

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2025

Ročník XXIX, číslo 1/2025

Brno 2025

Obsah

1	Stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji metodou HPLC Adriána Dobošová, Radvana Šulová Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno Hroznová 2, 603 00 Brno	1
2	Stanovení močoviny pro kontrolu kontaminace krmiv metodou LC-MS/MS Marta Pnioková, Ludmila Hamplová, Ladislava Benešová, Iva Křivánková Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdNRL Praha Za Opravnou 4, 155 06 Praha	26
3	Zavedení kvalitativní detekce transgenů GMB151 u sóji Jana Stehlíková Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB Hroznová 2, 603 00 Brno	39

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji metodou HPLC

Adriána Dobošová, Radvana Šulová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno
adriana.dobosova@ukzuz.gov.cz

1 Úvod

Řepka olejka je nejrozšířenější a nejvýznamnější olejninou České republiky a zároveň i jednou z nejproduktivnějších zemědělských plodin vůbec. Uplatnění nachází nejen jako potravinářská surovina pro lidskou výživu, ale má také značné možnosti nepotravinářského využití. Je významnou součástí krmných směsí (extrahované šroty, pokrutiny), biomasa se využívá na zelené krmení či hnojení. K atraktivnosti řepky významně přispívá i její využití k výrobě methylesterů řepkového oleje, resp. bionafty [1].

Obecně platí, že nejbohatším zdrojem vitamínu E jsou rostlinné oleje. V řepkovém oleji se vitamín E nachází ve formě tokoferolů. Nejvíce zastoupeným je γ -tokoferol, následovaný α tokoferolem a δ -tokoferolem. Tokoferoly se vyznačují vysokou antioxidační účinností, která zajišťuje vyšší stabilitu proti oxidačnímu žluknutí [2] [3].

Nejvíce metod na stanovení lipofilních vitamínů je vypracováno právě ke stanovení tokoferolů. Při analýze potravinářských materiálů se ve většině případů, po zmýdelnění a izolaci nezmýdelnitelného podílu, oddělí tokoferoly jednou z chromatografických metod. Izolované deriváty tokoferolů se stanoví spektrofotometricky, plynovou chromatografií nebo pomocí HPLC [4].

Úkolem této práce bylo nalézt vyhovující postup pro přípravu vzorků řepky, respektive řepkového oleje a nastavit podmínky chromatografie tak, aby bylo možné stanovit jednotlivé tokoferoly pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie.

2 Teoretická část

2.1 Brukev řepka olejka (řepka olejka) (*Brassica napus subsp. napus*)

2.1.1 Popis rostliny

Řepka olejka z rodu brukve náleží do čeledi brukvovitých. Řepka, tak jak ji dnes známe, vznikla zkřížením brukve zelené a brukve řepice. Jedná se o jednoletý druh, který se pěstuje ve dvou základních formách – ozimé a jarní. Jarní řepka je nejvíce rozšířena v oblasti Číny, severní části Kanady a v severní Evropě. Rozšíření ozimé řepky je výrazně nižší. Ozimá řepka převažuje díky vyšší výkonosti ve střední a západní Evropě. Jarní řepka se v této oblasti pěstuje pouze v případě vymrznutí řepky ozimé jako náhradní plodina. V České republice podíl ozimé řepky kolísá podle let od 90 % do 100 %. [5].

Řepka vytváří mohutný křovitý kořen, který se z téměř 90 % nachází v orniční vrstvě. Lodyha má nejčastěji výšku 140 cm až 160 cm. Na lodyze vyrůstá většinou 6 až 8 větví prvního řádu, které dále větví větvemi druhého a třetího řádu [6]. Listy řepky jsou střídavé, lyrovitě peřenosečné. Květenství řepky je hroznovité se čtyřmi žlutými korunními plátky. Plodem je dvouřadá šešule s blanitou přepážkou, dvěma chlopněmi, která obsahuje většinou 15 až 20 semen. Vyskytují se aj čtyřřadá šešule se 40 až 50 semeny. Semeno je kulovité červenohnědé až modročerné barvy, někdy i žlutě zbarvené s hmotností tisíce semen (HTS) kolem 4 g až 6 g, v některých případech až 10 g [7].



Obrázek č. 1. Řepka olejka (*Brassica napus subsp. napus*) [8].



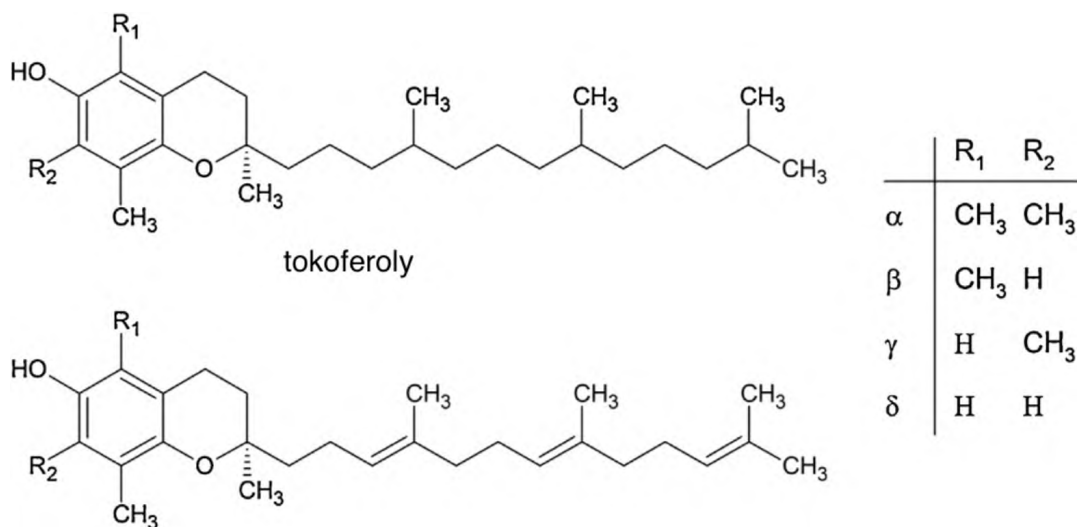
Obrázek č. 2. Semena řepky [9].

2.1.2 Vitamín E

Vitamíny jsou skupina organických sloučenin, které jsou ve velmi malých množstvích nezbytné pro normální fungování lidského těla. Mají různorodé chemické a fyziologické funkce a jsou široce distribuovány v přírodních zdrojích potravin. Třináct vitamínů se uplatňuje v lidské

výživě a podle jejich rozpustnosti se řadí do dvou skupin. Vitamíny rozpustné v tucích jsou vitamíny A, D, E, K. Sem je také zahrnuto asi 50 karotenoidů, které mají různé stupně aktivity vitamínu A. Vitamíny rozpustné ve vodě zahrnují vitamín C a vitamíny skupiny B. Tato jednoduchá klasifikace do určité míry odráží biologickou dostupnost vitamínů, protože rozpustnost ovlivňuje jejich způsob střevní absorpce a jejich příjem tkáněmi. Rozpustnost ovlivňuje také distribuci vitamínů v různých skupinách potravin a má přímý vliv na použité analytické metody [10,11].

Vitamín E byl identifikován v roce 1922 jako specifický vitamín plodnosti. Aktivitu vitamínu E vykazují osm základních strukturně příbuzných derivátů chromanolu (vitamery vitamínu E), jejichž společným základem jsou tokol a tokotrienol. Čtyři formy s nasyceným terpenoidním postranním řetězcem odvozené od tokolu se nazývají tokoferoly (z řeckého tocos = porod a pheros = přinést), čtyři formy s nenasyceným řetězcem odvozené od tokotrienolu se nazývají tokotrienoly. Tokoferoly a tokotrienoly se dále dělí na jednotlivé sloučeniny, které se liší počtem a polohou methylových skupin na chromanolovém kruhu (Obr. 3) a biologickou aktivitou [12]. Tyto vitamery vitamínu E jsou označovány jako α -, β -, γ - a δ -tokoferoly [11].



Obrázek č. 3. Strukturní vzorec tokoferolů a tokotrienolů.

V lidském organismu hraje vitamín E důležitou roli. Je důležitý v boji proti poškození způsobenému volnými radikály – působí jako antioxidant, posiluje imunitní odpověď, hraje roli v prevenci rakoviny, srdečních onemocnění, Parkinsonovy choroby a mnoha jiných nemocí. Má pozitivní účinky na tvorbu pohlavních buněk a zvyšuje plodnost. Dále nachází uplatnění u žen v klimakteriu pro zvýšení účinku hormonální léčby a poruch menstruačního cyklu [4].

2.1.3 Využití a vlastnosti řepky

Řepkové semeno má široké využití, v současné době se zpracovává následujícími způsoby:

- výroba potravin – rafinované jedlé oleje, z nichž jsou odvozené výrobky, ztužené tuky (margaríny),
- průmysl chemie a paliv – výroba paliva pro vznětové motory, glycerín, výroba syntetického kaučuku – faktisu,
- výroba krmiv – krmné směsi s podílem extrahovaných šrotů, řepkové semeno nebo surový olej ke krmným účelům [13].

Jako zdroj oleje zaujímá řepka olejka třetí místo po palmovém a sójovém oleji. Semena řepky jsou hlavní užitkovou částí rostliny. Obsahují (39 – 49) % oleje. Kromě oleje obsahují semena také esenciální aminokyseliny, proto se využívají jako krmivo nebo potravinové doplňky pro lidi. Obsah bezdusíkatých látek výtažkových je nízký, jen asi 5 %, obsah hrubé vlákniny je (7 – 12) % a minerálních látek (2 – 3) %. Semeno řepky obsahuje ale také značné množství antinutričních látek. Nejvýznamnější jsou glukosinoláty, sinapiny, kyselina eruková, ale patří k nim také například antinutriční polysacharidy [9, 14].

V minulosti se řepkový olej ve výživě lidí kvůli své nepříjemné chuti a vlastnostem, způsobeným vysokým podílem kyseliny erukové, nepoužíval. Šlechtěním nových odrůd, zaměřených především na potravinářské využití, došlo k redukci obsahu nežádoucí kyseliny erukové. Tyto odrůdy mají olej vysoké kvality, který může být využit jak pro např. smažení, tak i pro studenou kuchyni. V porovnání s jinými rostlinnými oleji vykazuje také lepší trvanlivost [6, 14].

V řepkovém oleji se nachází vysoký obsah nenasycených mastných kyselin, především kyselina olejová (58 – 68) % z celkového obsahu mastných kyselin (MK), linolová a linolenová.

V porovnání s jinými oleji má řepkový olej nejnížší obsah nasycených mastných kyselin (6 – 8) % z celkového obsahu MK. Díky tomu má řepkový olej vysokou dietní hodnotu [15]. Rostlinné oleje jsou vhodným zdrojem pro pokrytí příjmu vitamínu E. Různé publikace uvádějí, že celkový obsah tokoferolů se pohybuje mezi 80 mg/kg až 1 000 mg/kg oleje. Rafinované řepkové oleje obsahují maximálně 700 mg tokoferolů na kilogram oleje – jejich obsah závisí na kvalitě semene. Spodní limit tokoferolů bývá vyšší v řepkovém oleji než ve slunečnicovém oleji. Současně si řepkový olej uchovává během skladování v lednici, ve tmě i na světle, vyšší obsah tokoferolů ve srovnání s olejem slunečnicovým. Ke ztrátám tokoferolu dochází během rafinace, skladování a při kulinářském zpracování. Nejvyšší úbytek je spojen s deodorizací olejů, průmyslovým zpracování potravin a při fritování nebo smažení potravin. Hlavní tokoferolové frakce v řepkovém oleji jsou γ -tokoferol a α -tokoferol, v malém množství δ -tokoferol [16, 17].

2.2 Analytické metody na stanovení vitamínu E

Stanovení vitamínu E, jeho správného a přesného obsahu v krmivech a potravinách, je poměrně náročný a složitý proces. Náročnost procesu je dána nízkou koncentrací vitamínu ve vzorcích potravin, citlivostí k oxidaci a světelnému záření. Tento proces zahrnuje několik dílčích kroků, a to přípravu vzorku buď alkalickou hydrolýzou, nebo zmýdlením, extrakci vitamínu a vlastní stanovení vhodnou analytickou metodou. Izolované deriváty tokoferolů lze stanovit spektrofotometricky, plynovou chromatografií nebo pomocí HPLC [18].

Pro stanovení vitamínu E jsou v současnosti nejčastěji využívanými metodami vysokoúčinná a ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s UV/FLD detekcí. Rozvojem HPLC techniky poklesl význam ostatních metod stanovení tokoferolů na minimum.

Největší význam z ostatních metod mají i nadále separační techniky, zejména plynová chromatografie, při které je potřebné před samotnou separací provést derivatizaci.

Z elektrochemických metod se využívá přímá voltametrická metoda a polarografická metoda stanovení tokoferolů po jejich oxidaci síranem ceričitým na tokoferylchinony.

U vitamínu E spektrofotometrie představuje nepřímou metodu stanovení, kdy se tokoferoly oxidují na chinony železitými ionty a odpovídající množství vzniklých železnatých iontů se stanoví po reakci s bipyridylem.

Při HPLC metodě se k separaci tokoferolů může použít jak separace na normální, tak i separace na reverzní fázi. Při separaci na reverzní fázi nedochází k separaci β - a γ -tokoferolů. Separace na normální fázi umožňuje separaci 9 tokoferolů a tokotrienolů [19,20].

Oficiální a zároveň i nejpoužívanější metodou na stanovení obsahu tokoferolů a tokotrienolů v živočišných a rostlinných tucích a olejích, se zejména díky své specifčnosti a citlivosti, stala metoda využívající HPLC s FLD detekcí. Tato metoda je popsána v normě ČSN EN ISO 9936 (58 8723) [21].

3 Experimentální část

Na základě dostupných literárních publikací, které se věnují stanovení vitamínu E v potravinových vzorcích, byl vybrán vhodný postup na stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím fluorescenčního detektoru. Konkrétně šlo o stanovení třech forem vitamínu E, které se v řepce průkazně vyskytují a to α -, γ - a δ - tokoferolů. Podmínky měření byly optimalizovány pomocí standardů uvedených tokoferolů. Bylo odzkoušeno několik extrakčních, čisticích a také separačních postupů. V případě prvních dvou postupů se pracovalo se vzorky pomleté řepky, v zbylých dvou případech se vzorky vyextrahovaného oleje. S ohledem na zkušenosti se stanovením vitamínu E v krmivech a premixech doplňkových látek na Oddělení analytiky krmiv ONRL Brno, byl jako první vyzkoušen upravený postup, který vychází z JPP 1038.1 Stanovení vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC s UV detekcí [22]. Druhý postup vycházel z metodiky, kterou používá Výzkumný ústav pivovarský a sladařský v Brně. Zmýdlené vzorky extrahované do diethyletheru a po převedení do methanolu byly přímo analyzovány pomocí HPLC s FLD detektorem [23]. Třetím postupem byl extrakční postup, který vychází z ČSN EN ISO 9936 Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení obsahu tokoferolu a tokotrienolu metodou HPLC [21]. Extrakty vzorků řepkového oleje byly připravené podle normy, ale separace tokoferolů byla provedena v systému s reverzní fází. Poslední, a také nejvhodnější postup byl celý proveden přesně tak, jak je popsáno v normě ČSN EN ISO 9936. Separace vzorku byla provedena v systému s normální fází. Bylo provedeno ověření navržené metody na vzorcích řepkového oleje a následně byla provedena validace metody.

3.1 Metoda stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji

3.1.1 Princip metody

Zkušební dávka oleje se rozpustí v n-heptanu a přefiltruje přes nylonový filtr. Obsah vitamínu E, vyjádřený jako obsah jednotlivých tokoferolů, se stanoví metodou HPLC s FLD detekcí v systému s normální fází.

3.1.2 Chemikálie

Chemikálie jsou analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Acetonitril, pro HPLC.
- 2 Ethanol, $\approx 96\%$, denaturovaný.
- 3 Petrolether.
- 4 Tetrahydrofuran, čistota pro HPLC.
- 5 n-Heptan, čistota pro HPLC.
- 6 Butylhydroxytoluen (BHT).
- 7 Mobilní fáze.

Roztok tetrahydrofuranu, 3,85% v n-heptanu.

Příprava: K 1000 ml n-heptanu (5) se pomocí 20ml odměrné pipety přidá 2×20 ml tetrahydrofuranu (4). Směs se homogenizuje 15 min pomocí ultrazvukové lázně.

- 8 α -Tokoferol, standard, např. Supelco DL-alpha tocopherol, 100 mg, 47783.
- 9 γ -Tokoferol, standard, např. Supelco (+)- γ -Tocopherol, 25 mg, 47785.
- 10 δ -Tokoferol, standard, např. Supelco δ -Tocopherol, 100 mg, 47784.
- 11 α -Tokoferol, zásobní roztok, $c \approx 2000 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 50ml odměrné banky z hnědého skla se naváží asi 100 mg α -tokoferolu (8) a doplní se po značku n-heptanem (5).

- 12 γ -Tokoferol, zásobní roztok, $c \approx 1000 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 25ml odměrné banky z hnědého skla se naváží asi 25 mg γ -tokoferolu (9) a doplní se po značku n-heptanem (5).

- 13 δ -Tokoferol, zásobní roztok, $c \approx 2000 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 50ml odměrné banky z hnědého skla se naváží asi 100 mg δ -tokoferolu (10) a doplní se po značku n-heptanem (5).

Poznámky

- 1 *Po otevření láhve lze tetrahydrofuran (4) skladovat na tmavém místě nejvýše 3 měsíců.*
- 2 *Mobilní fáze (7) se uchovává v láhvi z tmavého skla nejvýše 1 týden.*
- 3 *Skutečná koncentrace α -, γ - a δ -tokoferolu v zásobních roztocích (11, 12, 13) se stanoví spektrofotometricky (viz kapitola 3.1.6 Příprava pracovních roztoků tokoferolů).*
- 4 *Zásobní roztoky (11, 12, 13) lze skladovat chráněné před světlem, při teplotě 4 °C nejvýše 1 měsíc.*

3.1.3 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s fluorescenčním detektorem.
- 2 Spektrofotometr.
- 3 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Topné hnízdo pro 250ml baňky.
- 6 Extrakční přístroj (např. podle Twisselmana).
- 7 Zpětný chladič s účinnou délkou (20 – 30) cm, se zábrusem pro připojení baňky.
- 8 Extrakční baňky se zábrusem, 250 ml.
- 9 Skleněné varné kuličky.
- 10 Rotační vakuová odparka, topná lázeň.
- 11 Stříkačkové nylonové filtry s velikostí pórů 0,45 μ m.
- 12 Injekční stříkačky, objem 2 ml, injekční jehly.
- 13 Automatické pipety s nastavitelným objemem, špičky.
- 14 Vialky z tmavého skla se šroubovacím uzávěrem, objem 2 ml.
- 15 Laboratorní mlýnek ZM 200.

3.1.4 Příprava zkušebního vzorku

3.1.4.1 Semena řepky

Zkušební vzorek oleje se ze semene řepky připraví extrakcí. Použije se postup popsany v JPP 10058.1 Stanovení obsahu tuku.

Poznámky

- 5 *Olej se musí extrahovat bezprostředně po namletí vzorku.*
- 6 *Na ochranu tokoferolů během extrakce se k rozpouštědлу před extrakcí přidá butylhydroxytoluen (BHT) (6), asi 5 mg až 10 mg.*
- 7 *Šestihodinovou extrakci lze rozdělit do dvou dní (např. 4 hodiny – 1. den, 2 hodiny – 2. den).*
- 8 *Aby se zabránilo degradaci tokoferolů, po extrakci se baňky s vyextrahovaným olejem nesuší. Zbytky petroletheru a vody ze vzorku oleje se odpaří na rotační vakuové odparce do sucha.*
- 9 *Olej se extrahuje ve 2 paralelních stanoveních.*

3.1.5 Extrakce vzorku oleje

Do 10ml tmavé odměrné baňky se naváží 0,1 g zkušebního vzorku oleje s přesností na 0,01g. Přidá se asi 5 ml n-heptanu (5), krouživým pohybem se baňka promíchá a doplní n-heptanem (5) po značku. Takto připravený extrakt se přefiltruje přes stříkačkový nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 μm do 2ml vialky a bezprostředně se použije k vlastní chromatografické analýze.

Poznámky

- 10 *V průběhu celého procesu přípravy vzorků musejí být vzorky co nejvíce chráněny před světlem. Použije se tmavé laboratorní sklo, případně se sklo zabalí do hliníkové fólie, okna se opatří UV fóliemi.*
- 11 *Aby se ochránily tokoferoly, extrakty vzorků oleje se připravují bezprostředně po extrakci oleje a následném odpaření zbytku rozpouštědla.*

3.1.6 Příprava pracovních roztoků tokoferolů

Skutečná koncentrace α -, γ - a δ - tokoferolu v zásobních roztocích (11, 12, 13) se stanoví spektrofotometricky:

- 1 ml zásobního roztoku α - a δ -tokoferolu v n-heptanu (11, 13) se odpaří pod proudem dusíku nebo na rotační vakuové odparce. Zbytek se po odpaření rozpustí v 50 ml ethanolu (2).
- 2 ml zásobního roztoku γ -tokoferolů v n-heptanu (12) se odpaří pod proudem dusíku nebo na rotační vakuové odparce. Zbytek se po odpaření rozpustí v 50 ml ethanolu (2).

Pomocí spektrofotometru se změří maximální absorbance těchto roztoků v rozsahu vlnových délek 270 nm až 310 nm. Takto připravené roztoky standardů se změří na spektrofotometru v 1cm kyvetě v absorpčním maximu příslušného tokoferolu proti příslušnému rozpouštědlu a pro výpočet koncentrace standardu (c) v $\mu\text{g/ml}$ pak platí:

$$c = 10000 \times \frac{A \times R}{A_{1cm}^{1\%}}$$

kde c je koncentrace standardu (c) v $\mu\text{g/ml}$,
 A absorbance roztoku,
 R ředění roztoku tokoferolu v etanole.

Pro α -tokoferol v ethanolu při vlnové délce 292 nm $A_{1cm}^{1\%} = 76$,
 γ -tokoferol v ethanolu při vlnové délce 296 nm, $A_{1cm}^{1\%} = 91$,
 δ -tokoferol v ethanolu při vlnové délce 298 nm, $A_{1cm}^{1\%} = 87$.

Poznámky

12 *Každý jednotlivý roztok tokoferolu v ethanolu se změří spektrofotometricky třikrát. Pro každý z roztoků se vypočítá průměrná absorbance A , která se použije k výpočtu skutečné koncentrace zásobních roztoků.*

Pracovní roztoky jednotlivých tokoferolů se připraví ředěním příslušných zásobních roztoků:

14 Pracovní roztok α -tokoferolu, $c \approx 40 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 50ml tmavé odměrné baňky se odpipetuje 1 ml zásobního roztoku α -tokoferolu (11) a doplní se po značku n-heptanem (5).

15 Pracovní roztok δ -tokoferolu, $c \approx 40 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 50ml tmavé odměrné baňky se odpipetuje 1 ml zásobního roztoku δ -tokoferolu (13) a doplní se po značku n-heptanem (5).

16 Pracovní roztok γ -tokoferolu, $c \approx 40 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 25ml tmavé odměrné baňky se odpipetuje 1 ml zásobního roztoku γ -tokoferolu (12) a doplní se po značku n-heptanem (5).

17 Pracovní směsný roztok.

Příprava: Pracovní směsný roztok se připraví do 50ml tmavé odměrné baňky ředěním pracovních roztoků jednotlivých tokoferolů (14, 15, 16) v n-heptanu (5) podle

požadovaného rozsahu analýzy, obvykle o koncentraci α -tokoferolu, $c \approx 11 \mu\text{g/ml}$, δ -tokoferolu, $c \approx 13 \mu\text{g/ml}$, γ -tokoferolu, $c \approx 0,8 \mu\text{g/ml}$.

3.1.7 Příprava kalibračních roztoků tokoferolů

Do sady 10ml tmavých odměrných baněk se odpipetuje postupně (0; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0) ml pracovního směšného roztoku (17). Baňky se doplní po značku n-heptanem (5) a promíchají. Vypočítá se aktuální koncentrace tokoferolů v kalibračních roztocích z koncentrací zjištěných podle 3.1.6.

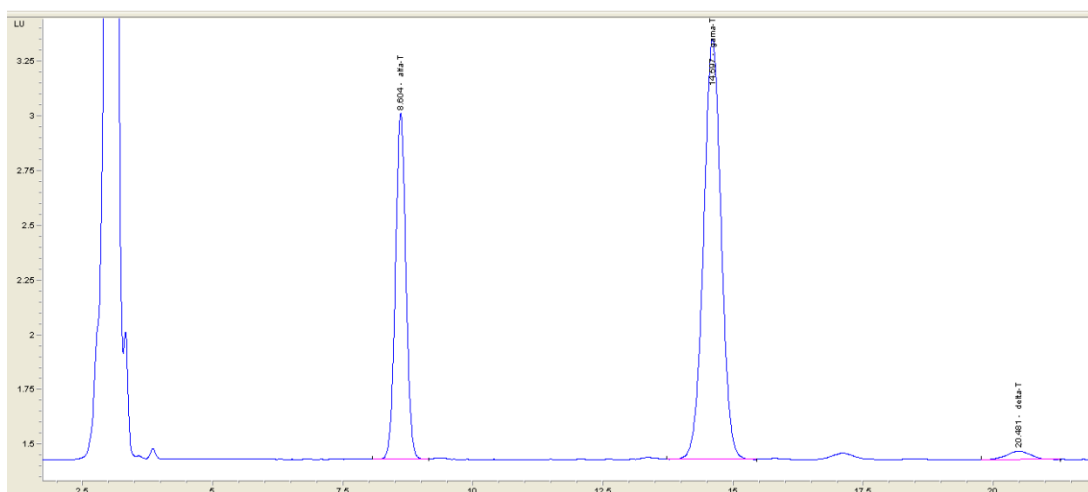
3.1.8 Chromatografické stanovení

Vlastní analýza se provádí metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím fluorescenčního pole. Jednotlivé tokoferoly se separují izokratickou elucí na chromatografické diolové koloně s normální fází. Detekují se při 295 nm (excitace) a 330 nm (emise). Nastavení chromatografických podmínek je uveden v tabulce č. 1. Chromatogram získaný při analýze vzorků řepkového oleje je na obrázku č. 4.

Tabulka č. 1. Chromatografické podmínky.

Kolona	LiChrospher 100Diol 5 μm , 250 $\times$ 4mm CrtgdCol
Předkolona	LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 DIOL (5 μm)
Mobilní fáze	3,85% roztok tetrahydrofuranu v n-heptanu
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Teplota kolony	25 °C
Objem nástřiku	1 μl
Detekce	295 nm (excitace), 330 nm (emise)

Jednotlivé tokoferoly se identifikují srovnáním retenčních časů standardů α -tokoferolu, γ -tokoferolu a δ -tokoferolu s retenčními časy píků v analyzovaném vzorku. Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnějšího standardu. Pro α -, γ - a δ -tokoferol se připraví nejméně sedmibodové kalibrační přímky. Kontroluje se linearita kalibračních grafů.



Obrázek č. 4: Chromatogram reálného vzorku řepkového oleje HPLC 1100.

Poznámky

- 13 Při separaci jednotlivých tokoferolů je vhodné po každém vzorku kolonu propláchnout mobilní fází 10 min při průtoku 1ml/min.
- 14 Před a po každém měření sady vzorků je nutné propláchnout kolonu acetonitrilem (1). Před měřením 15 min při průtoku 0,5ml/min, po měření 30 min při průtoku 0,5ml/min.

3.1.9 Výpočet

Obsah vitamínu E, stanovený jako obsah jeho vitamerů α -, γ - a δ -tokoferolů ve vzorku řepkového oleje, se vypočítá z kalibrační závislosti. Vitamin E se stanoví také jako výpočtový parametr – suma tokoferolů ($\alpha + \gamma + \delta$ tokoferol). Sestrojí se grafy závislosti plochy píků tokoferolů na koncentraci v požadovaném rozsahu. Ze směrnice kalibrační přímky se zjistí koncentrace každého tokoferolu v extraktu. Výsledná koncentrace α -, γ - a δ -tokoferolů ve vzorku, vyjádřená v mg/kg se vypočítá podle vztahu:

$$x = \frac{c \times V}{m}$$

- kde x je obsah tokoferolu (α -, γ - nebo δ -) ve vzorku v mg/kg,
- c koncentrace tokoferolu (α -, γ - nebo δ -) zjištěná z kalibrační závislosti v $\mu\text{g/ml}$,
- V objem extrakční směsi vzorku v ml,
- m navážka vzorku v g.

Poznámky

15 Podle ČSN EN ISO 9936 je na výpočet možné použít také vztah:

$$x = \frac{\rho \times A_t \times V}{A_s \times m}$$

kde x je obsah tokoferolu (α -, γ - nebo δ -) ve vzorku v mg/kg,
 ρ koncentrace tokoferolu (α -, γ - nebo δ -) zjištěná z kalibrační závislosti v $\mu\text{g/ml}$,
 A_t průměrná plocha píku tokoferolu (α -, γ - nebo δ -) ve zkušebním vzorku,
 V objem extrakční směsi vzorku v ml,
 A_s průměrná plocha píku získaného pro standard tokoferolu (α -, γ - nebo δ -),
 m navážka vzorku v g.

16 Obsah tokoferolů se přepočte na přesnou navážku vzorku oleje.

3.2 Výsledky a diskuse

3.2.1 Optimalizace postupu

Pro stanovení obsahu vitamínu E v potravinových vzorcích je dostupné poměrně velké množství zpracované literatury. Postup stanovení vitamínu E v potravinových a krmivářských vzorcích upravuje také legislativa. Konkrétně stanovení vitamínu E v krmivech popisuje ČSN EN ISO 6867 Krmiva – Stanovení obsahu vitamínu E – Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie, v potravinách je to ČSN EN 12822 Potraviny – Stanovení vitamínu E metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie – Měření α -, β -, γ -, δ - tokoferolu. Pro tukové vzorky je vypracovaná ČSN EN ISO 9936 Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení obsahu tokoferolu a tokotrienolu metodou HPLC. V literatuře jsou popsány další extrakční, čistící a také separační metody.

Vzhledem k tomu, že se řepka řadí k olejnatým plodinám a může obsahovat až 50 % oleje, se jako nejvhodnější, po odzkoušení čtyř různých postupů, ukázal postup popsáný v ČSN EN ISO 9936. Pomocí standardu α -, γ - a δ -tokoferolu byly optimalizovány podmínky pro měření na HPLC.

Byly stanoveny základní validační parametry metody: opakovatelnost, správnost, linearita, meze detekce a nejistota stanovení.

Poznámky

- 17 *Pro ověření a validaci metody byly použity vzorky řepky olejky, které poskytl Národní odrůdový úřad. Vzorky byly určeny k běžnému testování na pracovišti. Byly to vzorky č. 2434; č. 2435; č. 2437 a č. 2446 ze sklizně 2021 ze zkušební stanice Staňkov.*

Extrakce vzorku

Parametr vitamín E slouží k zpřesnění hodnocení řepky. Jako první byla zkoušena upravená forma postupu JPP 1038.1 Stanovení vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC s UV detekcí [22]. Tento postup používá Oddělení analytiky krmiv NRL, kde se pracuje se vzorky krmiv a premixů a vitamín E je stanovený jako DL- α -tokoferol. Podle této metodiky byly zkušební vzorky řepky nejdříve zmýdelněny 60% hydroxidem draselným na rotační třepačce po dobu (14 – 16) h. Byly odzkoušeny oba popsané typy extrakce vitamínu E do hexanu, a to jak extrakce kapalina – kapalina, tak i extrakce na pevné fázi. Alikvotní podíl hexanového extraktu byl pak odfoukán pod proudem dusíku a vzniklý odparek byl rozpuštěn v alikvotním podílu methanolu. Extrakty byly odstředěné na laboratorní odstředivce a analyzovány na HPLC s DAD a FLD detektorem. Byla odzkoušena silikagelová kolona YMC Carotenoid C30 3 μ m (150 mm $\times$ 3.0 mm) s předkolonou za použití mobilní fáze: 30 % methanol + 3 % H₂O + 67 % acetonitril. Při použití této kolony docházelo k rozmytí píku standardu α -tokoferolu, také se nepodařilo ověřit správnost metodou standardního přídávku. Druhou odzkoušenou kolonou, byla kolona Kinetex C18 (2,6 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm) s předkolonou. Ani v tomto případě se nepodařilo ověřit správnost metody. Podle zjištění laboratoře je pravděpodobné, že dochází ke ztrátám tokoferolů už během zmýdelnění. Postup je mnohem vhodnější na stanovení přidaného vitamínu E v krmivech a premixech, kde se vitamin E nachází v řádově vyšších množstvích, než je to u nativního vitamínu E, přítomného v semenech řepky.

Jako další zkoušený postup byl postup, který používá Výzkumný ústav pivovarský a sladařský v Brně [23]. Zmýdelněný vzorek byl v dělicí baňce extrahován do diethyletheru. Po promytí a vysušení éterového extraktu bylo rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn v methanolu. Vzorky se analyzovaly pomocí HPLC s FLD detektorem. Byla použita kolona s reverzní fází YMC Carotenoid C30 (3 μ m, 150 mm $\times$ 3,0 mm) s předkolonou. Tento extrakční postup byl vyvinutý pro stanovení vitamínu E ve vzorcích obilovin. Pro námi požadované stanovení vitamínu E v semenech řepky olejky se tento postup

jevil jako nevhodný z důvodu nedostatečného zmýdelnění vzorku. Problém se nepodařilo vyřešit ani výrazným snížením navážky vzorku.

Třetím odzkoušeným postupem byl postup vycházející z ČSN EN ISO 9936 Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení obsahu tokoferolu a tokotrienolu metodou HPLC [21]. Nejdříve bylo nutno vyextrahovat olej ze vzorku řepky. Navážka oleje byla rozpuštěna v n-heptanu a po odfoukání rozpouštědla byl odparek převeden do methanolu. Vzorek byl přefiltrován přes stříkačkový nylonový filtr do vialek a měřen na HPLC s FLD detektorem. Byla použita kolona s reverzní fází Kinetex C18 (2.6 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm) s předkolonou. Ani u tohoto postupu nebylo možné ověřit správnost metodou standardního přídatku. Docházelo k ztrátám tokoferolů, především γ -tokoferolu.

Posledním zkoušeným postupem byl postup, který vychází také z ČSN EN ISO 9936 [21]. Kvůli ztrátám tokoferolů během zmýdelnění a extrakce vzorku byla minimalizace kroků postupu žádoucí. Proto byla využita kapalinová chromatografie v systému s normální fází, která je vhodnější pro separaci tokoferolů ve vzorcích s vysokým obsahem tuků. Vzorky vyextrahovaného oleje byly rozpuštěny v n-heptanu, přefiltrovány a měřeny na HPLC s FLD detektorem. Tokoferoly byly separovány na koloně s normální fází.

Chromatografické podmínky

Při výběru kolony a nastavení chromatografických podmínek se vycházelo z ČSN EN ISO 9936. Byla použita analytická kolona typu „cartridge“ LiChrospher 100Diol (250 $\times$ 4 mm, 5 μ m) s předkolonou LiChroCART® 4-4 LiChrospher® 100 DIOL (5 μ m). Tokoferoly byly stanoveny metodou HPLC využitím fluorescenční detekce s vlnovou délkou excitace 295 nm a emisní vlnovou délkou 330 nm.

3.2.2 Validační parametry

Výpočet všech validačních parametrů (opakovatelnost, linearita, meze detekce a stanovitelnosti a nejistota stanovení) byl proveden pomocí software Labsystem 7.

Opakovatelnost

Opakovatelnost (repeatability) označuje přesnost metody, kdy se všechny analýzy provádějí v jedné laboratoři, stejným pracovníkem, v krátkém časovém úseku a na stejném přístroji. Charakterizuje rozptýlení hodnot měřené vlastnosti kolem střední hodnoty, zapříčiněné

působením náhodných chyb. Statistickou mírou přesnosti je směrodatná odchylka (s), resp. relativní směrodatná odchylka (s_r).

Výpočet opakovatelnosti byl proveden pomocí software Labsystem 7 – opakovatelnost po hladinách. Opakovatelnost byla stanovena zvlášť pro každý tokoferol (α -, δ - a γ -) a taky pro sumu tokoferolů. Čtyři vzorky řepkového oleje byly extrahovány a analyzovány v šesti opakováních podle výše popsaného postupu.

Byla vypočítána směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Ze směrodatné odchylky, která charakterizuje přesnost výsledků získaných použitou analytickou metodou, byla vypočítána dovolená difference paralelních stanovení $R_{\max}$, tj. maximální rozpětí, které lze ještě vysvětlit přítomností náhodných chyb [14].

$$R_{\max} = a_s \times s,$$

kde a_s je tabelovaný koeficient pro dvě měření a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$, jehož hodnota 2,77;

s směrodatná odchylka z vícenásobných měření jednoho vzorku.

Tabulka č. 2. α -Tokoferol – opakovatelnost měření a maximální difference dvou paralelních stanovení.

Vzorek	Počet opakování	Průměr (mg/kg)	s	s_r (%)	$R_{\max}$
2434	6	193,69	7,10	3,67	19,67
2435	6	177,25	1,04	0,59	2,88
2437	6	210,37	3,88	1,84	10,75
2446	6	203,15	1,39	0,69	3,85

Tabulka č. 3. γ -Tokoferol – opakovatelnost měření a maximální difference dvou paralelních stanovení.

Vzorek	Počet opakování	Průměr (mg/kg)	s	s _r (%)	R _{max}
2434	6	290,14	5,45	1,88	15,10
2435	6	275,78	2,86	1,04	7,92
2437	6	274,70	5,80	2,11	16,07
2446	6	277,63	1,70	0,61	4,71

Tabulka č. 4. δ -Tokoferol – opakovatelnost měření a maximální difference dvou paralelních stanovení.

Vzorek	Počet opakování	Průměr (mg/kg)	s	s _r (%)	R _{max}
2434	6	6,63	0,30	4,48	0,83
2435	6	8,48	0,36	4,18	1,00
2437	6	8,27	0,29	3,47	0,80
2446	6	7,21	0,19	2,64	0,53

Tabulka č. 5. Suma tokoferolů – opakovatelnost měření a maximální difference dvou paralelních stanovení

Vzorek	Počet opakování	Průměr (mg/kg)	s	s _r (%)	R _{max}
2434	6	490,46	12,1	2,46	33,52
2435	6	461,5	3,33	0,721	9,22
2437	6	493,35	9,47	1,92	26,23
2446	6	487,98	2,86	0,59	7,92

Pro zápis výsledků do Labsystému byly vloženy pro povolenou diferenci dvou paralelních stanovení tyto hodnoty:

α -tokoferol – 30 mg/kg,

γ -tokoferol – 30 mg/kg,

δ -tokoferol – 5 mg/kg.

Suma tokoferolů – 50 mg/kg.

Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s akceptovanou nebo deklarovanou referenční hodnotou. V současné době není dostupný žádný CRM s deklarovaným obsahem vitamínu E v semenech řepky či v řepkovém oleji a nejsou zavedeny žádné mezilaboratorní porovnávací zkoušky na toto stanovení. Z tohoto důvodu byla správnost metody na stanovení obsahu vitamínu E ověřena metodou standardního přídávku s použitím testu výtěžnosti. K přesné navážce vzorku oleje bylo vždy přidáno definované množství standardu tokoferolů tak, aby byla připravena řada vzorků na dvou koncentračních hladinách, pokrývající celý požadovaný rozsah. Pro každou hladinu byly připraveny vzorky ve 3 opakováních. Takto připravené vzorky byly změřeny na HPLC. Získané výsledky stanovení byly vyhodnoceny v programu LabSystem 7 - Správnost standardním přídávkem. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách č. 6, 7 a 8.

Tabulka č. 6. α -Tokoferol – ověření správnosti metody stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji.

Popis	Přídavek (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	T-test vypočtený	T-test tabelovaný	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Výchozí vz. 2436	0	0	-	-	-	-
Přídavek 1	218,244	218,29	0,1031	4,303	216,751 - 219,837	přijata
Přídavek 2	545,61	545,66	0,0598	4,303	542,896 - 548,428	přijata

Tabulka č. 7. γ -Tokoferol – ověření správnosti metody stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji.

Popis	Přídavek (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	T-test vypočtený	T-test tabelovaný	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Výchozí vz. 2436	0	0	-	-	-	-
Přídavek 1	254,52	254,81	0,3071	4,303	251,843 - 257,769	přijata
Přídavek 2	636,3	645,35	1,714	4,303	628,551 - 662,139	přijata

Tabulka č. 8. δ -Tokoferol – ověření správnosti metody stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji.

Popis	Přídavek (mg/kg)	Naměřeno (mg/kg)	T-test vypočtený	T-test tabelovaný	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Výchozí vz. 2436	0	0	-	-	-	-
Přídavek 1	15,356	13,225	4,075	4,303	11,5611 - 14,8889	přijata
Přídavek 2	38,39	37,685	2,417	4,303	36,7559 - 38,6133	přijata

Z výsledků v tabulkách č. 6; 7 a 8 vyplývá, že popsaná analytická metoda poskytuje správné výsledky.

Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Pro ověření linearity byly použity standardy tokoferolů (9; 10; 11) ve formě pracovního směsného roztoku. Byla vytvořena řada kalibračních roztoků tokoferolů v n-heptanu o koncentraci 0 $\mu\text{g/ml}$ až 10,9122 $\mu\text{g/ml}$ α -tokoferolu, 0 $\mu\text{g/ml}$ až 12,726 $\mu\text{g/ml}$ γ -tokoferolu a o koncentraci 0 $\mu\text{g/ml}$ až 0,7678 $\mu\text{g/ml}$ δ -tokoferolu. Uvedené koncentrační rozpětí je dostatečné pro stanovení obsahu jednotlivých tokoferolů ve vzorcích řepkového oleje. Připravené kalibrační roztoky byly analyzovány na HPLC. Kontrola lineární závislosti byla provedena pomocí software Labsystem 7 - Kalibrace MD, MS linearita. Hodnoty korelačních koeficientů R a hodnoty koeficientů QC jsou uvedeny v tabulce č. 9. Linearita se obecně považuje za prokázanou, když $R > 0,99$ a $QC < 5\%$.

Tabulka č. 9. Linearita – korelační a QC koeficient.

Tokoferol	Korelační koef.	QC (%)
α – tokoferol	0,9997	2,79
γ – tokoferol	0,9997	2,54
δ – tokoferol	0,9997	2,82

Hodnoty všech korelačních koeficientů a koeficientů QC jsou v požadovaném limitu – linearita byla prokázána.

Meze detekce a stanovitelnosti

Pro stanovení detekčních limitů byl použit program Labsystem 7 - MD, MS ze šumu základní linie. Byla vytvořena řada kalibračních roztoků tokoferolů v n-heptanu o koncentraci 0 µg/ml až 10,9122 µg/ml α-tokoferolu, 0 µg/ml až 12,726 µg/ml γ-tokoferolu a o koncentraci 0 µg/ml až 0,7678 µg/ml δ-tokoferolu. Připravené roztoky byly změřeny na HPLC za podmínek metody a následně byly vyhodnoceny výšky píků tokoferolů. Z naměřených hodnot byly vypočítány směrnice kalibrační přímky pro každý tokoferol. Dále bylo nutné zjistit maximální kolísání základní linie, tj. rozdíl mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou šumu v intervalu, který je dán 20tinásobkem pološířky sledovaného píku. Bylo připraveno 6 slepých vzorků, které byly změřeny na HPLC a pomocí řídicího software ChemStation B.04.02 byly vypočítány hodnoty šumu. Ze směrnice kalibrační přímky a hodnot maximálního kolísání základní linie byly vypočítány meze detekce a stanovitelnosti, které jsou shrnuty v tabulce č. 10.

Tabulka č. 10. Meze detekce a stanovitelnosti.

Parametr		α – tokoferol	γ – tokoferol	δ – tokoferol
Směrnice kalibrační přímky	b₁	0,844206	0,73433	0,60857
Korelační koeficient	R²	0,9997	0,9997	0,9997
Max. kolísání zákl.linie	h_{max} (pA)	0,02084	0,016168	0,014607
Koncentrace na mezi detekce	x_D (µg.ml⁻¹)	0,0741	0,0661	0,072
	x_D (mg/kg)	7,41	6,61	7,2
Koncentrace na mezi stanovitelnosti	x_Q (µg.ml⁻¹)	0,2469	0,2202	0,24
	x_Q (mg/kg)	24,69	22,02	24,00

Za výše popsaných podmínek metody je mez stanovitelnosti pro α-tokoferol 24,69 mg/kg, pro γ-tokoferol 22,02 mg/kg a pro δ-tokoferol 24,00 mg/kg.

Pro zápis výsledků byla použita praktická mez stanovitelnosti pro α-tokoferol 30,00 mg/kg, pro γ-tokoferol 30,00 mg/kg a pro δ-tokoferol 24,00 mg/kg.

Nejistota stanovení

Byla stanovena relativní standardní nejistota a relativní rozšířená nejistota. Výpočet byl proveden pomocí software Labsystem 7 – Nejistota po hladinách. Pro výpočet rozšířené nejistoty byl použit faktor pokrytí 2. Nejistota byla stanovena zvlášť pro každý tokoferol (α -, δ - a γ -) a taky pro sumu tokoferolů. Vypočítané nejistoty pro stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji jsou uvedeny v tabulkách č.11; 12, 13 a 14.

Tabulka č. 11. α – tokoferol – nejistoty pro stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji.

Vzorek	Koncentrační rozsah (mg/kg)	Standardní nejistota		Rozšířená nejistota (k = 2,0)	
			relativní (%)		relativní (%)
2434	170-250	7,10	3,67	14,20	7,34
2435		1,04	0,59	2,08	1,18
2437		3,88	1,84	7,76	3,68
2446		1,39	0,69	2,78	1,38

Tabulka č. 12. γ – tokoferol – nejistoty pro stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji.

Vzorek	Koncentrační rozsah (mg/kg)	Standardní nejistota		Rozšířená nejistota (k = 2,0)	
			relativní (%)		relativní (%)
2434	270-350	5,45	1,88	10,90	3,76
2435		2,86	1,04	5,72	2,08
2437		5,80	2,11	11,60	4,22
2446		1,70	0,61	3,4	1,22

Tabulka č. 13. δ – tokoferol – nejistoty pro stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji.

Vzorek	Koncentrační rozsah (mg/kg)	Standardní nejistota		Rozšířená nejistota (k = 2,0)	
			relativní (%)		relativní (%)
2434	5-15	0,30	4,48	0,60	8,96
2435		0,36	4,18	0,72	8,36
2437		0,29	3,47	0,58	6,94
2446		0,19	2,64	0,38	5,28

Tabulka č. 14. Suma tokoferolů – nejistoty pro stanovení obsahu vitamínu E v řepkovém oleji.

Vzorek	Koncentrační rozsah (mg/kg)	Standardní nejistota		Rozšířená nejistota ($k = 2,0$)	
			relativní (%)		relativní (%)
2434	450-620	12,10	2,46	24,20	4,92
2435		3,33	0,72	6,66	1,44
2437		9,47	1,92	18,94	6,94
2446		2,86	0,59	5,72	1,18

Pro α – tokoferol v intervalu koncentračního rozsahu (170 – 250) mg/kg α – tokoferolu v řepkovém oleji byla vypočítaná relativní rozšířená nejistota stanovení zaokrouhlena na hodnotu 15 %. Pro γ – tokoferol v intervalu koncentračního rozsahu (270 – 350) mg/kg α – tokoferolu v řepkovém oleji byla vypočítaná relativní rozšířená nejistota stanovení zaokrouhlena na hodnotu 15 %. Pro δ – tokoferol v intervalu koncentračního rozsahu (5 – 15) mg/kg α – tokoferolu v řepkovém oleji byla vypočítaná relativní rozšířená nejistota stanovení zaokrouhlena na hodnotu 20 %. Pro sumu tokoferolů v intervalu koncentračního rozsahu (450 – 620) mg/kg celkového obsahu tokoferolů v řepkovém oleji byla vypočítaná relativní rozšířená nejistota stanovení zaokrouhlena na hodnotu 15 %.

4 Závěr

Cílem práce bylo nalézt vhodnou metodu na stanovení obsahu vitamínu E ve vzorcích řepky olejné, případně ve vzorcích řepkového oleje s využitím HPLC. Po odzkoušení několika postupů byl jako nejvhodnější vybrán postup popsán v ČSN EN ISO 9936 Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení obsahu tokoferolu a tokotrienolu metodou HPLC. Byly optimalizovány podmínky pro extrakci oleje a taky pro měření na HPLC. Kvůli oxidaci tokoferolů bylo nutné nastavit podmínky, které zabezpečují ochranu tokoferolů během přípravy vzorků a během samotného měření. To se docílí využitím šestihodinové extrakce oleje s přidavkem antioxidantu (BHT), použitím tmavého skla či přípravy vzorku oleje bezprostředně po jeho získání. Uchovávání vzorků extraktu i pomletého vzorku vzhledem k obecně známe rychlé oxidaci tokoferolů není možné.

Vitamín E se stanoví ve formě přítomných tokoferolů a to alfa- (α), gama- (γ) a delta- (δ) tokoferolů a také jako výpočtový parametr – suma tokoferolů ($\alpha + \gamma + \delta$ tokoferol). Separace

tokoferolů probíhá izokratickou elucí na HPLC 1100 s chromatografickou kolonou s normální fází LiChrospher 100Diol (250 × 4mm, 5 µm) a detekuje na FLD detektoru s vlnovou délkou excitace 295 nm a emisní vlnovou délkou 330 nm.

Po ukončení optimalizace metody byla metoda validována. Byla stanovena opakovatelnost, linearita, meze detekce a stanovitelnosti a nejistota stanovení. Do laboratorního informačního a řídicího systému Labsystém 7 byly po zaokrouhlení vloženy následující parametry. Povolený rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními byl nastaven na hodnotu: α – tokoferol – 30 mg /kg, γ – tokoferol – 30 mg /kg, δ – tokoferol – 5 mg /kg, suma tokoferolů – 50 mg /kg, Pro mez stanovitelnosti byla zadána hodnota: α – tokoferol – 30 mg /kg, γ – tokoferol – 30 mg /kg, δ – tokoferol – 24 mg/kg a pro rozšířenou nejistotu stanovení hodnota: α – tokoferol – 15 %, γ – tokoferol – 15 %, δ – tokoferol – 20 %, suma tokoferolů – 15 %.

Vzhledem k tomu, že hodnoty δ – tokoferolu v měřených vzorcích nedosahují mez stanovitelnosti, výsledná hodnota bude vyjádřena jako obsah δ – tokoferolu < MS. To ale nevylučuje možnost existence odrůd s obsahem δ – tokoferolu nad mezí stanovitelnosti.

Popsaná metoda je vhodná pro stanovení vitamínu E ve formě alfa- (α), gama- (γ) a delta- (δ) tokoferolů v řepkovém oleji.

5 Literatura

1. VANČUROVÁ P.: Dynamika vývoje produkce a zpracování řepky v ČR a vybraných zemích EU. [online]. [cit. 17. 8. 2022]. Dostupné z: <https://adoc.pub/dynamika-vyvoje-produkce-a-zpracovani-epky-v-r-a-vybranych-z.html>
2. ZUKALOVÁ H. - BEČKA D. - VAŠÁK J. Kvalita ozimé řepky a její hospodářský význam. In: *Sborník z konference „Prosperující olejniny“, 12.-14.12. 2007*. Česká zemědělská univerzita v Praze [online]. Praha: 2007. [cit. 17. 8. 2022]. Dostupné z: http://konference.agrobiologie.cz/2007-12-12/15_zukalova_becka_vasak_kvalita_ozime_repy_a_jeji_hospodarsky_vyznam.pdf
3. HUSSAIN N., et al. Detection of Tocopherol in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Using Gas Chromatography with Flame Ionization Detector, In *Journal of Integrative Agriculture* [online]. 2013, 12 (5), pp. 803-814. [cit. 17. 8. 2022]. ISSN 2095-3119. Dostupné z: doi: 10.1016/S2095-3119(13)60301-9
4. ŠENKOVÁ T. *Charakteristika lipofilních vitamínů a jejich stanovení chromatografickými technikami*. Zlín, 2007. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická
5. LAŠTOVIČKOVÁ, I. *Řepka jako perspektivní plodina v programu českého zemědělství*. Brno, 2009. Diplomová práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Provozně ekonomická fakulta, Ústav regionální a podnikové ekonomiky.

6. BARANYK, P. et al., *Olejniny*. 1 vyd. Praha: Profi Press, s. r. o., 2010. 205 s. ISBN 978-80-86726-38-0.
7. VAŠÁK, J. et al. *Řepka*. Praha, Ing. František Savov – AGROSPÓJ, 2000. 321 s. ISBN 802-39-4236-0
8. Wikipedie, 2022. Brukev řepka [online]. [cit. 18.8.2022]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Brukev_%C5%99epka
9. ŘEPKA OLEJNÁ (*Brassica napus* L.) [online]. [cit. 18.8.2022]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/repka.htm>
10. BALL, G. F. M. 2004. *Vitamins. Their Role in the Human body*. Blackwell Publishing. USA. 2004. 432 p. ISBN 0-632-06478-1.
11. BALL, G. F. M. 2006. *Vitamins in Foods. Analysis, Bioavailability, and stability*. CRC Press Taylor & Francis Group. USA. 2006. 785 p. ISBN 978-1-57444-804-7.
12. KAMENICKÁ, M. *Analýza mastných kyselin a tokoferolů v olejích pomocí GC-MS*. Pardubice, 2020. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická
13. ZEHNÁLEK, P. *Seznam doporučených odrůd – Olejniny*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno. Národní odrůdový úřad. 2010. 122 s. ISBN 978-80-7401-023-1
14. FRANČÁKOVÁ, H., et al. *Hodnotenie poľnohospodárskych produktov*. 2010. Nitra: SPU. 168 s. ISBN 978-80-5520360-7.
15. ORLOVIUS, K. – KIRBKY, E.A. *Fettiling for higfy yeld and quality. Oilseed rape*. Basel: International potash institue [online]. 2013, no. 16, 125 p. [cit. 9. 12. 2022]. Dostupné z: <https://www.ipipotash.org/uploads/udocs/No%2016%20Oilseed%20rape.pdf>
16. KAMENICKÁ, M. *Analýza mastných kyselin a tokoferolů v olejích pomocí GC-MS*. Pardubice, 2020. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická
17. KREPS, F. *Vplyv ohrevu rastlinných olejov na degradáciu tokoferolov a vznik tokoferolov mastných kyselín*. Bratislava, 2015. Disertační práce. Slovenská technická univerzita v Bratislave. Fakulta chemickej a potravinárskej technológie.
18. Hosmanová R.- Douša M. HPLC stanovení obsahu vitamínu E v krmných surovinách, krmivech a potravinách. In *Chemické listy*. [online]. 2007, vol.101, pp. 578-583. [cit. 09. 12. 2022]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_07_578-583.pdf
19. Douša M. Stanovení vitamínů, doplňkových látek a vybraných léčiv v krmivech. 2007. ÚKZÚZ Brno.
20. HÁLKOVÁ, J. et al. *Analýza potravin*. 2000. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 102 s. ISBN 80-902775-3-5.
21. ČSN EN ISO 9936. 2016. Živočišné a rostlinné tuky a oleje – Stanovení obsahu tokoferolu a tokotrienolu metodou HPLC
22. JPP 1038.1 – Stanovení vitamínu A a vitamínu E metodou HPLC s UV detekcí – revize 2. NRL ÚKZÚZ
23. BENEŠOVÁ, K, et al. Charakteristika ječného sladu pomocí HPLC. In *Chemické listy* [online]. 2014, 108 (10), pp. 961-966. [cit. 12. 12. 2022]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/451>
24. Labsystém 7: Referenční příručka. CROSS Zlín a.s. 2023.

Stanovení močoviny pro kontrolu kontaminace krmiv metodou LC-MS/MS

Marta Pnioková, Ludmila Hamplová, Ladislava Benešová, Iva Křivánková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

OdNRL Praha, Za Opravnou 4, 155 06 Praha

marta.pniokova@ukzuz.gov.cz

1 Souhrn

Močovina, použitá jako doplňková látka, se stanovuje v krmivech pro účely úřední kontroly podle nařízení EK č. 152/2009, resp. prováděcího nařízení komise (EU) 2024/771 [1], spektrofotometricky. Při použití postupu stanovení močoviny pro nízké obsahy může v některých maticích docházet k interferencím jinými přítomnými dusíkatými látkami a tím k falešně pozitivním výsledkům.

Nově vypracovaný postup specifikuje podmínky pro stanovení močoviny v krmivech metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). Kladem této metody je dobrá opakovatelnost a správnost, využití pro široký rozsah koncentrací v různých maticích a spolehlivost metody při nízkých obsazích močoviny. Metoda je časově méně náročná než spektrofotometrie, protože je rychlá a jednoduchá na přípravu vzorku. Metoda je také robustnější, pokud jde o matriční efekty. Metoda je ale pro rutinní analýzu poměrně nákladná a molekula močoviny má pouze jeden iontový přechod.

2 Úvod

V posledních letech bylo mnoho požadavků na analýzu kontaminací močovinou v krmných směsích (KS), zejména v krmivech pro domácí zvířata, v rybí moučce (RM) a v kvasnicích (KV).

U těchto typů vzorků, kde jsou složité matrice s významným obsahem volných aminokyselin, je problém s falešně pozitivními výsledky. Jen v roce 2023 bylo v rámci úředních kontrol

dvanáct sporných výsledků s obsahem močoviny na úrovni 0,5 % (jedno krmivo pro domácí zvířata, tři vzorky kvasnic a osm rybích mouček).

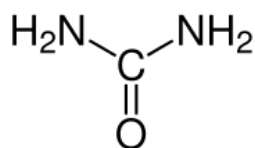
Močovina

Močovina je nejdůležitějším a nejpoužívanějším syntetickým zdrojem neproteinového dusíku, který mohou přežvýkavci využít pro syntézu všech aminokyselin pomocí bakterií v bachoru, kde je močovina metabolizována enzymem ureázou na amoniak a oxid uhličitý.

Močovina je také přirozenou látkou metabolismu dusíku a také jedním z celosvětově nejpoužívanějších hnojiv. Nadměrná konzumace močoviny může vést k rychlé produkci nebo přebytku amoniaku v bachoru, což vede k toxicitě nebo ztrátě dusíku, což může snížit užitkovost zvířat. Přítomnost močoviny je škodlivá pro nepřežvýkavé druhy.

Vzhledem k vysokému obsahu molekulárního dusíku v močovině, kolem 46 %, je potenciální látkou pro falšování obsahu bílkovin v krmivech.

Z uvedených důvodů je nutná pravidelná úřední kontrola v krmivech a materiálech pro výrobu krmiv.



Obrázek 1. Močovina.

Metody stanovení močoviny

Oficiální metodou v Evropské unii pro stanovení močoviny v krmivech je spektrofotometrická metoda podle nařízení komise 152/2009, příloha III část D, resp. prováděcího nařízení komise (EU) 2024/771, příloha III část D [1]. Tato metoda je založena na reakci močoviny se specifickou molekulou za vzniku chromoforu, jehož obsah je analyzován spektrofotometricky, měřením optické hustoty roztoku vzorku při specifické vlnové délce. Tato metoda podle Nařízení se v laboratoři dlouhodobě běžně používá a je osvědčená.

Druhá oficiální metoda je enzymatická, podle lékopisu Spojených států amerických, U.S. Pharmacopeia (AOAO Official method 941.04 2000), založená na enzymatické degradaci močoviny v přítomnosti ureázy na amoniak, který se stanoví Kjeldahlovou metodou. S enzymatickou metodou nemá laboratoř zkušenosti.

Třetí oficiální metodou používanou ke stanovení močoviny je kapalinová chromatografie s detekcí ultrafialovým a viditelným diodovým polem (HPLC-DAD) podle ISO 19746 z roku 2017 pro stanovení močoviny v hnojivech.

Neoficiálními metodami jsou kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí a LC-MS.

S třetí metodou (HPLC-DAD) má laboratoř zkušenost z účasti v testu způsobilosti z EURL v roce 2019. Shoda byla pouze pro vzorek s nejvyšším obsahem. Výsledky pro dvě nižší úrovně obsahu vzorků však nebyly tolik nadhodnoceny v porovnání s výsledky ostatních účastníků se spektrofotometrickou metodou.

DAD (UV-VIS) tedy také není optimální volbou detekce, díky interferencím, pro nízké obsahy močoviny v krmivech.

Proto se laboratoř rozhodla vyvinout a validovat metodu LC-MS/MS, která by měla mít mnohem lepší selektivitu a specifitu než předchozí metody. Metoda by také měla být robustnější vůči matričním vlivům.

Při výběru vhodného postupu laboratoř použila především metody uvedené v literatuře [2-5] pro matrice jako jsou krmiva a kvasnice. Všichni autoři vyvinuli vlastní metodu LC-MS. Tři z nich [2,3,4] porovnávali svou novou metodu s enzymatickou metodou a dva autoři [3,4] porovnávali novou metodu s metodou spektrofotometrickou. MacMahon [5] a kolegové neporovnávali metody, ale vyvinuli multireziduální analýzu pro analyty, které lze použít k falšování potravin, včetně močoviny. Pibarot a Pilard [4] použili k extrakci vzorku pouze vodu a k separaci reverzní fázi s izokratickou elucí vodou. Ostatní autoři použili extrakci pouze vodou nebo vodou s kyselinou mravenčí a k separaci HILIC (hydrofilní interakční chromatografie) s gradientovou elucí acetonitrilem a vodou s octanem amonným nebo kyselinou mravenčí. Kromě toho Krämer a kolegové [2] přidali do vzorku po navážce aktivní uhlí.

Vývoj postupu

Pro ionizaci byl jako iontový zdroj použit elektrosprej v pozitivním iontovém módu a pro detekci byl použit typ scanu Selected reaction monitoring. Jako prekurzorový ion byla zvolena protonovaná molekula m/z 61 a produktový ion m/z 44, který odpovídá ztrátě amoniaku. Vše bylo optimalizováno pro náš přístroj (MS).

Po tomto kroku byla připravena optimální gradientová eluce v systému HILIC. Do eluentů bylo přidáno aditivum mravenčan amonný oproti článkům, kde byl použit octan amonný. Metoda byla zkrácena z dvaceti na dvanáct minut.

Standardní zásobní roztoky močoviny byly připraveny do ultračisté vody. Poté byla připravena kalibrační křivka v acetonitrilu pro pokrytí rozsahu mezi 40 mg/kg až 400 mg/kg močoviny. Proběhl pokus o rozšíření jejího rozsahu, ale ve vyšších bodech křivky byl detektor pravděpodobně již zahlcen, takže byl ponechán původní rozsah kalibrační křivky podle literatury.

Po tomto vývoji LC-MS metody byla hledána ideální extrakce. Nejprve byla vyzkoušena navážka 2 g krmiva a porovnávána výtěžnost extrakce na úrovni 1000 mg/kg, což v křivce odpovídá 1,0 mg/l.

Vyzkoušeno bylo více druhů extrakce, na rotační třepačce, v ultrazvukové lázni, a to jak v kombinaci, tak po různě dlouhou dobu. Výsledky byly velmi podobné, takže výtěžnost není tolik závislá na extrakčním kroku a bylo zvoleno jednoduché rotační třepání po dobu třiceti minut s dobrými výsledky.

Po protřepání byl extrakt vzorku odstředěn, supernatant byl přenesen do nové zkumavky a znovu odstředěn, extrakt byl zředěn acetonitrem pro vysrážení proteinů a filtrován.

Poté byly porovnány navážky 2 g s 5 g pro kvasnice a krmné směsi a také navážky s přídavkem nebo bez přídavku aktivního uhlí. Výsledky byly srovnatelné, proto jsme z důvodu jednoduššího postupu zvolili navážku 2 g a bez aktivního uhlí.

3 Materiál a metody

3.1 Princip

Vzorky krmiv se extrahují vodou. Extrakty ředěné acetonitrem se separují na HILIC koloně a analyzují metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

3.2 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s MS/MS detekcí, např. Waters Xevo TQD.
- 2 Separační kolona, např. Luna 3 μ HILIC 100 $\times$ 3,0 mm.
- 3 Ultrazvuková lázeň.

- 4 Analytické váhy s přesností 0,001 g.
- 5 Laboratorní třepačka, (50–100) kmitů/min.
- 6 Laboratorní odstředivka s nastavitelnou teplotou, 1500 g a 4000 g.
- 7 Vialky skleněné, 1,5 ml.
- 8 Membránové filtry 0,45 µm.

3.3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Ultračistá voda pro HPLC (18,2 MΩ/cm) podle ČSN ISO 3696.
- 2 Mravenčan amonný, HCOONH₄, pro hmotnostní spektrometrii, Mr = 63,06.
- 3 Mravenčan amonný, HCOONH₄, vodný roztok, c(HCOONH₄) = 1 mol/l.
Příprava: Naváží se přesně 1,5765 g mravenčanu amonného (2) a kvantitativně se převede do 25ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku.
- 4 Acetonitril, HPLC grade.
- 5 Základní standardní látky s deklarovanou čistotou.
Močovina CO(NH₄)₂, Mr = 60,06, CAS 57-13-6.
- 6 Mobilní fáze A: 50% roztok acetonitrilu a 5mM mravenčan amonný ve vodě.
Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 250 ml acetonitrilu (4) a 2,5 ml mravenčanu amonného (3) a doplní se ultračistou vodou (1) po rysku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě.
- 7 Mobilní fáze B: 95% roztok acetonitrilu a 5mM mravenčan amonný ve vodě.
Příprava: Do 500ml odměrné baňky se odměří 475 ml acetonitrilu (4) a 2,5 ml mravenčanu amonného (3) a doplní se ultračistou vodou (1) po rysku. Vzniklý roztok se promíchá a odvzdušní v ultrazvukové lázni. Uchovává se při laboratorní teplotě.

4 Postup

4.1 Příprava standardních roztoků

Kalibrace se provádí před každým měřením.

Močovina – zásobní standardní roztok

Naváží se přesně asi 10 mg močoviny (5) s přesností 0,1 mg, kvantitativně se převede do 10ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku.

Při výpočtu výsledné koncentrace se bere v úvahu čistota základní standardní látky. Při uchování ve tmě při teplotě (4–8) °C je tento roztok stabilní 3 měsíce.

$$c(\text{močovina}) \doteq 1 \text{ g/l.}$$

Pracovní standardní roztok

Do 10ml odměrné baňky se odměří vypočtené množství zásobního roztoku močoviny tak, aby výsledná koncentrace byla 10 mg/l a doplní po značku vodou (1). Při uchování ve tmě při teplotě (4 – 8) °C je tento roztok stabilní měsíc.

$$c(\text{močovina}) = 10 \text{ mg/l.}$$

4.2 Příprava kalibračních roztoků a sestavení kalibrační křivky

Do 10ml odměrných baněk se odměří (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0) ml pracovního standardního roztoku a doplní se asi 1 cm pod značku acetonitrilem (4). Po promíchání a vytemperování se doplní acetonitrilem (4) po značku a převede do vialek. Takto naředěné kalibrační roztoky odpovídají koncentracím v rozmezí (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0) mg/l.

Na chromatografickou kolonu se dávkuje 2 µl kalibračního roztoku. Kalibrační roztoky se připraví bezprostředně před každým měřením. Z průměrných ploch píků pro každou koncentraci se sestrojí kalibrační křivka. Kalibrační křivka je lineární a prochází počátkem.

4.3 Extrakce močoviny ze vzorků

Do 50ml centrifugační zkumavky se naváží 2 g zkušební vzorku krmné směsi s přesností 0,01 g a přidá se 40 ml vody (1). Zkumavka se uzavře a třepe se při laboratorní teplotě na laboratorní třepačce 30 min při asi 90 kmitech/min. Získaný extrakt se poté odstředí 15 min při 1500 g na odstředivce s nastavenou teplotou 10 °C. Ze získaného supernatantu se odebere 20 ml do nové 50ml centrifugační zkumavky a poté znovu odstředí 10 min při 4000 g

na odstředivce s nastavenou teplotou 10 °C. Po odstředění se extrakt v centrifugační zkumavce vytemperuje na laboratorní teplotu a naředí se acetonitrilem (4) alespoň 10 ×, například 1 ml extraktu do 10ml odměrné baňky. U krmiv s dávkovanou močovinou se ředí podle obsahu močoviny. Po naředění se zfiltruje přes membránový filtr 0,45 µm a převede se do vialky. V každé sérii stanovení se provede stanovení slepého vzorku a vhodného referenčního materiálu.

4.4 Vlastní měření močoviny ve vzorcích

Močovina se měří za separačních podmínek chromatografického systému, které jsou uvedeny v Tabulkách 2 a 3. Parametry stanovení platí pro sestavu LC-MS/MS Waters Xevo TQD a slouží jako příklad nastavení instrumentace.

Tabulka 2. Chromatografické parametry stanovení.

Kolona	např. Luna 3µ HILIC 100 × 3,0 mm
Teplota kolony	30 °C
Teplota autosampleru	20 °C
Mobilní fáze	gradient mobilní fáze A (6) a mobilní fáze B (7) podle Tabulky 3
Celková doba analýzy	12 min
Průtok mobilní fáze	(0,2 – 0,4) ml/min
Objem nástřiku	2 µl
Retenční čas	4,8 min

Tabulka 3. Gradientový program pro analýzu.

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)	Průtok (ml/min)
0	0	100	0,2
0,6	0	100	0,2
5,0	100	0	0,2
6,2	100	0	0,2
7,0	0	100	0,4
9,8	0	100	0,4
10,5	0	100	0,2
12,0	0	100	0,2

Parametry stanovení MS

Pro identifikaci analytu se používá SRM mód (selected reaction monitoring), sledování produktového iontu pocházejícího z prekurzorového iontu. Nalezené optimální parametry MS detektoru, při kterých je intenzita daného produktového iontu maximální, jsou uvedeny v Tabulce 5. Nastavení SRM parametrů tohoto přechodu je uvedeno v Tabulce 6.

Tabulka 5. Příklad parametrů MS detektoru.

Ionizační mód	ESI+
Capillary voltage	1,0 kV
Source temperature	150 °C
Desolvation temperature	400 °C
Desolvation gas flow	650 l/h
Cone gas flow	1 l/h
CID gas	argon, p = 0,5 bar

Tabulka 6. Příklad MRM parametrů pro analýzu analytu v krmivech.

Prekurzorový iont (m/z)		Cone voltage (V)	Produktový iont (m/z)	Kolizní energie (eV)
Močovina	61,0	25	44,0	10

5 Výpočet a vyjadřování výsledků

Obsah močoviny (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vztahu:

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

kde

c je koncentrace močoviny ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu v mg/l,

V objem extrakční směsi v ml, v tomto postupu 40 ml,

m hmotnost zkušebního vzorku v g, v tomto postupu 2 g,

R ředění, resp. zakoncentrování.

6 Validace

Metoda byla validována pro pracovní rozsah (79 – 400) mg/kg. Tento pracovní rozsah byl odvozen od požadované meze pro stanovení kontaminace krmiv močovinou.

Vstupní data jsou uvedena v dokumentu Validační zpráva 1/2024.

6.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti z kalibrační křivky

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu Labsystém – modul Validace analytických metod.

Mez detekce a mez stanovitelnosti je vypočtena pro navážku 2 g vzorku močoviny a celkový objem výluhu 40 ml.

Tabulka 7. Vyhodnocení z programu Labsystém – Močovina.

	LOD	LOQ
Močovina	78,5 mg/kg	104,2 mg/kg
	0,3925 mg/l	0,5208 mg/l

6.2 Linearita kalibrační závislosti

Linearita byla určena z hodnot naměřených při stanovení kalibrační přímky. Linearita kalibrační závislosti byla testována na základě korelačního a QC koeficientu. K testování linearity kalibrační závislosti na základě korelačního a QC koeficientu se v programu Labsystém použila možnost: Kalibrace, MD, MS a linearita, viz Tabulka 8.

Tabulka 8. Vyhodnocení z programu Labsystém – Kalibrace, MD, MS a linearita – Močovina.

Parametr	Vypočtený R	Testovaný R	Vypočtený QC	Testovaný QC	Hypotéza
Močovina	0,99715	0,99	4,09	5,00	Přijata

Závěr: Linearita byla prokázána v rozsahu (0,2 – 2,0) mg/l močoviny na základě hodnot korelačního a QC koeficientu.

6.3 Citlivost metody

Citlivost metody byla určena z kalibrační křivky. K určení citlivosti metody se v programu Labsystém použila možnost: Kalibrace, MD, MS a linearita.

Závěr: Citlivost analytické metody pro močovinu daná směrnici kalibrační přímky je 0,0000669792.

6.4 Přesnost a správnost metody

Krmné směsi

Přesnost metody byla ověřena stanovením parametru Opakovatelnost po hladinách, která byla určena z paralelních vzorků ($n = 8$) na čtyřech koncentračních hladinách.

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je uvedena v Tabulce 9a.

Tabulka 9a. Vyhodnocení z programu LIMS – Opakovatelnost po hladinách – Močovina.

Rozsah (mg/kg)	Střední přesnost (% rel.)	Požadovaná opakovatelnost
Močovina – celý rozsah KS	6,97	< 20 % relativních
500	7,55	
1000	7,36	
1500	7,29	
5000	5,49	

Správnost byla zjišťována metodou standardního přídávku. K přesně známé navážce negativního vzorku byl přidán čistý standard stanovované látky v množství, které odpovídá 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 1500 mg/kg a 5000 mg/kg obsahu močoviny. Z naměřených dat byla zpětně vypočtena výtěžnost celé metody. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu Labsystém za použití možnosti – Správnost standardním přídávkem.

Vypočtené hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 10a.

Tabulka 10a Vyhodnocení z LIMS – Správnost – Močovina.

Popis	Předloženo	Nalezeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)					
Hladina 1	500	574	114,8	43,3359	8	4,83	2,365	Nevyhovuje
Hladina 2	1000	1061,6	106,2	78,1481	8	2,231	2,365	OK
Hladina 3	1500	1492,8	99,52	108,838	8	0,1884	2,365	OK
Hladina 4	5000	5140,9	102,8	282,067	8	1,413	2,365	OK

Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Kvasnice

Přesnost metody byla ověřena stanovením parametru Opakovatelnost po hladinách, která byla určena z paralelních vzorků ($n = 6$) na 2 koncentračních hladinách.

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je uvedena v Tabulce 9b.

Tabulka 9b. Vyhodnocení z programu LIMS – Opakovatelnost po hladinách – Močovina.

Rozsah (mg/kg)	Střední přesnost	Požadovaná opakovatelnost
Močovina – celý rozsah KV	8,21 % relativních	<20 % relativních
1000	9,93 % relativních	
5000	6,01 % relativních	

Správnost byla zjišťována metodou standardního přídatku. K přesně známé navážce negativního vzorku byl přidán čistý standard stanovované látky v množství, které odpovídá 1000 mg/kg a 5000 mg/kg obsahu močoviny. Z naměřených dat byla zpětně vypočtena výtěžnost celé metody. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu LIMS za použití možnosti – Správnost standardním přídatkem.

Vypočtené hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 10b.

Tabulka 10b. Vyhodnocení z LIMS – Správnost – Močovina.

Popis	Předloženo	Nalezeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)					
Hladina 1	1000	1032,2	103,2	102,502	6	0,7688	2,571	OK
Hladina 2	5000	5077,7	101,6	305,135	6	0,6235	2,571	OK

Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

Rybí moučky

Přesnost metody byla ověřena stanovením parametru Opakovatelnost po hladinách, která byla určena z paralelních vzorků ($n = 6$) na 2 koncentračních hladinách.

Závěr: Opakovatelnost analytické metody je uvedena v Tabulce 9c.

Tabulka 9c. Vyhodnocení z programu LIMS – Opakovatelnost po hladinách – Močovina.

Rozsah (mg/kg)	Střední přesnost	Požadovaná opakovatelnost
Močovina – celý rozsah KV	7,34 % relativních	<20 % relativních
1000	8,94 % relativních	
5000	5,27 % relativních	

Správnost byla zjišťována metodou standardního přídatku. K přesně známé navážce negativního vzorku byl přidán čistý standard stanovované látky v množství, které odpovídá 1000 mg/kg a 5000 mg/kg obsahu močoviny. Z naměřených dat byla zpětně vypočtena výtěžnost celé metody. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu LIMS za použití možnosti – Správnost standardním přídatkem.

Vypočtené hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 10c.

Tabulka 10c Vyhodnocení z LIMS – Správnost – Močovina.

Popis	Předloženo	Nalezeno	Výtěžnost	Přesnost	n	t – vyp.	t – krit.	Hypotéza
	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)					
Hladina 1	1000	1019,8	102,0	91,1886	6	0,5327	2,571	OK
Hladina 2	5000	5155,8	103,1	271,919	6	1,404	2,571	OK

Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.

6.5 Nejistota

Při výpočtu nejistoty se vycházelo z dat pro stanovení mezilehlé střední přesnosti. Relativní rozšířená nejistota je rovna přesnosti (vícenásobné měření) vynásobené koeficientem rozšíření $k = 2$, viz Tabulka 11.

Tabulka 11. Vyhodnocení z LIMS – Nejistota.

Analyt/Matrice	Rozšíř. stand. nejistota (mg/kg)	Rel. rozšířená nejistota %	Faktor pokrytí	Požadovaná nejistota podle plánu (%)
Močovina				
Krmné směsi	315,266	13,9	2	40
Kvasnice	455,223	16,4	2	40
Rybí moučka	405,599	14,7	2	40

6.6 Popis statistického vyhodnocení validace

Podle Validačního plánu 1/2024 byly zpracovány získané validační parametry z naměřených vstupních dat, viz Validační zpráva 1/2024. Ke statistickému zpracování vstupních dat byl použit statistický software LIMS, modul Validace analytických metod a související dokumenty Příručky kvality.

7 Závěr

Metoda stanovení močoviny v krmivech technikou LC-MS/MS byla úspěšně vyvinuta a zavedení této metody umožní sledovat, jak obsah močoviny jako doplňkové látky, tak pro nízké obsahy v necílových krmivech, kvasnicích a rybích moučkách.

Byla provedena validace na čtyřech koncentračních hladinách - pro 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 1500 mg/kg a 5000 mg/kg močoviny.

Metoda externí kalibrační křivky, bez přítomnosti matrice, vykazuje linearitu v rozsahu 0,2 mg/l až 2,0 mg/l. Pro nižší koncentrace už není vhodné používat tento postup.

Byly stanoveny tyto validační parametry: opakovatelnost, správnost, linearita, citlivost, mez detekce a stanovitelnosti pro validované koncentrace močoviny.

Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost ověřované metody k používání v rámci cíleného monitoringu nežádoucích látek v předem určeném kalibračním rozsahu.

8 Literatura

- 1 Prováděcí nařízení komise (EU) 2024/771, Příloha III D.
- 2 Krämer M., Fry H. and Kappenstein O., 2021, *Food Additives & Contaminants*.
- 3 Flannely L., Dillon G.P. and Moran C.A., 2019, *Food Additives & Contaminants*.
- 4 Pibarot P., Pilard S., 2012, *American Journal of Analytical Chemistry*, 613-621.
- 5 MacMahon S., Begley T.H., Diachenko G.W., Stromgren S.A., 2012, *Journal of Chromatography A*, 1220, 101-107.
- 6 JRC Technical reports, 2019.
- 7 JPP ÚKZÚZ, postup JPP 10625.1.
- 8 LIMS, modul Validace analytických metod, 2024.

Zavedení kvalitativní detekce transgenu GMB151 u sóji

Jana Stehlíková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, OdMB

Hroznová 2, 603 00 Brno

Jana.stehlikova@ukzuz.gov.cz

1 Úvod

Geneticky modifikovaný organismus (GM organismus, GMO) je organismus, jehož genetický materiál byl úmyslně změněn, a to způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací. Dotčené techniky jsou uvedeny v Zákonu o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty č. 78/2004 Sb.

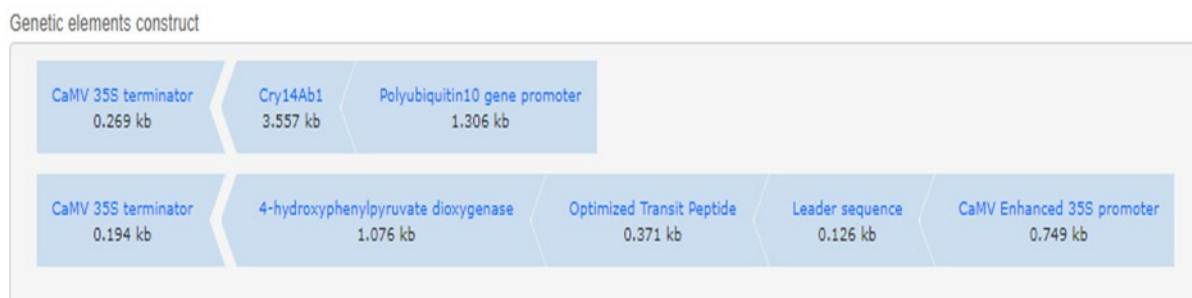
Geneticky modifikované (GM) plodiny jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál (DNA) pomocí genových technologií.

GM sója GMB151

Název: Plant-Parasitic Nematode-Protected and Herbicide Tolerant Soybean

Unique Identifier UI: BCS-GM151-6

Sójový event GMB151 byl produkován *Agrobacterium tumefaciens* zprostředkovanou transformací kultivaru sóji Thorne vektorem pSZ8832. T-DNA transformačního vektoru pSZ8832 má dvě genové kazety. Sója obsahuje *Bacillus thuringiensis* Cry14Ab1 pro odolnost vůči rostlinným parazitům, jako je hád'átka sójové (*Heterodera glycines*). Protein je příbuzný s jinými krystalovými proteiny a předpokládá se, že působí na výstelku střeva hlístic a dodává rostlinám rezistenci vůči těmto škůdcům. Pro toleranci vůči herbicidům slouží gen *Pseudomonas fluorescens* 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (HPPD) s bodovými mutacemi na C-konci, aby se umožnila a zvýšila tolerance vůči herbicidům s inhibítorem HPPD, jako je isoxaflutol a mesotrion. Transgenní kazeta GMB151 je znázorněna na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1. Konstrukt GMB151.

2 Cíl

Cílem práce bylo rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u sóji o kvalitativní stanovení GMB151 a určení meze detekce stanovení (MD). Součástí je ověření detekce screeningového elementu promotor 35S.

3 Princip

Základem metody detekce genetických modifikací je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o běžně používanou metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmnožení konkrétního požadovaného úseku DNA. V tomto případě se jedná o klasickou PCR s elektroforetickou detekcí amplikonu na agarózovém gelu.

4 Materiál a metody

Pro zavedení byly použity izoláty DNA z certifikovaných referenčních materiálů od The American Oil Chemists' Society (AOCS) a IRMM Institute for reference Material and Measurements (IRMM).

- AOCS 0906-A2, Non-Modified soybean powder, (pure), laboratorní značení: CRM 8/2022
- AOCS 0906-D, MON88913 cotton powder, (> 99,4 % GM), laboratorní značení: CRM 13/2012

- AOCS 0906-A, Non-Modified soybean powder, (pure), laboratorní značení: CRM 19/2014
- ERM[®] - BF443b: GMB151 soya bean powder (100 % GM), laboratorní značení: CRM 1/2022
- ERM[®] - BF443c: GMB151 soya bean powder (0,1 % GM), laboratorní značení: CRM 2/2022

Izolace byla provedena pomocí zavedeného komerčního kitu (NucleoSpin[®] Food – MACHEREY-NAGEL). U izolátů DNA byla změřena koncentrace, byly otestovány na kvalitu i amplifikovatelnost DNA.

V rámci verifikace byla stanovena správnost stanovení. K tomu bylo využito 4 izolátů (A-D) CRM 1/2022 a CRM 2/2022. Zároveň byl otestován i směsný izolát z 2. eluce, aby mohl být nadále používán při rutinních analýzách jako pozitivní kontrola. Směsný izolát vznikl smícháním izolátů A-D, změřením koncentrace výsledné směsi a naředěním na koncentraci požadovanou do reakce. Byla provedena PCR s koncentrací DNA v izolátu 5 ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl.

Dále byla ověřena detekce screeningového elementu p35S v CRM 1/2022, CRM 2/2022 a CRM 8/2022 u izolátů A-D.

Součástí verifikace bylo stanovení meze detekce (MD) na hladině $\leq 0,1$ % GM m/m. K dispozici byl CRM s 100 % GM m/m a CRM s 0,1 % GM m/m. Postupným ředěním izolované DNA byla připravena koncentrační řada 100-0,05 % m/m GM. Pro ředění izolátu DNA z CRM s GM byl použit izolát DNA z CRM stejné, nemodifikované plodiny (NK, CRM 8/2022, 0 % GM m/m) o stejné koncentraci DNA v izolátu.

Mez detekce byla ověřena provedením pěti nezávislých PCR (amplifikací) zaváděné modifikace.

Pro zavedení byly využity následující metody

- Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1
- ID č. 7 Validace metod v NRL, Příloha č. 6 Verifikace metod založených na polymerázové řetězové reakci pro stanovení genetických modifikací v osivech, krmivech a krmných směsích.
- Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO

Laboratories (ENGL), 2011.

- Event-specific Method for the Quantification of soybean GMB151 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, JRC Publication JRC120901, 2020.

4.1 Přístroje a pomůcky

Extrakce DNA

Váhy s přesností 0,01 g.

Vodní lázeň nebo termoblok, přednostně s vibrací, třepáním.

Centrifuga.

Minishaker, vortex.

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

Přenosná UV lampa.

Digestoř.

pHmetr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Nízkoobjemový spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)

Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.

pHmetr.

Lednice.

Mrazicí box.

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl, špičky s filtrem a bez filtru.

Plastové zkumavky s víčkem o objemu (2 – 2,5) ml.

Elektroforetická vana, zdroj napětí, elektroforetické hřebínky.

Fotodokumentační zařízení se softwarem BIO PRINT TX4 (Vilber Lourmat).

Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby.

PCR reakce – amplifikace

PCR box.

Minishaker, vortex.

Termální cyklér C 1000 Touch Thermal Cycler (BIO RAD)

Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem i bez filtru.

Plastové sterilní zkumavky, 0,2 ml, 0,5 ml, 2 ml.

Výrobník ledu.

Lednice.

Mrazicí box.

Latexové rukavice bezpudrové, obalový materiál, stojánky na zkumavky, odpadní nádoby, nádoba na uchování ledu.

4.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

Extrakce DNA: NucleoSpin® Food, výrobce Macherey – Nagel, kit pro izolaci genomické DNA z potravin a krmiv

Lysis Buffer CF.

Buffer C4.

Wash buffer CQW.

Wash buffer C5 (koncentrát).

Elution buffer CE.

NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).

Proteinase K (lyofilizát).

Proteinase buffer PB.

Měření koncentrace a čistoty DNA, gelová elektroforéza

Agaróza pro molekulární biologii (Agarose for molecular biology, Sigma Aldrich).

Pracovní roztok 1 × TAE pro elektroforézu.

1% Pracovní roztok interkalačního barviva (ethidium bromid).

Elektroforetický marker pro izolát DNA (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Life Technologies Czech Republic).

6 × Loading Dye Solution.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (EZ Load™ Molecular Ruler 50 bp PCR Biorad).

Ribonuklease A 10 mg / ml (DNase and protease free).

PCR reakce – amplifikace

REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with MgCl₂, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq).

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

PCR voda.

Další potřebné chemikálie nedodávané v rámci kitů .

Voda vhodná pro PCR.

Dekontaminační roztok pro ošetření ploch.

Amplifikační primery:

Pro analýzy byly použity amplifikační primery od firmy Geneti-Biotech.

Vnitřní (referenční) gen sóji, sójový lektin:

GMO-3: 5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC G-3'

GMO-4: 5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG-3'

GMB151

PRIM1040: 5' TCA AAT CAA CAT GGG TGA CTA GAA A 3'

PRIM1041: 5' CAT TGT GCT GAA TAG GTT TAT AGC TAT GAT 3'

p35S

35s-cf3: CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG

35s-cf4: TCC TCT CCA AAT GAA ATG CCA TTC C

4.3 Pracovní postup

Pro zavádění byly použity postupy JPP 10252.1 Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR-kit Nucleospin Food, JPP 10255.1 Provedení polymerázové řetězové reakce (PCR) pomocí kitu RedTaq pro stanovení GMO, JPP 10257.1 Gelová elektroforéza pro stanovení GMO metodou PCR a JPP 10259.1 Vyhodnocení výsledků stanovení GMO metodou PCR.

Složení reakční směsi pro PCR pomocí kitu REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (jednoduchá PCR) pro vnitřní gen sóji, p35S, GMB151 je uvedeno v tabulce č. 1. Jednotlivé amplifikační programy jsou uvedeny v tabulkách č. 2 až 4.

Tabulka č. 1-

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (μl/reakce)
PCR voda			6,5
RedTaq PCR MIX	2×	1×	12,5
Primer F	20 μM	0,4 μM	0,5
Primer R	20 μM	0,4 μM	0,5
Templátová DNA	10 ng/μl	2 ng/ul	5
Objem směsi vč. templátu			25

Vnitřní gen sóji

primery: GMO3 /GMO4

délka amplikonu: 118 bp

Tabulka č. 2: Amplifikační program

Fáze	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	94	60	1
denaturace	94	45	35
annealing	57	50	
extenze	72	60	
závěrečná extenze	72	355	1

p35S

primery: 35s-cf3/35s-cf4

délka amplikonu: 123bp

Tabulka č. 3. Amplifikační program.

Fáze	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	94	60	1
denaturace	94	58	40
annealing	57,5	120	
extenze	72	105	
závěrečná extenze	72	180	1

GMB151

primery: PRIM1040 / PRIM1041

délka amplikonu: 84 bp

Tabulka č. 4. Amplifikační program.

Fáze	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
počáteční denaturace	95	600	1
denaturace	95	15	40
annealing a extenze	60	60	

5 Výsledky a diskuse

5.1 Kvalita DNA

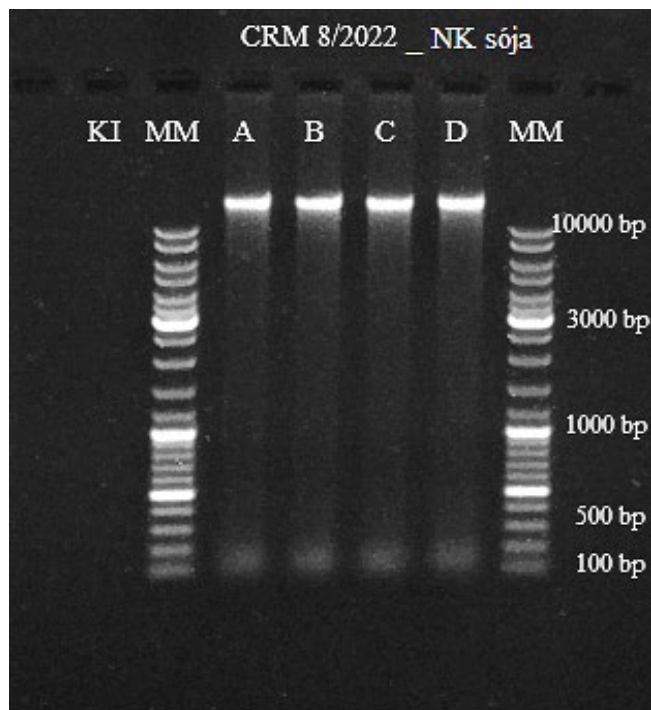
Pro potřeby zavádění, byla extrahována DNA z CRM geneticky nemodifikované sóji (CRM 8/2022) a z CRM GM sóji GMB151 (CRM 1/2022 a CRM 2/2022)). U izolátů byla změřena koncentrace (tabulka č. 5), otestována kvalita i amplifikovatelnost DNA při stanovení vnitřního genu - sójového lectinu (obrázky č. 2 až 6).

Kvalita a koncentrace izolátů nebyla úplně optimální. Při izolaci CRM byl problém s bobtnáním vzorku během lyze. Po centrifugaci se usazená část vzorku rychle uvolňovala od stěn zkumavky a na hladině byl silný film znesnadňující odtažení čirého extraktu. Přesto všechny získané izoláty CRM vyhovovaly pro všechny následující analýzy.

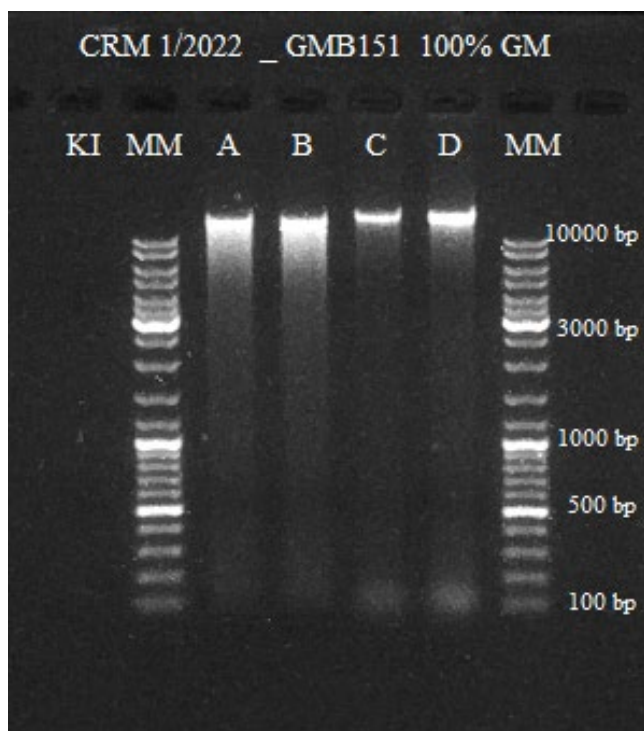
Tabulka č. 5. CRM 1/2022, CRM 2/2022 a CRM 8/2022– hodnoty naměřených koncentrací a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.

CRM	Izolát	Koncentrace ng/μl	A 260/A 280
CRM 1/2022 _ GMB151 100 % GM m/m Izolace 5.12. 2022 Izoláty A, B, C, D	A	58,4	1,97
	B	51,8	2,00
	C	51,7	1,97
	D	52,6	2,00
CRM 2/2022 _ GMB151 0,1 % GM m/m Izolace 5.12. 2022 Izoláty A, B, C, D	A	84,4	1,82
	B	86,2	1,82
	C	73,0	1,81
	D	81,5	1,81
CRM 8/2022 Sója NK 0 % GM m/m Izolace 2. 12. 2022 Izoláty A, B, C, D	A	34,3	1,86
	B	63,3	1,85
	C	67,2	1,87
	D	39,7	1,84

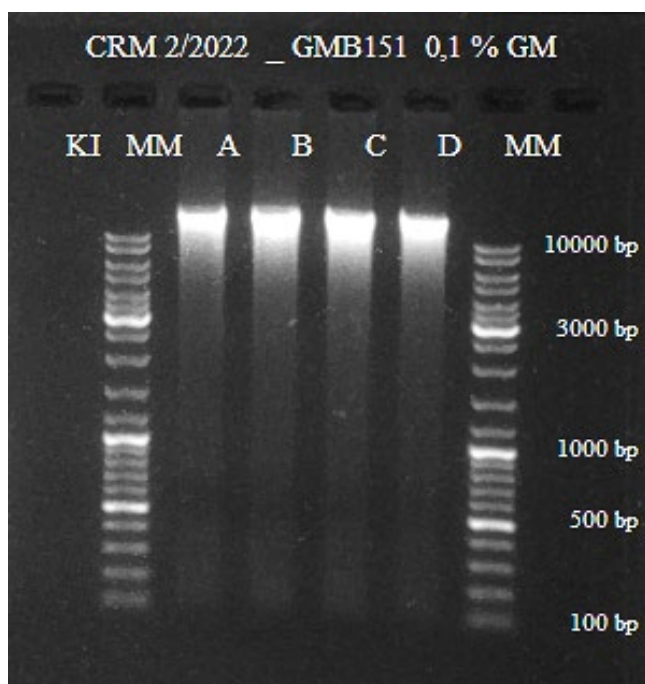
Kvalita izolátů DNA



Obrázek č. 2. Kvalita izolátů DNA, CRM 8/2022_ izoláty NK A-D. MM – Elektroforetický marker, KI – kontrola izolace.

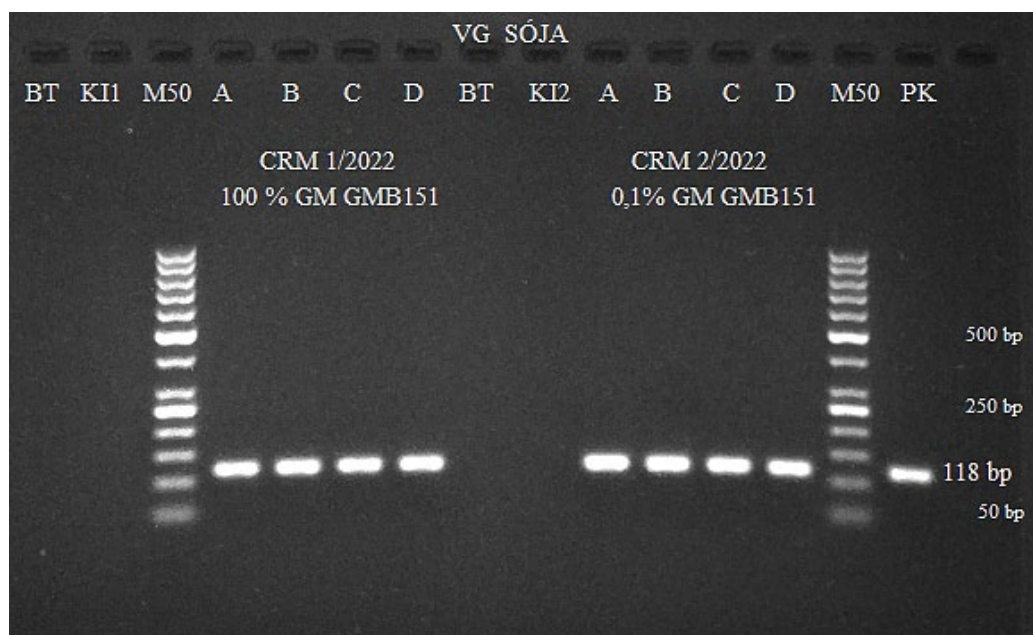


Obrázek č. 3. Kvalita izolátů DNA, CRM 1/2022 izoláty A-D. MM – Elektroforetický marker, KI – kontrola izolace. 15. 12. 2022.



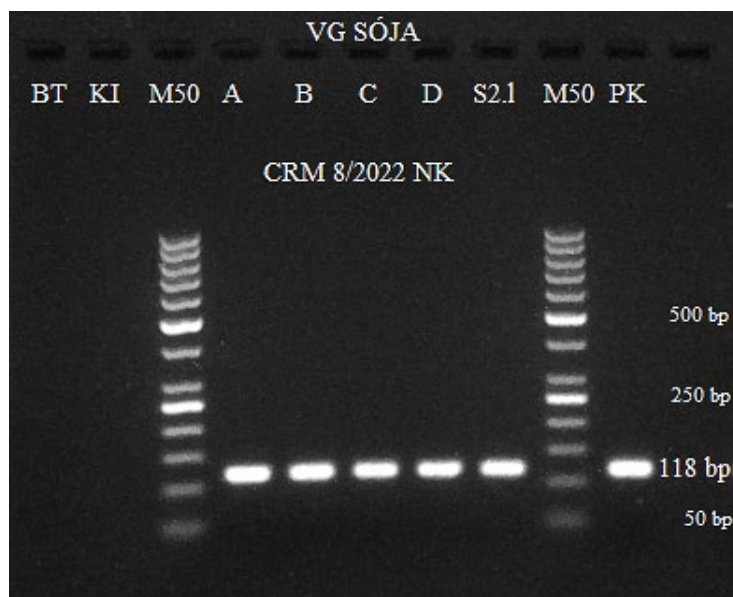
Obrázek. č. 4. Kvalita izolátů DNA, CRM 2/2022 izoláty A-D. MM – Elektroforetický marker, KI – kontrola izolace. 15. 12. 2022.

5.2 Vnitřní gen sóji



Obrázek č. 5. Vnitřní gen sóji (118bp) pro CRM 1/2022, izoláty A-D; CRM 2/2022, izoláty A-D.

BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI1 a KI2 – kontroly izolace.
PK- CRM 19/2014.



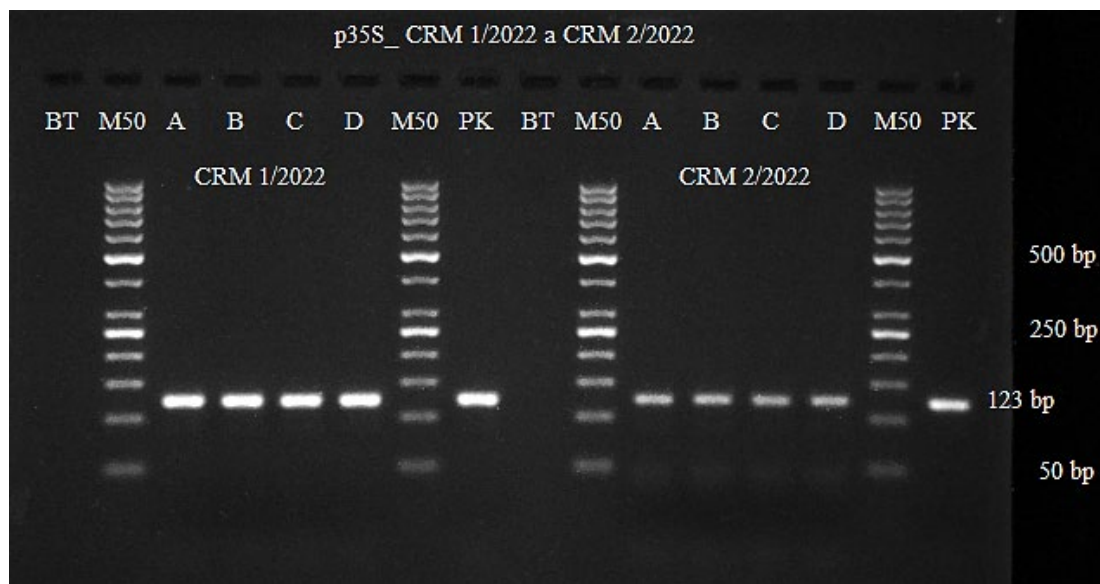
Obrázek č. 6.

Vnitřní gen sóji (118bp) pro CRM 8/2022 (NK-negativní kontrola) izoláty A-D a směs izolátů z 2. eluce (S2.1), BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI kontrola izolace, PK- CRM 19/2014.

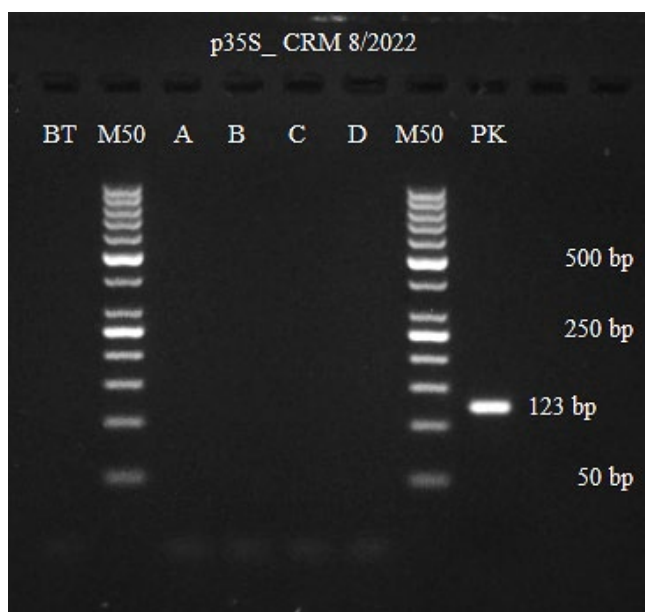
5.3 Screeningové elementy

U GMB151 byla ověřena detekce screeningového elementu p35S. Výsledky zkoušek byly pozitivní. Obrázek č.7.

U CRM 8/2022 byla ověřena nepřítomnost p35S. Obrázek č. 8.



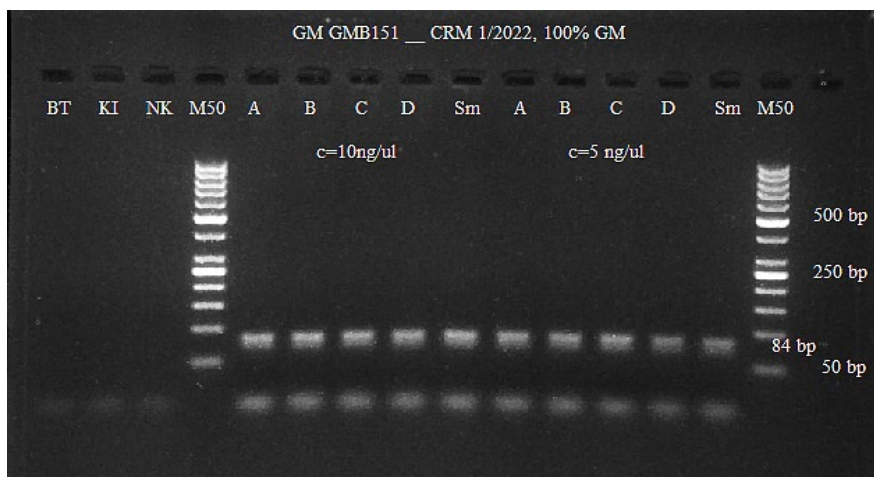
Obrázek č. 7. Promotor 35S (123 bp) - CRM 1/2022 a CRM 2/2022 izoláty A, B, C, D. BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50bp, PK-CRM 30/2012.



Obrázek č. 8.
Promotor 35S (123 bp) -
CRM 8/2022,
izoláty A, B, C, D.
BT- beztemplátová kontrola, M50 –
hmotnostní marker 50bp,
PK-CRM 30/2012.

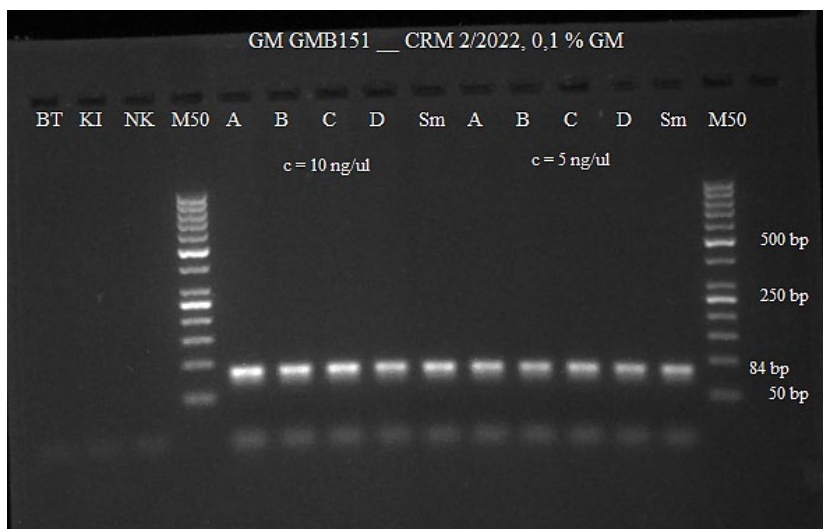
5.4 Správnost stanovení

U GMB151 byla z izolátů (A-D) CRM 1/2022 a CRM 2/2022 provedena PCR s koncentrací DNA v izolátu 5ng/μl a s koncentrací DNA 10 ng/μl. Výsledky zkoušek byly pozitivní. (obrázek č. 9 a 10).



Obrázek č. 9. Stanovení GMB151 (84 bp).

BT – beztemplátová kontrola, KI_ kontrola izolace, M50-marker 50 bp, NK – CRM 8/2022, CRM 1/2022: Izoláty A, B, C, D a Sm (Směs izolátů) v koncentracích 10 ng DNA/μl a 5 ng DNA/μl.



Obrázek č. 10. Stanovení GMB151 (84 bp).

BT – beztemplátová kontrola, KI_ kontrola izolace, M50-marker 50 bp, NK – CRM 8/2022, CRM 2/2022: Izoláty A, B, C, D a Sm (Směs izolátů) v koncentracích 10 ng DNA/μl a 5 ng DNA/μl.

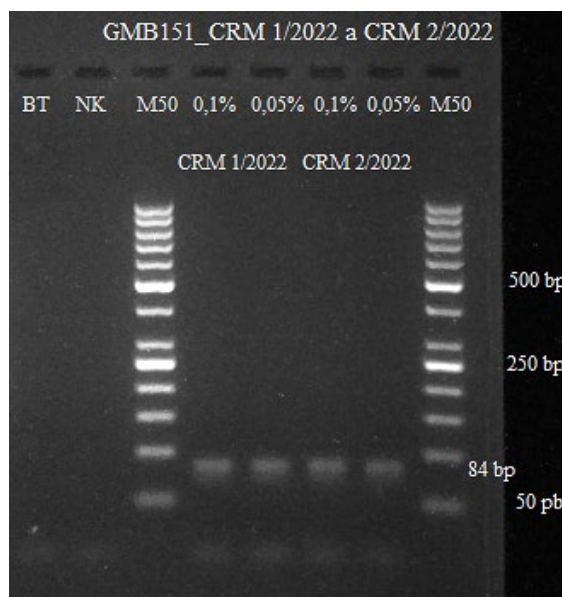
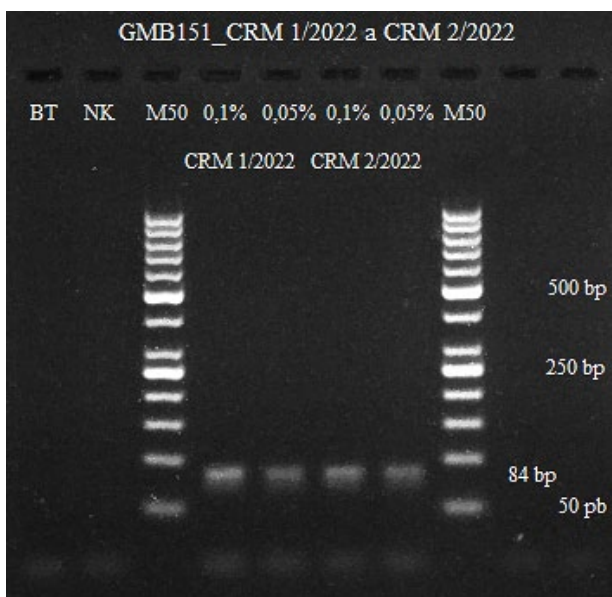
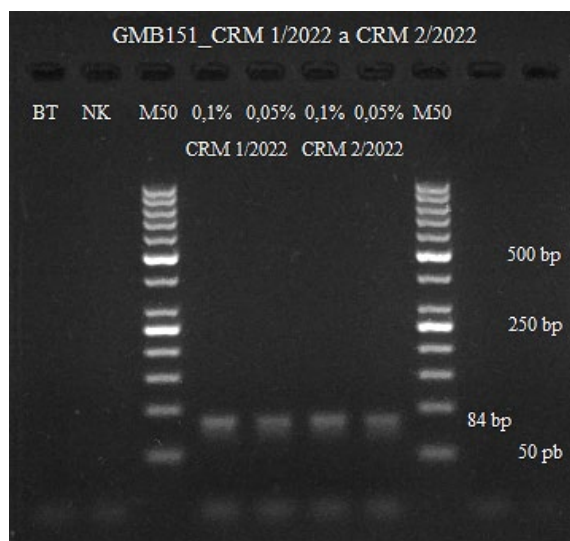
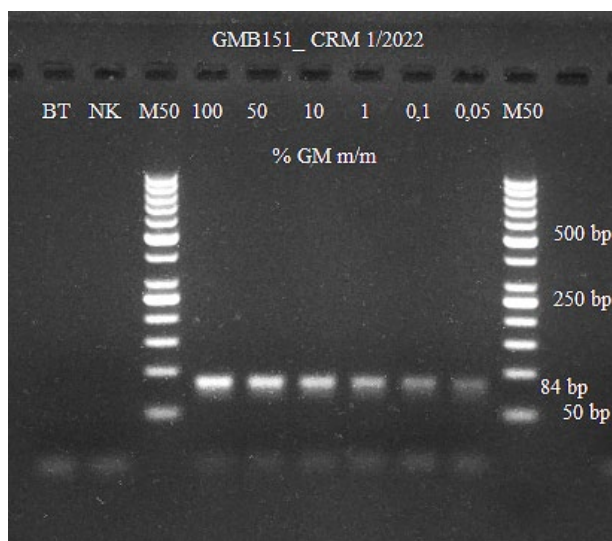
5.5 Mez detekce stanovení (MD)

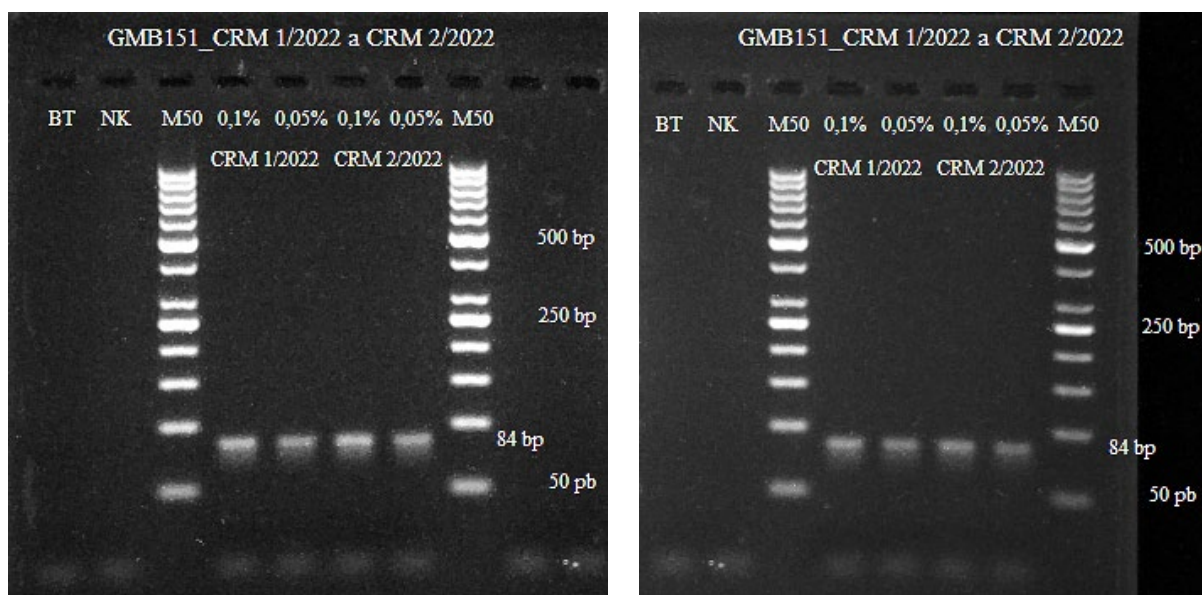
Cílem verifikace bylo stanovení meze detekce na hladině $\leq 0,1$ % GM m/m.

Byla provedena amplifikace izolátu CRM 1/2022 a CRM 2/2022 o koncentraci DNA 10 ng/ μ l a obsahu modifikace (100-0,05) % m/m GM.

K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních u obou použitých CRM. (Obrázky č. 11-16)

Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace GMB151 lze detekovat na hladině 0,05 % GM m/m.





Obrázky č. 11 až 16. Stanovení MD transgenů GMB151 (84 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 8/2022, M50-marker 50 bp.

CRM 1/2022: 100 %, 10 %, 1 %; 0,1 %; 0,05 % GM m/m. CRM 2/2022: 0,1 %, 0,05 % GM m/m. PCR proběhla do koncentrace 0,05 % GM m/m.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testované certifikované referenční materiály vykazují pruhy v příslušných místech.

Detekovatelnost pruhů DNA je závislá zejména na koncentraci templátové DNA, kvalitě templátové DNA (závisí na způsobu izolace, skladování apod.), kvalitě amplifikačních primerů, kvalitě gelu, použitém interkalačním barvivu a provedení elektroforézy.

6 Závěr

Cílem práce bylo zavést metodu pro detekci nové geneticky modifikované sóji GMB151 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OdMB.

Metoda stanovení GMB151 byla zavedena s mezí detekce 0,05 % GM m/m.

Tato metoda se zařadí jako další parametr při zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv a osiv.

7 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1.
2. Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EURL-GMFF), European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2011.
3. Event-specific Method for the Quantification of Soybean GMB151 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, JRC Publication JRC120901, 2020.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXIX, 2025/1

Ročník: XXIX, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2025

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 54

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196