

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



**Bulletin 2005**

**Ročník IX, číslo 2/ 2005**

**Brno 2005**

## Obsah

1. **Zavedení metody GPC a její využití při analýze kalů a krmných směsí** 1  
(Petra Kosubová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno)
  
2. **Rozšíření stanovení OCP o další zakázané látky ze skupiny POP** 12  
(Pavla Tieffová, Petra Kosubová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno)
  
3. **Stanovení PCB v krmných směsích s různým obsahem tuku v sušině** 21  
(Pavla Tieffová, Petra Kosubová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Regionální oddělení Brno)
  
4. **Zavedení detekce GMO v laboratoři molekulárně genetické diagnostiky pomocí univerzálního PCR-kitu a vlastních primerů** 32  
(Miroslava Suchomelová, Dagmar Kopotová, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, Oddělení mikrobiologie a biochemie Brno, Laboratoř molekulárně genetické diagnostiky)

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

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

# Zavedení metody GPC a její využití při analýze kalů a krmných směsí

*Petra Kosubová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno  
[petra.kosubova@ukzuz.cz](mailto:petra.kosubova@ukzuz.cz)

## 1. Úvod

Gelová permeační chromatografie (GPC) je technika používaná v různých oborech, zejména v molekulárně biologických, biochemických vědách a farmaceutickém průmyslu k identifikaci a separaci proteinových fragmentů, buněčných komponent, steroidů, aj. Významné uplatnění našla GPC při zpracování vzorků potravin, krmiv, environmentálních matric a biologických materiálů k analýze pesticidů a dalších persistetních organických kontaminantů. Technika se používá k odstraňování lipidických a proteinových složek, dispergovaných vysokomolekulárních látek, přírodních pryskyřic a polymerů rušících finální stanovení kontaminantů (1).

GPC, označovaná rovněž jako vylučovací chromatografie (size exclusion chromatography) či filtrace molekulovým sítím, je metoda založená na separaci látek podle velikosti a tvaru molekul. Stacionární fáze je tvořena nerozpustným inertním pórovitým gelem. Mobilní fáze transportuje látky systémem a zpravidla neovlivňuje jejich separaci na stacionární fázi. Pro účely environmentální analýzy se využívají bobtnavé hydrofobní gely na bázi styren- divinylbenzenového polymeru. Stupeň zesítnění gelu určuje oblast tlaku použitelnou pro separaci (1). Nejčastěji využívaných gelem je Bio – Beads SX3 (40 – 80  $\mu\text{m}$ ), dodávaný na trh společností Bio – Rad Laboratories, který je charakterizován 3 % zesítněním a protitlakem 1 – 2 MPa (2). Firma Watrex nabízí GPC kolonu PAH prep 10  $\mu\text{m}$  plněnou styren- divinylbenzenovým kopolymerem s vyšším stupněm zesítnění, označovaným jako rigidní gel. Výhodou této fáze je použitelnost do protitlaku 5 MPa a možnost změny mobilní fáze bez předchozího bobtnání gelu (3). Další srovnání a použitelnost kolon je diskutována ve výsledkové části.

Cílem práce bylo optimalizovat postup přípravy vzorku k analýze polychlorovaných bifenyľů (PCB) a organochlorových pesticidů (OCP) v čistírenských kalech a rybích moučkách. Čištění extraktu těchto materiálů na SPE kolonkách s florisilem či silikagelem není dostačující pro dosažení kvalitních a opakovatelných výsledků. Čištění extraktů alkalickou hydrolyzou bylo nahrazeno gelovou permeační chromatografií, umožňující analýzu méně stabilních pesticidů (dieldrin, heptachlorepoxydy, aj.), které při hydrolytickém odstranění vysokomolekulárních složek z extraktu podléhají degradaci. Předložená práce dále obsahuje statistické vyhodnocení analýzy čistírenských kalů, zahrnující GPC přečištění.

Gelová permeační chromatografie umožňuje separaci vysokomolekulárních látek, které negativně ovlivňují analýzu polychlorovaných bifenyľů a pesticidních látek v krmných směsích a čistírenských kalech. Podmínky GPC byly optimalizovány pro stanovení PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180, dále pro HCB, HCH isomery, DDT a jeho metabolity, aldrin, isodrin, dieldrin, endrin, heptachlor, heptachlorepoxydy, oxychlordan, chlordan, endosulfany, methoxychlor a mirex. Technika byla využita ke zpracování 35 vzorků čistírenských kalů a 15 vzorků rybích mouček. Získána data byla využita pro statistické vyhodnocení navrženého postupu stanovení.

## **2. Materiál a metody**

### **Princip metody**

Sledované analyty a ostatní lipofilní složky se ze vzorku extrahují směsí hexan- aceton. Vysokomolekulární a tukové složky se z extraktu odstraní gelovou permeační chromatografií (GPC). Následuje skupinová separace chlorovaných kontaminantů s využitím adsorpční chromatografie na florisilu nebo silikagelu modifikovaném koncentrovanou kyselinou sírovou (Sil- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Vyčištěný extrakt se zkoncentruje, převede do isooktanu a obsah požadovaných analytů se stanoví metodou plynové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC- MS/ MS).

### **Chemikálie**

Všechny použité chemikálie jsou čistoty minimálně p.a., nejlépe však kvality pro residuální analýzu. Čistota sorbentů a rozpouštědel je sledována analýzou slepého vzorku.

Použitá rozpouštědla: hexan, aceton, dichlormetan, chloroform a isooktan.

Síran sodný je aktivován 6 hodin při 550 °C.

Silikagel 100 (0,063- 0,200 mm) (Merck) je aktivován 12 hod při 150 °C a deaktivován 3 % destilované vody. Modifikovaný silikagel se připraví smísením 50 g silikagelu 100 a 27,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Dále je využíván pro SPE silikagel 60 (0,063- 0,200 mm a 0,2- 0,5 mm) (Merck).

Florisil (0,15- 0,25 µm, tj. 60- 100 mesh) (Merck) je aktivován 4 hodiny při 650 °C. Před použitím se florisil reaktivuje 5 hodin při 130 °C.

Standardní roztok PCB 30 a PCB 155 v isooktanu o koncentraci 100 ng/ ml je použit jako vnitřní standard (Absolute Standards). Směsný standard CEN PCB MIX1 (Supelco) v heptanu o koncentraci 10 µg/ ml obsahující 12 PCB kongenerů a směsný standard PESTICIDE- MIX13 (Dr. Ehrenstorfer) v cyklohexanu o koncentraci 10 µg/ ml obsahující 26 pesticidních látek je použit ke kalibraci a následné kvantifikaci analytů ve vzorku.

### **Přístroje a zařízení a jejich nastavení**

GPC analýzy se provádějí pomocí následující GPC sestavy: HP 1050 pumpa – nástřikový ventil Rheodyne (model 7725i) s přeplňovací smyčkou (1 ml) – kolona Bio-Beads S- X3 200- 400 mesh (8 × 500 mm). Průtok mobilní fáze (chloroform) je 0,6 ml/ min. Sběrač frakcí Gilson FC203B je nastaven pro sběr PCB/ OCP frakce mezi 20 a 40 min do srdcových baněk o objemu 50 ml. Teflonové filtrační disky 30 mm × 0,45 µm.

Chromatografická separace byla provedena pomocí plynového chromatografu Varian 3800GC na koloně DB- XLB (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) umožňující dělení kritického páru PCB 28 a PCB 31. Teplotní program byl následující: 90 °C (1 min), 200 °C (25 °C/ min), 250 °C (4 °C/ min), 280 °C (15 °C/ min), 280 °C (15 min). Splitless nástřik (1 µl) byl proveden do nástřikového portu vyhřátého na 270 °C s linerem s restrikcí (3,4 mm id). Průtok nosného plynu helia o čistotě 5.0 byl konstantní (1 ml/ min).

Detekce byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru Varian 1200MS metodou tandemové hmotnostní spektrometrie. Analyty byly vystaveny elektronové ionizaci při 70 eV. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 200 °C a teplota spojky na 275 °C. Optimalizované parametry pro detekci pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie byly následující: tlak argonu v kolizní cele (2,2 mTorr), šířka m/ z prekursoru (0,7) a produktů (1,0). Prekursory, produktové ionty a kolizní energie optimální pro detekci jednotlivých PCB a OCP jsou uvedeny v SOP 48 (4).

Dále bylo k analýzám využito následujících zařízení: extraktor Soxtec Avanti, rotační vakuová odparka (RVO), muflová pec, ultrazvuková lázeň, laboratorní sklo.

### **Postup stanovení**

Postup extrakce, čištění a stanovení PCB/ OCP v rybích moučkách a kalech je podrobně uveden v SOP 48 (4).

Odparek extraktu se rozpustí ve 4 ml chloroformu. Mechanické nečistoty jsou z extraktu odstraněny filtrací přes teflonový disk. Zfiltrovaný extrakt (1 ml) se vnese na GPC kolonu a jímá se frakce obsahující PCB při analýze kalů nebo frakce obsahující PCB a OCP při analýze rybích mouček. Ta se zkoncentruje na RVO téměř k suchu, převede do 1 ml isooktanu a následuje dočištění na SPE kolonce.

Kaly se dočistí pomocí SPE na kombinované silikagelové kolonce, ze které se eluují hexanem. Pro čištění rybích mouček se použije SPE na florisilu, ze kterého se analyty eluují 50% DCM v hexanu. Vzorek se před GC-MS/ MS analýzou rekonstituuje do 0,25 (rybí moučky) nebo 0,5 (kaly) ml isooktanu.

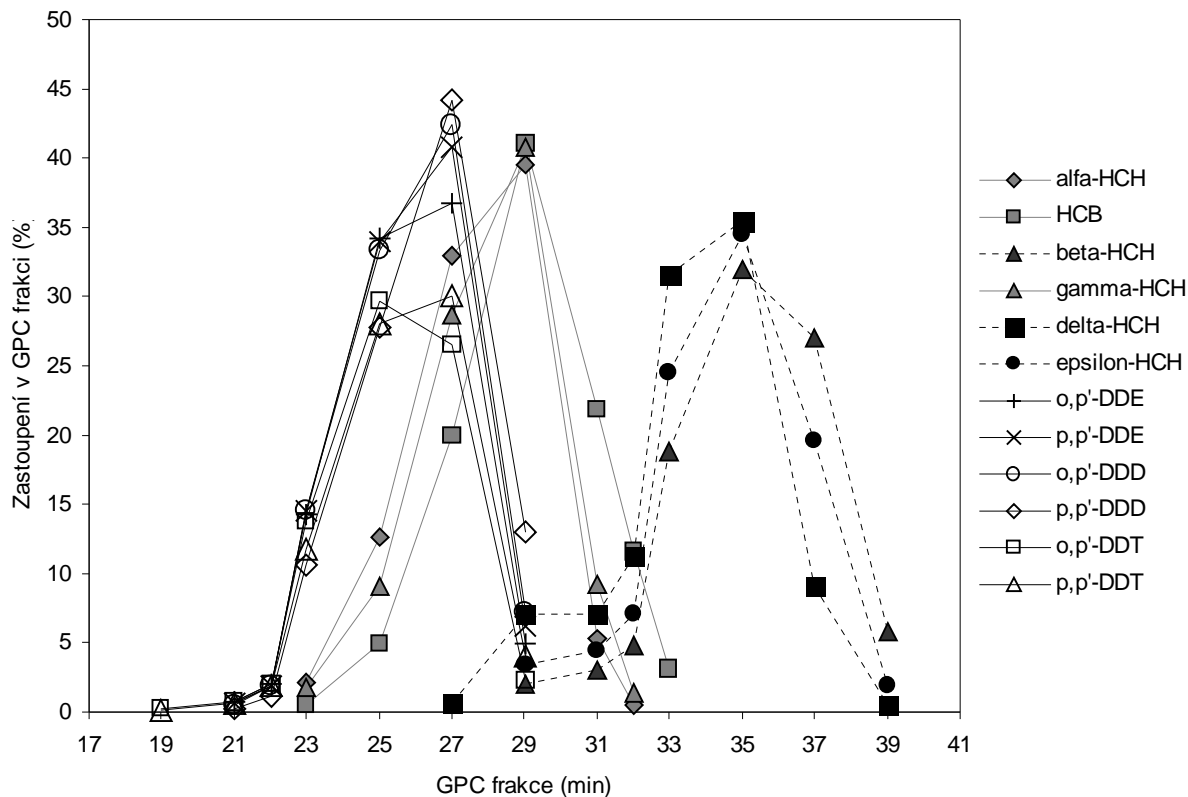
## **3. Výsledky a diskuse**

### **Vývoj a optimalizace GPC**

Při analýze stopových množství PCB a OCP je nezbytné intenzivní čištění vzorku před jeho finálním stanovením. V případě rybích mouček a čistírenských kalů je nutné odstranění lipidických a dalších vysokomolekulárních složek, které nelze pomocí SPE dostatečně oddělit. Nejčastěji využívanými metodami je kyselá hydrolyza, alkalická etanolýza a gelová permeační chromatografie. Kyselou hydrolyzu a alkalickou etanolýzu lze použít při analýze PCB a dalších chlorovaných aromatických sloučenin, avšak v případě nenasycených sloučenin s kyslíkatou funkční skupinou dochází k jejich degradaci a ztrátám při přípravě vzorku k analýze. Jako univerzální metodu odstranění tuku a vysokomolekulárních látek lze použít GPC, při které dochází pouze k separaci podle velikosti a tvaru molekul. Zavedení GPC umožnilo rozšíření rozsahu stanovení o dieldrin, endrin, heptachlorepoxydy, endosulfany a další.

Optimalizace GPC byla provedena pro 31 analytů pomocí roztoku standardu o koncentraci 100 ng/ ml. Ve dvouminutových intervalech bylo odebráno 14 frakcí o objemu

1,2 ml. Po obohacení 100 ng vnitřního standardu byly v jednotlivých frakcích stanoveny koncentrace všech 31 analytů pomocí GC- MS/ MS metody. Z elučních profilů znázorněných na obrázcích 1, 2, 3 byly stanoveny frakce pro sběr PCB (22- 34 min) a OCP (20- 40 min). Výtěžnost GPC pro stanovení PCB byla 99- 106 %, pro základní OCP (HCB, HCH isomery, DDT a jeho metabolity) 97- 109 % a pro ostatní OCP 83- 112 %. Počáteční nastavení GPC frakcí pro sběr PCB nebo OCP při tlaku 3 bary bylo ověřeno při každém nárůstu tlaku na koloně o 1 bar, způsobeném zanesením kolony surovými extrakty rybích mouček a kalů.

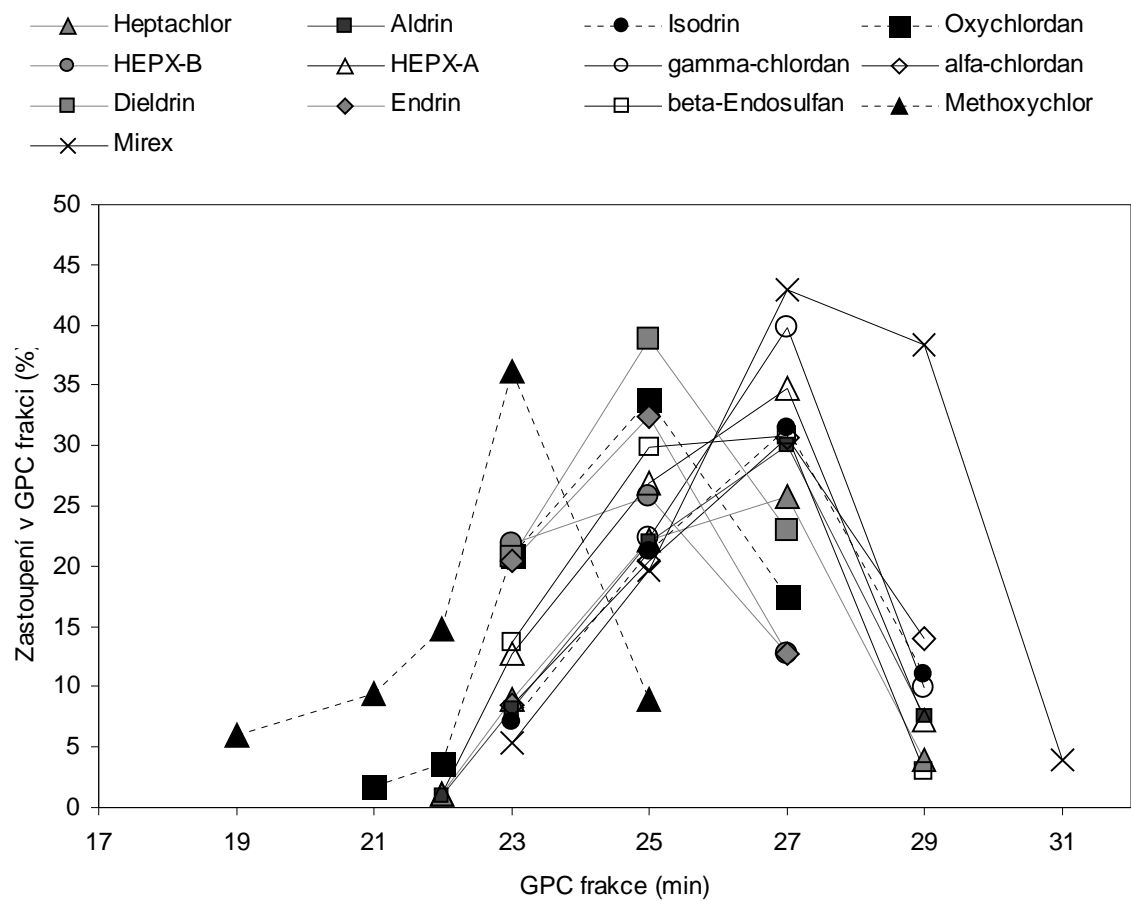


**Obrázek 1. GPC profily základních OCP**

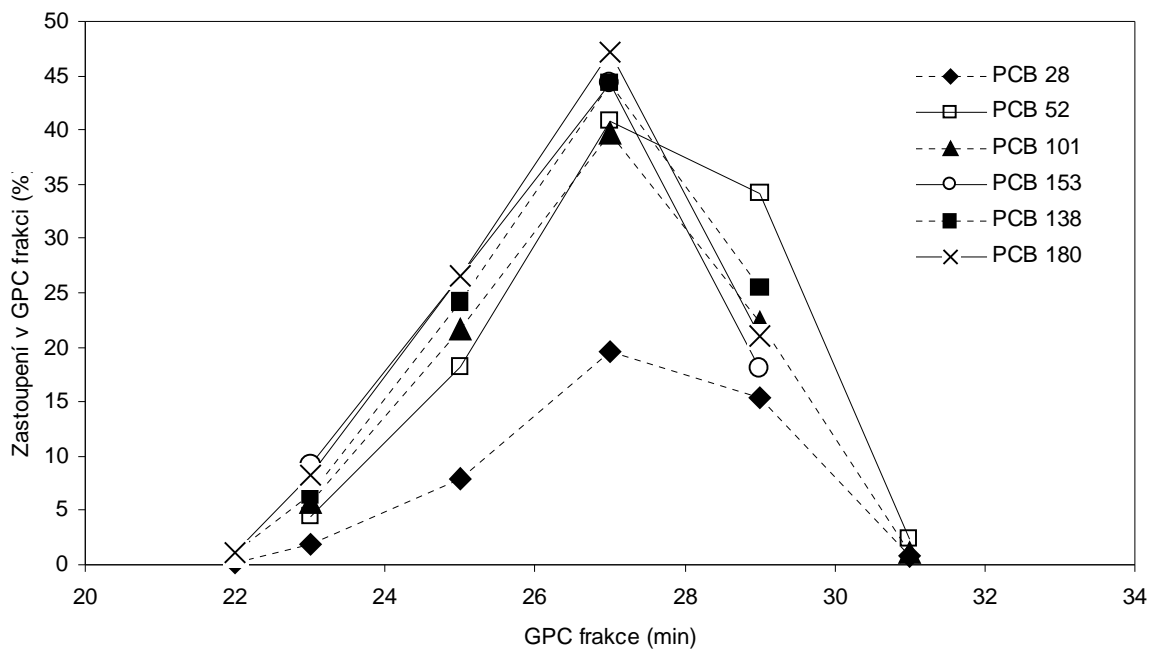
Dále byl optimalizován celkový postup čištění vzorku. SPE čištění bylo provedeno dle ČSN EN 1528- 3 na silikagelovém sloupci (5). Výtěžnosti byly stanoveny zpracováním obohacené matrice (rybí moučky 723/ 2004). Pro správné vyhodnocení pokusu byl za stejných podmínek připraven matricový standard. Výtěžnost postupu čištění pro PCB byla 101- 108 % a pro OCP 99- 110 %. Nakonec byl silikagel pro SPE nahrazen florisilem, který lépe zadržuje zbytkový tuk po GPC analýze a finální postup byl ověřen pomocí standardního referenčního materiálu v rámci VÚ K6/ 2005 (6).

V rámci optimalizace byla GPC technika porovnána s kyselou hydrolyzou. Extrakt rybí moučky byl před SPE čištěním ošetřen koncentrovanou kyselinou sírovou. Stanovené obsahy

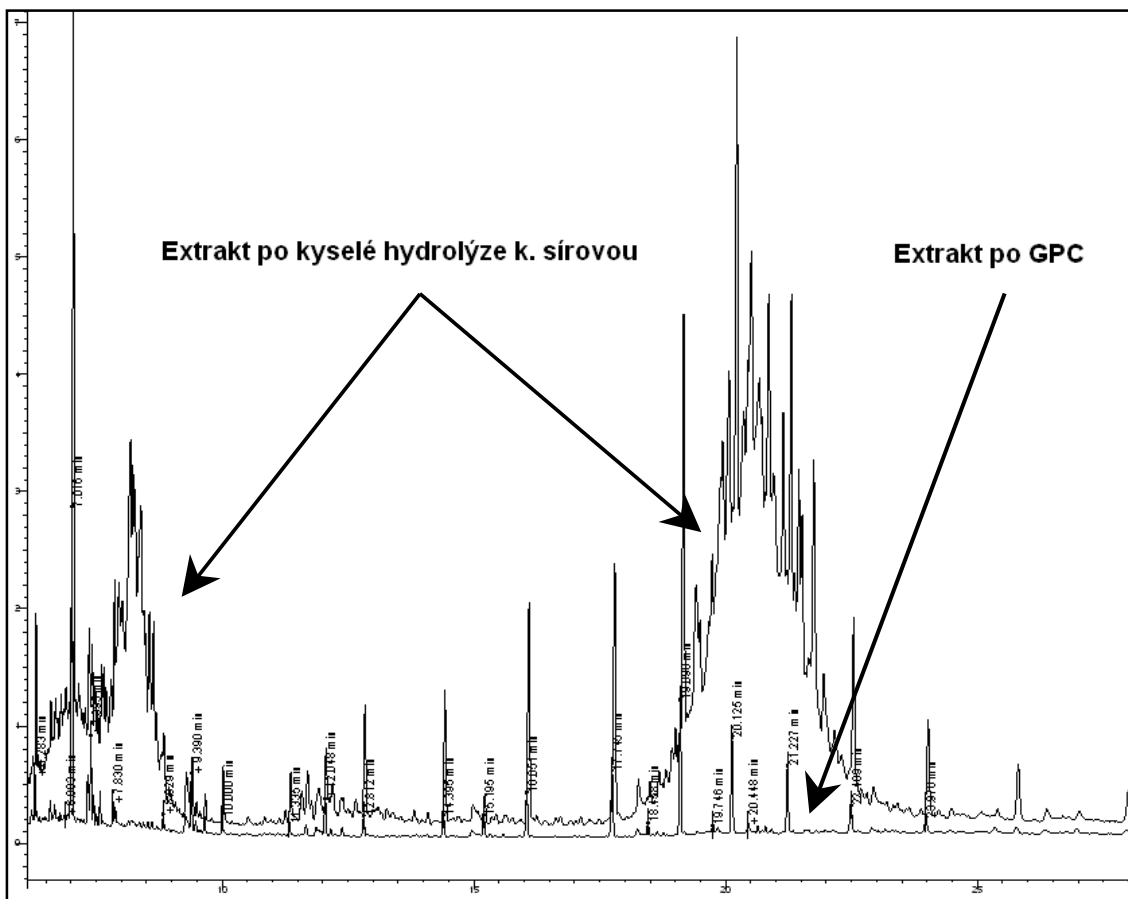
PCB získané oběma přístupy byly srovnatelné, ale extrakt po GPC poskytoval výrazně vyšší čistotu při finální GC- MS analýze než extrakt po kyselé hydrolýze (obr. 4).



**Obrázek 2. GPC profily ostatních OCP**



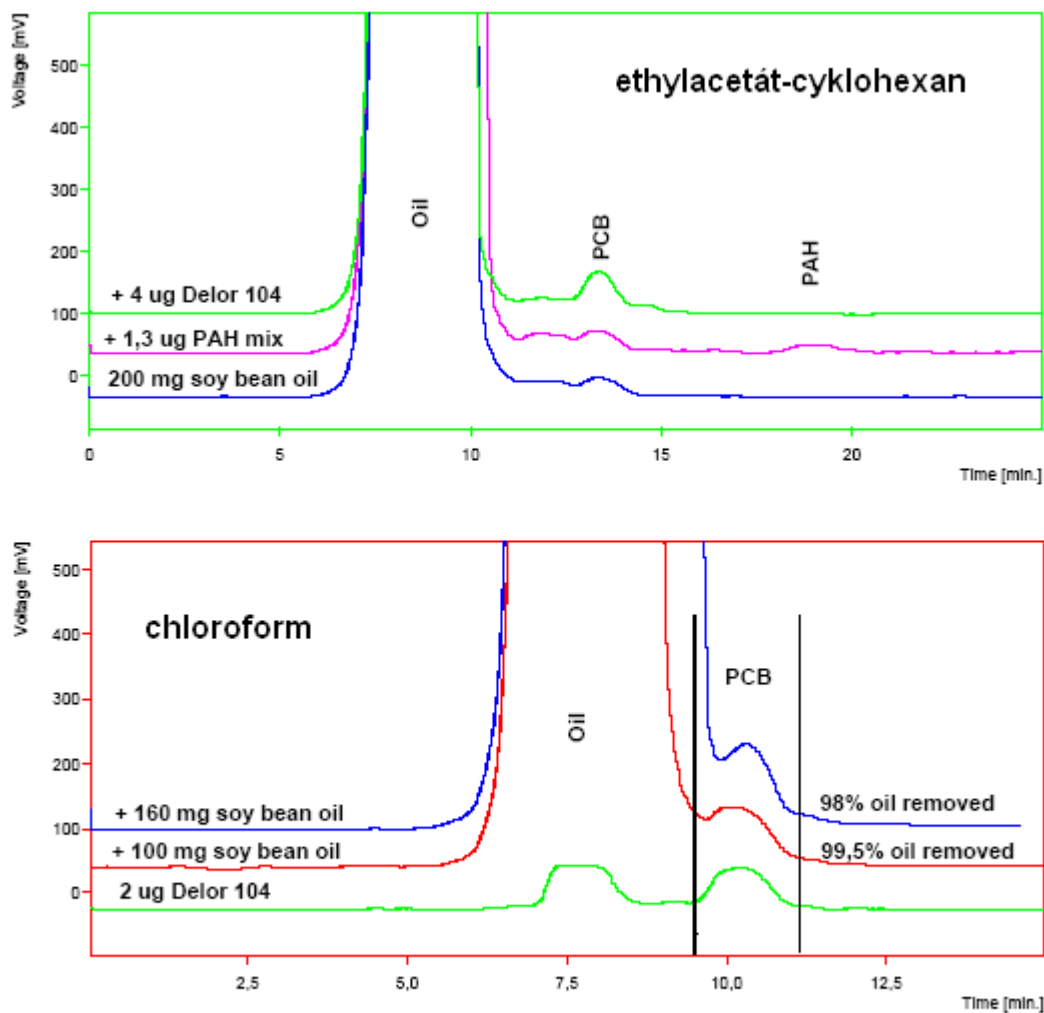
**Obrázek 3. GPC profily indikátorových PCB**



**Obrázek 4. Srovnání čistoty extraktu rybí moučky po odstranění tuku kyselou hydrolyzou a GPC technikou**

Důležitým faktorem ovlivňujícím separaci tuku a ostatních složek je volba mobilní fáze, která mění stupeň bobtnání gelu. Další požadavky při volbě mobilní fáze je její dobrá rozpustnost pro širokou škálu látek a nízká viskozita (1). EPA metoda 3640A popisuje GPC v systému Bio- Beads a dichlormetan (7), který je často nahrazován chloroformem s lepšími rozpouštěcími vlastnostmi. Současné normy a směrnice využívají nechlorovaná rozpouštědla, nejčastěji směs cyklohexan- ethylacetát (5). V aplikačních listech firma Watrex popisuje vliv mobilní fáze na separaci tuku. V případě použití chloroformu nedochází k úplnému odstranění tuku z extraktu. Zbytkový tuk může představovat až 2 % z množství tuku v surovém extraktu, což bylo potvrzeno vázkovým stanovením odparku GPC frakce extraktu rybí moučky.

Tento nedostatek lze odstranit změnou mobilní fáze na směs ethylacetát- cyklohexan (1:1) (obr. 5) (3).



**Obrázek 5. Vliv mobilní fáze (3)**

### **Analýza reálných vzorků**

V roce 2004 bylo navržených postupem zpracováno 16 vzorků rybích mouček, jejichž výsledky jsou popsány ve VÚ K3/ 2005 (8) a K6/ 2005 (6). Postup byl dále využit při analýze PCB ve 35 vzorcích čistírenských kalů. Obsahy jednotlivých PCB a statistické parametry PCB stanovení jsou přehledně uvedeny v následující tabulce (tab. 1). Analýzu PCB

v čistírenských kalech, zahrnující GPC, SPE na modifikovaném silikagelu a GC- MS/ MS stanovení, lze provést s průměrnou relativní rozšířenou nejistotou 18 %.

**Tabulka 1. Statistické parametry pro analýzu PCB v čistírenských kalech získané z výsledků paralelních stanovení**

<b>PCB kongener</b>	<b>Rozsah obsahu (ppb)</b>	<b>Průměrný obsah (ppb)</b>	<b>Stand. rozšíř. nejistota (ppb)</b>	<b>Relat. rozšíř. nejistota (%)</b>	<b>Opakovatelnost (%)</b>
<b>28</b>	1 - 70	10,3	2,1	20	10
<b>52</b>	1 - 25	6,8	1,5	23	11
<b>101</b>	5 - 75	16,3	2,0	12	6
<b>118</b>	2 - 25	8,4	1,2	15	8
<b>138</b>	10 - 150	34,0	5,6	16	8
<b>153</b>	13 - 200	46,9	6,5	14	7
<b>180</b>	10 - 160	38,7	9,2	24	12

#### **4. Závěr**

V roce 2004 byla provedena optimalizace podmínek pro GPC analýzu matric s vysokým obsahem tuku a vysokomolekulárních látek. Navržené podmínky byly ověřeny analýzou obohacených vzorků rybí moučky. Metoda byla využita při analýze čistírenských kalů a rybích mouček. Dále práce předkládá návrhy ke zvýšení efektivity čištění a statistické zpracování výsledků analýz PCB v čistírenských kalech.

## 5. Literatura

1. Ferenčík, M.; Škárka, B. Molekulová vylučovacia chromatografia. Biochemické laboratorne metódy, 1; Alfa: Bratislava, **1981**; 8049, 192-208.
2. [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_9142.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9142.pdf)
3. [http://www.watrex.cz/en-download/applisty/PAH\\_Prep\\_E.pdf](http://www.watrex.cz/en-download/applisty/PAH_Prep_E.pdf)
4. Příručka jakosti UKZÚZ, **2004**, SOP č.48, Stanovení PCB a OCP metodou GC/ MS.
5. ČSN EN 1528-3 Potraviny s vysokým obsahem tuku – Stanovení pesticidů a polychlorovaných bifenyliů (PCB), část 3: Metody přečišťování, Český normalizační institut, Praha, únor **1998**.
6. Tieffová, P., Kosubová, P. Rozšíření stanovení OCP o další zakázané látky ze skupiny POP. Závěrečná zpráva VÚ K6/2005. NRL- RO Brno, ÚKZÚZ, Brno, **2005**
7. EPA method 3640A. Gel-permeation cleanup. US Environmental Protection Agency, Washington, D.C., September **1994**.
8. Tieffová, P., Kosubová, P. Stanovení PCB v krmných směsích s různým obsahem tuku v sušině. Závěrečná zpráva VÚ K3/2005. NRL- RO Brno, ÚKZÚZ, Brno, **2005**.

# Rozšíření stanovení OCP o další zakázané látky ze skupiny POP

*Pavla Tieffová, Petra Kosubová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL- RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno  
[pavla.tieffova@ukzuz.cz](mailto:pavla.tieffova@ukzuz.cz), [petra.kosubova@ukzuz.cz](mailto:petra.kosubova@ukzuz.cz)

## 1. Úvod

Organochlorové pesticidy (OCP) patří mezi persistentní organické polutanty. POPs mají negativní vliv na životní prostředí a zdraví, způsobují reprodukční a vývojové poruchy, změny imunitního i endokrinního systému. Česká republika v roce 2002 ratifikovala Stockholmskou úmluvu (1), která se v celosvětovém měřítku snaží o regulaci POPs a zavazuje smluvní strany k odstranění jejich výroby, zákazu používání nebo alespoň o omezení použití na nezbytné případy. K počátečním 12 POPs patří aldrin, chlordan, DDT, dieldrin, endrin, heptachlor, hexachlorbenzen, mirex, toxafen, polychlorované bifenyly, dioxiny a furany. Tyto látky se do ekosystému dostávají třemi základními cestami: jako pesticidní přípravky, průmyslové chemikálie a nežádoucí vedlejší produkty (2). Výroba persistentních chlorovaných pesticidů byla zakázána, výjimku dostaly prozatím nezastupitelné přípravky proti termitům, ektoparazitům a přenašečům malárie (aldrin, DDT, heptachlor, chlordan a mirex). Hexachlorbenzen a DDT jsou ještě povolené jako meziprodukty při výrobě jiných pesticidů (3).

Ze skupiny POP stanovujeme metodou plynové chromatografie s hmotnostně selektivní detekcí indikátorové kongenery PCB a 25 organochlorových pesticidů ve všech typech půd, sedimentech, čistírenských kalech a vzorcích krmiv s různým obsahem živočišného nebo rostlinného tuku. Předupravený vzorek (řádně odebraný, vysušený a zhomogenizovaný) se extrahuje do organického rozpouštědla, extrakt se vyčistí a připraví ke koncové analýze. Varianty postupu, které umožňuje vybavení NRL- RO Brno, jsou uvedeny ve standardním operačním postupu akreditovaného stanovení (4). Vypracování a validace jednotlivých kroků byla nejprve provedena pro PCB, HCB, HCH, DDT, DDE a DDD, neboť tyto analyty se v našich vzorcích nacházejí pravidelně v hodnotách nad mezí stanovitelnosti. Pro ostatní látky skupiny OCP bylo třeba optimalizovat odlišný postup čištění a vypracovat měřicí a vyhodnocovací metodu na novém přístroji pro GC/ MS/ MS analýzy.

V roce 2004 získala národní referenční laboratoř nové přístroje z projektu PHARE. Pro potřeby reziduálních analýz to byl především plynový chromatograf s hmotnostním detektorem typu trojnásobného kvadrupólu, který může pracovat v různých módech měření včetně chemické ionizace. Nový automatizovaný extraktor ASE 100 umožní regulaci teploty i tlaku použitých rozpouštědel. Pro čištění extraktu vzorků byla pořízena sestava pro gelovou permeační chromatografii (GPC).

Odzkoušení a zavedení nových přístrojů je tématem i dalších vývojových úkolů. Variabilní používání dosažitelných technik pro co nejlepší analytické výsledky je shrnuto ve standardním operačním postupu SOP 30 (5).

POPs stanovujeme v různých maticích, největší množství koextraktů, které musí být čistícími kroky odstraněny, obsahují vzorky čistírenských kalů a krmiva s vysokým obsahem tuku. Požadavky na kompletní stanovení OCP jsou právě u vzorků krmiv, a proto byla metoda optimalizována na vzorcích rybí moučky.

Byla vypracována a ověřena metoda stanovení 25 organochlorových pesticidů (OCP). Vzorky byly extrahovány do směsi rozpouštědel hexan-aceton (3:1) a extrakt s přídavkem vnitřního standardu byl přečištěn a zakoncentrován vícestupňovým čištěním s využitím gelové permeační chromatografie (GPC) a extrakce na pevné fázi (SPE) s florisilovým sorbentem. Vyčištěný extrakt byl zanalyzován metodou GC/MS/MS, optimalizovanou pro stanovení 11 základních látek skupiny OCP (HCB, *a*, *b*, *g*, *d*- izomerů HCH, *o*, *p*- a *p*, *p*'-izomerů DDT, DDE a DDD) a 14 ostatních OCP (aldrin, dieldrin, endrin, isodrin, heptachlor, heptachlorepoxid, chlordan, oxychlordan, endosulfan, methoxychlor a mirex). Mez stanovitelnosti byla 0,03- 0,16 µg analytu/ kg sušiny pro základní OCP a 0,02- 0,54 µg/ kg sušiny vzorku pro ostatní OCP. Správnost metody byla ověřena analýzou rybího tuku, certifikovaného referenčního materiálu SRM 1588a. Tento postup byl použit pro stanovení všech OCP v 10 vzorcích rybí moučky.

## 2. Materiál a metody

### Chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou čistoty minimálně p.a., nejlépe však kvality pro reziduální analýzu. Dostatečná čistota sorbentů a rozpouštědel je kontrolována analýzou slepého vzorku.

Rozpouštědla: hexan, aceton, dichlormetan, chloroform, isooktan.

Florisil (0,15- 0,25 mm), [Merck]; aktivace 4 hod/ 650 °C, reaktivace 5 hod/ 130 °C, deaktivace 3 % vody.

Silikagel 60 (0,063- 0,200 mm), [Merck]; aktivace 12 hod/ 150 °C, deaktivace 3 % vody.

Síran sodný, aktivace 6 hod/ 550 °C.

Vnitřní standardy: PCB 30 a PCB 155, [Absolute Standards]; pracovní roztok 100 ng/ ml isooktanu.

Směsný analytický standard: Pesticide MIX 13, [Dr. Ehrenstorfer]; 10 µg/ ml cyklohexanu, obsahuje 32 analytů pro kalibraci a kvantifikaci OCP a PCB ve vzorku.

Standardní referenční materiál: rybí tuk SRM 1588a, [NIST]; s certifikovanými obsahy POP.

### Přístroje a pomůcky

Plynový chromatograf Varian 3800 GC, kapilární kolona DB-XLB [J&W Scientific] (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). Teplotní program pece: 90 °C (1 min), 200 °C (25 °C/ min), 250 °C (4 °C/ min), 280 °C (15 °C/ min, 15 min). Splitless nástřik (1 µl), teplota injektoru 270 °C. Nosný plyn He 5.0, průtok 1 ml/ min.

Hmotnostní spektrometr Varian 1200 MS, umožňující tandemovou hmotnostní spektrometrii. EI ionizace při 70 eV. Teplota iontového zdroje/ výstupu z GC 200/ 275 °C. Kolizní plyn Argon 4.6, tlak 2,2 mTorr, šířka m/z prekurzoru (0,7), produktů (1,0). Prekurzory, produktové ionty a kolizní energie optimální pro detekci jednotlivých analytů jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1. Optimalizované parametry pro GC/ MS/ MS stanovení OCP**

Analyt	Prekurzor (m/z)	Produkty (m/z)	Kolizní energie (V)	LOD (pg/nástřik)
HCB	284	214	-30	0,5
HCH izomery	219	181, 183	-10	0,4
DDE	246	176, 211	-30	0,2
DDT, DDD	235	165, 199	-20	0,1
Heptachlor	272	235, 237	-15	0,1
Heptachlorepoxid-A	183	155	-15	0,5
Heptachlorepoxid-B	353	281, 282	-12	1,1
α, γ-chlordan	375	301, 303	-12	1,6; 1,5
Oxychlordan	185	149	-7	0,3
Aldrin, dieldrin, endrin	263	191, 193	-35	0,4; 0,8; 0,8
Isodrin	193	123, 157	-20	0,1
Heptachlor	272	235, 237	-15	0,5
α β-endosulfan	195	159	-10	0,5
Methoxychlor	227	169	-25	0,2
Mirex	272	235, 237	-15	0,06

GPC-sestava: HP 1050 pumpa, nástřikový ventil Rheodyne (model 7725i) s přeplňovací smyčkou (1 ml), separační kolona (8 × 500 mm), náplň Bio- Beads SX3 200- 400 mesh,

mobilní fáze chloroform, průtok 0,6 ml/ min. Sběrač frakcí Gilson FC 203B, sběr OCP frakce mezi 20- 40 min. Teflonové filtrační disky 30 mm × 0,45 μm.

Extraktor Soxtec Avanti, rotační vakuová odparka (RVO), muflová pec, ultrazvuková lázeň, laboratorní sklo.

### **Pracovní postup**

Podrobný popis je uveden ve standardním operačním postupu tohoto stanovení a v následujícím textu jsou uvedeny odkazy na příslušné kapitoly SOP č. 48 (4).

Rybí moučka (10 g) se extrahuje v automatickém extraktoru soxhletového typu Soxtec 80 ml směsí hexan/ aceton v poměru 3:1. (5.4.1.). Extrakt s přidavkem vnitřního standardu se zakoncentruje na RVO téměř k suchu, odparek se rozpustí v chloroformu a zbaví mechanických nečistot filtrací přes teflonový disk. Z takto připraveného extraktu se nastříkne 1 ml na GPC kolonu a jímá se frakce obsahující OCP mezi 20. až 40. minutou při rychlosti průtoku mobilní fáze 0,6 ml CHCl<sub>3</sub>/ min (5.5.4.). Frakce se zájmovými analyty se odpaří na RVO téměř k suchu, odparek rekonstituovaný do 1 ml hexanu se dočistí na SPE kolonce s florisilem (3.9.1.). Skleněná kolonka se naplní 4 ml sorbentu, převrství 1 ml bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a nanese se extrakt po GPC. OCP se vymyjí 12 ml 50% dichlormetanu v hexanu. Eluát se odpaří na RVO a odparek rekonstituovaný do isooktanu se převede do vialky pro koncové GC/ MS/ MS stanovení.

## **3. Diskuse a výsledky**

### **Extrakce vzorků**

Pro tuto práci byly všechny typy vzorků extrahovány automatickým extraktorem Soxtec. Vzorek je umístěn do celulózy patry, nejprve se extrahuje ponořený do vroucího rozpouštědla, potom je vytažen a intenzivně promýván kondenzovanými parami rozpouštědla. Účinnost extrakce OCP z rybí moučky byla ověřena pro tři rozpouštědla se stoupající extrakční silou: hexan/ hexan:aceton (3:1)/ dichlormetan (DCM). Rozdíly nebyly významné, ale celkově nejlepší výsledky byly získány při extrakci do směsi hexan/ aceton.

### **Čištění extraktu**

Podrobný popis GPC čištění je uveden ve VÚ L3/ 2005 (6). Optimální interval pro sběr OCP/ PCB analytů je 20– 40 min a byl ověřen analýzou extraktu rybí moučky s přidavkem standardu. Výťažnost GPC byla v rozmezí 83- 112 % pro všechny analyty.

Pro SPE kolonky byly odzkoušeny sorbenty Silikagel 100, Silikagel 60 a Florisil, plně aktivní i deaktivované 3 % vody. Při optimalizaci eluce zájmových látek bylo provedeno srovnání pro toluen a DCM v hexanu (7). Nejlepší výsledky byly dosaženy při použití deaktivovaného florisilu se 3 % vody a eluci 50% DCM v hexanu. Při promytí šestinásobkem  $V_0$  (objemu rozpouštědla, nutného ke smočení kolony) byla výtěžnost SPE čištění pro všechny OCP v rozmezí 92- 128 %.

### **Optimalizace GC/ MS/ MS metody**

Všechny požadované analyty byly stanoveny vysoce selektivní metodou tandemové MS. Prekurzory OCP se po kolizi s argonem rozpadají na produktové fragmenty, které jsou zaznamenány pro kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení. U HCH izomerů, oxychlordanu, chlordanů a endosulfanů byla sledována ztráta jedné nebo dvou molekul HCl, u HCB, heptachloru, heptachlorepoxydu- B, drinů, mirexu, izomerů DDE, DDD a DDT ztráta jednoho nebo dvou atomů Cl. U methoxychloru disociace rodičovského iontu odpovídá ztrátě dvou karbonylů a pro heptachlorepoxyd- A byla vybrána ztráta etylenu. Pro každou specifickou reakci byla optimalizována kolizní energie při třech různých hodnotách tlaku argonu v kolizní cele. Pro zvýšení citlivosti detekce byla rozšířena hmotová šířka sledovaných produktových iontů z hodnoty 0,7 na 1,0.

Pro kvalitativní potvrzení stanovovaného analytu je potřeba dosáhnout shody se standardem v retenčním čase a v poměru produktových iontů (8). Povolená odchylka je  $\pm 0,2 \%$  z RRT (tabulka 2), tedy pro  $\beta$ - endosulfan, methoxychlor, mirex, *p,p'*- DDD a *p,p'*- DDT lze tolerovat posun RRT  $\pm 0,003$  a pro zbývající OCP  $\pm 0,002$ .

Při nastaveném tlaku argonu v kolizní cele (2,2 mTorr) bylo možné u 7 látek pozorovat pouze jeden disociační přechod. Za podmínek EI ionizace dochází k silné fragmentaci původní molekuly a některé látky neposkytují výrazný prekurzor. Ke zlepšení citlivosti i selektivity stanovení těchto analytů lze využít MS s chemickou ionizací. Odzkoušení výhod této ionizační techniky je cílem dalšího VÚ K11/ 2005.

Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno metodou kalibrační přímky s použitím dvou vnitřních standardů. U některých analytů byl zjištěn výrazný matricový efekt. Použití matricového standardu (přídavku vyčištěného extraktu nekontaminovaného vzorku do pracovního roztoku standardu) výrazně zvýšilo kvalitu kalibračních parametrů (tabulka 3). Kalibrační rozsah byl 10 – 300 ng/ ml isooktanu, koncentrace vnitřních standardů 100 ng/ ml. Mez stanovitelnosti nastavená pro zápis výsledků je 10 ng/ ml, při navážce 10 g vzorků je LOQ metody 1 ppb, pro základní OCP 5 ng/ ml a LOQ je 0,5 ppb (9).

**Tabulka 2. Identifikační parametry pro MS/ MS stanovení OCP**

Analyt	RRT kolona DB-XLB	Prekurzor (m/z)	Produktové ionty		
			(m/z)	zastoupení (%)	max odchylka
PCB 30 (IS1)	1,000	256	186, 221	97,0	±19,7
α-HCH	0,956	219	183, 181	76,4	±17,6
HCB	0,974	284	214	-	-
γ-HCH	1,037	219	183, 181	75,7	±17,6
β-HCH	1,118	219	183, 181	76,4	±17,6
δ-HCH	1,194	219	183, 181	75,0	±17,5
heptachlor	1,206	272	237, 235	83,4	±18,3
PCB 155 (IS2)	1,000	360	290, 288	66,3	±16,6
Aldrin	0,857	263	193, 191	60,7	±16,1
Isodrin	0,931	193	157, 123	59,5	±15,9
Oxychlordan	0,958	185	149	-	-
HEPX-B	0,963	353	282, 281	69,4	±16,9
HEPX-A	0,977	183	155	-	-
o,p'-DDE	1,018	246	176	-	-
γ-chlordan	1,048	375	303, 301	50,9	±15,1
α-chlordan	1,060	375	303, 301	51,6	±15,2
α-endosulfan	1,067	195	159	-	-
p,p'-DDE	1,222	246	176, 211	93,7	±19,4
Dieldrin	1,137	263	193, 191	59,3	±15,9
o,p'-DDD	1,147	235	165, 199	78,9	±17,9
Endrin	1,200	263	193, 191	60,9	±16,1
o,p'-DDT	1,235	235	165, 199	79,5	±18,0
p,p'-DDD	1,278	235	165, 199	83,2	±18,3
β-endosulfan	1,286	195	159	-	-
p,p'-DDT	1,372	235	165, 199	82,3	±18,2
Methoxychlor	1,519	227	169	-	-
Mirex	1,630	272	237, 235	83,6	±18,4

### Ověření správnosti metody

Správnost postupu byla ověřena analýzou vzorků rybí moučky s přidavkem standardu a referenčního materiálu SRM 1588a s certifikovanými obsahy vybraných OCP. Výsledky byly zpracovány statistickým programem Effivaldation (verze 3.0). Pro všechny sledované analyty byly výsledky měření statisticky správné. Výsledky stanovení SRM 1588a byly využity pro výpočet opakovatelnosti a nejistot metody pro hladiny OCP vyšší než 15 ppb. V blízkosti meze stanovitelnosti byly tyto parametry stanoveny z měření vzorků rybích mouček za rok 2004. Na této úrovni byla opakovatelnost 5- 21 % a rozšířená relativní nejistota 9- 41 %.

**Tabulka 3. Kalibrační parametry pro MS/ MS stanovení OCP**

Analyt	Směrnice kalibrační přímký	RSD (%)	R <sup>2</sup>
HCB	0,247	3,8	1,000
$\alpha$ -HCH	0,211	2,0	0,998
$\beta$ -HCH	0,162	3,9	1,000
$\gamma$ -HCH	0,163	1,8	1,000
$\delta$ -HCH	0,162	2,5	1,000
o,p'-DDE	3,098	3,1	0,999
p,p'-DDE	1,258	2,1	1,000
o,p'-DDD	2,440	3,9	0,999
p,p'-DDD	2,327	6,1	0,998
o,p'-DDT	1,575	5,5	0,998
p,p'-DDT	1,249	5,1	0,998
Heptachlor	0,510	1,6	0,999
HEPX-A	0,356	4,6	0,999
HEPX-B	0,083	7,2	0,999
Aldrin	0,322	6,0	1,000
Dieldrin	0,149	7,6	0,999
Endrin	0,176	2,9	1,000
Isodrin	0,490	5,9	0,999
$\alpha$ -chlordan	0,108	4,6	0,999
$\gamma$ -chlordan	0,106	4,4	1,000
Oxychlordan	0,785	4,8	1,000
$\alpha$ -endosulfan	0,303	5,0	1,000
$\beta$ -endosulfan	0,261	8,1	1,000
Methoxychlor	1,254	7,3	0,998
Mirex	1,764	9,8	1,000

**Tabulka 4. Obsahy OCP v rybím tuku SRM 1588a**

Analyt	Obsah OCP $\pm$ nejistota <sup>(a)</sup> (ppb)		Výtěžnost metody (%)	Opakovatelnost (%)	Rozšířená nejistota (%)
	stanovený	certifikovaný			
$\alpha$ -HCH	87 $\pm$ 10	85,3 $\pm$ 3,4	102	6	12
$\gamma$ -HCH	23,8 $\pm$ 1,3	24,9 $\pm$ 1,7	96	3	6
p,p'-DDE	631 $\pm$ 37	651 $\pm$ 11	97	3	6
o,p'-DDD	34,3 $\pm$ 4,2	36,3 $\pm$ 1,4	95	6	12
o,p'-DDT	151 $\pm$ 18	156,0 $\pm$ 4,4	97	6	12
$\alpha$ -chlordan	159,0 $\pm$ 9,7	167,0 $\pm$ 5,0	95	3	6
$\gamma$ -chlordan	46,2 $\pm$ 8,2	52 $\pm$ 7	89	9	18
Oxychlordan	38,2 $\pm$ 3,2	38 $\pm$ 4	100	4	8
Dieldrin	156 $\pm$ 18	155,9 $\pm$ 4,5	100	6	11
Mirex	15,8 $\pm$ 2,1	16 $\pm$ 3	99	7	13

(a) rozšířená standardní nejistota

## Výsledky analýz v roce 2004

Ve vzorcích půd a sedimentů se pravidelně nacházejí nadlimitní hodnoty DDT/ DDE a HCB. Hodnoty HCH se pohybují kolem meze stanovitelnosti a pozitivní nálezy ostatních látek skupiny OCP jsou spíše výjimečné. Ani ve vzorcích sedimentů, které pravidelně analyzujeme v okružním testu SETOC/ WEPAL (NL), nejsou statisticky vyhodnotitelné pozitivní nálezy. Z tohoto pohledu nejzajímavější jsou výsledky analýz rybích mouček, které se k nám dovážejí od různých světových výrobců.

**Tabulka 5. Obsahy OCP v rybích moučkách analyzovaných v roce 2004, v µg/ kg tuku**

Číslo vzorku	227	510	554	576	577	579	683	721	1018	1127
sušina [%]	90,5	91,6	93,	91,2	94,0	93,2	89,2	90,4	92,5	90,6
tuk [%]	7,32	8,31	9,89	9,01	9,82	8,15	8,55	8,63	8,21	9,65
<b>HCB</b>	6,3	15,4	12,4	20,4	20,1	10,9	6,3	31,1	13,5	5,9
<b>α-HCH</b>	1,5	3,3	1,7	4,0	3,1	2,4	2,0	9,1	1,9	1,6
<b>β-HCH</b>	1,2	2,2	1,0	3,3	1,9	1,9	1,4	2,5	<1	1,1
<b>γ-HCH</b>	3,6	5,3	4,3	6,6	10,5	6,8	4,0	9,5	3,3	3,5
<b>δ-HCH</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>o, p'-DDE</b>	<1	<1	<1	1,11	1,8	<1	<1	<1	<1	<1
<b>p, p'-DDE</b>	14,9	27,2	29,7	132	105	29,2	15,4	15,0	69,5	10,7
<b>o, p'-DDD</b>	<1	2,5	2,3	5,8	8,4	1,4	<1	<1	4,0	<1
<b>p, p'-DDD</b>	2,9	11,8	10,1	38,6	46,8	8,2	4,9	3,4	22,1	2,0
<b>o, p'-DDT</b>	<1	1,7	<1	1,0	17,3	1,1	<1	<1	2,2	<1
<b>p, p'-DDT</b>	<1	4,1	2,1	3,0	41,0	2,7	2,1	1,8	6,6	<1
<b>Heptachlor</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>HEPX-A</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>HEPX-B</b>	<1	<1	3,6	2,6	3,3	<1	<1	<1	2,4	<1
<b>α-chlordan</b>	<1	<1	6,8	5,5	11,1	<1	<1	<1	9,7	<1
<b>γ-chlordan</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>Oxychlordan</b>	<1	<1	2,0	1,9	3,1	<1	<1	<1	2,7	<1
<b>Aldrin</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>Dieldrin</b>	<1	6,8	15,1	9,5	21,3	9,0	<1	<1	19,5	<1
<b>Endrin</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>Isodrin</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>α-endosulfan</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>β-endosulfan</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>Metoxychlor</b>	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
<b>Mirex</b>	<1	<1	<1	<1	1,1	<1	<1	<1	<1	<1

## 4. Závěr

Tato metoda stanovení organochlorových pesticidů umožňuje stanovení všech analytů této skupiny s dostatečně nízkým detekčním limitem a je vhodná pro všechny typy vzorků, analyzované pro potřeby technických odborů ÚKZÚZ.

## 5. Literatura

1. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants; [www.pops.int](http://www.pops.int)
2. Zbírál, J. a kol. Stanovení persistentních organických polutantů. *Analýza půd II – Jednotné pracovní postupy*. ÚKZÚZ, Brno, **2003**, 172-173.
3. Holoubek, I. (koordinátor); Adamec, V.; Bartoš, M.; Černá, M.; Čupr, P.; Bláha, K.; Demnerová, K.; Drápal, J.; Hajšlová, J.; Holoubková, I.; Jech, L.; Klánová, J.; Kocourek, V.; Kohoutek, J.; Kužílek, V.; Machálek, P.; Matějů, V.; Matoušek, J.; Matoušek, M.; Mejstřík, V.; Novák, J.; Ocelka, T.; Pekárek, V.; Petira, K.; Provazník, O.; Punčochář, M.; Rieder, M.; Ruprich, J.; Sážka, M.; Tomaniová, M.; Vácha, R.; Volka, K.; Zbírál, J. Úvodní národní inventura persistentních organických polutantů v České republice. Projekt GF/CEH/01/003: ENABLING ACTIVITIES TO FACILITATE EARLY ACTION ON THE IMPLEMENTATION OF THE STOCKHOLM CONVENTION ON PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS (POPs) IN THE CZECH REPUBLIC. TOCOEN REPORT No. 249, Brno, srpen **2003**, část I./2.
4. Příručka jakosti UKZÚZ, **2004**, SOP 48, Stanovení PCB a OCP metodou GC/MS.
5. Příručka jakosti UKZÚZ, **2005**, SOP 32, Stanovení vybraných POP metodou GC/MS.
6. Kosubová, P. Zavedení metody GPC a její využití při analýze kalů a krmných směsí. Závěrečná zpráva VÚ L3/2005. NRL-RO Brno, ÚKZÚZ, Brno.
7. ČSN EN 1528-3 Potraviny s vysokým obsahem tuku – Stanovení pesticidů a polychlorovaných bifenylnů (PCB), část 3: Metody přečišťování, Český normalizační institut, Praha, únor **1998**.
8. ISO/DIS 22 892; Soil quality-Guidelines for the identification of target compounds by gas chromatography/mass spectrometry, **2003**.
9. Tieffová, P., Kosubová, P. Stanovení PCB v krmných směsích s různým obsahem tuku v sušině. Závěrečná zpráva VÚ K3/2005. NRL-RO Brno, ÚKZÚZ, Brno.
10. ČSN EN 14181 Krmiva – Stanovení reziduí organochlorových pesticidů – Metoda plynové chromatografie, Český normalizační institut, červen, **2001**.

# Stanovení PCB v krmných směsích s různým obsahem tuku v sušině

*Pavla Tieffová, Petra Kosubová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL, RO Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno  
[pavla.tieffova@ukzuz.cz](mailto:pavla.tieffova@ukzuz.cz), [petra.kosubova@ukzuz.cz](mailto:petra.kosubova@ukzuz.cz)

## 1. Úvod

Polychlorované bifenyly PCB vznikají katalytickou chlorací bifenyly. Může tak vzniknout 209 derivátů- kongenerů, které obsahují 1- 10 atomů chloru v molekule. Tyto látky jsou netěkavé, bez zápachu, stabilní, nekorosivní, nejsou akutně toxické a dlouho byly považovány za bezpečné chemické produkty. Pro své vynikající fyzikálně chemické vlastnosti našly uplatnění v rozsáhlém spektru výrobků. Byly vyráběny a hojně používány od 30. až do 80. let 20. století. Světová produkce se odhaduje na dva miliony tun. Obchodní preparáty s různými názvy (např. Aroclor, Clophen, Kaneclor) vyráběly firmy po celém světě. Československo vyrábělo PCB v Chemku- Strážské v letech 1959-1984 pod obchodními názvy Delor, Hydrodelor a Deloterm.

Ve vztahu k životnímu prostředí však patří PCB do skupiny persistentních organických polutantů (POPs) s vysokým bioakumulačním potenciálem. Jsou vysoce odolné vůči degradaci a transformaci v životním prostředí. Potravním řetězcem postupují prakticky beze změn až k člověku a hromadí se v tkáních a orgánech bohatých na tuk (1). Tyto negativní toxikologické účinky na životní prostředí byly zjištěny až po sérii havárií a hromadných otrav (2). Identifikace, analýza a sledování látek skupiny POP v životním prostředí bylo umožněno dynamickým rozvojem přístrojové techniky v posledních letech.

Odbor Krmiv ÚKZÚZ provádí monitoring zakázaných a nežádoucích látek v krmivech, který je součástí koordinovaného inspekčního programu ministerstva zemědělství v oblasti výživy zvířat (3) a je v souladu se směrnicí EU (4), která kromě sledování kontaminace polutanty dioxinového typu doporučuje i monitorování indikátorových kongenerů PCB, jejichž zvýšená přítomnost v krmivu a surovinách pro jejich výrobu signalizuje nebezpečí kontaminace dioxiny.

Krmiva pro hospodářská zvířata jsou rozhodujícím vstupem do potravního řetězce člověka a jejich kontaminace polychlorovanými dioxiny, furany (PCDD/ F), PCB a jinými persistentními organickými polutanty byla studována řadou pracovních skupin (5, 6, 7, 8). Zejména po dioxinové krizi v Belgii v roce 1999 se této problematice věnovala řada prací. Bylo třeba rychle zkontrolovat velké množství vzorků krmiv, podezřelých z kontaminace

dioxiny, a tak byla snaha najít přepočít, který by umožnil z rychlejšího a levnějšího stanovení majoritních indikátorových PCB odhadnout očekávané hladiny dioxinů. Holandský institut pro bezpečnost potravin RIKILT provedl studii odchovu prasat a brojlerů, krmných kontaminovaným krmivem (4). Poměr obsahu PCB a PCDD v krmné směsi byl přibližně 80 000 a v mase testovaných zvířat 60 000 u brojlerů a 120 000 u prasat. Universální přepočít však stanoven nebyl, poměr PCB a dioxinů se liší i podle zdroje kontaminace.

Zatím není v platnosti jednotná evropská norma pro stanovení indikátorových PCB v krmných surovinách. Rozsáhlou srovnávací studii používaných metod pořádala Evropská Komise v roce 2000 (9).

Primárním cílem této práce bylo zavést spolehlivou metodu stanovení PCB v krmných směsích s vysokým obsahem tuku, především masokostních a rybích moučkách. V roce 2003 se ale ČR připojila k totálnímu zákazu krmení hospodářských zvířat masokostní moučkou platicímu v Evropské unii (10), a tak se v roce 2004 v GC- MS laboratoři NRL- RO Brno prováděla jen kontrola rybích mouček.

Pro čištění extraktu různých vzorků krmiv před GC/ MS analýzou nelze použít jednotný postup. Nejobtížnější matricí jsou vzorky s vysokým obsahem živočišného tuku a jednostupňové čištění na sloupci sorbentu je pro ně nedostačující. Cílem této práce bylo nalézt postup přípravy i pro tak obtížné matrice, jakými jsou rybí a masokostní moučky.

Nejprve byla úspěšně odzkoušena metoda alkalické etanolýzy tuku a následné dočištění extraktu na SPE koloně se silikagelovým sorbentem. Později byla tato metoda nahrazena lepším a univerzálnějším postupem s gelovou permeační chromatografií a s dočištěním na florisilovém sorbentu. Optimalizovaný postup byl ověřen pomocí standardního referenčního materiálu a použit k analýze 16 vzorků rybí moučky. Naměřená data byla využita pro statistické vyhodnocení metody.

## **2. Pracovní postup**

### **2.1. Princip metody**

PCB a ostatní lipofilní složky se ze vzorku extrahují směsí hexan-aceton, extrakt s přidavkem vnitřního standardu se zkoncentruje a přečistí vhodným postupem. Vzorky s nízkým obsahem tuku se vyčistí adsorpční chromatografií na sloupci silikagelového nebo florisilového sorbentu (SPE). U vzorků s vyšším obsahem tuku (nad 2 %) je nutné odstranit lipidické složky gelovou permeační chromatografií (GPC), popřípadě alkalickou etanolýzou, a dočistit extrakt pomocí SPE. Vyčištěný extrakt se zkoncentruje, převede do isooktanu a obsah požadovaných analytů

se stanoví metodou GC/ MS/ MS. Celá zkouška je akreditována a jednotlivé kroky jsou podrobně popsány ve standardním operačním postupu (11).

## 2.2. Chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou čistoty minimálně p.a., nejlépe však kvality pro reziduální analýzu. Dostatečná čistota sorbentů a rozpouštědel je kontrolována analýzou slepého vzorku. Rozpouštědla: hexan, aceton, etanol, voda, dichlormetan, chloroform, isooktan.

Florisil (0,15- 0,25 mm), [Fluka]; aktivace 4 hod/ 650 °C, reaktivace 5 hod/ 130 °C, deaktivace 3 % vody.

Silikagel 100/ resp. 60 (0,063- 0,200 mm), [Merck]; aktivace 12 hod/ 150 °C, deaktivace 3 % vody.

Síran sodný, aktivace 6 hod/ 550 °C.

Vnitřní standardy: PCB 30 a PCB 155, [Absolute Standards]; pracovní roztok 100 ng/ ml isooktanu.

Směsný analytický standard: CEN PCB MIX1, [Supelco]; 10 µg/ ml heptanu. Standard pro kalibraci a kvantifikaci PCB ve vzorku, obsahuje 12 PCB kongenerů.

Standardní referenční materiál: olej z tresčích jater SRM 1588a, [NIST]; s certifikovanými obsahy organických kontaminantů.

## 2.3. Přístroje a pomůcky

Plynový chromatograf Varian 3800 GC, kapilární kolona DB- XLB [J&W Scientific] (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), dělicí kritický pár PCB 28 a PCB 31. Teplotní program pece: 90 °C (1 min), 200 °C (25 °C/ min), 250 °C (4 °C/ min), 280 °C (15 °C/ min, 15 min). Splitless nástřík (1 µl), teplota injektoru 270 °C. Nosný plyn He 5.0, průtok 1 ml/ min.

Hmotnostní spektrometr Varian 1200 MS, umožňující tandemovou hmotnostní spektrometrii. EI ionizace při 70 eV. Teplota iontového zdroje/ spojky s GC je 200/ 275 °C. Kolizní plyn Argon 4.6, tlak 2,2 mTorr, šířka m/z prekurzoru (0,7), produktů (1,0). Prekurzory, produktové ionty a kolizní energie optimální pro detekci jednotlivých PCB jsou uvedeny v tabulce 1.

GPC- sestava pro gelovou permeační chromatografii: HP 1050 pumpa, nástříkový ventil Rheodyne (model 7725i) s přeplňovací smyčkou (1 ml), separační kolona (8 × 500 mm), náplň Bio- Beads S- X3 200- 400 mesh, mobilní fáze chloroform, průtok 0,6 ml/ min. Sběrač frakcí Gilson FC 203B, sběr PCB frakce mezi 22- 34 min. Teflonové filtrační disky 30 mm × 0,45 µm.

Extraktor Soxtec Avanti, rotační vakuová odparka (RVO), muflová pec, ultrazvuková lázeň, laboratorní sklo.

**Tabulka 1. Optimalizované parametry pro GC/ MS/ MS stanovení PCB**

<b>PCB kongener</b>	<b>Prekurzor (m/ z)</b>	<b>Produkty (m/ z)</b>	<b>Kolizní energie (V)</b>	<b>LOD (pg/ nástřík)</b>
<b>PCB 28</b>	256	186, 221	-25	0,04
<b>PCB 52</b>	292	220, 222	-30	0,3
<b>PCB 101</b>	326	254, 256	-25	0,3
<b>PCB 118</b>	326	254, 256	-27	0,3
<b>PCB 138</b>	360	288, 290	-25	0,4
<b>PCB 153</b>	360	288, 290	-25	0,7
<b>PCB 180</b>	396	324, 326	-30	1,2

## **2.4. Čištění extraktu vzorků s různým obsahem tuku**

Postup extrakce je pro všechny vzorky krmiv shodný a je podrobně popsán v kapitole 5.4.1. SOP 48 (11).

### **2.4.1. Vzorky neobsahující živočišný tuk**

Do této skupiny patří stopové prvky a minerální doplňky krmiva.

Extrakt se čistí pomocí SPE na sloupci silikagelu modifikovaného kyselinou sírovou, postupem shodným pro přípravu půd. Při navážce 20 g vzorku je mez stanovitelnosti 0,25 ppb. Postup je podrobně popsán v kapitole 5.5.1. SOP 48 (11).

### **2.4.2. Krmiva s nízkým obsahem tuku**

Pro extrakty materiálů s nízkým obsahem tuku (do 2 % tuku v sušině) je vhodné jednostupňové čištění na sloupci florisilu. Postup je podrobně popsán v kapitole 5.5.3. SOP 48 (11).

### **2.4.3. Krmiva s vysokým obsahem tuku**

Z extraktů s vyšším obsahem tuku je nutné odstranit lipidické složky. Nejprve byla zavedena metoda alkalické etanolýzy tuku, po získání příslušného vybavení laboratoře byla nahrazena gelovou chromatografií.

### **Alkalická etanolýza**

Zkoncentrovaný extrakt tuku s přidávkem vnitřního standardu se povaří pod zpětným chladičem s roztokem KOH v etanolu. K reakční směsi se přidá hexan a voda, opatrně se protřepe a nechají se rozsadit obě vrstvy. Spojené, vodou přečištěné hexanové výtřepky se vysuší a dočistí na sloupci silikagelu modifikovaného kyselinou sírovou. PCB se ze sorbentu

vymyjí hexanem, eluát se odpaří téměř k suchu, přidá se 1 ml isooktanu a převede se do vialky ke koncové analýze.

### **Gelová permeační chromatografie**

Odparek extraktu se rozpustí ve 4 ml chloroformu. Mechanické nečistoty se z extraktu odstraní filtrací přes teflonový disk. Zfiltrovaný extrakt (1 ml) se vnese na GPC kolonu a jímá se frakce obsahující PCB. Ta se zkoncentruje na RVO téměř k suchu, převede do 1 ml isooktanu a dočistí na SPE kolonce s florisilovým sorbentem. PCB se z kolony vymyjí 50% dichlormetanem v hexanu, eluát se odpaří téměř k suchu, přidá se 1 ml isooktanu a převede se do 2ml vialky pro koncové GC/ MS/ MS stanovení.

### **Poznámka:**

1. *Postup alkalické hydrolyzy byl použit k analýze vzorků masokostních a rybích mouček v roce 2002-2003, kdy ještě nebyla k dispozici GPC.*
2. *V extraktu čištěném pomocí GPC lze spolu s PCB stanovit i všechny analyty skupiny OCP.*

## **3. Výsledky a diskuse**

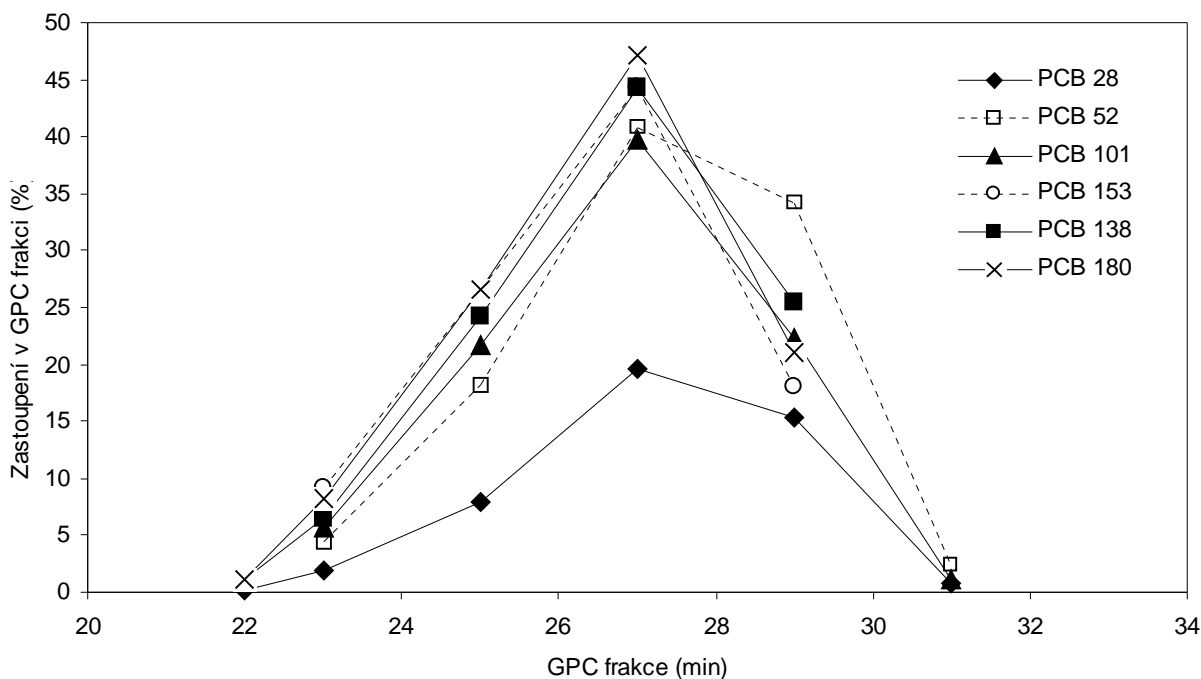
### **Vývoj a optimalizace přípravy vzorku k analýze**

V rámci monitoringu zakázaných a nežádoucích látek v krmivech stanovujeme od roku 2002 obsah indikátorových PCB v minerálních látkách, rybích a masokostních moučkách. Pravidelně se analyzuje 10 vzorků minerálních doplňků ročně, všechny nálezy byly negativní.

Pro čištění vzorků s vysokým obsahem tuku byla nejprve použita metoda čištění s alkalickou etanolýzou. V roce 2002 tak bylo analyzováno 7 vzorků rybích mouček, 14 masokostních mouček a 2 vzorky kafilerního tuku. V roce 2003 to bylo 10 vzorků rybích a 5 masokostních mouček. Obsahy PCB byly do 20 ng kongeneru/ g tuku.

V roce 2004 se laboratoř vybavila zařízením pro gelovou chromatografii a extrakty s vyšším obsahem tuku mohly být čištěny pomocí GPC. K separaci byla použita 50 cm kolona s polymerním sorbetem Bio Beads SX3, optimalizace byla provedena s roztokem standardu o koncentraci 100 ng/ ml. Jednotlivé frakce byly odebírány ve dvouminutových intervalech, obohaceny přídatkem 100 ng vnitřního standardu, převedeny do 1 ml isooktanu a analyzovány. Optimální interval (obr. 1) pro sběr PCB je 22– 34 min a byl ověřen analýzou extraktu rybí moučky s přídatkem standardu. Výtěžnost GPC byla v rozmezí 99- 106 %.

Extrakt po GPC je nutné ještě dočistit na SPE kolonce. Byly testovány sorbenty florisil a silikagel v různém stupni aktivace a promývací směsi rozpouštědel s rozdílnou eluční silou.



**Obrázek 1. GPC profily indikátorových PCB**

Toluen, doporučený v ISO normě (12), nebyl vhodný pro koncové GC/ MS stanovení, a proto byl nahrazen dichlormetanem. Nejlepší výsledky byly získány pro florisil deaktivovaný 3 % vody a eluční činidlo 50% DCM v hexanu.

Výtěžnost celkového postupu čištění na GPC a SPE byla v rozmezí 104- 115 %.

### **Vývoj a optimalizace GC/ MS metody stanovení PCB**

Do roku 2004 byla PCB analyzována pomocí přístroje GC 8000/ MS 800 [Fisons] v režimu monitorování vybraných iontů (SIM) (13).

V roce 2003 byl pro GC/ MS analýzy zakoupen nový přístroj GC 3800/ MS 1200 [Varian]. Tento hmotnostní spektrometr s trojitým quadrupolem může pracovat v různých režimech měření a pro stanovení PCB byla použita vysoce selektivní tandemová MS. Z první fragmentace po elektronové ionizaci byl pro každý kongener vybrán nejintenzivnější charakteristický iont, ten byl podroben sekundární fragmentaci v kolizní cele (druhý quadrupol s přívodem argonu). Rodičovský iont se po kolizi s argonem rozpadá a pro kvantifikaci se vyberou produktové fragmenty, odpovídající ztrátě 2 atomů chloru. Pro tuto specifickou reakci byla optimalizována kolizní energie při třech různých hodnotách tlaku argonu v kolizní cele. Pro zvýšení citlivosti detekce byla rozšířena hmotová šířka sledovaných produktových iontů z hodnoty 0,7 na 1,0. Pro kvalitativní potvrzení stanovovaného analytu je

potřeba shoda se standardem v retenčním čase a v poměru produktových iontů (14). Kvantitativní vyhodnocení se provede metodou kalibrační přímky s použitím dvou vnitřních standardů; PCB 30 pro stanovení PCB 28 a 52; PCB 155 pro stanovení PCB 101, 118, 138, 153 a 180. Rozsah kalibrace byl 5- 500 ng/ ml isooktanu, koncentrace vnitřního standardu byla 100 ng/ ml. Mez stanovitelnosti je 5 ng/ ml, při navážce 10 g vzorku je LOQ 0,5 ppb.

**Tabulka 2. Identifikační parametry pro MS/ MS stanovení PCB**

PCB kongener	RRT <sup>(a)</sup> kolona DB-XLB	Prekurzor (m/ z)	Produktové ionty		
			(m/ z)	zastoupení (%)	max. odchylka
PCB 30 (IS1)	1,000	256	186, 221	97,0	±19,7
PCB 28	1,189	256	186, 221	97,0	±19,7
PCB 52	1,273	292	222, 220	50,1	±15,0
PCB 155 (IS2)	1,000	360	290 , 288	66,3	±16,6
PCB 101	1,043	326	256, 254	60,2	±16,0
PCB 118	1,241	326	256, 254	60,2	±16,0
PCB 138	1,372	360	290, 288	66,6	±16,7
PCB 153	1,286	360	290, 288	65,9	±16,6
PCB 180	1,561	396	326, 324	49,6	±15,0

(a) Relativní retenční čas (RRT) je vztažen k příslušnému vnitřnímu standardu IS 1 resp. IS 2

**Tabulka 3. Kalibrační parametry pro pro MS/ MS stanovení PCB**

PCB kongener	Směrnice kalibrační přímky	RSD (%)	R <sup>2</sup>
PCB 28	1,064	8,3	0,999
PCB 52	0,329	8,4	0,999
PCB 101	1,109	10,1	0,999
PCB 118	1,087	10,7	0,999
PCB 138	0,519	8,3	0,999
PCB 153	0,605	10,0	0,998
PCB 180	0,258	7,8	0,998

### Ověření správnosti metody

Správnost postupu byla ověřena analýzou standardního referenčního materiálu SRM 1588a (3.2.). Výsledky šesti stanovení byly zpracovány statistickým programem Effvalidation (verze 3.0). Pro všechny sledované indikátorové PCB byly získané výsledky statisticky správné.

**Tabulka 4. Obsahy PCB v rybím tuku SRM 1588a**

PCB kongener	Obsah PCB ± nejistota <sup>(a)</sup> (ppb)		Výtěžnost metody (%)
	stanovený	certifikovaný	
<b>PCB 28</b>	28,32 ± 0,55	28,8 ± 2,9	102
<b>PCB 52</b>	83,3 ± 2,3	83,7 ± 9,0	100
<b>PCB 101</b>	126,5 ± 4,3	133 ± 17	105
<b>PCB 118</b>	176,3 ± 3,8	176 ± 20	99
<b>PCB 138</b>	263,5 ± 9,1	257 ± 18	98
<b>PCB 153</b>	273,8 ± 7,7	279 ± 10	102
<b>PCB 180</b>	105,0 ± 5,2	109 ± 19	104

(a) rozšířená standardní nejistota

Programem Effvalidation byla vypočtena opakovatelnost a nejistota metody pro dvě různé hladiny obsahu PCB; pro nízké obsahy 0,5– 15 ppb a pro vyšší než 15 ppb. Parametry pro první úroveň byly stanoveny z měření vzorků rybích mouček v roce 2004 a pro druhou úroveň byly využity výsledky analýz SRM 1588a.

**Tabulka 5. Statistické parametry metody**

PCB kongener	Opakovatelnost (%)		Rozšířená nejistota (%)	
	vzorky RM	SRM	vzorky RM	SRM
<b>PCB 28</b>	-	5	-	10
<b>PCB 52</b>	12	5	23	11
<b>PCB 101</b>	12	7	23	13
<b>PCB 118</b>	5	6	10	12
<b>PCB 138</b>	9	4	18	7
<b>PCB 153</b>	8	2	15	4
<b>PCB 180</b>	15	9	30	17

#### **Výsledky analýz rybích mouček - monitoring zakázaných látek v krmivech 2004**

Analyzované rybí moučky byly dováženy převážně z Peru (227, 553, 555, 579, 580, 723, 1127) a Dánska (554, 576, 721, 839, 1018). U ostatních vzorků nebylo možné dohledat zemi původu. Nalezené hodnoty PCB byly uvedeny v původním vzorku, pro potřebu srovnání s údaji publikovanými v literatuře byly výsledky přepočteny na tuk.

Stanovené celkové hladiny PCB v rybích moučkách byly v rozmezí 2,33– 18,5 ppb v sušině a 19,8- 181,1 ppb v tuku. Naše výsledky jsou ve výborné shodě s hodnotami publikovaným v literatuře.

Kontrolní krmivo použité ve studii institutu RIKILT (8) obsahovalo 13,9 ppb PCB v sušině. M. Jacobs naměřila v krmivu pro ryby, které obsahovalo rybí moučku, hladiny PCB v rozmezí 31,7– 258,7 ppb v tuku (6). Autorka dále uvádí, že 80 % všech PCB stanovených v krmivu představují penta- a hexachlorové PCB, což odpovídá zastoupení penta- a hexachlorových PCB v rybích moučkách analyzovaných v naší laboratoři, tj. 82 %. Schepens upozorňuje na rozdíl kontaminace rybích mouček podle jejich původu. Vyšší stupeň kontaminace organochlorovými látkami vykazují rybí moučky pocházející ze Severního Atlantiku oproti méně kontaminovaným produktům z Jižního Pacifiku. V peruánských rybích moučkách stanovil obsahy okolo 10 ppb PCB v tuku a moučky pocházejících z Dánska obsahovaly 120 ppb PCB v tuku (15).

Průměrný obsah sumy indikátorových PCB v rybích moučkách analyzovaných v naší laboratoři byl 76,4 ng/ g tuku. Ve skupině méně kontaminovaných vzorků (průměr 37,1 ppb) převažovaly peruánské suroviny, moučky s vyššími obsahy (průměr 138,1 ppb) byly hlavně dánské produkce. Pro jednoznačné závěry vztahu původu rybí moučky a úrovně kontaminace u dosavadních vzorků zatím nebylo dost podkladů.

**Tabulka 6. Obsahy PCB v rybích moučkách analyzovaných v roce 2004**

RM	Sušina (%)	Tuk (%)	PCB (ppb) v přepočtu na tuk							Suma PCB	
			28	52	101	118	138	153	180	(v suš.)	(v tuku)
227	90,5	7,32	18,3	6,2	4,1	3,7	9,8	6,5	4,7	3,7	53,4
510	91,6	8,31	4,5	3,9	8,4	6,6	18,0	12,0	6,5	5,7	59,8
553	91,6	8,78	2,1	1,6	4,1	2,9	9,2	6,4	4,7	2,9	31,2
554	93,8	9,89	3,2	4,6	11,3	16,8	52,4	32,1	19,7	14,5	140,0
555	90,5	8,51	9,6	4,2	6,8	3,2	10,1	6,6	4,2	3,9	44,6
576	91,2	9,01	4,6	7,3	22,0	21,4	62,1	44,4	19,3	17,7	181,1
577	94,0	9,82	3,4	8,4	20,9	22,4	59,9	40,0	22,8	18,5	177,8
579	93,2	8,15	3,6	4,3	10,3	11,1	31,2	20,0	10,3	7,8	90,9
580	93,4	8,66	3,9	4,9	12,8	10,4	28,2	19,2	9,3	7,9	88,7
683	89,2	8,55	1,6	1,5	3,9	2,8	7,9	5,4	3,4	2,4	26,5
721	90,4	8,63	3,8	2,7	6,3	3,3	9,2	7,3	6,9	3,7	39,4
723	90,6	8,83	3,2	3,2	8,3	3,0	10,5	6,5	4,9	3,6	39,6
839	88,0	8,24	2,6	1,9	4,9	2,3	7,7	5,3	3,7	2,4	28,4
1018	92,5	8,21	3,6	7,3	22,3	19,0	48,9	37,1	12,2	13,3	150,3
1127	90,6	9,65	2,2	1,2	2,9	2,0	5,4	3,6	2,6	2,2	19,8
1295	91,3	9,15	3,3	2,2	7,1	3,0	6,1	3,9	2,3	2,7	27,9

Aktuálně platné směrnice neuvádějí limity pro obsah indikátorových PCB v krmivu, dříve navržený limit 200 ppb pro sumu indikátorových PCB v tuku nebyl ani u jednoho vzorku překročen.

### **Poznámka:**

3. *Masokostní moučka se vyrábí z jatečního odpadu a uhynulých zvířat. Byla využívána jako zdroj živočišné bílkoviny pro hospodářská zvířata. Avšak v souvislosti s šířením bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) u přežvýkavců byl ve všech státech EU vydán absolutní zákaz krmení hospodářských zvířat masokostní moučkou. ČR se k zákazu připojila v roce 2003.*

4. *Rybí moučky se zpracovávají za podmínek, při kterých nedochází k odstranění kontaminace ryb cizorodými látkami, technologické zpracování probíhá při teplotách do 100 °C (16, 17). Tato surovina se do ČR dováží převážně z Peru a Dánska. Spolu s Norskem, Islandem a Chile patří tyto státy k největším producentům rybí moučky a rybího tuku.*

## **4. Závěr**

Metoda využívající gelovou permeační chromatografii při čištění extraktu vzorku umožňuje stanovení indikátorových PCB ve vzorcích s vysokým obsahem tuku. Postup byl optimalizován, ověřen analýzou certifikovaného referenčního materiálu a použit při analýze 16 vzorků rybí moučky. Naměřená data byla v souladu s literárními údaji.

## **5. Literatura**

1. Holoubek, I. (koordinátor); Adamec, V.; Bartoš, M.; Černá, M.; Čupr, P.; Bláha, K.; Demnerová, K.; Drápal, J.; Hajšlová, J.; Holoubková, I.; Jech, L.; Klánová, J.; Kocourek, V.; Kohoutek, J.; Kužílek, V.; Machálek, P.; Matějů, V.; Matoušek, J.; Matoušek, M.; Mejstřík, V.; Novák, J.; Ocelka, T.; Pekárek, V.; Petira, K.; Provazník, O.; Punčochář, M.; Rieder, M.; Ruprich, J.; Sánka, M.; Tomaniová, M.; Vácha, R.; Volka, K.; Zbíral, J. Úvodní národní inventura persistentních organických polutantů v České republice. Projekt GF/CEH/01/003: ENABLING ACTIVITIES TO FACILITATE EARLY ACTION ON THE IMPLEMENTATION OF THE STOCKHOLM CONVENTION ON PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS (POPs) IN THE CZECH REPUBLIC. TOCOEN REPORT No. 249, Brno, srpen **2003**.
2. Horák, J. Dioxiny jako zdroj ohrožení životního prostředí a zdraví. Chem. Listy 96, **2002**, 863-868.
3. 2004/163/EC; Koordinovaný program kontrol v oblasti výživy zvířat pro rok **2004**.
4. 2004/704/EC; Doporučení Komise o monitorování základních hodnot dioxinů a polychlorovaných bifenylů typu dioxinů v krmivech.

5. Moreno-Lopez, J. Contaminants in feed for food-producing animals. *Pol. J. Vet. Sci.*, **2002**, 5 (2), 123-125.
6. Jacobs, M.N.; Covaci, A.; Schepens, P. Investigation of Selected Persistent Organic Pollutants in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*), Salmon Aquaculture Feed, and Fish Oil Components of the Feed. *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36 (13), 2797-2805.
7. Isoaari, P.; Vartiainen, T.; Hallikainen, A.; Ruohonen, K. Feeding trial on rainbow trout: comparison of dry fish feed and Baltic herring as a source of PCDD/Fs and PCBs. *Chemosphere*, **2002**, 48, 795-804.
8. Hoogenboom, L.A.P.; Kan, C.A.; Bovee, T.F.H.; van der Weg, G.; Onstenk, C.; Traag, W.A. Residues of dioxins and PCBs in fat of growing pigs and broilers fed contaminated feed. *Chemosphere*, **2004**, 57, 35-42.
9. von Holst, C.; Muller, A. Intercomparison study for the determination of selected polychlorinated biphenyls (PCBs) in feed matrices. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2001**, 371(7), 994-1000.
10. Formánek, J. Změny ve veterinární asanaci v souvislosti s výskytem BSE.
11. Příručka jakosti UKZÚZ, 2004, SOP č.48, Stanovení PCB a OCP metodou GC/MS.
12. ČSN EN 1528-3 Potraviny s vysokým obsahem tuku – Stanovení pesticidů a polychlorovaných bifenylnů (PCB), část 3: Metody přečišťování, Český normalizační institut, Praha, únor **1998**.
13. Zbírál, J. a kol. Stanovení persistentních organických polutantů. Analýza půd II – Jednotné pracovní postupy. ÚKZÚZ, Brno, **2003**, 172-180.
14. ISO/DIS 22 892; Soil quality-Guidelines for the identification of target compounds by gas chromatography/mass spectrometry, **2003**.
15. Schepens, P.; Covaci, A.; Jorens, P.; Hens, L.; Scharpe, S.; van Larebeke, L. Surprising findings following a Belgian food contamination with polychlorobiphenyls and dioxins. *Environ. Health Perspect.*, **2001**, 109, 101-103.
16. Fisheries Industries Division. The production fish meal and oil. FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER, ISBN 9251024642; **1986**, T142.
17. <http://www.austral-peru.com/fishmeal.htm>

# **Zavedení detekce GMO v laboratoři molekulárně genetické diagnostiky pomocí univerzálního PCR-kitu a vlastních primerů**

*Miroslava Suchomelová, Dagmar Kopotová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL, Oddělení mikrobiologie a biochemie,  
Laboratoř molekulárně genetické diagnostiky, Hroznová 2, 656 06 Brno  
e-mail: [miroslava.suchomelova@ukzuz.cz](mailto:miroslava.suchomelova@ukzuz.cz), [dagmar.kopotova@ukzuz.cz](mailto:dagmar.kopotova@ukzuz.cz)

## **1. Úvod**

Laboratoř molekulárně genetické diagnostiky zahájila detekci GMO pomocí specifických kitů (Biogenics, firma Biotools, Španělsko). Specifické komerční kity pro detekci GMO (od uvedeného i dalších výrobců) jsou však koncipovány pro nevhodné počty vzorků a jejich dodávka, případně změna počtu některých složek kitu podle aktuální potřeby laboratoře, se ukázala jako nevyhovující. Proto byly vyzkoušeny techniky amplifikace DNA pomocí univerzálních PCR- kitů (a v nich popsanych protokolů) v kombinaci s primery, jejichž používání pro příslušné detekce je známo z literatury a materiálů EU. Byla ověřena vhodnost těchto kitů v podmínkách našeho pracoviště a provedena optimalizace parametrů PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce). Byl vypracován Jednotný pracovní postup „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“, který byl na konci roku 2004 také akreditován ČIA.

Nový systém používající vypracovaný JPP je univerzální - specifitu dodává stanovením výběr vhodných amplifikačních primerů. Tak je umožněno zavádění dalších detekcí v podstatě libovolných GM, což v rámci specifických kitů nebylo možné. V rámci tohoto JPP byly zavedeny identifikace dalších tří genetických modifikací kukuřice: NK603 (Roundup-Ready), GA21(Roundup- Ready) a CBH351 StarLink (rezistence k hmyzím škůdcům podmíněná transgenem Cry9, tolerance k herbicidu fosfotricinu). Optimalizace parametrů PCR byla provedena za použití dostupného certifikovaného referenčního materiálu (CRM).

Cílem práce na vývojovém úkolu K8 v roce 2004 bylo převést dříve zavedený způsob identifikace GMO (geneticky modifikovaných organizmů) ve vzorcích sóji a kukuřice pomocí specifických kitů na pružnější způsob identifikace pomocí univerzálního PCR- kitu a specifických primerů. Takto byly ošetřeny všechny analýzy prováděné v Laboratoři molekulárně genetické diagnostiky (LMGD). Cíl se podařilo splnit, a to částečně již v roce 2003 (screening na přítomnost promotoru 35S CaMV, doplňkový screening na infekci virem CaMV, identifikace modifikace Roundup-Ready sója) a částečně v rámci VÚ K8 v roce 2004: screening na přítomnost terminátoru NOS Agrobacteria tumefaciens a identifikace modifikací kukuřice: Bt-176, Bt-11 a MON 810.

Zavedený způsob detekce byl dále rozšířen v rámci VÚ K9 o identifikace tří dalších známých genetických modifikací, které laboratoř dosud neprováděla. Tyto nové detekce se podařilo zavést, zatím se však nepodařilo dosáhnout limitu detekce 0,1% GMO.

## **2. Materiál a metody**

Základem používaných metod je 1. izolace DNA z daného vzorku, 2. amplifikace DNA pomocí PCR a 3. vyhodnocení amplifikovaných fragmentů pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Výsledky se vyhodnocují za použití systému kontrol a ve srovnání s certifikovanými referenčními materiály.

### **2.1. Přístroje a zařízení**

1. laboratorní šrotovník (podmínkou je rozebíratelnost a dekontaminovatelnost všech součástí, které přišly do styku se vzorkem)
2. váhy - navažování vzorků a agarózy
3. el. vodní lázeň - temperování vzorků během izolace DNA
4. centrifuga - stáčení při vyšších otáčkách, izolace DNA
5. termostat - temperování vzorků při 37 °C, izolace DNA
6. biohazard- box - míchání PCR směsí
7. termální cykler - amplifikace DNA (PCR)
8. elektromagnetické míchadlo - příprava pufrů
9. mikrovlnná trouba - vaření agarózy pro elektroforézu
10. el. vana a zdroj - elektroforéza; vyhodnocení PCR
11. gelově-dokumentační zařízení - vyhodnocení PCR (součástí je i snímač Kodak a PC s příslušným softwarem).

Sterilizace a dekontaminace je prováděna dle charakteru materiálu buď tepelně (sušárna, autokláv), nebo roztokem přípravku na bázi chlornanu sodného (např. Savo apod).

## **2.2. Chemikálie a roztoky**

Používáme jeden kit pro izolaci DNA a dva univerzální kity pro PCR. Přesné chemické složení jednotlivých reagensů výrobce kitů neuvádí.

### **2.2.1. Kit pro izolaci DNA**

GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit, výrobce Sigma-Aldrich - kit pro izolaci DNA z rostlinného materiálu včetně semen.

Kit obsahuje: Lysis Solution Part A, Lysis Solution Part B, Precipitation Solution, Binding Solution, Column Preparation Solution, Wash Solution Concentrate (před prvním použitím se ředí ethanolem 95 - 100% dle návodu), Elution Solution (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH přibližně 8,0), GenElute™ Filtration Columns (kolony) ve zkumavkách, GenElute™ Nucleic Acid Binding Columns (kolony) ve zkumavkách, Collection Tubes (sběrné zkumavky) o objemu 2ml.

### **2.2.2. Kity pro amplifikaci DNA**

Podle zkušeností s výsledky PCR získanými s oběma uvedenými kity se první z nich používá jen pro jednoduchou PCR, zatímco druhý je schopen provádět jak jednoduchou, tak duplexní PCR (současná amplifikace dvou různých úseků DNA dvěma páry primerů v téže zkumavce).

a) REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix, výrobce Sigma- Aldrich - univerzální reakční směs. Dále je označován jako „REDTaq“. Obsahuje:

1. 20 mM Tris- HCl (pH8,3) se 100 mM KCl
2. 3 mM MgCl<sub>2</sub>
3. 0,002% želatina
4. stabilizátory
5. 0,4 mM dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
6. 0,06 unit/μl Taq DNA- polymeráza

## 7. voda PCR Reagent

Přípravu reakční směsi pro PCR udává následující tabulka zpracovaná dle pokynů výrobce k použití kitu.

**Tabulka č. 1: Příprava PCR, kit REDTaq**

Složka	1 reakce μl	5 reakcí μl	10 reakcí μl	15 reakcí μl	20 reakcí μl	25 reakcí μl
Voda	18	90	180	270	360	450
REDTaq mix	25	125	250	375	500	625
Specifický amplifikační primer F (forward)	1	5	10	15	20	25
Specifický amplifikační primer R (reverse)	1	5	10	15	20	25
Reakční směs bez templátu	45	225	450	675	900	1125
Templát	5	5 × 5	10 × 5	15 × 5	20 × 5	25 × 5
Reakční směs včetně templátu	50	250	500	750	1000	1250

b) REDExtract- N- Amp<sup>TM</sup> Plant PCR Kit, výrobce Sigma- Aldrich - univerzální kit pro PCR. Dále je označován jako „REDEx“. Obsahuje:

1. Extraction Solution
2. Dilution Solution
3. REDExtract- N- AmpPCR Reaction Mix (2× PCR mix obsahující dle výrobce reakční pufr, soli, dNTPs, Taq- polymerázu a TaqStart antibody)
4. Zkumavky Collection Tubes 2ml.

(Poznámka: Extraction a Dilution Solution jsou pufrы pro rychlou extrakci DNA, která se však pro běžné analýzy nepoužívá, neboť nezachycuje malé podíly GM materiálu.)

Izolát DNA získaný pomocí kitu GenElute<sup>TM</sup> Plant Genomic DNA Miniprep Kit je nutno pro amplifikaci tímto kitem upravit tak, že ho smícháme v poměru 1:1 se směsí pufrů (Extraction Solution: Dilution Solution 1:1). Požadovaný objem 4 μl roztoku templátu vkládaný do 1 PCR tedy tvoří 2 μl izolátu DNA a 2 μl této směsi pufrů, a to na 20 μl celkové reakční směsi v 1 PCR.

Přípravu reakční směsi pro PCR udává následující tabulka zpracovaná dle pokynů výrobce k použití kitu. (Čísla jsou uvedena pro duplexní PCR; v případě jednoduché PCR je množství vody zvýšeno o součet objemů vynechaného páru primerů.)

**Tabulka č. 2: Příprava PCR, kit REDEx**

Reagencie	1 reakce	5 reakcí	10 reakcí	20 reakcí
dd H <sub>2</sub> O	4.4	22	44	88
REDEx	10	50	100	200
1. pár primerů, primer F	0.4	2	4	8
1. pár primerů, primer R	0.4	2	4	8
2. pár primerů, primer F	0.4	2	4	8
2. pár primerů, primer R	0.4	2	4	8
Roztok templátu	4	5 × 4	10 × 4	20 × 4
Bez templátu	16	80	160	320
Včetně templátu	20	100	200	400

### 2.2.3. Charakteristika specifických amplifikačních primerů

**Tabulka č. 3: Používané primery (informace staženy z různých internetových stránek)**

Amplikon	Délka [bp]	Název primeru	Charakteristika amplikonu	LOD (limit detekce)
Sójový vnitřní gen	118	GMO- 3 4	gen Le1 pro sojový lectin	nestanoven *
Kukuřičný vnitřní gen	226	IVR1- F R	gen pro škrobovou invertázu kukuřice	nestanoven *
Řepkový vnitřní gen	212	SGT1 SGT2	gen pro UDP- glukózasinapát glukosyl-transferázu	nestanoven *
Screening - S	35 123	35s- cf3 35s- cr4	sekvence promotoru 35 S viru žilkové mozaiky kvěťáku (CaMV)	ověřeno 0,1%
Screening - NOS	180	NOS- 1 NOS- 3	sekvence terminátoru genu pro nopalinní syntázu A. tumefaciens	ověřeno 0,1%
Doplňkový screening CaMV	191	CRT F R	přesah ze sekvence prom. 35 S a ORF V (reverse transcriptase gene)	ověřeno minimálně 10 <sup>-6</sup> (Validační protokol)
	383	CaMV1 CaMV2	přesah ze sekvence prom. 35 S a ORF VI (inclusion body matrix protein)	

Amplikon	Délka [bp]	Název primeru	Charakteristika amplikonu	LOD (limit detekce)
Sója RoundUp-Ready	172	35s- f2 petu- r1	přesah ze sekv. p35 S do sekv. CTP (Petunia chloroplast transite signal peptide)	ověřeno 0,1%
Transgen bar	428	BarHyg1 HygPat4	transgen pro toleranci k herbicidu glufosinátu	ověřeno 0,1%
Kukuřice MON 810	194	CRO 1 HSO 1	přesah z intronu hsp70 do transgenu cryIA(b)	ověřeno 0,1%
Kukuřice Bt-176	211	CRY- 03 CRY- 04	přesah z promotoru CDPK do synt. transgenu CryIA(b)	ověřeno 0,1%
Kukuřice Bt-11	189	IVS- 2 PAT- B	přesah z intronu IVS-2 do transgenu pat	ověřeno 0,1%
Kukuřice GA21	270	GA21 1- 5' GA21 1- 3'	přesah z OTP (enhancer) do transgenu m-epsps	ověřeno ≤ 1%
Kukuřice CBH351 (StarLink)	170	CaM03- 5' CBH02- 3'	přesah z promotoru 35S do CBH0	ověřeno ≤ 1%
	171	Cry9C- 5' 35Ster- 3'	přesah z transgenu cry9 do 35S terminátoru	
Kukuřice NK603	108	NK603 primer1, NK603 primer 2	přesah z 3'- konce insertu do kukuř.DNA, primery pro Real- Time PCR	ověřeno ≤ 1%

*\*) ověření LOD u vnitřních genů nemá smysl, protože je obsahuje 100% kopií genomu daného druhu.*

#### 2.2.4. Pozitivní a negativní standardy (referenční materiály - RM)

Laboratoř používá certifikované referenční materiály (CRM), interní referenční materiály (IRM) a kontroly z dříve používaných specifických kitů pro detekci GMO. Jsou většinou v podobě mouky, z níž je nutno izolovat DNA, nebo jako již vyizolovaná DNA. RM - mouky jsou používány jako zdroj DNA pro:

1. negativní kontroly - mají obsah GMO nulový nebo menší než LOD,
2. pozitivní kontroly - mají obsah GMO 100%, nebo několik procent (různá množství, jsou vhodnou pozitivní kontrolou pro PCR) a dále 0,1% GMO pro ověřování LOD dané screeningové nebo identifikační reakce. IRM se používají u řepky, kde na trhu dosud chybí vhodné CRM; byly připraveny v LMGD pomletím 100% GMO materiálů a smícháním ve vhodném poměru za použití analytických vah.

Při každém běhu PCR u rutinních analýz se kromě negativní kontroly používá i pozitivní kontrola obsahující 0,1% GMO (vhodné modifikace), podle níž se posuzuje negativita či pozitivita vzorku při dané detekci, případně ještě další pozitivní kontrola s vyšším obsahem GMO.

Kromě uvedených kontrol se při každé rutinní analýze vzorku používá i negativní kontrola izolace DNA („blank“) a tzv. beztemplátová kontrola každého běhu PCR pro ověření

nepřítomnosti kontaminací, které by mohly způsobit falešně pozitivní výsledky.

Laboratoř má vypracována kritéria pro návázání IRM na CRM.

**Tabulka č. 4: Přehled CRM [IRMM\*], materiál z kruhových testů a kontroly z dřívě používaných specifických kitů pro detekci GMO]**

Plodina	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	Původ - certifikát nebo kit s návodem- od:	Poznámka
Sója	-	sója RoundUp-Ready (40-3-2 Event Monsanto)	IRMM 410S-1	0,10 +/- 0,05 g GMO dry powder / 100 g dry soya bean powder
Kukuřice	-	kukuřice MON 810 (Monsanto)	IRMM 413-1	0,10 +/- 0,03 g GMO dry powder / 100 g dry maize powder
Kukuřice	-	kukuřice Bt-176 (Syngenta)	IRMM 411R-1	Certifikovaná hodnota GMO: 1g/ kg (nejistota 0,29 g/ kg)
Kukuřice	-	kukuřice Bt-11 (Syngenta)	IRMM 412R-1	Certifikovaná hodnota GMO: 0,98 g/ kg (nejistota 0,29 g/ kg)
Sója	-	3% Roundup-Ready Sója	GeM 23 A - GeMMA Report **)	3% RRS v 97 % soj. mouky; expirace neuváděna (z r. 2003)
Sója	Soya Internal Control	-	Biogenics - Biotoools Španělsko	Koncentrace neuváděna mouka
Sója	-	RoundupReady Control	Biogenics - Biotoools Španělsko	Koncentrace neuváděna ***) mouka
Kukuřice	Maize Internal Control	-	Biogenics - Biotoools Španělsko	Koncentrace neuváděna mouka
Kukuřice	-	Bt-176 Maize Control	Biogenics - Biotoools Španělsko	Koncentrace neuváděna ***) mouka a DNA
Kukuřice	-	MON 810 Maize Control	Biogenics - Biotoools Španělsko	DNA - Koncentrace neuváděna ***)
Kukuřice	-	Bt-11 Genomic DNA	Bt11 Control DNA - Genescan	DNA - Koncentrace 100 kopií/ 1µl
Kukuřice	-	NK603 - DNA		
Kukuřice	-	GA21 - DNA	set 69407, Fluka Biochemica IRMM	GMO Genomic DNA Standard Set for MaisNK603, GA21 und CBH-351 (StarLink)
Kukuřice	-	CBH 351 - DNA		

\*) IRMM - Institute of Reference and Measurement Materials, Geel, Belgie

\*\*) GeMMA -Genetically Modified Materials Analysis; GeMMA Report je zpráva o vyhodnocení výsledků

\*\*\*) Výrobce udává vlastnosti kontrolního materiálu ohledně přítomnosti / nepřítomnosti dané GM, obvykle neudává množství geneticky modifikované DNA..

**Tabulka č. 5: Přehled IRM (interních referenčních materiálů)**

Plodina	Negativní kontrola	Pozitivní kontrola	Původ, certifikát od:	Poznámka (navázání na CRM)
Řepka	Nemodifik. PAU C 911	-	OOZ ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou	ověřeno např.: 23.4.04.BAR + rep-
Řepka	Nemodifik. EGG 051	-	OOZ ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou	0,15stand.bip; 31.10.03.BAR 60
Řepka	Nemodifik. DS 29 206	-	OOZ ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou	°C.bip; 17.10.03- řep+
Řepka	Nemodifik. SG- C 105	-	OOZ ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou	35S.bip #)
Řepka	-	Modifikovaná PHW 01- 429	OOZ ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou	ověřeno např.: 23.4.04.BAR +
Řepka	-	Modifikovaná PHW 01- 439	OOZ ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou	rep- 0,15stand.bip; 31.10.03.BAR 60
Řepka	-	Modifikovaná PHW 01- 440	OOZ ÚKZÚZ Hradec nad Svitavou	°C.bip; 2.10.03BAR a řep+ 35S.bip #)
Řepka	CaMV + (Nemodifikovaná řepka infikovaná virem CaMV - izolát DNA z pozitivní kontroly ke kitu ELISA, katal. č. 07086PC)	Loewe Biochemica GmbH	ověřeno např.: CaMV- multi- 12.3.03.bip; CaMV-11.3.03.bip; CaMVdet- citl.10- 10 000.bip #);	

#)... Názvy obrázků, dokládajících způsobilost daného RM k účelu kontroly, v počítači Suchomelová.

### 2. 2. 5. Potřebné chemikálie (nedodávané v rámci kitů):

Používají se chemikálie čistoty p.a. nebo označené „pro molekulární biologii“.

1. Voda vhodná pro PCR (vodivost do 2  $\mu$ S)
2. Agaróza pro molekulární biologii (A-5093 Sigma, pro rutinní použití) – pro elektroforézu
3. Denaturovaný ethanol – pouze do stříček pro čištění povrchů
4. 95 - 100 % ethanol pro ředění „Wash Solution“ při izolaci DNA
5. Ethidiumbromid – zásobní a pracovní roztok (Merck, 1%) – pro elektroforézu
6. Elektroforetický marker pro amplifikáty (GeneRuler 50bp DNA Ladder SMO373 Fermentas, uchovává se ve zkumavkách po cca 20 $\mu$ l)

7. Elektroforetický marker pro genomovou DNA (Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3 SMO193 Fermentas (uchovává se ve zkumavkách po cca 20μl)
8. Ribonukleáza A (ENO 531 Fermentas)
9. Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE (Sigma):
  - Na<sub>2</sub>EDTA (disodná sůl kyseliny ethyléndiamintetraoctové)
  - Trizma base [tris- (hydroxymethyl)aminomethan]
  - ledová kyselina octová

### **2.3. Vzorky**

Všechny uvedené vzorky byly dodány Odborem krmiv ÚKZÚZ; šlo o krmné suroviny (sójový šrot toastovaný, kukuřičné zrno, řepkové semeno a řepkové expelery). U kukuřice byl analyzován jeden vzorek navíc v rámci mezinárodního kruhového testu GeMMA.

### **2.4. Pracovní postupy**

#### **2.4.1. Izolace rostlinné DNA**

Navážka mletého vzorku je dvakrát po 50 mg u sóji a dvakrát po 60 mg u kukuřice a řepky na každý vzorek.

Metodika je přesně popsána v manuálech uvedených kitů a v JPP „Detekce přítomnosti GMO v rostlinném materiálu metodou PCR“. Rozemletý zhomogenizovaný vzorek podstupuje lýzi buněk lyzačním pufrem za přítomnosti proteinázy, degradaci RNA, vysrážení a odstranění ostatních buněčných komponent, navázání DNA na silikagel upevněný v kolonce, promytí navázané DNA a její rozpuštění v elučním pufru. K amplifikaci se používá neředěný izolát DNA v objemu podle návodu výrobce PCR kitů.

#### **2.4.2. Polymerázová řetězová reakce**

Příprava reakční směsi:

1. Připraví se PCR box: pracovní nástroje a pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů ethanolem a UV zářením po 20 min.

2. Stanoví se počet reakcí (počet vzorků plus příslušné kontroly). Dle tabulky reakčních směsí se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Výsledný objem celkové reakční směsi je 50 nebo 20  $\mu$ l dle použitého kitu, viz tabulka.

3. Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí: redestilovaná  $H_2O$ , REDEx nebo REDTaq Mix (obsahující všechny komponenty potřebné pro PCR včetně DNA-polymerázy) a primery specifické pro hledaný úsek DNA. Tato směs bez templátu se rozpipetuje po množstvích stanovených v tabulce do přichystaných amplifikačních zkumavek.

4. Nakonec se do každé zkumavky přidá 5 $\mu$ l nebo 2 $\mu$ l templátové DNA (dle použitého kitu, viz tabulka). Pro beztemplátovou kontrolu se místo templátové DNA přidá tentýž objem vody.

5. Amplifikační zkumavky s dobře utěsněným víčkem se vloží do jamek v bloku termocykleru a spustí se příslušný program.

**Tabulka č. 6: Amplifikované fragmenty a amplifikační programy pro detekci vnitřních genů a screening**

Hledaný / Amplifikovaný úsek název                      délka [bp]		Název	Amplifikační program *) průběh	Poznámka
<b>Sójový vnitřní gen</b>	118	A:01 SOJTAQ	94 °C/ 1min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 45sec 58 °C/ 1min 50sec 72 °C/ 1min 55sec / 35cyklů 72 °C/ 5min 55sec / 1 cykl	Jednoduchá PCR
<b>Kukuřičný vnitřní gen</b>	226	A:02 KUKTAQ	94 °C/ 1min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 50sec 68 °C/ 1min 50sec 72 °C/ 2min 0sec / 35cyklů 72 °C/ 5min 0sec / 1 cykl	Jednoduchá PCR
<b>Řepkový vnitřní gen</b>	212	A:03 REP/BAR	94 °C/ 3min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 45sec 60 °C/ 0min 50sec 72 °C/ 2min 0sec / 35cyklů 72 °C/ 10min 0sec / 1 cykl	Duplexní PCR shodná s *)
<b>Screening - promotor 35 S</b>	123	B:04 NO35TAQ	94 °C/ 1min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 45sec 57 °C/ 2min 0sec 72 °C/ 1min 30sec / 40 cyklů 72 °C/ 5min 0sec / 1 cykl	Jednoduchá PCR
<b>Screening - terminátor NOS</b>	180	B:04 NO35TAQ	94 °C/ 1min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 45sec 57 °C/ 2min 0sec 72 °C/ 1min 30sec / 40 cyklů 72 °C/ 5min 0sec / 1 cykl	Jednoduchá PCR
<b>Doplňkový screening - infekce CaMV</b>	191 383 <sup>a</sup>	B:05 CaMV (duplexní PCR)	94 °C/ 3min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 45sec 56 °C/ 0min 30sec 72 °C/ 2min 0sec / 35 cyklů 72 °C/ 10min 0sec / 1 cykl	Duplexní PCR

\*) V amplifikačních programech je možno učinit drobné změny dle potřeby.

**Tabulka č. 7: Amplifikované fragmenty a amplifikační programy pro identifikaci transgenů a modifikací**

Hledaný / Amplifikovaný úsek název	délka [bp]	Název	Amplifikační program *) průběh	Poznámka
<b>RoundUp- Ready Sója</b>	172	C:06 RRS.TAQ nebo C:07 35S/ RRS	94 °C/ 3min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 45sec 57 °C/ 2min 0sec 72 °C/ 1min 50sec /35 cyklů 72 °C/ 5min 0sec / 1 cykl	Jednoduchá PCR
<b>Transgen bar</b>	428	C:08 BAR/REP	94 °C/ 3min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 45sec 60 °C/ 0min 50sec 72 °C/ 2min 0sec / 40 cyklů 72 °C/ 10min 0sec / 1 cykl	Duplexní PCR shodná s *)
<b>MON 810 Kukuřice</b>	194	C:10 MON810	94 °C/ 1min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 55sec 58,5 °C/ 2min 0sec 72 °C/ 2min 0sec / 40 cyklů 72 °C/ 3min 0sec / 1 cykl	Jednoduchá PCR
<b>Kukuřice Bt-176</b>	211	C:12 BT:176	94 °C/ 1min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 55sec 61,5 °C/ 2min 0sec 72 °C/ 2min 0sec / 40 cyklů 72 °C/ 3min 0sec / 1 cykl	Jednoduchá PCR
<b>Kukuřice Bt-11</b>	189	C:11 BT:11	94 °C/ 1min 0sec / 1 cykl 94 °C/ 0min 45sec 60 °C/ 2min 0sec 72 °C/ 1min 30sec / 40 cyklů 72 °C/ 3min 0sec / 1 cykl	Jednoduchá PCR

\*) V amplifikačních programech je možno učinit drobné změny dle potřeby.

### 2.4.3. Elektroforéza v agarózovém gelu

Je standardní metodou pro tzv. "end- point" vyhodnocení PCR (tj. vyhodnocení po ukončení celé amplifikace), vhodnou pro kvalitativní detekce GMO.

1. Příprava gelu: Uvaří se 2% agarózový gel v elektroforetickém TAE- pufru (Tris-acetát- EDTA). Připraví se nalévací vanička s vhodným hřebínkem a vyrovná se vodováhou. "Zuby" hřebínku vytvoří v tuhoucím gelu jamky konstantní velikosti. Po mírném zchlazení se přidá roztok ethidiumbromidu (interkalační barvivo sloužící ke zviditelnění DNA v gelu),

opatrně zamíchá a nalije se do vaničky v digestoři. Po ztuhnutí gelu se opatrně vyjme hřebínek, gel se přenesse do elektroforetické vany a převrství se TAE- pufrem.

2. Nanášení vzorků: Objem vzorku nanášeného do jamky závisí na typu hřebínku. Promyslíme si rozvržení vzorků a markerů. Vzorky před nanesením do jamek není třeba barvit (oba používané amplifikační kity používají červenou DNA- polymerázu a toto barvivo během chodu elektroforézy indikuje postup DNA v gelu.) Naneseme do jamek vzorky amplifikátů a marker molekulové hmotnosti (obsahuje fragmenty DNA deklarovaných délek) a spustíme chod elektroforézy. Pro amplifikáty používáme krokový marker (po 50 bp). Pro kontrolu izolované DNA používáme marker o větší délce fragmentů (564 - 21 226 bp).

3. Vyhodnocení: Po 35 - 45 min. chodu, když rozdělení fragmentů podle jejich délek již dostatečně pokročilo, prosvítíme gel na transiluminátoru a provedeme fotodokumentaci. Snímky popisujeme, vyhodnocujeme a uchováváme v počítači.

### **3. Výsledky a diskuse**

#### **3.1. Sója**

V roce 2004 bylo analyzováno 20 vzorků sóji. Z toho ve 2 vzorcích nebyla detekována příměs GMO, 18 vzorků bylo identifikováno jako obsahující RoundUp- Ready sóju (RRS). Primery použité pro tuto identifikaci daly shodné výsledky při použití dvou různých amplifikačních kitů (REDEx i REDTaq), viz obrázek 1.

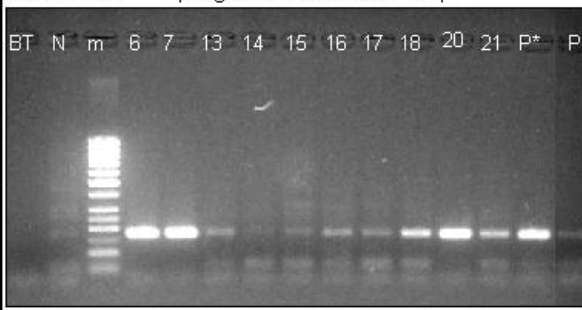
Těchto 18 vzorků bylo dále postoupeno ke kvantifikaci na SZPI metodou Real- Time PCR. Výsledky kvantifikace potvrdily kvalitativní výsledky dosažené v LMGD (viz samostatný dokument Zpráva o kvantifikaci vzorků sóji OK ÚKZÚZ v SZPI).

Amplifikace EPSPS (172 bp), kit REDTaq  
27.7.04 program C: 06 RRS. Taq



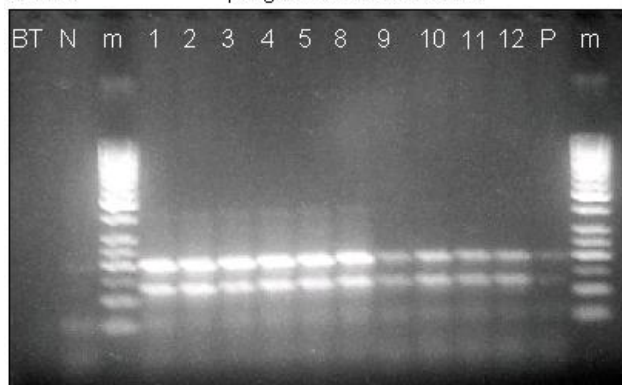
m... marker 50 bp, BT... beztemplátová kontrola  
N... negativní kontrola, P... pozitivní kontrola RRS (0,1% IRMM)  
P\*... pozitivní kontrola RRS  
1,2,3,4,5,8,9,10,11,12... vzorky sója OK 2004

Amplifikace EPSPS (172 bp), kit REDTaq  
22/23.7.04 program C: 06 RRS. Taq



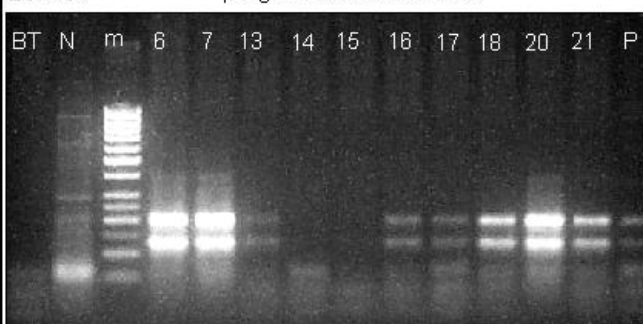
m... marker 50 bp, BT... beztemplátová kontrola  
N... negativní kontrola  
6,7,13,14,15,16,17,18,20, 21... vzorky OK 2004  
P... pozitivní k. RRS 0,1% (IRMM 410S-1), P\*... pozitivní k. RRS (20%)

Duplexní amplifikace - transgen EPSPS (172 bp) a  
promotor 35 S (123 bp), kit REDEx  
2.8.04 program C:07 35S/RRS



m... marker 50 bp, BT... beztemplátová kontrola  
N... negativní kontrola, P... pozitivní kontrola RRS (0,1% IRMM)  
1,2,3,4,5,8,9,10,11,12... vzorky sója OK 2004

Duplexní amplifikace - transgen EPSPS (172 bp) a  
promotor 35 S (123 bp), kit REDEx  
23.7.04 program C:07 35S/RRS



m... marker 50 bp, BT... beztemplátová kontrola  
N... negativní kontrola  
6,7,13,14,15,16,17,18,20, 21... vzorky OK 2004  
P... pozitivní k. RRS 0,1% (IRMM 410S-1)

**Obrázek č. 1: Shoda výsledků při použití dvou různých PCR kitů (primery pro identifikaci Roundup-Ready sóji: 35s- f2/petu-r1; srovnávaná stanovení jsou zobrazena pod sebou).**

### 3.2. Kukuřice

V roce 2004 bylo analyzováno 21 vzorků kukuřice, z toho 20 vzorků krmné suroviny OK ÚKZÚZ a 1 vzorek kukuřičné mouky v rámci kruhového testu GeMMA. Ve vzorcích krmných surovin nebyla nalezena žádná z modifikací spadajících do VÚ K8 (Bt- 176, Bt- 11 a MON810). Jeho úspěšné vypracování však potvrdila (kromě kontrol použitých při zavádění reakcí) detekce těchto modifikací ve vzorku GeMMA.

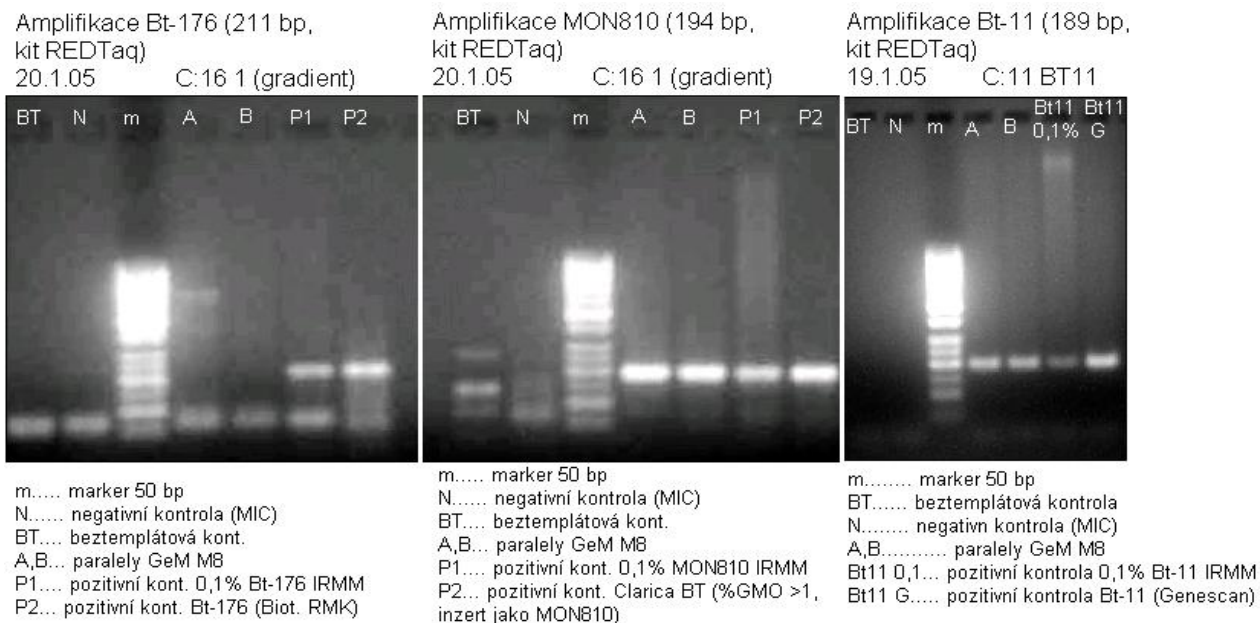
Identifikace těchto GM byly provedeny jak pomocí kitu REDTaq (dle JPP vypracovaného v LMGD v rámci tohoto VÚ), tak i zbytkem dříve používaného kitu firmy Biotoools. Z následující tabulka porovnává PCR- primery a s jejich pomocí amplifikované

fragmenty u obou metod. (Přestože firma Biotools primery zahrnuté ve svém kitu nspecifikuje, z délky amplifikovaného úseku lze soudit na odlišnost nebo pravděpodobnou totožnost primerového páru, protože v rámci sekvence hledaného úseku DNA je jen malá pravděpodobnost existence více párů primerů dávajících stejně dlouhý produkt). Tabulka ukazuje, kde se liší identita amplifikovaných úseků DNA při použití kitu Biotools a metody zavedené v LMGD.

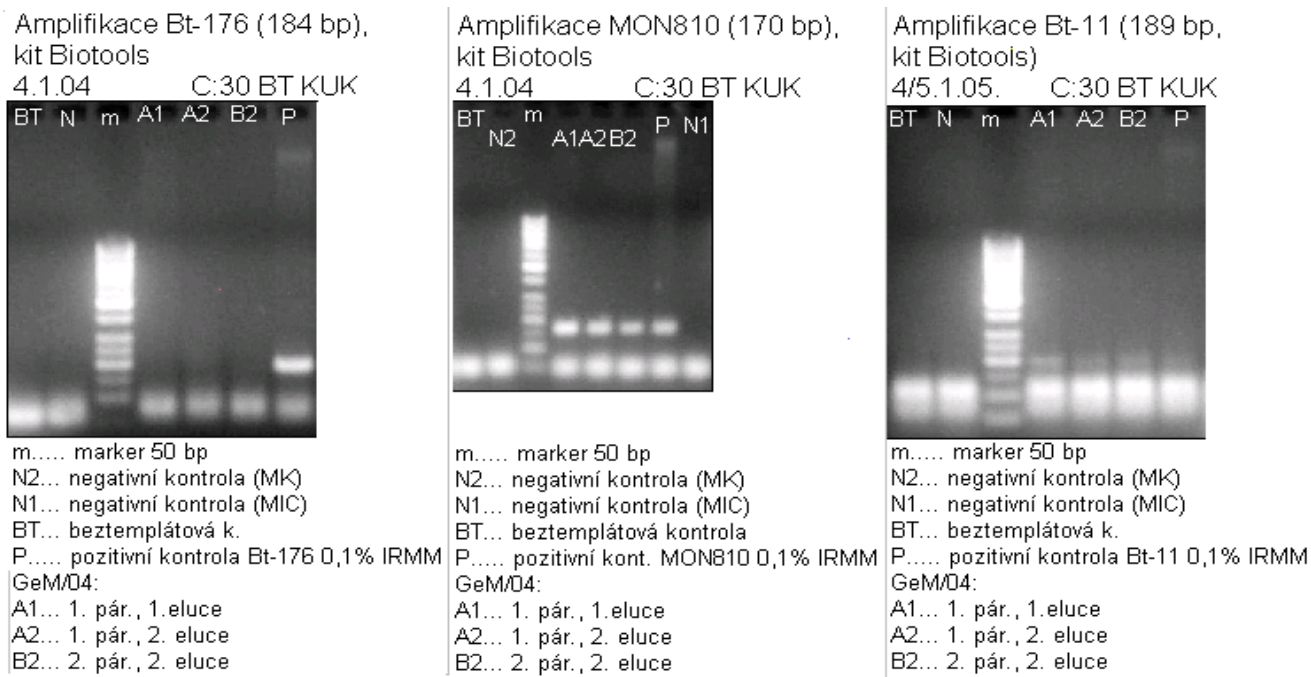
**Tabulka č.7: Porovnání amplifikovaných úseků při použití dřívější a nově zavedené metody**

Genetická modifikace	Kit REDTaq: Délka amplifikovaného úseku a PCR primery	Kit Biotools: Délka amplifikovaného úseku	Pravděpodobná odlišnost
<b>Bt-176</b>	Cry-03 / Cry-04 - 211 bp	184 bp	ano
<b>Bt-11</b>	IVS-2 / PAT-B - 189 bp	189 bp	ne
<b>MON810</b>	HSO1 / CRO1 - 194 bp	170 bp	ano

Obě použité metody daly shodné výsledky, viz obrázky č. 2 a č.3.



**Obrázek č. 2: Identifikace modifikací Bt-176, MON810 a Bt-11 - mezinárodní kruhový test GeMMA podle JPP vypracovaného v rámci VÚ K8**



**Obrázek č.3: Identifikace modifikací Bt- 176, MON810 a Bt- 11 - mezinárodní kruhový test GeMMA pomocí dříve používaného kitu firmy Biotoools (Španělsko)**

## 4. Výsledky a diskuse

V žádném ze vzorků dodaných k rozboru Odborem krmiv ÚKZÚZ nebyla detekována přítomnost modifikací Bt-11, Bt-176 a MON810 (VÚ K8), ani modifikací NK603, GA21 a CBH351 (VÚ K9). Jsou to však modifikace, jejichž identifikaci běžně provádějí laboratoře zabývající se detekcí GMO.

Jako pozitivní kontrola PCR pro VÚ K9 byla použita sada 3 druhů genomové DNA zakoupená přes firmu Fluka Biochemica od IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements), Belgie. Tyto standardy (pro NK603, GA21 a CBH351) se od ostatních referenčních materiálů IRMM liší:

1. Ostatní dosud v LMGD používané RM jsou v podobě mouky, z níž je DNA sloužící jako pozitivní kontrola izolována až v LMGD, stejně jako zkoumané vzorky. U těchto tří modifikací však byla zakoupena již vyizolovaná DNA (z důvodu tehdejší nedostupnosti jiného materiálu), která byla dodána v lyofilizované podobě a rozpuštěna podle přiloženého návodu.

2. Výrobce deklarovaný obsah příslušné genetické modifikace je u námi zakoupených RM - mouk 0,1% ( $\pm$  výrobcem udaná tolerance). Tato množství geneticky modifikovaného

materiálu lze metodami a amplifikačními primery používanými v LMGD ještě detekovat. Naproti tomu uvedený set DNA má deklarovaný obsah příslušné genetické modifikace kolem 1%, ale schopnost této pozitivní kontroly vytvořit hledaný pruh v gelu - čili být detekována - je srovnatelná s 0,1%- ní kontrolou z první skupiny RM. Zdá se tedy, že práh detekce se tu pohybuje až kolem 1%!

Protože laboratoř nemá dosud k dispozici jinou formu pozitivní kontroly, není možné zjistit, zda tento vysoký limit detekce je zdánlivý (protože zakoupená DNA není dostatečně kvalitní), nebo zda je skutečně takto vysoký (např. z důvodu nedostatečné amplifikace při PCR). Údaje z validačních studií jiných laboratoř, které udávají LOD 0,1% GMO, naznačují, že je možné jej snížit. Zdá se, že otázku kvalitního RM by mohlo vyřešit zakoupení nově na trhu dostupného materiálu s uvedenými modifikacemi v podobě mouky. (To jsou zatím RM s obsahem GA21 a NK 603; mouka obsahující CBH351 není dosud k dispozici.) Zatím tedy nelze rozhodnout, zda fakt, že u podezřelých vzorků nebyla detekována přítomnost těchto modifikací, byl způsoben skutečnou nepřítomností těchto modifikací ve zkoumaných vzorcích, nebo vyšším LOD detekčních reakcí.

**Tabulka č.8: Přehled výsledků detekce GMO u sóji a kukuřice v r. 2004**

Plodina	Počet analyzovaných vzorků	Počet vzorků, kde nebyla detekována přítomnost GMO ani p35S a tNOS	Počet vzorků pozitivních při screeningu			Počet vzorků, kde byla identifikována konkrétní modifikace
			p35S	tNOS	z toho 35S+ NOS zároveň	
<b>Sója</b>	20 (OK)	2	18	- *)	18 *)	18 (RRS)
<b>Kukuřice</b>	21 (20 OK + 1 GeMMA)	16 (OK)	5 (4 OK + 1 GeMMA)	2 (1 OK + 1 GeMMA)	2 (1 OK + 1 GeMMA)	1 (GeMMA-modifikace Bt-11 a MON810)

\*) Screening na tNOS nebyl proveden u vzorků s detekovanou pozitivitou na Roundup-Ready sóju, protože je známo, že jej daný inzert obsahuje.

\*\*) Z uvedených 16 vzorků řepky se zjištěnou pozitivitou na p35S CaMV bylo 7 detekováno jako napadených CaMV, takže u nich nelze prokázat transgenní původ tohoto promotoru.

## 5. Závěr

Vyzkoušeli jsme techniky izolace a amplifikace DNA pomocí vhodných univerzálních a dodavatelem pružně poskytovaných kitů a v nich popsanych protokolů. Ověřili jsme vhodnost těchto kitů a používaných specifických primerů v podmínkách našeho pracoviště a provedli jsme optimalizaci parametrů PCR. Zavedli jsme metody pro detekci vybraných transgenů či transgenních odrůd pružnějším a levnějším způsobem.

V současnosti tedy můžeme provádět tyto analýzy:

1. zachytit pomocí screeningu na p35S a tNOS cca 95% všech komerčních GMO,
2. identifikovat 8 nejběžnějších transgenů či modifikací u sóji, kukuřice a řepky.

Dle dalších možností bude vhodné ověřit či snížit limit detekce až na 0,1% GMO. Doporučujeme zakoupit příslušné RM v podobě mouky, jako pozitivní kontrolu pro PCR detekce použít DNA izolovanou z nich v LMGD a dále doladit parametry PCR s tímto novým RM. Pokud by ani tento postup nevedl k detekci s LOD 0,1%, bude zřejmě třeba použít jiné amplifikační primery.

## 6. Literatura

1. D. Rickwood and B.D. Hames: *PCR - Essential Data*, John Wiley & Sons UK **1995**
2. S. Surzycki: *Basic Techniques in Molecular Biology*, Springer lab manual, Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2000**.
3. Návody k používaným kitům firmy Sigma-Aldrich:
  - GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit
  - REDTaq™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix
  - REDExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit.
4. Materiály JRC (Joint Research Centre EK - Ispra, Itálie):
  - The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms, Session 9, Qualitative Detection of MON810 Maize, Bt176 Maize and Roundup Ready Soybean by PCR
  - Methods validated by Interlaboratory Studies 11/2001
  - CRL - Detection methods submitted under the provision of Art. 47 of Regulation EC 1829/2003.
5. internetové stránky JRC (Joint Research Centre EK - Ispra, Itálie), IRMM (Institute of Reference and Measurements Materials) a CRL (Community Reference Laboratory) Evropské unie:
  - <http://gmo-crl.jrc.it>
  - <http://biotech.jrc.it>
  - <http://www.irmm.jrc.be>

Kromě uvedeného seznamu bylo použito i informací předaných osobně během školení o detekci transgenů u řepky v ÚM BR ČAV České Budějovice, Branišovská 31

---

**Bulletin laboratorního odboru IX 2005/ 2**

Ročník: IX, č. 2  
Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2005  
Odpovědný redaktor: RNDr. Jiří Zbíral, Ph.D.  
Technická spolupráce: Ing. Iva Strížová  
Náklad: 130 výtisků  
Počet stran: 51  
Tisk: ÚKZÚZ, Hroznová 2, 656 06 Brno, tel.: 543 548 111  
e-mail: [ukzuz@ukzuz.cz](mailto:ukzuz@ukzuz.cz)

Texty neprošly jazykovou úpravou

**ISSN 1212- 5466**