ve vláknech (hydrofobní látky mají tendenci se ve vláknech akumulovat, tedy i malý objem vlákna dostačuje na překonání detekčních limitů). Změřená koncentrace ve vláknech je pak přímo úměrná koncentraci v porové vodě. Koeficientu úměrnosti se říká rozdělovací koeficient ( $K_{\text{vlákno-voda}} = C_{\text{vlákno}}/C_{\text{voda}}$ ) a dá se laboratorně stanovit pro každou látku. Pak platí, že pokud  $K_{\text{vlákno-voda}}$  je rovno např. 10 a naměřená koncentrace polutantů v 1 µL PDMS polymeru je 20 ng, pak v 1 ul porové vody budou 2ng látky. Pomocí  $K_{\text{vlákno-voda}}$  lze tedy při známé koncentraci ve vláknech dopočítat  $C$  látky v porové vodě. Koncentrace změřená ve vláknech (ng/µL PDMS) koreluje s koncentracemi naměřenými v lipidech organismů žijících v kontaminovaných půdách nebo sedimentech, protože proces rozdělování mezi vodu a vlákno mimikuje proces rozdělování mezi vodu a lipidy. Koncentrace v pórové vodě tak přímo souvisí i s toxicitou kontaminovaných půd a sedimentů. Pomocí SPME tedy můžeme odhadnout nejen koncentrace polutantů v lipidech, ale i toxicitu vzorků bez nutnosti analyzovat v nich žijící organismy nebo je exponovat toxickým materiálům.

### **Postup:**

a) Do 22 mL vialky navažíme **5g suché půdy** a přidáme **3x 2.5 cm dlouhé SPME vlákno** (vlákno si nařežte řezačkou ze zásobního vlákna – **používejte ochranné brýle, kousky vlákna mohou zaletět do oka**) a **5 mL roztoku  $\text{NaN}_3$**  (10 mM,  $M(\text{NaN}_3) = 65 \text{ g/mol}$ ) – roztok si sami připravte do **100 ml odměrné baňky**, na rozpouštění použijte destilovanou vodu. Směs třepeme po dobu 40 dnů<sup>2</sup> na třepače při 110 rpm.

b) Po stanovené době odebereme vlákna **pinzetou** (pokud na něm ulpěly zbytky půdy, očistíme je pomocí navlhčeného ubrousku) a dáme je do 22ml vialky obsahující **10 mL směsi DCM:hexan (1:1)**. Ke vzorku přidáme 50 µl recovery standardu ("**PCB 155, 50µg/mL**").

c) Vzorek umístíme do **ultrazvukové lázně na 1 minutu** (cílový analyt se desorbuje z vlákna do rozpouštědla). Poté vlákna vyjmeme pinzetou a zbylý extrakt zkoncentrujeme na 1 mL.

d) Zakoncentrovaný vzorek převedeme Pasteurovou pipetou do **2mL GC vialky** a přidáme **50 µL vnitřního standardu** (PCB 121, 50 µg/mL). Vzorek analyzujeme metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS).

c) Další postup – výpočet  $c_{\text{free}}$  se provede pomocí vzorce:

$$C_{\text{water = free}} = C_{(\text{ng/ul PDMS})} / K_{\text{SPME-water}}, \text{ kde}$$

$C_{\text{water = free}}$  (ng/ul) je volně rozpuštěná koncentrace analytu v pórové vodě,

$C_{(\text{ng/ul PDMS})}$  je Vámi změřená koncentrace analytu na vláknech, resp. v 1 µL jeho objemu (použité vlákno je skleněné a pokryté 30 µm vrstvou polymeru polydimethylsiloxanu, tzn. 3x2.5 cm vlákna obsahují právě 1 µL PDMS),

$K_{\text{SPME-water}}$  je rovnovážný rozdělovací koeficient dané látky mezi vlákno (SPME) a pórovou vodu v půdě. Pro DDE je  $\log K_{\text{SPME-water}}$  rovno 5.88 (tzn.  $K_{\text{DDE}} = 758588$ ). Vezmeme-li v úvahu, že  $K_{\text{DDE}} = C_{\text{ng/µl PDMS}} / C_{\text{water-free}} = 758588$ , tak DDE se v systému vlákno – porová voda rozděluje: 758588 ng do 1 µl vlákna a 1ng do 1µL vody.

### 3) Stanovení celkové koncentrace v půdě

**Princip:** Soxhletova extrakce využívá vysoké rozpustnosti analytů ve zvoleném rozpouštědle a zvýšené teploty pro urychlení procesu dosorpce analytu z půdy/sedimentu či jiné matrice do extrakčního média. Vlivem vařícího se rozpouštědla, ve kterém je vzorek v první fázi extrakce ponořen, dochází prakticky k desintegraci extrahovaného vzorku a účinnému přechodu analytů do rozpouštědla. V druhé fázi se vzorek vytáhne výš, aby nebyl ponořen do rozpouštědla v zásobní nádobce, a je promýván čistým rozpouštědlem (rozpouštědlo se při varu odpařuje ze zásobní nádoby, kondenzuje na chladiči a skapává přes vzorek zpět do zásobní nádoby). Soustavný přechod čistého rozpouštědla umožňuje účinnou extrakci vlivem vysokého koncentračního spádu (vysoká C látky ve vzorku → nulová C v prokapujícím rozpouštědle) i při relativně malé spotřebě rozpouštědla.

**Postup:**

- Na papírovou **extrakční patronu** navlečeme kovový kroužek a navážíme 5g suché **půdy**. Přidáme **50 µL z nachystaného recovery standardu** (50 µg/mL PCB155). Patronu se vzorkem umístíme do extraktoru (nasadíme na magnet v horní části). Do zásobní nádoby nalijeme **dichlormethan** tak, aby hladina dosahovala cca 2 cm pod okraj. Přidáme 2-3 ks **varných kamínků**. Nádobku umístíme na plotýnku extraktoru a pomocí černé páky zaklapneme horní díl s patronou na zásobní nádobku. Pustíme **vodu** do chladičů. Zapneme extraktor a zvolíme program 1 – enter (130°C, 1 hodina ponor, 1 hodina promývání, max 30 minut zahušťování). Po zahuštění na cca 3 mL, extrakt kvantitativně převedeme do 22 ml vialky a objem upravíme na 10 mL (použijte nachystanou rysku).
- Nachystáme si kolonu na přečištění vzorku metodou kolonové chromatografie: 1) konec kolony opatříme vatou a dosypeme cca 1-cm sloupec nemodifikovaného silikagelu z nádoby označené **“nemodif. silikagel“**, 2) z nádoby (**“Silikagel + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>“**) do skleněné kolony přisyme 5g přečištěného silikagelu modifikovaného kys. sírovou<sup>4</sup>. Na vrchol silikagelu nepipetujeme 1 mL vzorku. Vzorek eluujeme **30 mL DCM** do **40 mL vialky** a zkoncentrujeme pod proudem dusíku na 1 mL<sup>5</sup>.
- Zakoncentrovaný vzorek převedeme Pasteurovou pipetou do **2mL GC vialky** a přidáme **50 µL vnitřního standardu** (PCB 121, 50 µg/mL). Vzorek analyzujeme metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS).

#### 4) Stanovení bioakumulačního koeficientu v žížalách (pouze demonstračně)

**Princip:** Žížaly obsahují cca 1-2% tuku, ve kterém se mohou z kontaminované půdy akumulovat polutanty. Akumulace je proces postupný, po dostatečně dlouhé době (rovnovážná doba) se však ustanoví rovnováha mezi příjmem polutantů a jeho eliminací z těla žížaly – po této době bychom tedy v žížale naměřili konstantní koncentraci cílového polutantu. Ta se přepočítá na celkovou koncentraci polutantu v půdě, tedy  $C_{\text{žížala}} (\text{ng/g žížaly}) / C_{\text{půda}} (\text{ng/g půdy})$  a nazývá se biokumulačním faktorem (BAF). Charakterizuje tendenci látky přecházet do žížaly (zejména významné pro látky s  $\log K_{ow} > 5$ ) a může se lišit mezi půdami v závislosti na obsahu organické hmoty a dalších půdních vlastnostech. Důležitou podmínkou bioakumulačního testu je, že žížala musí být exponována dostatečně dlouho (do rovnováhy) a biodostupná koncentrace musí být během expozice konstantní (to je zajištěno vysokým poměrem půda vs žížala (např. 50g na jednu žížalu), kdy podobně jako u SPME přítomnost žížaly nesmí narušit rovnováhu ve vzorku – žížala do sebe nesmí akumulovat signifikantní množství v půdě přítomného polutantu).

##### **Postup:**

- a) 500 g půdy ovlhčené na 50% její maximální vodní kapacity navážíme **do sklenice** a přidáme **10 žížal** (předem zvážených) s vyvinutým opaskem. Naplněnou sklenici zavíčkneme, zvážíme a umístíme do místnosti se stabilní teplotou po dobu 21 dní. Každý druhý den kontrolujeme úbytek vody (převážním, případný úbytek doplníme destilovanou vodou) a 1x týdně přidáme 1 malou lžičku pomletého hnoje jako potravu pro žížaly. Po 21 dnech žížaly odebereme, umyjeme, zvážíme a umístíme do **Petriho misek s ovlhčeným filtračním papírem**. Necháme stát 24 hodin, aby žížaly mohly vyprázdnit svůj trávicí trakt (přítomnost kontaminovaných půdních částic v traktu by vadila při následné analýze) a žížaly znovu převážíme. Poté žížaly zmrazíme na  $-80^{\circ}\text{C}$  a umístíme na lyofylyzační přístroj (vysušení provádíme 24 hodin). Vysušení žížaly zvážíme a extrahujeme na Soxhletově extraktoru (viz. úloha 3a).
- b) Po extrakci extrakt pod proudem dusíku zkoncentrujeme do poslední kapičky a doplníme chloroformem na 5 mL (jedná se o nutný převod vzorku z jednoho rozpouštědla do druhého, zde z **DCM** do **chloroformu**). 1 mL extraktu se dále přečistí gelovou permeační chromatografií (metoda založená na separaci molekul podle velikosti, vzorek projde kolonou a odchytne se pouze určitá frakce obsahující cílový analyt; zbytek obsahující lipidy a další makromolekulární látky se zničí). Poté se vzorek přečistí kolonovou chromatografií (viz. 3b) a zanalyzuje (viz. 3c).

<sup>1</sup> XAD se čistí v Soxhletově extraktoru promýváním směsí rozpouštědel (např. hexan:aceton 1:1 a metanolem) po dobu několika hodin. Proces čištění je individuální podle toho, jestli se jedná o stopovou analýzu či pracujete s vysokými koncentracemi sledovaných látek. Proces čištění slouží k odstranění kontaminantů, interferujících látek a nečistot, např. mono- a polymerů, které by rušily při GC nebo HPLC analýze.

<sup>2</sup> Studenti nebudou vzorek třepat po stanovenou dobu, ale pouze umístí na třepačku na několik minut a poté odeberou. Nicméně, budou dotázáni na čem doba třepání závisí a jak ji lze stanovit.

<sup>3</sup> Lyofylyzace (vymrazení vody za vakua – tzn. sublimací) trvá 24 hodin. Studenti ji tedy nebudou provádět, ale vezmou si předpřipravené vzorky.

<sup>4</sup> Studenti z důvodu bezpečnosti neprovádí, ale pro info: Modifikace se provádí smícháním cca 50g silikagelu s 22 mL koncentrované kys. sírové. Kyselina se přidává postupně (po mL) a směs se vždy promíchá prudším protřepáním v ruce. Při míchání je cítit uvolňované teplo. Míchání je třeba provádět, dokud se vzniklé hrudky nerozpadnou. Práce s takto modifikovaným silikagem musí být prováděny velmi opatrně – koncentrovaná kys. sírová je silná žravina, způsobuje dehydrataci (**zuhelnatění**) organických látek.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  má při přečištění za úkol odstranit neperzistentní látky – nespecifikované látky, ale třeba i PAU, které vadí při stanovení chlorovaných látek jako je DDE. Nemodifikovaný silikagel se vkládá mezi vatou a  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -silikagel pouze jako ochrana;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  by vatou při přímém styku rozežralo a silikagel by se z kolony vysypal.

<sup>5</sup> Studenti vzorek na odpařovací zařízení nachystají, ale nebudou čekat (asi 30 min), až se DCM odpaří. Místo toho si vezmou předpřipravené 22mL obsahující 1 mL extraktu, se kterým budou dále pracovat podle návodu.

##### **Vysvětlí pojmy:**

**Vnitřní standard** – přidává se ke vzorku až těsně před finální analýzou (GC, HPLC). Slouží ke kontrole odezvy stroje. Odezva stroje (plocha píku) látky klesá s každým dalším měřeným vzorkem kvůli zanášení stroje nečistotami. Při přepočtení plochy píku na koncentraci pro sledovanou látku se tedy její koncentrace navyšuje úměrně s klesající odezvou vnitřního standardu. Pokles odezvy vnitřního standardu je strojem vyhodnocován automaticky v poměru ke kalibračním vzorkům, které vedle standardů polutantů obsahují i vnitřní standard, jehož odezva je v tomto případě brána jako 100%. Vnitřním standardem je vždy látka, která ve vzorku obsažena být nemůže.

**Recovery standard** – slouží ke kontrole ztrát při manipulaci se vzorkem (od extrakce až po finální analýzu). Před extrakcí se přidává známé množství recovery standardu (látka, která přirozeně ve vzorku obsažená není), jež odpovídá 100% výtěžnosti. Reálně změřené množství ve vzorku obvykle dosahuje >80%. 20% tedy odpovídá ztrátám (např. z důvodu neúplné eluce u kolonové chromatografie, odparu při redukci objemů extraktů, nekvantitavnímu převodu Pasteurovou pipetou, vylití vzorku apod.). Protože stejné ztráty jako u recovery standardu lze předpokládat pro cílový analyt (pro nás DDE), jeho změřenou koncentraci musíte dopočítat do 100%, tedy příslušně navýšit podle ztrát zjištěných u recovery standardů. Na rozdíl od přepočtu na vnitřní standard, přepočet na výtěžnost recovery standardu musíte udělat Vy sami, např. přepočtem v excelu.