Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř

Bulletin 2023

Ročník XXVII, číslo 3/2023

Brno 2023

Obsah

1 **Zavedení kvalitativní detekce transgenu MZIR098 u kukuřice**
Jana Stehlíková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 603 00 Brno
1

2 **Porovnání metod stanovení obsahu theobrominu**
Šárka Plhalová, Václav Poštulka, Miroslava Valentíková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Opava, Jaselská 16, 746 01 Opava 16

3 **Stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky metodou HPLC**
Radvana Šulová, Adriána Dobošová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno 34

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Zavedení kvalitativní detekce transgenu MZIR098 u kukuřice

Jana Stehlíková

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdMB Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno
jana.stehlikova@ukzuz.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. Jedná se o šlechtitelské metody z oblasti biotechnologií, které mimo jiné umožňují mezidruhový přenos genů.

MZIR098 je geneticky modifikovaná kukuřice, jejíž DNA byla modifikována pomocí syntetické formy genu Cry3A a genu Cry1Ab z *Bacillus thuringiensis*. Produktem je chimérický (Cry3A-Cry1Ab) delta endotoxin protein, který poskytuje odolnost vůči některým škůdcům z řádu Lepidoptera a Coleoptera selektivním poškozením jejich střevní výstelky.

Dále byla modifikována syntetickou formou genu cry3A z *Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis*. Produktem je modifikovaný Cry3A delta-endotoxin, který poskytuje odolnost vůči škůdcům řádu Coleoptera, zejména škůdcům kukuřičných kořenů, selektivním poškozením jejich střevní výstelky.

K dosažení herbicidové tolerance je obsažen pat gen ze *Streptomyces viridochromogenes*. Produktem je fosfinothricin N-acetyltransferáza (PAT) enzym, jehož funkcí je eliminace

herbicidní aktivity glufosinátových (fosfinothricin) herbicidů acetylací. Výslednou vlastností je tolerance herbicidu glufosinátu..

2 Cíl

Cílem práce je rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u kukuřice o kvalitativní stanovení MZIR098 a určení meze detekce stanovení. Součástí je ověření detekce screeningových elementů promotor 35S, terminátor NOS a gen pat.

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).

AOCS 0411-C, Non-Modified Maize, (pure, 0 g/kg) – laboratorní značení: CRM 14/2016.

AOCS 1114B2, NP2391/NP2222 (MZIR098) Maize Syngenta Crop LLC Event MZIR098, (> 962 g/kg) – laboratorní značení: CRM 5/2020.

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

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 maize MZIR098 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, JRC Publication JRC114043.

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.

Pracovní roztok 1 × TAE pro elektroforézu.

1% Pracovní roztok interkalačního barviva (ethidium bromid).

EZ Load Precision Molecular Mass Standard, BIO-RAD.

6 × Loading Dye Solution.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. EZ LoadTM Molecular Ruler 50 bp PCR Biorad).

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

PCR reakce – amplifikace

REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix with $MgCl_2$, výrobce Sigma–Aldrich, univerzální reakční směs pro PCR (dále REDTaq)

REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with $MgCl_2$.

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 Generi-Biotech.

Vnitřní (referenční) gen kukuřice – škrobová invertáza:

IVRI-F: CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC

IVRI-R: GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C

MZIR098

MZIR098F: ATCTCAGACACCAAACCGAGATC

MZIR098R: ACACCGTTAGGCTAGTGCCAGT

p35S

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

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

tNOS

NOS-1: GAA TCC TGT TGC CGG TCT TG

NOS-3: TTA TCC TAG TTT GCG CGC TA

pat

PAT_16-L (F): GAT ATG GCC GCG GTT TGT GAT

PAT_16-R (R): TTC CAG GGC CCA GCG TAA

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 kukuřice, p35S, tNOS, pat, MZIR098 je uvedeno v tabulce č. 1. Jednotlivé amplifikační programy jsou uvedeny v tabulkách č. 2 až 6.

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	50 ng	5
Objem směsi vč. templátu			25

Vnitřní gen kukuřice (škrobová invertáza)

primery: IVRI-F / IVRI-R

délka amplikonu: 225 bp

Tabulka č. 2. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
počáteční denaturace	94	60	1
denaturace	94	50	35
annealing	68	110	
extenze	72	120	
závěrečná extenze	72	300	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

tNOS

primery: NOS-1/ NOS-3

délka amplikonu: 180bp

Tabulka č. 4. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
počáteční denaturace	1 94	60	1
denaturace	2 94	58	40
annealing	3 57,5	120	4.1
extenze	4 72	105	
závěrečná extenze	5 72	180	1

pat

primery: PAT_16-L (F)/ PAT_16-R (R):

délka amplikonu: 186bp

Tabulka č. 5. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	600	1
denaturace	95	15	40
annealing a extenze	60	60	

MZIR098

primery: MZIR098F / MZIR098R:

délka amplikonu: 73 bp

Tabulka č. 6. Amplifikační program.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	600	1
denaturace	95	15	40
annealing a extenze	60	60	

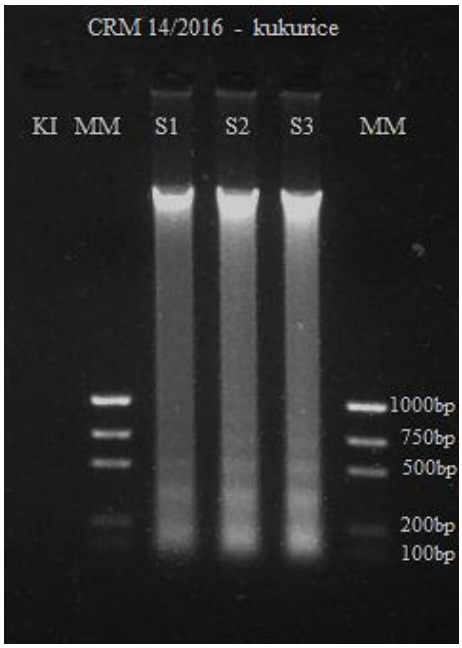
5 Výsledky a diskuse

Kvalita DNA

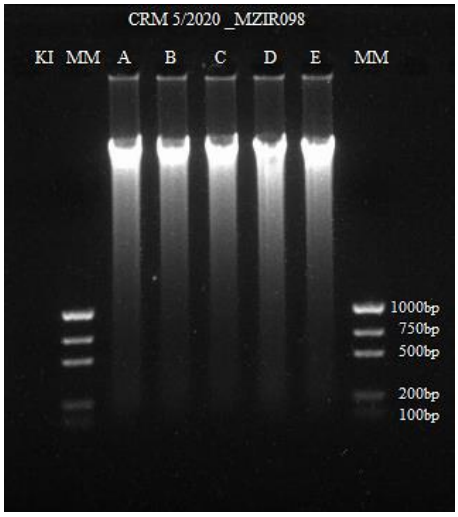
Pro potřeby zavádění, byla extrahována DNA z CRM geneticky nemodifikované kukuřice (CRM 14/2016) a z CRM GM kukuřice MZIR098 (CRM 5/2020). U izolátů byla změřena koncentrace (tabulka č. 7), otestována kvalita i amplifikovatelnost DNA (obrázky č. 1 až 4). Kritéria čistoty daná poměrem A 260/280 byla splněna u všech izolátů (doporučený poměr absorbancí je v rozmezí 1,7 až 2,0), u poměru A 260/230 jsou hodnoty také vyhovující (doporučený poměr absorbancí je v rozmezí 1,6 až 2,2). Kvalita na gelu a koncentrace izolátů vyhovovala požadavkům na analýzu a všechny izoláty byly pro analýzy vyhovující.

Tabulka č. 7. CRM 14/2016, CRM 5/2020– hodnoty naměřených koncentrací a hodnoty určující čistotu vyextrahované DNA.

CRM		Koncentrace ng/µl	A 260/A 280	A 260/230
CRM 5/2020 MZIR098 > 96,2 % GM m/m Izolace 20.10. 2020 Izoláty A, B, C, D, E	A	193,6	1,88	2,21
	B	114,6	1,89	2,18
	C	182,2	1,87	2,20
	D	175,9	1,88	2,22
	E	167,9	1,88	2,21
CRM 14/2016 kukuřice 0 % GM m/m Izolace 13. 2. 2020 Směsi izolátů	S 1	89,8	1,88	2,21
	S 2	90,3	1,87	2,21
	S 3	89,9	1,88	2,20

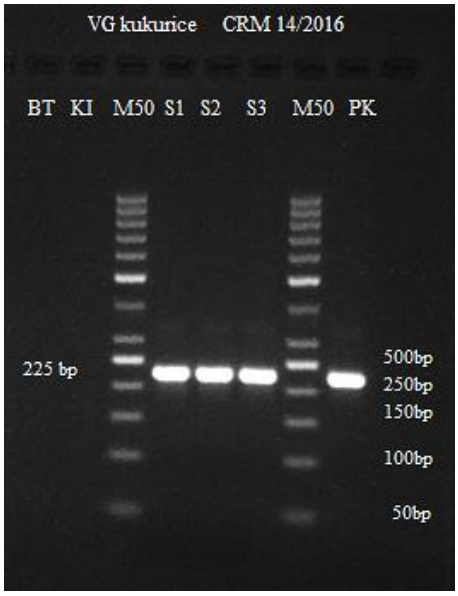


Obr. č. 1. Kvalita izolátů DNA, CRM 14/2016_ izoláty NK (S1, S2, S3). MM – Load Precision, Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.

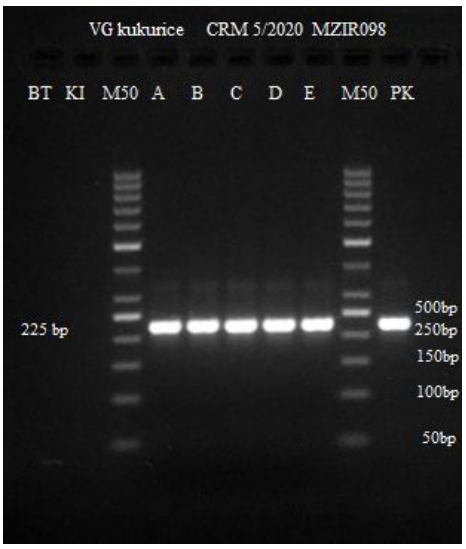


Obr. č. 2. Kvalita izolátů DNA, CRM 5/2020_ izoláty A, B, C, D, E. MM – Load Precision Molecular Mass Standard, KI – kontrola izolace.

Vnitřní gen kukuřice



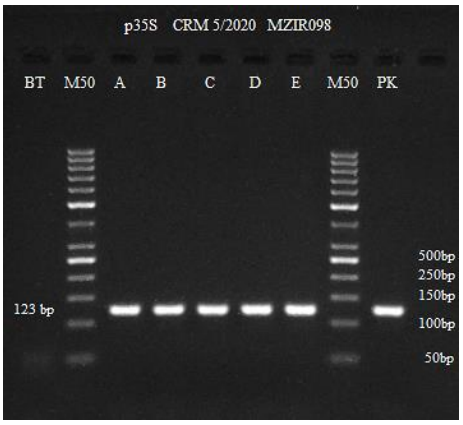
Obr. č. 3. Vnitřní gen kukuřice (225bp) - CRM 14/2016, izoláty S1, S2, S3. BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, PK-CRM 15/2014.



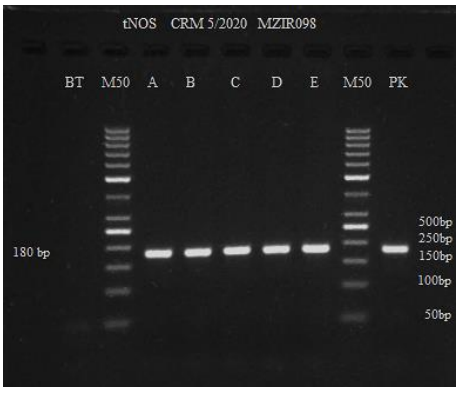
Obr. č. 4. Vnitřní gen kukuřice (225bp) - CRM 5/2020, izoláty A, B, C, D, E. BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 15/2014.

Screeningové elementy

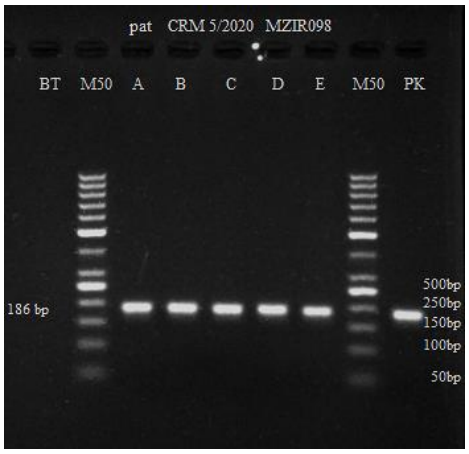
U MZIR098 byla ověřena detekce screeningového elementu p35S, tNOS a pat. Obrázky č. 5-7. Výsledky zkoušek byly pozitivní.



Obr. č. 5. Promotor 35S (123 bp) - CRM 5/2020, izoláty A, B, C, D, E. BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 27/2012.



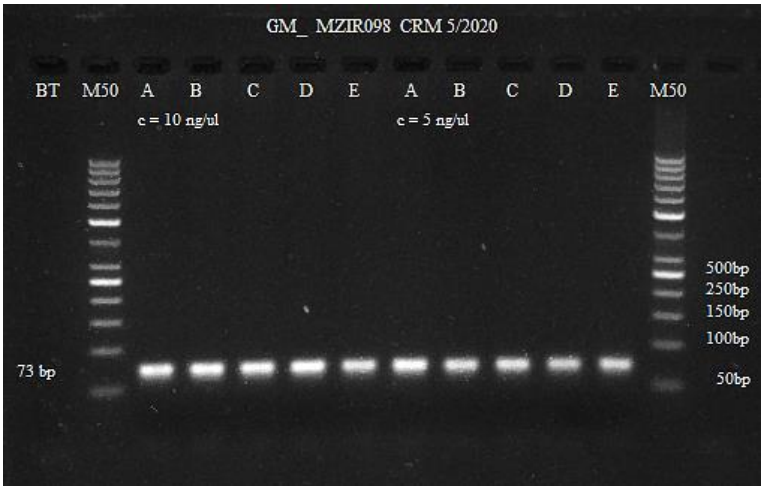
Obr. č. 6. Terminátor NOS (180 bp) - CRM 5/2020 izoláty A, B, C, D, E. BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 29/2012.



Obr. č. 7. pat (186 bp) – CRM 5/2020, izoláty A, B, C, D, E. BT- beztemplátová kontrola, M50 – hmotnostní marker 50 bp, KI – kontrola izolace, PK-CRM 24/2012.

Správnost stanovení

U MZIR098 byla z izolátů (A-E) CRM 5/2020 provedena PCR s koncentrací DNA v izolátu 5ng/µl a s koncentrací DNA 10 ng/µl. Výsledky zkoušek byly pozitivní. (obrázek č. 8).



Obr. č. 8. Stanovení MZIR098 (73 bp), BT – beztemplátová kontrola, M50-marker 50 bp, NK – CRM 14/2016, CRM 5/2020: Izoláty A-E v koncentracích 10 ng DNA/ul a 5 ng DNA/ul.

Mez detekce stanovení

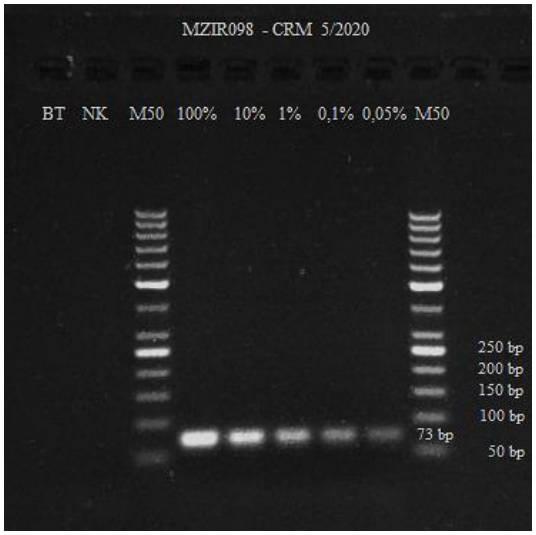
Součástí verifikace bylo stanovení meze detekce na hladině ≤ 0,1 % GM m/m. K dispozici byl pouze CRM se 100 % GM m/m. Postupným ředěním izolované DNA byla připravena koncentrační řada 100-0,05 % m/m GM. Pro ředění izolátu DNA z CRM s GM byl použit izolát DNA z CRM stejné, nemodifikované plodiny (NK, CRM 14/2016, 0 % GM m/m) o stejné koncentraci DNA v izolátu. (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.)

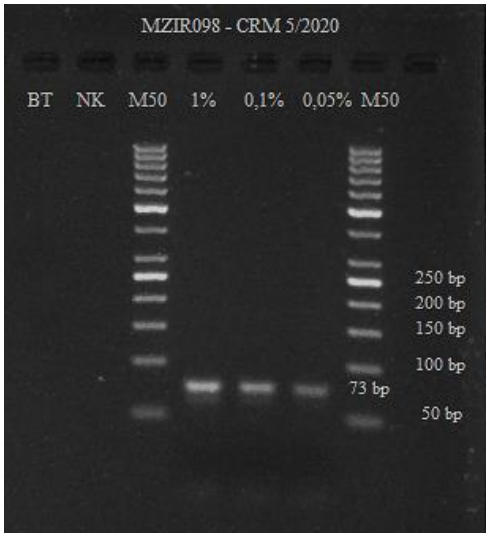
Byla provedena amplifikace izolátu CRM 5/2020 o koncentraci DNA 10 ng/µl a obsahu modifikace 100-0,05 % m/m GM.

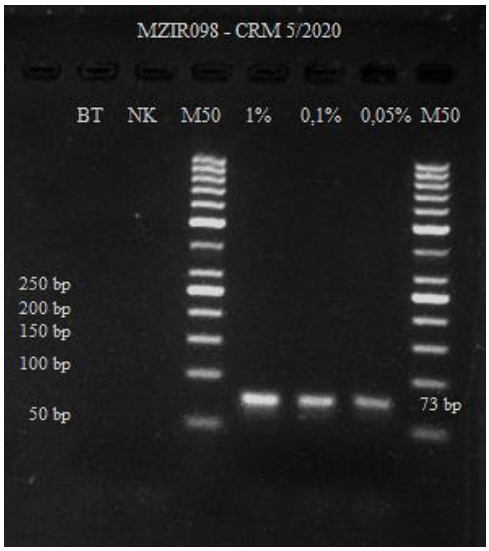
K amplifikaci a detekci produktu došlo ve všech opakováních. (obrázky č. 9 až 13)

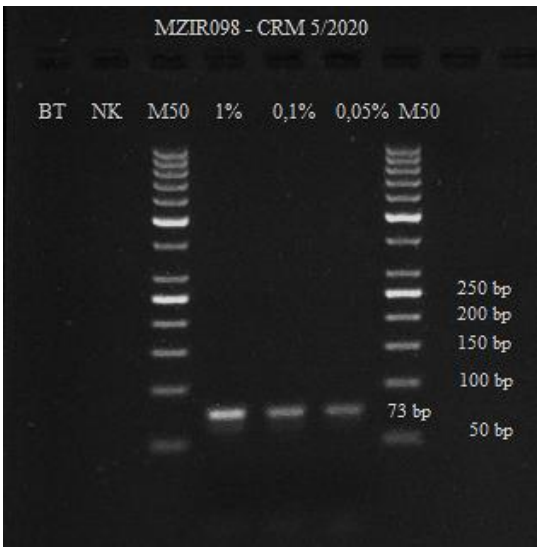
Mez detekce byla ověřena provedením pěti nezávislých PCR (amplifikací) zaváděné modifikace.

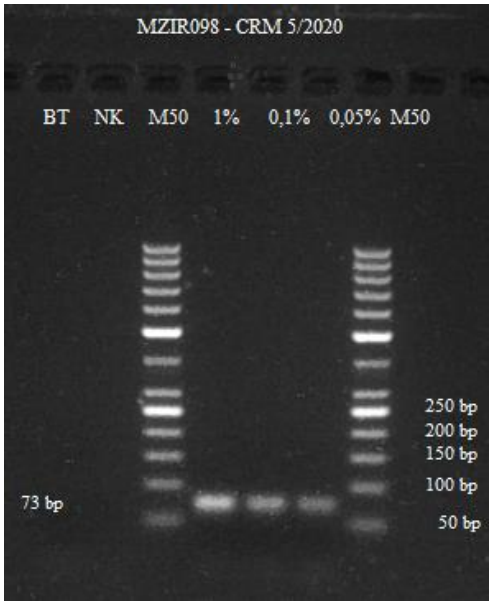
Z výsledků analýz vyplynulo, že obsah modifikace MZIR098 lze detekovat na hladině 0,05 % GM m/m.











Obr. č. 9 až 13. Stanovení MD transgenu MZIR098 (73 bp), BT – beztemplátová kontrola, NK – CRM 14/2016, M50-marker 50 bp. CRM 5/2020: 100 %, 10 %, 1 %; 0,1 %; 0,05 % GM m/m. Amplifikační kit REDTaq.

PCR proběhla do koncentrace 0,05 % GM m/m.

Během verifikace se postupovalo podle metody JPP (postupy č. 10252.1, 10255.1, 10257.1, 10259.1 a metod validovaných EURL. Zachovaly se sekvence primerů i amplifikační programy.

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 kukuřice MZIR098 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací v laboratoři OdMB.

Metoda stanovení MZIR098 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 maize MZIR098 by Real-time PCR, Validation Report and Validated Method, JRC – Institute for Health and Consumer Protection, JRC Publication JRC114043.

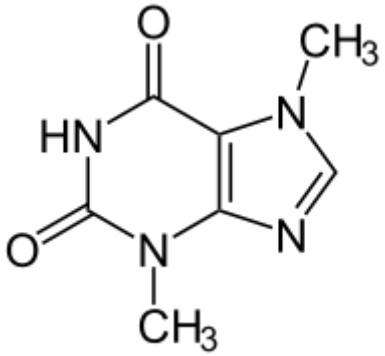
Porovnání metod stanovení obsahu theobrominu

Šárka Plhalová, Václav Poštulka, Miroslava Valentíková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Opava, Jaselská 16 2, 746 01 Opava
vaclav.postulka@ukzuz.cz

1 Úvod

V roce 2020 vyšla nová norma ČSN EN 17270 – Stanovení theobrominu v krmných surovinách a krmných směsích, včetně složek pocházejících z kakaa, metodou kapalinové chromatografie. Cílem práce bylo porovnat postup z této normy se stávajícím postupem JPP ÚKZÚZ 10542.2, který byl na pracovišti ONRL Opava zvalidován a akreditován a zjistit, zda tyto postupy poskytují srovnatelné výsledky.

Theobromin, chemickým názvem, 3,7-dimethylxanthin, je hořký alkaloid kakaovníku. Jeho název je odvozen od slova Theobroma (kakaovník). Je to krystalický prášek bílé barvy, je nerozpustný ve vodě a rozpustný v tucích. Theobromin způsobuje mírnou akutní toxicitu u řady živočichů. Slupky a moučka z kakaových bobů, kakaové klíčky a nespotřebované cukrovinky se používají ke krmení. Legislativa EU stanovuje maximální obsah theobrominu v krmném materiálu.



Obr. 1. Struktura molekuly theobrominu.

2 Metody stanovení theobrominu

2.1 Stanovení theobrominu podle JPP ÚKZÚZ 10542.2

2.1.1 Princip

Obsah theobrominu se stanoví po extrakci vzorku směsí rozpouštědel chloroform – amoniak metodou vysokoúčinné kapalinové chromatogafie na reverzní fázi za použití UV detekce.

2.1.2 Chemikálie

1 Chloroform.

2 Mořský písek.

3 Amoniak, roztok 20%.

Příprava: 400 ml koncentrovaného amoniaku se smíchá se 100 ml vody (5) a promíchá.

4 Acetonitril pro HPLC.

5 Voda (deionizovaná nebo demineralizovaná).

6 Octan sodný, roztok, c = 0,01 mol/l.

Příprava: 0,8203 g pevného octanu sodného se rozpustí ve vodě v 1000ml odměrné baňce a doplní po značku.

7 Theobromin, min 99%.

8 Mobilní fáze, pH = 4, octan sodný + acetonitril.

Příprava: Octan sodný (6) a acetonitril (4) se smíchají v poměru 9 + 1 (V/V). Hodnota pH se zkontroluje na pH metru. Pokud pH neodpovídá požadované hodnotě, upraví se pomocí kyseliny octové (10).

9 Theobromin, základní standardní roztok, c = 0,1 g/l.

Příprava: 100 mg theobrominu (7) se rozpustí v 1000ml odměrné baňce v cca 500 ml vody za použití ultrazvukové lázně. Po rozpuštění a vytemperování se doplní po značku vodou.

10 Kyselina octová, koncentrovaná.

11 Dusík, čistota 4.0.

2.1.3 Přístroje a pomůcky

1 Ultrazvuková lázeň.

2 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detektorem.

3 Extrakční zařízení podle Soxhleta nebo Twisselmanna.

4 Zmýdelňovací baňky, 250 ml.

5 Extrakční patrony, asi (30 × 90) mm.

6 Nástřikový filtr Nylon, 0,45 μm.

7 Váhy, s hmotnostním rozlišením 0,001 g.

2.1.4 Extrakce

Krmné suroviny

Do nízké kádinky o objemu 150 ml se naváží asi 20 g mořského písku (2) a 1 g zhomogenizovaného vzorku. Obsah kádinky se dobře promíchá a převede do extrakční patrony. Zbytky na stěnách kádinky se důkladně setřou vatou, která se poté použije na uzavření extrakční patrony. Obsah patrony se před uzavřením zvlhčí 5 ml roztoku amoniaku (3) a patrona se ponechá v uzavřené nádobě přes noc.

Patrona se vloží do extrakčního zařízení (3) a extrahuje se 150 ml chloroformu (1) po dobu 7 h. Poté se rozpouštědlo odpaří do sucha a jeho zbytky se odstraní proudem dusíku. Odparek se rozpustí ve 100 ml mobilní fáze (8) v ultrazvukové lázni při 60 °C a zfiltruje přes hustý filtr. Před nástřikem na kolonu se ještě podle potřeby naředí a pak přefiltruje přes nástřikový filtr.

Krmné směsi

Do nízké kádinky o objemu 150 ml se naváží asi 12 g mořského písku (2) a 5 g až 10 g zhomogenizovaného vzorku. Obsah kádinky se dobře promíchá a převede do extrakční patrony. Zvlhčí se 10 ml roztoku amoniaku (3) a uzavře vatovou zátkou. Patrona se ponechá v uzavřené nádobě přes noc.

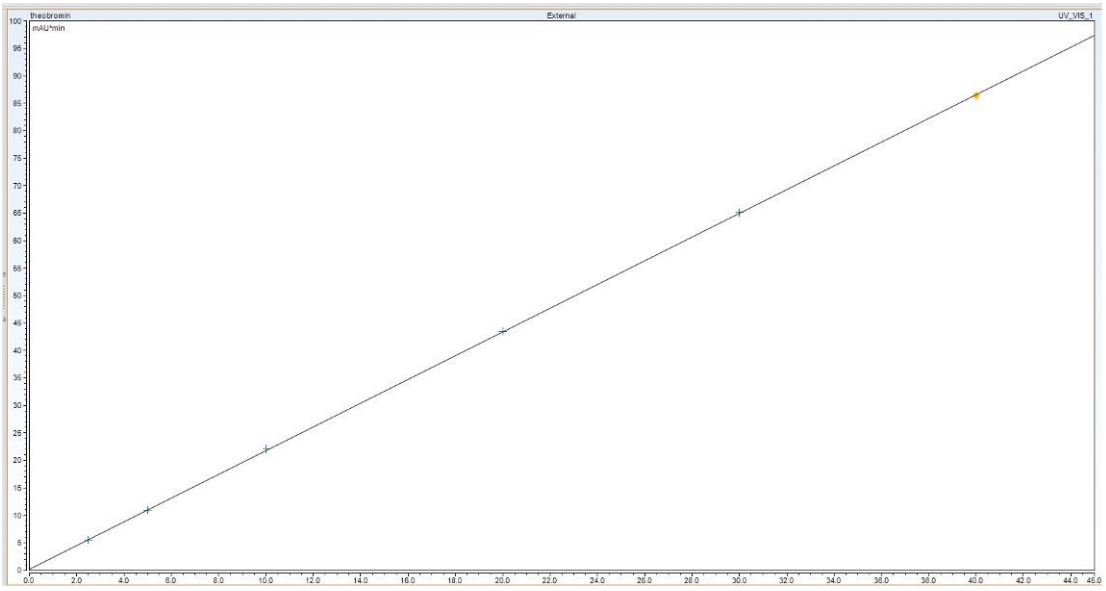
Patrona se vloží do extrakčního zařízení a extrahuje se 150 ml chloroformu (1) po dobu 7 h. Poté se rozpouštědlo odpaří do sucha a jeho zbytky se odstraní proudem dusíku. Odparek se rozpustí ve 100 ml mobilní fáze (8) v ultrazvukové lázni při 60 °C a zfiltruje přes hustý filtr. Před nástřikem na kolonu se ještě podle potřeby naředí a pak přefiltruje přes nástřikový filtr.

Obr. 1. Extrakce vzorku chloroformem.

2.1.5 Chromatografické stanovení

Kalibrace

Do sady 10ml odměrných baněk se pipetuje postupně (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0) ml základního standardního roztoku theobrominu (9), doplní se vodou (5) po značku a promíchá. Sada kalibračních roztoků odpovídá koncentraci theobrominu (2,5; 5; 10; 20; 30; 40) mg/l. Takto připravené roztoky se nastřikují na kolonu HPLC. Průměrné hodnoty jim odpovídajících ploch píků slouží k sestrojení kalibrační křivky.



Obr. 2. Kalibrační přímka theobrominu.

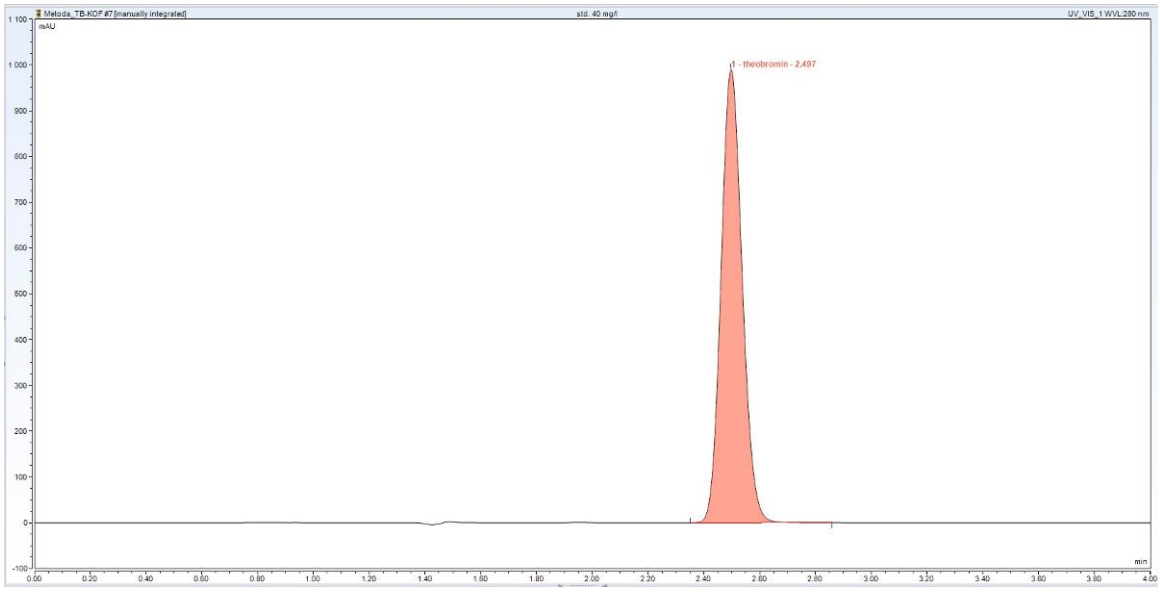
Separační podmínky

Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému (tab. č. 1).

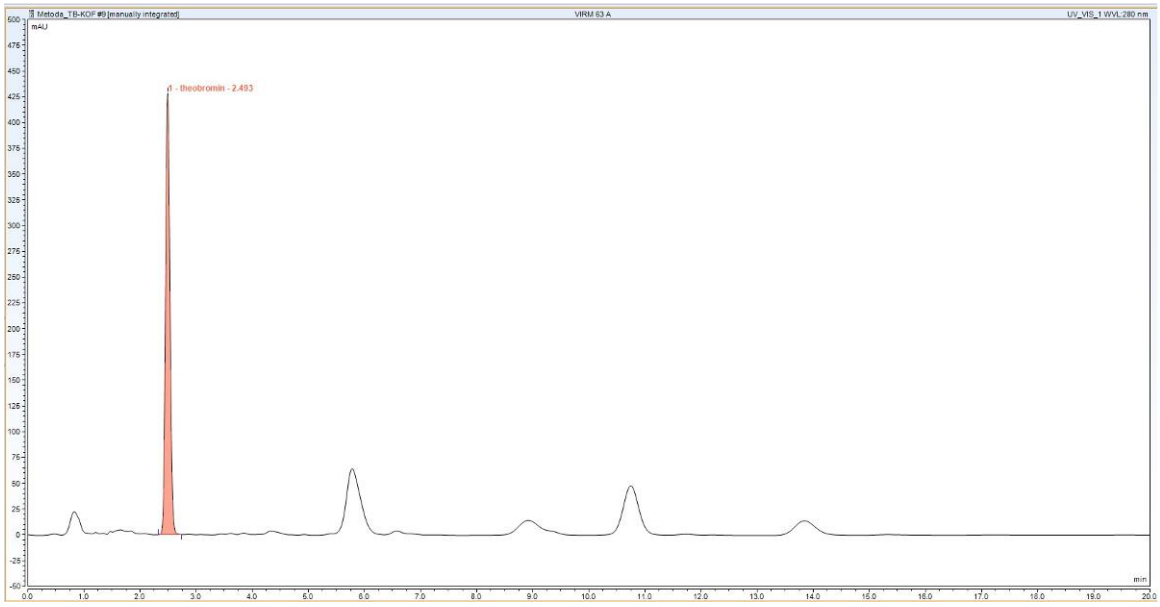
Tab. 1. Podmínky chromatografického stanovení.

Kolona	C_{18}-reverzní fáze, Nucleodur Polar Tec 5 μm, (150 × 3,0) mm
Mobilní fáze	(8)
Průtok mobilní fáze	0,65 ml/min
Teplota kolony	25 °C (okolí)
Detektor UV	280 nm
Objem nástřiku	5 μl
Retenční čas při laboratorní teplotě	2,6 min

K identifikaci theobrominu se provede srovnání retenčního času píku standardu a píku reálného vzorku. Ke kvantifikaci theobrominu se použije metoda vnějšího standardu.



Obr. 3. Chromatogram standardu theobrominu.



Obr. 4. Chromatogram theobrominu reálného vzorku.

2.1.6 Výpočet

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

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

c koncentrace theobrominu ve zkušebním vzorku, zjištěná z kalibračního grafu (mg/l),

V objem mobilní fáze, ve kterém je rozpuštěn odparek (ml),

m hmotnost zkušebního vzorku (g),

R ředění.

2.2 Stanovení theobrominu podle ČSN EN 17 270

2.2.1 Princip

Zkušební homogenní materiál se odtuční hexanem, přidá se interní standard a extrahuje se tlumivým roztokem octanu amonného. Extrakt se vyčistí přídavkem Carrezova činidla, přefiltruje se a analyzuje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s UV detekcí.

2.2.2 Chemikálie

1 Octan amonný, p. a.

2 Kyselina octová, 99,5%.

3 Kyselina octová, c = 1 mol/l.

Příprava: Do odměrné baňky 100 ml se přidá 60 ml vody (4) a napipetuje se 5,7 ml kyseliny octové (2). Po promíchání a vytemperování se doplní vodou (4) po značku.

4 Voda (deionizovaná nebo demineralizovaná).

5 Tlumivý roztok octanu amonného, c = 2,5 mol/l, pH = 5,5.

Příprava: Do kádinky o objemu 1 l se naváží 192,7 g ± 0,1 g octanu amonného (1) a rozpustí se v přibližně 600 ml vody (4). pH tlumivého roztoku se nejprve upraví pomocí kyseliny octové (2) a poté pomocí 1 mol/l kyseliny octové (3) na hodnotu v rozsahu pH 5,4 – 5,6.

Tlumivý roztok s upraveným pH se kvantitativně přenese z kádinky do odměrné baňky o objemu 1 l a doplní se po značku vodou (4). Před použitím se promíchá. Tento roztok je stabilní po dobu 1 měsíce při skladování za laboratorní teploty.

6 Hexan, p. a.

7 Octan zinečnatý dihydrát, p. a.

8 Hexakyanoželeznatan draselný trihydrát, p. a.

9 Carezzovo činidlo I.

Příprava: Do kádinky o objemu 1 l se naváží 219 g dihydrátu octanu zinečnatého (7) a přidá se přibližně 800 ml vody (4). Po rozpuštění se převede do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplní se po značku vodou. Před použitím se dobře promíchá. Tento roztok je stabilní 3 měsíce při skladování za laboratorní teploty.

10 Carrezovo činidlo II.

Příprava: Do kádinky o objemu 1000 ml se naváží 106 g trihydrátu hexakyanoželeznatanu draselného (8) a přidá se přibližně 800 ml vody (4). Po rozpuštění se převede do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplní se po značku vodou. Před použitím se dobře promíchá. Tento roztok je stabilní 3 měsíce při skladování za laboratorní teploty.

11 Theobromin, ≥ 98,5%.

12 Zásobní roztok theobrominu, 125 µg/ml.

Příprava: Do 500ml odměrné baňky se naváží 62,5 theobrominu (11) a přidá se asi 400 ml vody (4). Umístí se do ultrazvukové lázně, dokud se nerozpustí. Po rozpuštění a vytemperování se doplní vodou po značku. Tento roztok je stabilní 1 měsíc při skladování při teplotě 2 ºC – 8 ºC.

13 7-(ß-hydroxyethyl)theofylin, ≥ 98 %.

14 Zásobní roztok interního standardu 7-(ß-hydroxyethyl)theofylinu, 1 mg/ml.

Příprava: Do odměrné baňky o objemu 100 ml se naváží 100 mg 7-(ß-hydroxyethyl)theofylinu (13) a přidá se asi 80 ml vody (4). Po rozpuštění se doplní vodou po značku. Před použitím se dobře promíchá. Tento roztok je stabilní 1 měsíc při uchování při teplotě 2 ºC – 8 ºC.

15 Roztok interního standardu 7-(ß-hydroxyethyl)theofylinu, 100 µg/ml.

Příprava: Do odměrné baňky o objemu 10 ml se napipetuje 1 ml zásobního interního standardu 7-(ß-hydroxyethyl)theofylinu 1 mg/ml (14) a doplní se vodou (4) po značku. Před použitím se dobře promíchá. Tento roztok je stabilní měsíc při uchování při teplotě 2 ºC – 8 ºC.

16 Kyselina ortofosforečná p. a.

17 Dihydrogenfosforečnan draselný p. a.

18 0,0125 mol/l dihydrogenfosforečnan draselný, pH = 3,5.

Příprava: V kádince o objemu 1 l se rozpustí 1,7 g dihydrogenfosforečnanu draselného (17) v přibližně 800 ml vody (4). Hodnota pH se upraví na pH 3,5 pomocí kyseliny ortofosforečné (16). Roztok se přenese do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplní po značku vodou a před použitím se důkladně promíchá obracením. Tento roztok se připravuje každý týden čerstvý.

19 Acetonitril, HPLC.

20 Mobilní fáze,

90% 0,0125 mol/l dihydrogenfosforečnanu draselného, pH 3,5 + 10% acetonitrilu

Příprava: Smíchá se 900 ml 0,0125 mol/l dihydrogenfosforečnanu draselného, pH 3,5 (18) a 100 ml acetonitrilu (19). Roztok se důkladně promíchá.

2.2.3 Přístroje a pomůcky

1 Mlýnek, jednoduchý mlýnek schopný rozemlít zkušební materiál na velikost částic < 500 µm.

2 Váhy, s hmotnostním rozlišením 0,001 g.

3 Centrifuga, rcf 3000 g.

4 Vortex.

5 Vodní lázeň, schopná udržovat teplotu 40 °C ± 5 °C.

6 Ultrazvuková lázeň.

7 pH metr.

8 Centrifugační kónické polypropylenové zkumavky se šroubovacím uzávěrem, 50 ml.

9 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detektorem.

10 Nástřikový filtr Nylon, 0,45 µm.

2.2.4 Extrakce

Do polypropylenové zkumavky se šroubovacím uzávěrem se naváží 2,5 g ± 0,1 g zhomogenizovaného vzorku. Přidá se 6 ml hexanu (6) a pečlivě se promíchá vortexem,

pak se centrifuguje při rcf 2700 g po dobu 5 min. Horní vrstva hexanu se odstraní umělohmotnou pipetkou.

Extrakce hexanem se zopakuje ještě dvakrát, pokaždé se 3 ml hexanu. Vzorek se vysuší proudem dusíku, aby se odstranily poslední stopy hexanu. Poté se přidá 0,2 ml inertního standardu 1mg/ml 7-(ß-hydroxyethyl)theofylinu (14).

Přidá se 25 ml octanu amonného, pH = 5,5 (5), důkladně se protřepe a poté se umístí do vodní lázně nastavené na 40 °C na 15 min. Pomocí vortexu se pečlivě promíchá, aby se zajistilo, že žádný pevný materiál nezůstane přilepený na dně zkumavky a umístí se do ultrazvukové lázně na 20 min. Poté se vzorek a extrakt převedou do odměrné baňky o objemu 100 ml. Polypropylenová zkumavka se vypláchne vodou. Přidá se Carrez I (9), důkladně se promíchá, poté se přidá Carrez II (10) a opět se pečlivě promíchá. Následně se doplní 100 ml odměrná baňka vodou (4) po rysku, důkladně se promíchá a přefiltruje. Alikvotní podíl filtrátu se přefiltruje přes 0,45 µm nástřikový filtr.

Obr. 5. Odtučnění vzorku na vortexu.

Obr. 6. Odstředění vzorku.

Obr. 7. Sonifikace vzorku v ultrazvukové lázni při 40 °C.

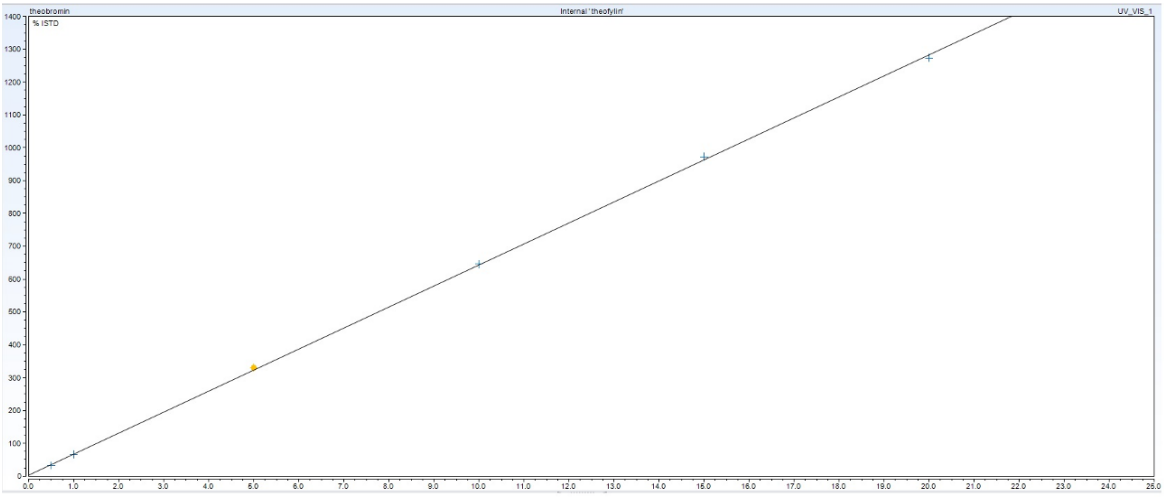
2.2.5 Chromatografické stanovení

Kalibrace

Do šesti odměrných baněk o objemu 10 ml se napipetuje 200 µl roztoku interního standardu 7-(ß-hydroxyethyl)theofylinu o koncentraci 100 µg/ml (15). Potom se postupně do těchto baněk přidá zásobní roztok theobrominu o koncentraci 125 µg/ml (12) v objemech (40, 80, 400, 800,

1200, 1600) µl. Kalibrační roztoky se doplní vodou (4) po značku. Získáme řadu kalibračních roztoků (0,5, 1, 5, 10, 15 a 20) µg/ml (mg/l) theobrominu.

Ke kvantifikaci theobrominu se použije metoda vnitřního standardu.



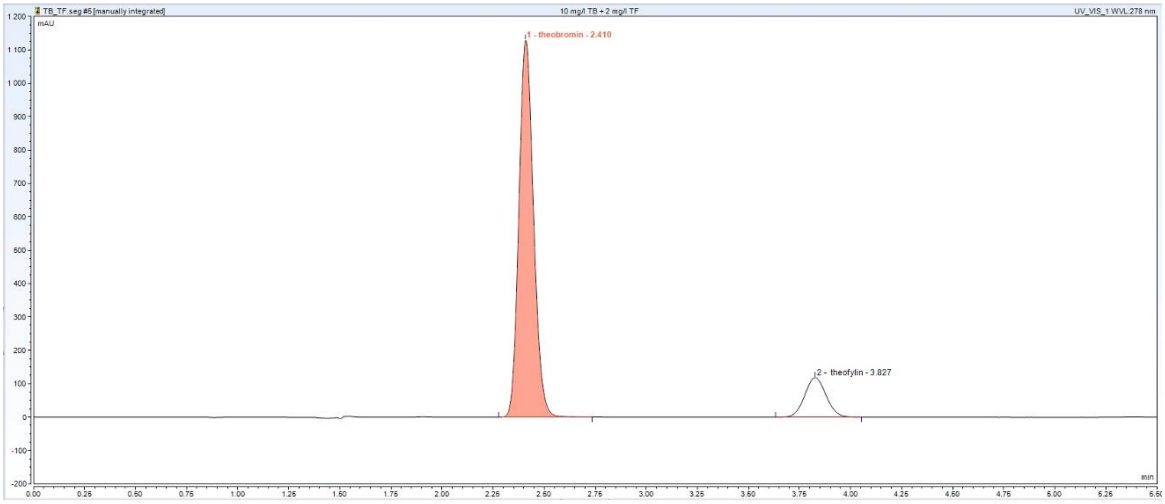
Obr. 8. Kalibrační přímka theobromine.

Separační podmínky

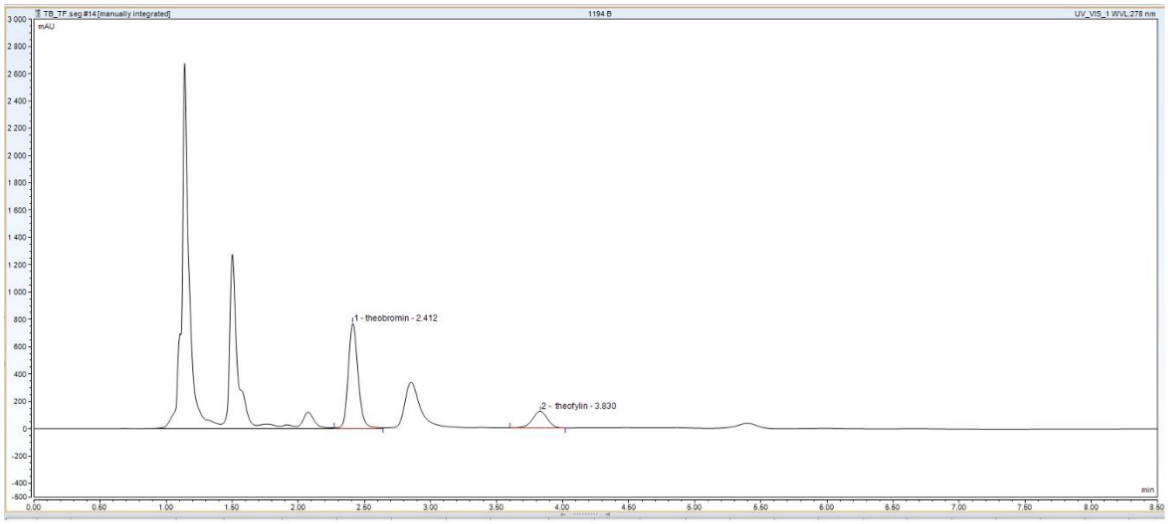
Kalibrační roztoky i extrakty zkušebních vzorků se měří za následujících separačních podmínek chromatografického systému (tab. č. 2).

Tab. 2. Podmínky chromatografického stanovení.

Kolona	C_{18}-reverzní fáze, Nucleodur Polar Tec 5 µm, (150 × 3,0) mm
Mobilní fáze	(20)
Průtok mobilní fáze	0,65 ml/min
Teplota kolony	30 °C
Detektor UV	278 nm
Objem nástřiku	20 µl
Retenční čas	Theobromin 2.41 min , theophylin 3,83 min.



Obr. 9. Chromatogram theobrominu a theophylinu.



Obr. 10. Chromatogram theobrominu a theophylinu reálného vzorku.

2.2.6 Výpočet

Ke kvantifikaci theobrominu se použije metoda vnitřního standardu. Poměr plochy píku theobrominu a plochy píku 7-(ß-hydroxyethyl)theofylinu se vynese proti koncentraci theobrominu odpovídajících kalibračních standardů, stanoví se sklon a úsek kalibrační přímky.

Koncentrace theobrominu v nastříknutém roztoku:

$$C_e = \frac{{A_1}/{A_2} - a}{b} \times \frac{c}{d}$$

Ce koncentrace theobrominu v extraktu (µg/ml),

A1 plocha píku theobrominu,

A2 plocha píku 7-(ß-hydroxyethyl)theofylinu,

a úsek z kalibračního grafu,

b sklon z kalibračního grafu,

c koncentrace 7-(ß-hydroxyethyl)theofylinu ve výchozím 100 ml extraktu vzorku (µg/ml),

d koncentrace 7-(ß-hydroxyethyl)theofylinu v kalibračním standardu (µg/ml).

Koncentrace theobrominu ve vzorku:

$$C_s = C_e \times \frac{V}{m}$$

Cs koncentrace theobrominu ve vzorku (mg/kg)

Ce koncentrace theobrominu v extraktu (µg/ml)

V extrakční objem (ml)

m hmotnost vzorku (g)

3 Výsledky

Bylo vybráno 18 vzorků krmných směsí z cílené kontroly na theobromin a v těchto vzorcích byl stanoven obsah theobrominu podle JPP ÚKZÚZ 10542.2 a podle ČSN EN 17270. Oběma postupy byl také analyzován certifikovaný materiál CRM 66 (Muva-S-0819 Nougat). Získané hodnoty byly zpracovány pomocí programu EffiValidation 4.0. Porovnání výsledků bylo provedeno t-testem. Naměřené hodnoty a vyhodnocení je uvedeno v tabulkách č. 3 až č. 6.

Tab. 3. Správnost – Omezený koncentrační rozsah, referenční materiál k dispozici.

Vzorek	Měření				Průměr mg/kg
	1.	2.	3.	4.	
CRM 66 JPP ÚKZÚZ 10542.2	790,6	791,2	817,5	776	793,8
CRM 66 ČSN EN 17270	807,7	791,5	767,1	782,8	787,3

Tab. 4. Vyhodnocení: Správnost – Omezený koncentrační rozsah, referenční materiál k dispozici.

Vzorek	Ref. Hodnota	Naměřeno	Výtěžnost	Referenční přesnost	Přesnost	Hypotéza o přesnosti	Hypotéza o správnosti
	mg/kg	mg/kg	%	mg/kg	mg/kg		
CRM 66 ČSN EN 17270	788	787,3	99,91	40	16,95	přijata	přijata
CRM 66 JPP ÚKZÚZ 10542.2	788	793,8	100,7	40	17,27	přijata	přijata

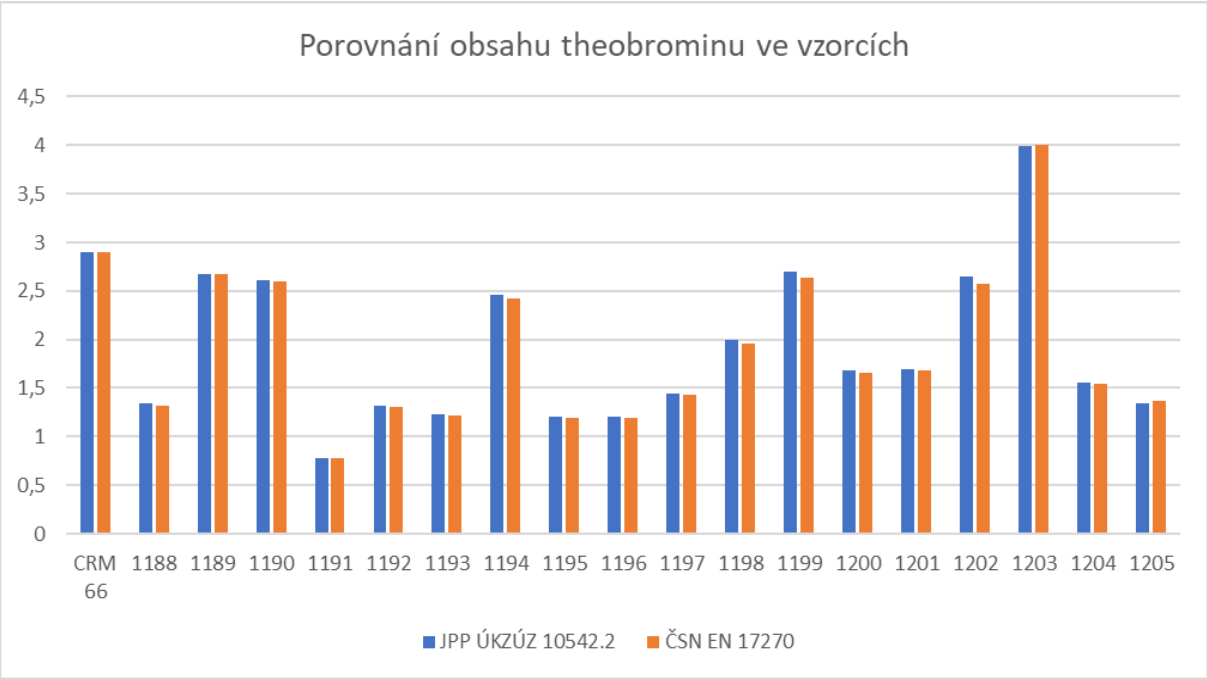
Tab. 4 Hodnoty obsahu theobrominu v mg/kg.

Číslo vzorku	Materiál	JPP ÚKZÚZ 10542.2	ČSN EN 17270
CRM 66	Nugát	793,8	787,3
1188/2021	Komplet. KS pro prasata	22,00	20,59
1189/2021	Doplňková KS ostatní (hosp. zvířata)	477,5	470,4
1190/2021	Doplňková KS ostatní (hosp. zvířata)	404,7	400,5
1191/2021	Komplet. KS pro selata (ČOS)	6,047	5,931
1192/2021	Komplet. KS pro předvýkrm prasat A1	20,62	20,03
1193/2021	Komplet. KS pro užitkové nosnice	16,91	16,38
1194/2021	Komplet. KS pro chov prasat	291,6	261,7
1195/2021	Komplet. KS pro chov prasat	16,09	15,47
1196/2021	Komplet. KS pro selata (ČOS)	16,16	15,58
1197/2021	Komplet. KS pro předvýkrm prasat A1	27,39	26,82
1198/2021	Komplet. KS pro selata (ČOS)	98,02	91,06
1199/2021	Dopl. KS jiná (směs krmných surovin)	501,8	427,3
1200/2021	Komplet. KS pro chov prasat	48,59	45,60
1201/2021	Komplet. KS pro selata (ČOS)	49,55	48,08
1202/2021	Doplňková KS ostatní (hosp. zvířata)	446,9	373,6
1203/2021	Kakaové slupky	9760	10221
1204/2021	Komplet. KS pro selata (ČOS)	36,24	35,03
1205/2021	Komplet. KS pro výkrm králíků	22,19	23,05

Tab. 5 Srovnání 2 metod – t-test na rozdíl výsledků.

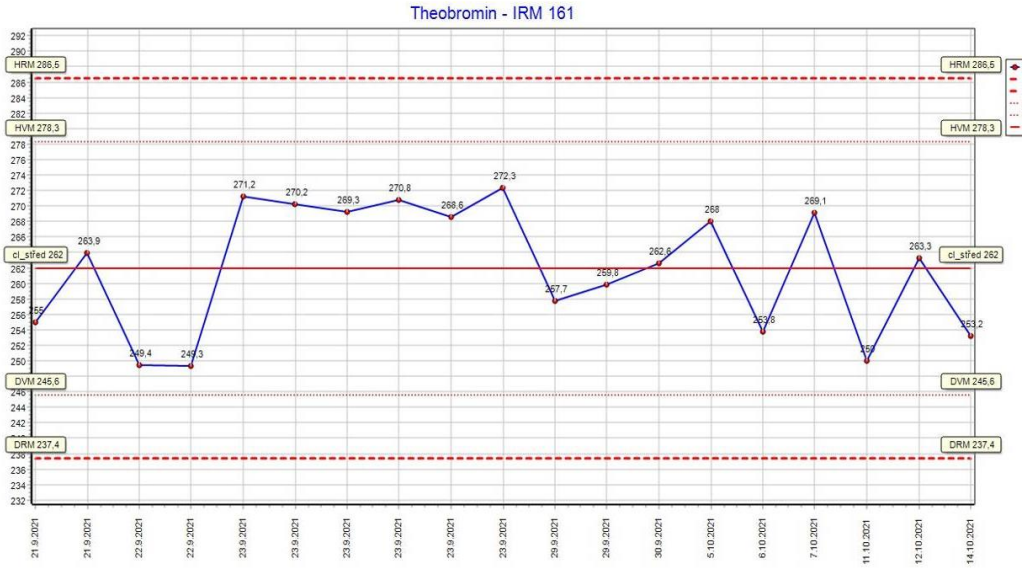
Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Výtěžnost	Hypotéza
-12,1757	108,2798	-62,8376 – 38,4862	104,82	přijata

Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 90 % až 110 %.



Obr. 11. Grafické znázornění výsledků theobrominu ve vzorcích z tabulky č. 5.

V každé analytické várce se analyzoval interní referenční materiál IRM 161, který je navázán na certifikovaný materiál CRM 66. Hodnoty IRM 161 se pohybovaly ve varovných mezích regulačního diagramu pro obě metody, viz. obrázek č. 13.



Obr. 13 Regulační diagram theobrominu - IRM 161.

4 Diskuze

Výsledky zjištěné metodou podle ČSN EN 17270 poskytují ve většině případů nižší hodnoty obsahu theobrominu než u srovnávané metody JPP ÚKZÚZ 10542.2.

Jedním z důvodů, proč tomu tak je, může být přílišná manipulace se vzorkem v průběhu samotné extrakce vzorku u ČSN EN 17270, kdy se supernatant po odstřeďování odlévá jako nežádoucí zbytek. Toto je nejkritičtější část samotné extrakce, neboť při odlévání dochází k „utržení“ a zvíření lehčích částic, které po centrifugaci zůstávají v nejsvrchnější vrstvě. Zároveň dochází k ulpívání části vzorku na stěnách centrifugační zkumavky. Tato operace je prováděna celkem třikrát pro každý vzorek. Současně není normou nijak definována samotná doba a intenzita extrakce hexanem.

Jako problematické se jeví normou požadovaná předúprava vzorku na jemnějších sítech (0,2 mm). Vzhledem k vysokému zastoupení tukové složky v reálných vzorcích dochází při předúpravě k zanášení síta a potenciální ztrátě analytu již v této fázi.

Dalším kritickým místem může být použití Carrezova činidla během úpravy vzorku. Nelze vyloučit, že samotný analyt se účastní vločkotvorby při čiření roztoku Carrezovým činidlem.

To, že by byly hodnoty poskytované metodou ČSN EN 17270 nižší, není statisticky signifikantní, nicméně v případě implementace metody by bylo dobré ověřit vliv identifikovaných kritických míst.

Obr. 14. Ulpívání vzorku na stěnách centrifugační zkumavky.

5 Závěr

V rámci vývojového úkolu bylo ověřeno, že akreditovaná metoda JPP ÚKZÚZ 10542.2 a ČSN EN 17270 poskytují statisticky srovnatelné výsledky obsahu theobrominu ve vzorcích krmných směsí i v certifikovaném materiálu. Výsledky byly zpracovány pomocí statistického programu EffiValidation 4.0. s výsledkem, že srovnávané analytické metody poskytují statisticky signifikantní výsledky. Vypočtená hodnota výtěžnosti vyhovuje kritériu přijatelnosti 90 % až 110 %.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem je vhodné pokračovat s již implementovanou akreditovanou metodou JPP ÚKZÚZ 10542.2. U metody ČSN EN 17270 je až příliš mnoho kritických míst vycházejících především z komplikovaného postupu při úpravě vzorku. Tato kritická místa mohou být zdrojem potenciálních chyb při analýze, pokud by zůstaly aplikovány v současném znění bez možnosti je jakkoliv redukovat, či možnosti jejich přínos k chybovosti zkoumat a následně jej eliminovat.

6 Literatura

1. JPP ÚKZÚZ, postup č. 10542.2.
2. ČSN EN 17270.

Stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky metodou HPLC

Radvana Šulová, Adriána Dobošová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Brno, Hroznová 2, 603 00 Brno
radvana.sulova@ukzuz.cz

1 Úvod

Pohanka setá patří k nejmladším plodinám v Evropě. V Čechách a na Moravě byla pěstována hlavně v podhorských oblastech. Pohanka setá se jeví jako vhodná plodina pro výrobu zdravých a funkčních potravin, protože má vysokou nutriční hodnotu a průkazné pozitivní účinky na lidské zdraví (1). Na českém území je pohanka nejvýznamnějším zdrojem rutinu. Jeho množství závisí na odrůdě pohanky a také na množství přijatého slunečního záření. Obsah rutinu v pohance se v různých částech rostliny liší. Tepelným zpracováním pohanky však obsah rutinu klesá (2).

V současné době existuje v ČR mnoho studií zabývajících se obsahem rutinu v pohance a jiném rostlinném materiálu. Mezi často používané metody patří především spojení kapalinové chromatografie s UV detekcí nebo MS detekcí, spektrofotometrické metody nebo v menší míře i elektrochemické metody (4).

Úkolem této práce bylo připravit vhodný extrakční případně čisticí postup tak, aby mohl být rutin v nažkách pohanky stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s DAD.

2 Teoretická část

Popis rostliny

Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum*) je jednoletá rostlina z čeledi rdesnovitých. Nepatří mezi obiloviny, ale je nazývána pseudoobilovinou, protože má moučná zrna jako obilí. Do této čeledi patří spolu s laskavcem a merlíkem. Po celém světě se pěstují dva druhy pohanky: pohanka setá *(Fagopyrum esculentum)* a pohanka tatarská *(Fagopyrum tataricum).* Pohanka setá se pěstuje

a používá běžně, zatímco pohanka tatarská se pěstuje v hornatých regionech. Pohanka obsahuje draslík, fosfor, vápník, železo, měď, mangan, zinek. Dále má relativně vysoký obsah vlákniny a obsahuje vitaminy skupiny B, cholin a tokoferol. Jejími primárními antioxidanty - flavonoidy jsou rutin, kvercetin, hyperin a katechiny (6).

Obrázek č. 1. Pohanka obecná (Fagopyrum esculentum).

Plody jsou trojboké nažky s hladkými, ostrými hranami. Kromě běžných nažek trojhranného tvaru, vyskytují se i nažky čtyřhranné (obyčejně do 4 %) a velmi ojediněle i dvojhranné a pětihranné. Podle velikosti zrna patří naše povolené krajové odrůdy k odrůdám se středně velkými zrny, jejichž délka se pohybuje v průměru od 5,3 mm do 6,8 mm. Barva oplodí bývá narezavělá nebo tmavě skořicová, světle šedá až tmavě šedá, a přitom je oplodí buď jednobarevné nebo mramorované (3).

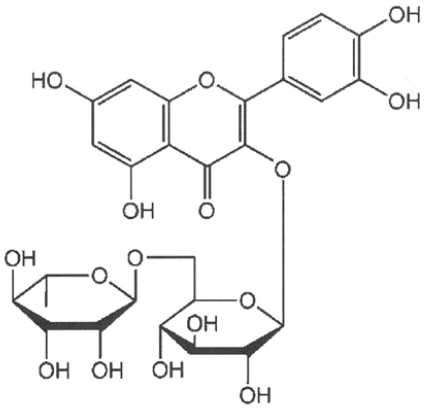
Obrázek č. 2. Plody pohanky – nažky.

Flavonoidy

Flavonoidy jsou běžnými sekundárními metabolity vyšších rostlin. Zejména jsou známy jako barevné pigmenty květů. Mnoho flavonoidů se uplatňuje jako rostlinná barviva. Nejznámější skupinou barviv jsou flavony (anthoxanthiny). Příkladem je flavonový glykosid rutin. Flavonoidy mají charakteristicky nízkou molekulovou hmotnost a hojně se vyskytují v rostlinných tkáních. V lidském těle vykazují mnoho biologických účinků – antioxidační, antialergenní, antibakteriální, antivirové a antikarcinogenní. Tyto znaky jim udělují farmakologické vlastnosti užitečné pro léčbu nemocí (6).

Rutin

Rutin je složený disacharid rutinosy (zbytek glukosy a rhamnosy a kvercetinu (kvercetin-3-rutinosid), také nazývaný vitamínem P. Fenolová část je spojena s cukrem – hydrofilní část molekuly. Vyššími rostlinami je syntetizován jako obrana vůči ultrafialovému záření a chorobám. Rutin má pozitivní účinky při léčení zvýšené křehkosti a propustnosti krevních vlásečnic. Je také významným antioxidantem (schopnost působit proti volným radikálům). Dále snižuje vysoký krevní tlak a snižuje riziko arteriosklerózy (ucpání tepen). Rutin je široce přítomný v rostlinách, ale jeho obsah se liší v závislosti na části rostliny. Byl poprvé stanoven v routě vonné (*Ruta graveolens*), která dala název této důležité látce. Je obsažen v čaji, v listech tabáku, v kůře některých stromů a mezi nejdůležitější potraviny obsahující rutin patří ovoce, zelenina, obiloviny, hrozny a pohanka. Rutin patří k nejčastěji studovaným flavonoidům. Je to dáno jeho významnou biologickou aktivitou (6).



Obrázek č. 3: Vzorec rutinu.

Využití pohanky

Pohanka se využívá:

- v potravinářství (konvenční i dietní potravina),
- jako léčivá rostlina pro zpracování ve farmaceutickém průmyslu,
- jako meziplodina k obnově půdní úrodnosti, ke zlepšení struktury pro následné plodiny,
- jako krmivo,
- jako medonosná plodina.

Pohanka má poměrně krátkou růstovou dobu, která jí umožňuje dozrávat i v méně příznivých oblastech a vyšších polohách. Sklízí se v srpnu až září, když většina nažek zhnědne. Pohanka je ceněna díky své vysoké biologické hodnotě bílkovin, vyváženému složení esenciálních animokyselin, vysokému obsahu vlákniny a škrobu, příznivému zastoupení mastných kyselin v tuku. Nažky pohanky jsou cenným zdrojem minerálních látek, vitamínů především vitamíny B_1, B_2, B_3, B_6 a vitamín E, obsahují však i některé antinutriční látky jako jsou inhibitory proteas, taniny a fytáty. Chemické složení se mění vlivem různých podmínek (klimatické podmínky, oblast pěstování, vlastnosti půdy atd.) v jednotlivých letech.

Velmi významnou složkou pohanky je rutin, který patří mezi přírodní antioxidanty.

Obsah rutinu je v jednotlivých částech pohanky různý. Nejmenší je v loupaných nažkách a postupně obsah rutinu roste v neloupaných zrnech, klíčících zrnech, kořeni, v lodyhách a stopkách, květech, mladé rostlině, nati a nejvíce rutinu je obsaženo v listech rostliny.

Nejvyšší obsah byl nalezen v pohankových listech, ale pohankové natě se používají častěji jako zdroj rutinu, protože technologie sběru natě je jednodušší než u sběru listů. Sušené pohankové natě obsahují 100krát více rutinu než pohankové nažky.

Rutin se extrahuje ze zelené nebo sušené natě a na trh se dostává ve formě tablet. Mnohem přirozenější jsou pohankové čaje (pohanková nať a slupky). Pohanka se pro čaj sbírá před květem, protože v tomto období obsahují pohankové natě nejvíce rutinu.

Tabulka č. 1. Porovnání obsahu fenolických látek a rutinu v obilovinách a pohance.

	Celkový obsah fenolických látek (mg/kg)	Rutin (mg/kg)
Pohanka - loupané nažky	3303	178
Pohanka - neloupané nažky	3903	184
Pohanka - listy	39514	23443
Oves	1138	< 0,1
Ječmen	2168	< 0,1

Pohankové zrno určené pro potravinářské účely musí být důkladně vyčištěno a zbaveno všech příměsí, tzn. pohankové nažky, které jsou na povrchu obaleny tvrdým tmavým oplodím, musí být těchto plev zbaveny.

Jedním z hlavních aspektů kvality potravinářské pohanky je čerstvost. Při dlouhém skladování se ztrácí některé látky významné pro chuť a vůni.

Základním výrobkem při zpracování pohanky mletím jsou celá zrna, obchodně označovaná jako pohankové krupky celé (příloha do polévek, nádivek a nákypů), případně pohankové krupky lámané (lámanka − pohanková kaše, do pomazánek, polévek a knedlíků). Mezi samostatné výrobky dále patří pohanková krupice (do kaší, zavářek, halušek) a pohanková mouka našedlé barvy, která se míchá i s dalšími druhy mouk pro přípravu různých druhů těstovin, chleba. Dalšími mlynářskými výrobky z pohanky mohou být extrudované pohankové křupky a pohankové vločky.

Pohanková nať a slupky se využívají pro přípravu čaje s léčivými účinky.

Kromě mlynářských výrobků určených pro potravinářské při vyloupání pohanky i odpady, které lze použít ke krmení (3).

Analytické metody na stanovení rutinu

Obsah rutinu i dalších fenolických sloučenin v přírodních materiálech může být stanoven různými separačními metodami. Patří mezi ně například vysokoúčinná kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, kapilární nebo mikročipová elektroforéza, fluorescenční analýza, elektrochemické metody, UV spektroskopie a chemická luminiscence. Mezi těmito metodami je pro detekci rutinu a ostatních flavonoidů nejčastěji používaná kapalinová chromatografie díky snadné reprodukovatelnosti, ale zároveň tato metoda vykazuje některé nevýhody jako jsou komplikované přípravné operace před měřením. Mezi dalšími

metodami detekce pak vyniká fluorescenční analýza, která spojuje výhody jednoduché obsluhy, rychlosti, vysoké citlivosti a selektivity detekovaných látek. Fluorescence komplexu rutinu s yttriem (rutin-Y^{3+}) je pak měřena v 1,0 cm křemenných kyvetách při exitační a emisní vlnové délce 380 nm resp. 540 nm. K nejběžněji používaným metodám na stanovení obsahu rutinu případně dalších flavonoidů patří kapalinová chromatografické s UV/VIS, DAD nebo MS detekcí (7).

3 Experimentální část

Na základě literární rešerše byl vybrán postup na stanovení obsahu rutinu v pohance metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím detektoru diodového pole. Podmínky měření byly optimalizovány pomocí standardu rutinu. Bylo odzkoušeno několik extrakčních a čisticích postupů. První byl vyzkoušen postup popsaný v Českém lékopisu (10). Jako druhý pak extrakční postup směsí methanol, voda, kyselina octová v ultazvukové lázni (6). Třetí postup byl testován postup podle metodiky používané v Národnom poľnohospodárskom a potravinárskom centre, VÚP Bratislava (18). Čtvrtým postupem byla extrakce methanolem na Soxhletově extraktoru IKA (15) s následným přečištěním pomocí extrakce na pevnou fázi (SPE).

Jako nevhodnější extrakce pro stanovení rutinu v nažkách pohanky seté byla vybrána, testována a následně zvolena extrakce vzorku pomocí extrakční směsi methanol, voda, kyselina octová (6). Bylo provedeno ověření navržené metody na vzorcích nažek pohanky seté a následně provedena validace metody.

3.1 Metoda na stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky seté

3.1.2 Princip metody

Extrakce rutinu z pomletého vzorku nažek pohanky seté se provede směsí methanol, voda, kyselina octová v ultrazvukové lázni. Po odstředění vzorku v odstředivce a filtraci získaného eluátu přes stříkačkový filtr se rutin následně stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí v UV oblasti při 355 nm.

3.1.3 Chemikálie

Chemikálie jsou analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.

2 Methanol, čistota pro HPLC.

3 Acetonitril, čistota pro HPLC

4 Kyselina octová, 99,0 % (m/m), $\rho(CH_3COOH) = 1,05$ g/ml.

5 Kyselina octová, roztok c $(CH_3COOH) = 2\%$

Příprava: Do odměrné baňky 1000ml se odměří 20 ml kyseliny octové (4) a doplní vodou (1) po značku. Směs se důkladně promíchá.

6 Mobilní fáze.

kyselina octová (5): ACN (3): Metanol (2) = 75:15:10

Příprava: Smíchá se 750 ml kyseliny octové (5), 150 ml acetonitrilu (3) a 100 ml methanolu (2). Směs se důkladně promíchá.

7 Methanol, 50% vodný roztok.

Příprava: Do 500 ml odměrné baňky se odměří 250 ml methanolu (2) a doplní vodou (1) po značku.

8 Extrakční směs.

Příprava: Smíchá se 100 ml metanolu (2), 2 ml kyseliny octové (4) a 100 ml vody (1). Směs se důkladně promíchá.

9 Rutin hydrát s čistotou > 94 %.

10 Rutin, zásobní roztok, c= 0,5 mg/ml

Příprava: 25 mg rutinu (9) se rozpustí v 50 ml metanolu (7).

11 Sada kalibračních roztoků rutinu.

Ze zásobního roztoku rutinu se připraví řada kalibračních roztoků o koncentraci 1,25 μg/ml až 150 μg/ml rutinu v metanolu (7).

3.1.4 Přístroje a pomůcky

1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent 1100 a 1260 s detektorem diodového pole.

2 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.

3 Minitřepačka typu Vortex.

4 Ultrazvuková lázeň.

5 Odstředivka laboratorní.

6 Stříkačkové filtry (PTFE, 0,45 μm), injekční stříkačky, objem 5 ml.

7 Sušárna.

8 Automatické pipety s nastavitelným objemem, špičky.

9 Vialky se šroubovacím uzávěrem, objem 2 ml.

10 Běžné laboratorní sklo.

11 Laboratorní mlýnek ZM 200.

3.1.5 Odběr laboratorního vzorku

Vzorky odebírá technický odbor Národního odrůdového úřadu, nebo Oddělení ekologického zemědělství ze Sekce rostlinné výroby ÚKZÚZ Brno.

3.1.6 Příprava zkušebního vzorku

Laboratorní vzorek se po odstranění nečistot důkladně promíchá a kvartací se připraví zkušební vzorek, který se pomele na laboratorním mlýnu ZM 200 rychlostí 14000 ot./min na sítě s velikostí ok 0,25 mm. Pomletý materiál se uchovává v uzavíratelné plastové nádobě při laboratorní teplotě.

3.1.7 Extrakce rutinu

Před vlastní extrakcí se provede aktivace obsahu rutinu v pohance tím, že se pomletý vzorek vloží do sušárny na 30 min. při teplotě 150 °C, pak se ihned vloží do exsikátoru, kde se nechá vychladnout při laboratorní teplotě. Do 25ml plastové falkonovy zkumavky se naváží 0,5 g zchladlého pomletého vzorku. Přidá se 10 ml extrakční směsi (8), baňka se uzavře šroubovacím uzávěrem a vzorek se extrahuje v ultrazvukové lázni 60 min při teplotě asi 30 °C. Během extrakce se každých 10 min vzorek protřepe na minitřepačce (3). Poté se vzorek odstřeďuje 5 min rychlostí 3900 ot/min. Takto připravený extrakt se přefiltruje přes stříkačkový teflonový filtr s velikostí pórů 0,45 um a průměrem filtru 25 mm do 2ml vialky (6).

3.1.8 Chromatografické stanovení

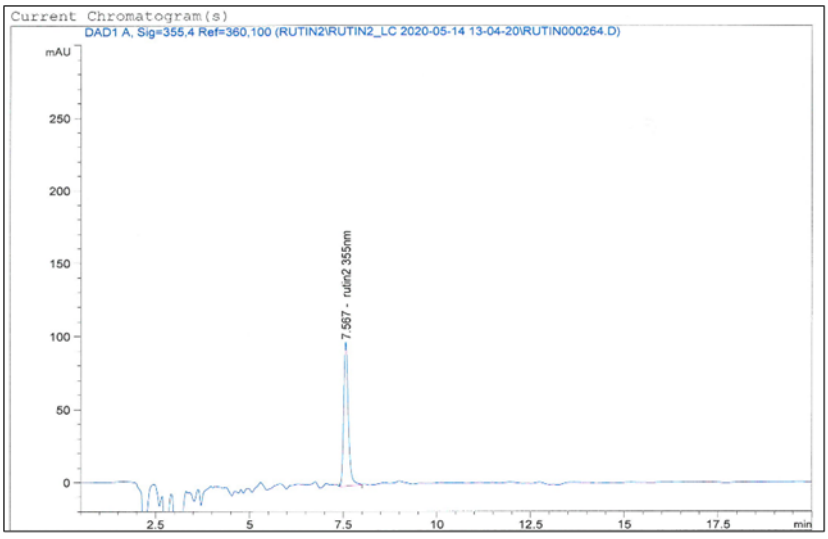
Vlastní analýza se provádí metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím detektoru diodového pole. Rutin se separuje izokratickou elucí na chromatografické koloně s reverzní fází C18 detekuje při 355nm. Nastavení chromatografických podmínek je uvedeno

v tabulce č. 2. Chromatogramy získané při analýzách vzorků nažek pohanky jsou na obrázcích č. 4 a 5.

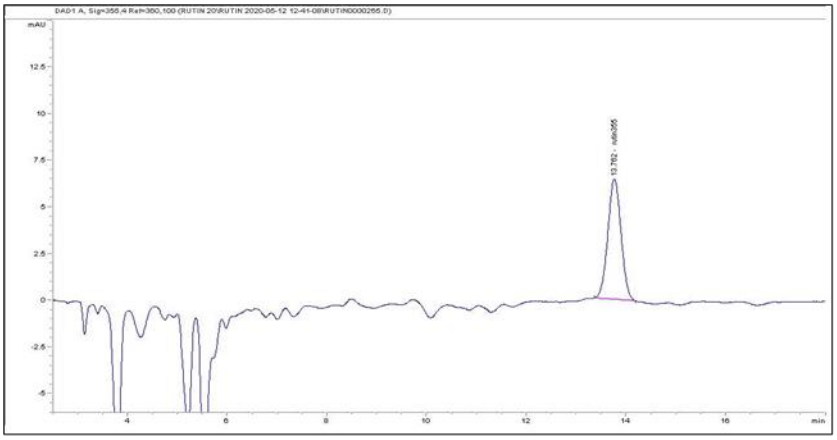
Tabulka č.2. Chromatografické podmínky.

Kolona	HPLC 1260: Kinetex (15 cm × 4,6 mm ID, 2,6 µm) pevné jádro HPLC 1100: Luna (25 cm × 4,6 mm ID, 4,6 µm)
Předkolona	Pursuit 5 C 18 (1,0 cm × 4,6 mm ID)
Mobilní fáze	2% CH_3COOH : ACN: MeOH v poměru 75:15:10
Průtok mobilní fáze	0,7 ml/min
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	20 µg
Detekce	355 nm

Rutin se identifikuje srovnáním retenčního času standardu s retenčními časy píku v analyzovaném vzorku. Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnějšího standardu. Pro stanovení rutinu v nažkách pohanky se připraví nejméně sedmibodová kalibrační přímka v rozsahu 1,25 µg/ml až 150 µg/ml rutinu v 50 % methanolu. Kontroluje se linearita kalibračního grafu.



Obrázek č. 4. Chromatogram reálného vzorku nažek pohanky – lámanky HPLC 1260 při 355 nm.



Obrázek č. 5. Chromatogram reálného vzorku nažek pohanky – lámanky HPLC 1100 při 355 nm.

3.1.9 Výpočet

Obsah rutinu ve vzorku se vypočítá z kalibrační závislosti. Sestrojí se graf závislosti plochy píku rutinu na koncentraci v požadovaném rozsahu. Ze směrnice kalibrační přímky se zjistí koncentrace rutinu a jeho obsah vyjádřený v mg/kg se vypočítá v závislosti na použití extrakční metody podle níže uvedených vztahů:

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

kde x je obsah rutinu ve vzorku v mg/kg
c koncentrace rutinu zjištěná z kalibrační závislosti v μg/ml,
V objem extrakční směsi
m navážka vzorku v g,

3.2 Výsledky a diskuse

3.2.1 Optimalizace postupu

V současné době neexistuje v České republice závazná norma pro stanovení rutinu ve vzorcích nažek pohanky seté. V literatuře bylo nalezeno několik vhodných extrakčních a čisticích postupů umožňujících následnou analýzu na HPLC. Jednalo se o extrakce jak v systému kapalina-kapalina, tak i využití extrakce s čištěním na pevné fázi. Po prvotním odzkoušení těchto metod (viz. kapitola *Extrakce vzorku*), byla pro další práci vybrána extrakce (6) pomocí

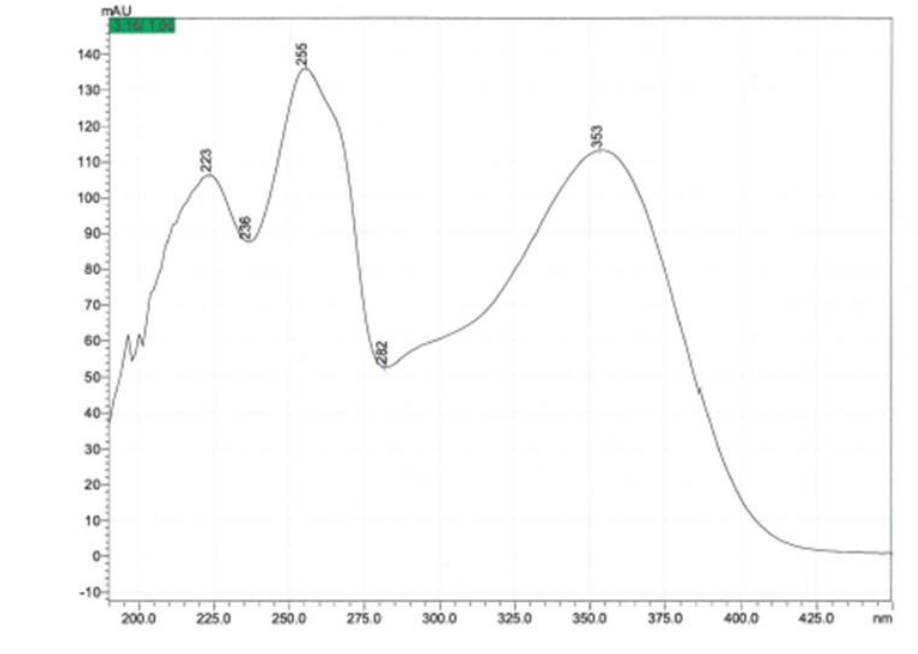
extrakční směsi methanol, kyselina octová, voda. Pomocí standardu rutinu byly optimalizovány podmínky pro měření na HPLC.

Pro ověření a provedení validace metody byly použity vzorky nažek pohanky loupané, neloupané a lámanky zakoupené v obchodní síti. Získané výsledky byly porovnány a statisticky vyhodnoceny. Při ověřování metody se testoval vliv doby extrakce a množství vzorku pro extrakci na výsledný obsah rutinu. Byly stanoveny základní validační parametry metody: opakovatelnost, střední přesnost, správnost, linearita, citlivost, meze detekce a nejistota stanovení.

Součástí vývojového úkolu bylo stanovení stability rutinu v připraveném pomletém materiálu před extrakcí a také časová stabilita extraktu vzorku pro analýzu na HPLC.

Chromatografické podmínky

Při výběru kolony a nastavení chromatografických podmínek se vycházelo z práce zabývající se kapalinovou chromatografií stanovení rutinu v extraktu pohanky (6). Na pracovišti proběhlo testování na dvou HPLC přístrojích – HPLC 1260 a HPLC 1100. Pro HPLC 1260 byla použitá analytická kolona s reverzní fází Kinetex (15 cm × 4,6 mm ID, 2,6 μm) pevné jádro a předkolona Pursuit 5 C 18 (1,0 cm × 4,6 mm ID), pro HPLC 1100 byla použitá analytická kolona Luna (25 cm × 4,6 mm ID, 4,6 μm) s předkolonou Pursuit 5 C 18 (1,0 cm × 4,6 mm ID). Rutin se metodou HPLC nejčastěji stanovuje na dvou vlnových délkách 255 nm a 355nm (10). Pro odzkoušení byly testovány obě vlnové délky, kde rutin vykazuje charakteristická absorpční maxima a základní linie je během analýzy stabilní. Správnost volby byla potvrzena změřením absorpčního spektra pro standard rutinu viz. obrázek č. 6. Pro další měření byla zvolena vlnová délka 355nm.



Obrázek č. 6. Absorpční spektrum rutinu.

Tabulka č. 3. Stanovení citlivosti rutinu při vlnové délce 355 nm.

Analyt	**Citlivost (plocha/ug)**
	Měření při 355 nm
Rutin HPLC 1260	86,03
Rutin HPLC 1100	139,67

Tabulka č. 4. Porovnání výsledků stanovení rutinu při vlnové délce 255 nm a 355 nm na HPLC 1260 použitá kolona s pevným jádrem Kinetex (15 cm × 4,6 mm ID, 2,6 m) a předkolona Pursuit 5 C 18 (1,0 cm × 4,6 mm ID).

	Vlnová délka	**Měření č. (obsah rutinu mg/kg)**						**Průměr (mg/kg)**	**Směrodatná odchylka**
		1.	**2.**	**3.**	**4.**	**5.**	**6.**		
Arax	**255 nm**	180,72	175,64	178,78	180,12	180,48	180,40	**179,36**	**1,95**
	355 nm	178,96	179, 94	179,82	178,58	181,48	182,12	**180,19**	**1,55**
Lámanka	**255 nm**	200,44	201,04	202,82	202,64	200,50	200,66	**203,68**	**1,09**
	355 nm	201,06	201,66	203,66	202,80	203,08	203,34	**202,55**	**1,02**
Pohanka neloupaná	**255 nm**	396,46	396, 04	385,16	381,02	385,86	385,22	**386,74**	**5,76**
	355 nm	373,84	374,94	365,08	364,02	378,18	378,44	**372,42**	**6,36**

Tabulka č. 5: Porovnání výsledků stanovení rutinu při vlnové délce 255 nm a 355 nm na HPLC 1100 použitá kolona Luna (25 cm × 4,6 mm ID, 4,6 µm) a předkolona Pursuit 5 C 18 (1,0 cm × 4,6 mm ID).

.	Vlnová délka	Měření č. (obsah rutinu mg/kg)						Průměr (mg/kg)	Směrodatná odchylka
		1.	2.	3.	4.	5.	6.		
Arax	**255 nm**	174,78	172,22	174,70	179,40	177,46	176,94	**175,92**	**2,31**
	355 nm	186,06	184,6	185,24	184,16	190,14	187,42	**186,27**	**2,03**
Lámanka	**255 nm**	166,30	159,04	165,32	158,80	158,42	164,44	**162,05**	**3,35**
	355 nm	178,06	174,74	182,40	183,40	177,18	175,02	**178,47**	**3,35**
Pohanka neloupaná	**255 nm**	362,48	364,36	352,76	352,12	353,36	358,22	**357,22**	**4,84**
	355 nm	419,82	419,92	408,24	407,60	408,78	411,08	**412,57**	**5,27**

Vliv skladování pomletého vzorku na extrakci

Pro mletí vzorku nažek pohanky i lámanky bylo vybráno mletí na ultraodstředivém mlýnku Retsch ZM 200 za použití síta s velikostí ok 0,25 mm. Při volbě velikosti ok na sítě se vycházelo z rigorózní práce (11), kde byly vzorky mlety přes síto 0,35 mm. Byl studován vliv skladování pomletého vzorek na jeho extrakci. Důvodem bylo ověření, zda je nutné po mletí provést extrakci ve stejném dni, kdy byl vzorek pomletý nebo zda je možné extrakci vzorku provést jiný den.

Extrakce vzorku

Problematikou stanovení rutinu z nažek pohanky metodou HPLC se laboratoř zabývá již několik let. Jako první byl zkoušen postup uváděný v Českém lékopisu. Práce, z níž bylo čerpáno, byla popsána v rámci rigorózní práce (11). Tato práce byla zaměřena na určení antiradikálové aktivity extraktů nati a plodů *Fagopyrus exculentum* Moench (pohanka obecná), kde byla použita metoda HPLC podle ČSL 2009. Podle této metodiky se rutin ze vzorku nažek extrahuje 80% methanolem ve vodní lázni 60 °C, po dobu 30 min s následnou 15min extrakcí v ultrazvukové lázni. Po ochlazení a filtraci extraktu se získaný vzorek analyzuje na HPLC s DAD detektorem při vlnové délce 350 nm. Rutin se stanoví gradientovou elucí na koloně s reverzní fází LiChrospher RP-18 250 × 4 mm (5um) s předkolonou za použití mobilní fáze: 5% acetonitril + 0,15 % H_3PO_3. Bylo zjištěno, že tento postup je mnohem vhodnější na stanovení rutinu v pohankové nati než v nažkách pohanky.

Další zkoušený postup byl postup podle podnikové metodiky Stanovenie rutinu v múkach a pekárenských výrobkoch metódou HPLC z Národného poľnohospodárskeho a potravinárskeho centra na Slovensku. Využívá extrakci vzorku 80% methanolem za pomoci třepačky a ultrazvuku. Po centrifugaci se extrakt přefiltruje přes stříkačkový mikrofiltr (0,45 μm) a analyzuje na HPLC s DAD detektorem s kolonou PuroSpher STAR RP-18 endcapované 250 × 4,6 mm, id.,5μm. V metodice byla použita gradientová eluce mobilní fází A methanol, B 0,01M kyselina fosforečná : methanol (95 : 5) s průtokem 1,3 ml/min při vlnové délce 256 nm. Tento extrakční postup byl vyvinutý pro stanovení rutinu ve vzorcích mouky a pečiva. Pro požadované stanovení rutinu v nažkách pohanky se tento postup jevil jako méně vhodný než odzkoušený postup uvedený v kapitole 3.1.7, který vychází z postupu uvedeného v diplomové práci zabývající se stanovením rutinu v extraktech pohanky metodou HPLC (6).

Extrakce vzorku s následným čištěním pomocí SPE

Při hledání vhodného extrakčního postupu pro nažky pohanky byly nalezeny i extrakční postupy s následným čištěním pomocí SPE. Zde se vycházelo z prací (13, 14, 15 a 17), kde se testovalo využití různých typů extrakce i rozpouštědel na extrakci rutinu z různých matric. Jako nejvhodnější se ukázala technika zrychlené extrakce (PSE, ASE) a to jako ve statickém tak i dynamickém módu. Methanol byl, pro svoji vyšší polaritu než ethanol, vybrán jako nejvhodnější extrakční činidlo. Zrychlená extrakce je vysoce efektivní extrakční metoda, u které působící vyšší tlak a teplota zvýší účinnost extrakce.

K extrakci rutinu z nažek pohanky bylo využito extrakce na IKA extraktorech, umožňující extrakci v horkém rozpouštědle v kombinaci s následnou extrakcí chladným rozpouštědlem. Takto získané extrakty vyžadovaly následné čištění pomocí SPE metody. Extrakce podle Soxhleta je vysoce efektivní, avšak je náročnější časově a také na spotřebu rozpouštědla a následně i SPE kolonek. Příprava extraktu a následné čištění pomocí SPE kolonek Oasis HLB se provádí dle postupu uvedeného v poznámce č.1.

Poznámky.

1 *Do nástavce v extraktoru se do papírového čtverce naváží 1 g pomletého vzorku nažek pohanky. Přidá se 100 ml methanolu do spodní extrakční nádoby a systém se spojí. Nastaví se program extrakce se dvěma kroky: a) 1 hod extrahování v horkém rozpouštědle a b) 2 hod extrakce studeným rozpouštědlem. Po ukončení extrakce se oddestiluje větší objemu použitého rozpouštědla. Následně se vzorek ve zbytku extrakčního rozpouštědla převede do 25ml odměrné baňky a doplní po značku methanolem. 10ml extraktu se umístí do koncentrátoru vzorků, kde se extrakt odpaří*

pod proudem dusíku při 40 °C. K odparku se přidá 2 ml (5 ml) methanolu, rozpustí se pomocí ultrazvuku. Následuje přečistění pomocí extrakce na pevnou fázi. Na SPE manifold se umístí kolonka Oasis HLB, kondicionuje se 3 ml methanolu a následně ekvilibruje 3 ml deionizované vody. Poté se na kolonku nanesou 0,5 ml připraveného extraktu. Extrakt se nechá vsáknout, promyje se 2 × 1ml vody. Rutin se eluuje 2 ml methanolu. Do 2 ml vialky se dá 0,5 ml eluátu a 0,5 ml vody a zamíchá se pomocí ultrazvukové lázně. Takto připravený vzorek se analyzuje na HPLC.
Byly zkoušeny i SPE kolonky Oasis MCX cc (60mg) o velikosti 30 μm. Z důvodu nevhodnosti využití kationtových kolonek Oasis MCX (zakalení extraktu) se extrakt čistil na kolonkách Oasis HBL s kapacitou o velikosti 3 ml a s 60 mg sorbentu.

K ověření a porovnání výše uvedených metod byly použity vzorky pohanky seté neloupané, loupané a lámanky lišící se obsahem rutinu. Vzorky byly extrahovány a získané extrakty byly analyzovány na HPLC.

Jako nejvhodnější extrakční postup byl vybrán druhý popsaný postup (6) s aktivací rutinu před extrakcí ve vzorku popsané v metodice (18).

Vliv délky trvání extrakce

Vliv délky trvání extrakce na výsledný obsah rutinu byl sledován u extrakce směsným rozpouštědlem na vzorcích pohanky seté a to neloupané, loupané a lámanky. U extrakce vzorku extrakční směsí v ultrazvukové lázni byly provedeny extrakce v délce 15 min, 30 min a 60 min. Pro každou z variant bylo provedeno 6 opakování. Byly stanoveny obsahy rutinu a vypočítány směrodatné odchylky pro jednotlivé doby extrakce viz. tabulky č. 6 a č.7.

Z uvedených výsledků vyplývá, že doporučená doba extrakce 60 min při extrakci pomocí extrakční směsi v ultrazvukové lázni je dostačující a přesnost stanovení je zcela vyhovující. Při delší době extrakce v lázni docházelo k nadměrnému přehřátí vzorků, což je nežádoucí.

Tabulka č. 6. Porovnání vlivu doby extrakce na obsah rutinu - extrakce extrakční směsí pro HPLC 1260 při 355 nm.

Vzorek	Doba extrakce	Měření č. (obsah rutinu mg/kg)						Průměr (mg/kg)	Směrodatná odchylka
		1.	2.	3.	4.	5.	6.		
Arax	**15 min.**	173,66	170,08	168,78	180,10	170,24	170,00	**172,65**	**4,10**
	30 min.	178,96	179,84	179,82	178,58	181,48	182,12	**180,19**	**1,55**
	60 min.	181,10	180,84	183,06	181,80	181,96	183,38	**182,02**	**1,02**
Lámanka	**15 min.**	199,08	199,86	195,60	195,90	191,66	191,62	**195,62**	**3,51**
	30 min.	201,06	201,66	203,66	202,80	203,08	203,34	**202,55**	**1,02**
	60 min.	204,98	204,64	213,86	214,24	204,94	204,64	**207,88**	**4,78**
Pohanka neloupaná	**15 min.**	361,66	362,36	374,72	374,40	368,40	368,66	**368,37**	**5,62**
	30 min.	373,84	374,94	365,08	364,02	378,18	378,44	**372,42**	**6,36**
	60 min.	401,52	401,24	388,80	388,12	390,78	387,86	**393,07**	**6,52**

Tabulka č. 7: Porovnání vlivu doby extrakce na obsah rutinu - extrakce extrakční směsí pro HPLC 1100 při 355 nm.

Vzorek	Doba extrakce	Měření č. (obsah rutinu mg/kg)						Průměr (mg/kg)	Směrodatná odchylka
		1.	2.	3.	4.	5.	6.		
Arax	**15 min.**	159,20	159,04	162,42	162,94	154,98	152,98	**158,59**	**3,62**
	30 min.	152,58	150,24	150,72	150,96	148,30	154,94	**151,29**	**2,06**
	60 min.	154,14	156,84	158,10	157,54	160,50	160,46	**157,93**	**2,19**
Lámanka	**15 min.**	189,30	191,66	186,16	186,40	184,30	184,38	**187,03**	**2,65**
	30 min.	195,06	194,06	195,20	194,16	195,02	193,4	**194,48**	**0,66**
	60 min.	197,52	196,06	203,82	205,06	196,48	196,64	**199,26**	**3,70**
Pohanka neloupaná	**15 min.**	370,36	371,92	387,56	387,04	378,86	379,88	**379,27**	**6,62**
	30 min.	388,04	391,64	399,36	380,30	394,40	392,42	**391,03**	**5,88**
	60 min.	419,82	419,92	408,24	407,60	408,78	411,08	**412,57**	**5,27**

Vliv množství vzorku při extrakce směsným roztokem

Byl sledován také vliv množství vzorku pohanky seté na výsledný obsah rutinu. U extrakce vzorku extrakční směsí v ultrazvukové lázni byly testovány navážky 0,5 g; 1 g a 2 g. Pro každou z variant bylo provedeno 6 opakování.

Byly stanoveny obsahy rutinu a vypočítány směrodatné odchylky pro jednotlivé navážky vzorku pro extrakce viz. tabulky č. 8 a č. 9.

Z uvedených výsledků vyplývá, že doporučená navážka vzorku 0,5 g při extrakci pomocí extrakční směsi v ultrazvukové lázni s teplotou 30 °C po dobu 60 min je dostačující a přesnost stanovení zcela vyhovující.

Tabulka č. 8. Porovnání vlivu množství vzorku pro stanovení obsahu rutinu – extrakce extrakční směsí po dobu 60 min v ultrazvukové lázni pro HPLC 1260.

Vzorek	Navážka	Měření č. (obsah rutinu mg/kg)						Průměr (mg/kg)	Směrodatná odchylka
		1.	2.	3.	4.	5.	6.		
Arax	0,5 g	188,62	187,86	189,26	187,86	190,28	188,66	**188,75**	**0,92**
	1 g	182,36	183,85	185,22	185,79	181,15	189,24	**184,60**	**2,86**
	2 g	170,94	172,48	171,99	173,66	172,51	173,50	**172,51**	**1,01**
Lámanka	0,5 g	214,42	215,34	225,04	224,10	217,84	215,06	**218,63**	**4,75**
	1 g	212,73	211,50	213,05	218,22	213,08	211,69	**213,38**	**2,47**
	2 g	204,21	203,73	207,74	207,24	202,87	201,77	**204,59**	**2,40**
Pohanka neloupaná	0,5 g.	387,42	397,28	401,42	393,80	405,98	397,08	**397,16**	**6,26**
	1 g	383,93	389,50	398,27	380,49	388,00	387,92	**388,02**	**6,01**
	2 g	367,69	373,02	367,45	365,99	367,76	363,63	**367,59**	**3,09**

Tabulka č. 9. Porovnání vlivu množství vzorku pro stanovení obsahu rutinu – extrakce extrakční směsí po dobu 60 min v ultrazvukové lázni pro HPLC 1100.

Vzorek	Navážka	Měření č. (obsah rutinu mg/kg)						Průměr (mg/kg)	Směrodatná odchylka
		1.	2.	3.	4.	5.	6.		
Arax	0,5 g	186,06	184,6	185,24	184,16	190,14	187,42	**186,27**	**2,03**
	1 g	180,45	184,61	181,87	184,35	180,46	181,59	**182,22**	**1,68**
	2 g	165,91	166,62	169,60	168,48	169,16	166,81	**167,76**	**1,38**
Lámanka	0,5 g	194,72	196,42	206,22	201,12	199,08	196,94	**199,08**	**3,78**
	1 g	196,54	196,81	200,98	209,49	201,1	200,07	**200,83**	**4,29**
	2 g	196,19	183,97	195,1	196,09	191,5	193,59	**192,74**	**4,24**
Pohanka neloupaná	0,5 g	411,44	411,34	411,22	399,02	413,58	399,18	**407,63**	**6,08**
	1 g	390,87	392,70	402,06	386,61	382,40	391,38	**391,00**	**6,04**
	2 g	369,25	374,3	367,65	367,30	367,75	364,95	**368,53**	**2,87**

3.2.2 Ověření stability

Během ověřování metody byla sledována stabilita rutinu v extraktu vzorku připraveném k analýze na HPLC. Extrakt byl skladován při teplotě přibližně 4 °C. Opakované analýzy byly provedeny po jednom a osmi dnech. Po celou dobu byly dodržovány popsané podmínky skladování. Vzorky byly připraveny ve dvou opakováních.

Současně byla sledována stabilita rutinu v pomletém vzorku. Extrakt vzorku z již pomletého materiálu byl opakovaně připraven po dvou a dvaceti dnech po pomletí. V mezidobí byl pomletý vzorek pohanky skladován při laboratorní teplotě. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 10 a tabulce č. 11.

Tabulka č. 10. Stabilita rutinu ve vzorku připraveném k analýze na HPLC.

	Obsah rutinu ve vzorku (mg/kg) HPLC 1260	
Interval mezi měřením	**Pohanka osivo**	
	A	B
	277,92	276,86
po 1 dni	280,42	278,96
po 8 dnech	269,32	265,58

Tabulka č. 11. Stabilita rutinu v extrakce s využitím extrakční směsi.

Interval mezi mletím vzorku a přípravou vzorku z extraktu	Obsah rutinu ve vzorku (mg/kg)	
	Lámanka	Pohanka neloupaná
po 1 dni	207,88	393,07
po 20 dnech	209,68	391,52

Při opakovaném měření jednoho vzorku se stanovený obsah rutinu mírně zvyšoval. Z uvedených výsledků vyplývá, že v případě skladování připraveného vzorku sice dochází k mírnému zvýšení nebo snížení hodnot rutinu. Tento rozdíl je v rozmezí zjištěných hodnot opakovatelnosti. Uchovávání extraktu i pomletého vzorku s následnou extrakcí a měření na HPLC lze využít.

3.2.3 Validační parametry

Opakovatelnost

Opakovatelnost je druh přesnosti stanovený za podmínek měření opakovatelnosti, tzn. opakované měření se provádí v jedné laboratoři, stejným analytikem, na stejném přístroji a v co nejkratším čase. 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 EffiValidation 3.0. - Opakovatelnost - po úrovních z vícenásobného měření. Opakovatelnost byla stanovena pro extrakční postup na dvou koncentračních hladinách. Tyto hladiny byly zvoleny tak, aby postihovaly oblast s nízkým a vysokým obsahem rutinu v nažkách pohanky seté. Pro každou koncentrační hladinu byl vybrán jeden vzorek, který byl minimálně v šesti opakováních extrahován a následně analyzován na HPLC tak, jak bylo výše popsáno.

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

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

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

s směrodatná odchylka z vícenásobných měření jednoho vzorku.

Tabulka č. 12. Opakovatelnost měření a maximální diference dvou paralelních stanovení měření na HPLC 1260.

Extrakce	Úroveň	Popis vz.	Počet opakování	Průměr (mg/kg)	s	s_r (%)	R_{max}
Extrakční směs	1.	Arax	6	184,2	2,0	1,09	5,54
	2.	Pohanka nel.	6	399,33	1,6	0,4	4,43

Tabulka č. 13. Opakovatelnost měření a maximální diference dvou paralelních stanovení měření na HPLC 1100.

Extrakce	Úroveň	Popis vz.	Počet opakování	Průměr (mg/kg)	s	s_r (%)	R_{max}
Extrakční směs	1.	Arax	6	179,49	0,91	0,51	2,52
	2.	Pohanka nel.	6	412,57	5,77	1,4	15,98

Z tabulky č. 12 a č. 13 vyplývá, že opakovatelnost stanovení je různá pro dvě uvedené hladiny a pro daný koncentrační rozsah akceptovatelná.

Pro zápis výsledků do Labsystému byly vloženy pro povolenou diferenci dvou paralelních stanovení tyto hodnoty: obsah rutinu 10 mg/kg > 250 mg/kg , 30 mg /kg > 500 mg/kg.

Střední přesnost

Střední přesnost je druh přesnosti, popisující výsledky měření dosažené za podmínek mezi podmínkami pro měření opakovatelnosti a reprodukovatelnosti. Statistickou mírou přesnosti je směrodatná odchylka (s) resp. relativní směrodatná odchylka (sr).

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí software EffiValidation 3.0. - Opakovatelnost – z paralelních měření. Obsah rutinu v nažkách pohanky se ve vzorcích pohanky ze sklizně 2020 pohyboval v koncentračním rozsahu (220 – 420) mg/kg.

Byla vypočítána směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka z paralelních měření a dovolená diference paralelních stanovení R_{max}, podle vztahu

$$R_{max} = b_R \cdot s$$

kde b_R je tabelovaný koeficient pro dvě měření a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$, jehož hodnota 2,46

s směrodatná odchylka získaná z paralelních stanovení

Tabulka č. 14. Střední přesnost a maximální diference dvou paralelních stanovení měření na HPLC 1260.

Extrakce	Počet vzorků (n)	Průměr měření (mg/kg)	s	s_r (%)	R_{max}
Extrakční směs	20	311,1	2,6623	0,81	6,55

Z tabulky č. 14 vyplývá, že střední přesnost je u dané metody srovnatelná a pro daný koncentrační rozsah akceptovatelná. Zároveň lze říci, že výsledky korespondují s hodnotami přesnosti získanými za podmínek opakovatelnosti měření na HPLC 1260.

Správnost

Správnost charakterizuje shodnost výsledků měření validované vlastnosti s akceptovanou nebo deklarovanou referenční hodnotou.

V současné době není dostupný žádný CRM s deklarovaným obsahem rutinu v nažkách pohanky seté a nejsou organizovány žádné mezilaboratorní porovnávací zkoušky na toto stanovení. Správnost metody na stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky seté byla proto ověřena metodou standardního přídavku s použitím testu výtěžnosti. Bylo postupováno následovně. K přesné navážce vzorku s nízkým obsahem hledaného analytu bylo vždy přidáno definované množství standardu rutinu tak, aby byla připravena řada vzorků na třech koncentračních hladinách, pokrývající celý požadovaný rozsah. Na každé z hladin byly připraveny vzorky ve 2 opakováních. Takto připravené vzorky byly změřeny na HPLC. Získané výsledky stanovení byly vyhodnoceny v programu EffiValidation 3.0. - Správnost - Velký koncentrační rozsah - slepý pokus není k dispozici. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách č.15 a č. 16.

Tabulka č. 15. Ověření správnosti metody stanovení rutinu v nažkách pohanky seté měřené na HPLC 1260.

Popis	Přídavek	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Výchozí vz.	0	0	0	0,495	0 – 2,13	přijata
Přídavek 1	100	99,85	99,85	1,98	93,64 -106,06	přijata
Přídavek 2	250	249,0	99,6	0, 778	246,20 – 251,81	přijata
Přídavek 3	500	498,85	99,77	0, 141	497,28 – 500,42	přijata
Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.						

Tabulka č. 16. Ověření správnosti metody stanovení rutinu v nažkách pohanky seté měřené na HPLC 1100

Popis	Přídavek	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Výchozí vz.	0	0	0	1,3011	-5,599 – 5,599	přijata
Přídavek 1	100	95,98	95,98	2,6587	86,974 – 104,986	přijata
Přídavek 2	250	242,89	97,16	5,1336	226,776 – 259,004	přijata
Přídavek 3	500	496,84	99,37	6,4488	467,823 – 516,857	přijata
Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.						

Z výsledků v tabulce č.15 a 16 vyplývá, že popsaná analytická metoda poskytuje správné výsledky.

Linearita

Linearita popisuje míru lineární závislosti mezi validovanou vlastností a měřením. Pro prvotní ověření linearity byl použit standard rutinu (9). Byla vytvořena řada kalibračních roztoků o koncentraci 1 µg/ml až 100 µg/ml rutinu v 50% methanolu. Tento koncentrační rozsah odpovídá množství rutinu ve vzorku na mezi stanovitelnosti až po obsah 2000 mg/kg rutinu. Připravené kalibrační roztoky byly analyzovány na HPLC. Lineární závislost byla zkontrolována pomocí software EffiValidation 3.0. - Linearita - korelační a QC koeficient. Hodnota korelačního koeficientu R pro uvedený koncentrační rozsah byla 0,9999 (HPLC 1260) a 0,9997 (HPLC 1100) a hodnota koeficientu QC byla 0,655 (HPLC 1260) a 2,414 (HPLC 1100), přičemž linearita se obecně považuje za prokázanou, když $R > 0,99$ a $QC < 5\%$.

Citlivost

Citlivost je dána změnou signálu, vyvolanou jednotkovou změnou validované vlastnosti a je vyjádřena směrnicí kalibrační přímky. Výpočet byl proveden pomocí programu EffiValidation 3.0 - Citlivost-ze směrnice přímky. Pro analýzu rutinu provedenou za výše uvedených podmínek byla stanovena hodnota citlivosti 86,1184 na HPLC 1260 a 139,672 na HPLC 1100 (tabulka č. 3).

Meze detekce a stanovitelnosti

Pro stanovení detekčních limitů byl použit program EffiValidation 3.0. - Stanovení ze signálu slepého pokusu v chromatografii.

Byla vytvořena řada kalibračních roztoků o koncentraci 1,25 μg/ml až 100 μg/ml rutinu v 50 % methanolu. Připravené roztoky byly změřeny na HPLC za podmínek metody a následně byly vyhodnoceny výšky píků rutinu. Z naměřených hodnot byla vypočítána směrnice kalibrační přímky (EffiValidation 3.0 - Kalibrace). Dále bylo nutné zjistit maximální kolísání základní linie, tj. rozdíl mezi nejnižší a nejvyšší hodnotou šumu v intervalu, který je dán 20- tinásobkem položířky sledovaného píku. Pro každý extrakční postup bylo připraveno 5 slepých vzorků, které byly změřeny na HPLC a pomocí řídícího 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.17.

Tabulka č. 17. Meze detekce a stanovitelnosti.

Parametr		**Rutin** HPLC 1260	**Rutin** HPLC 1100
Směrnice kalibr. přímky	b_1	8,398	13,621
Korelační koeficient	R^2	0,99993	0,9997
Max. kolísání zákl.linie	h_{max} **(pA)**	0,068	0,051
Koncentrace na mezi detekce	x_D **(μg.ml^{-1})**	0,0243	0,0123
	x_D **(mg/kg)**	**0, 49**	**0,25**
Koncentrace na mezi stanovitelnosti	x_Q **(μg.ml^{-1})**	0,081	0,0376
	x_Q **(mg/kg)**	**1,62**	**0,75**

Za výše popsaných podmínek metody je mez detekce, resp. stanovitelnosti u metody využívající extrakční směs 1,62 mg/kg pro HPLC 1260 a 0,75 mg/kg pro HPLC 1100.

Pro zápis výsledků byla použita praktická mez stanovitelnosti 5 mg/kg.

Nejistota stanovení

Bylo provedeno stanovení relativní standardní nejistoty a relativní rozšířené nejistoty K výpočtu byly použity výsledky analýz vzorků nažek pohanky seté loupané, neloupané a lámanky získané z obchodní sítě. Výpočet byl proveden v programu EffiValidation 3.0 - Nejistoty z přesnosti - po úrovních z vícenásobného měření. Pro výpočet rozšířené nejistoty byl použit faktor pokrytí 2. Vypočítané nejistoty pro stanovení obsahu rutinu v nažkách pohanky jsou uvedeny v tabulce č. 18.

Tabulka č. 18. Nejistoty pro stanovení obsahu rutinu v pohance seté.

HPLC	Koncentrační rozsah (mg/kg)	Standardní nejistota		Rozšířená nejistota (k = 2,0)	
			relativní (%)		relativní (%)
HPLC 1260	180 - 450	1,6	0,402	3,212	0,8043
HPLC 1100		5,77	1,399	11,545	2,798

Pro interval s koncentračním rozsahem (180 – 450) mg/kg rutinu byla vypočítaná relativní rozšířená nejistota stanovení zaokrouhlena na hodnotu 20 %.

4 Závěr

Cílem práce bylo nalézt vhodnou metodu na stanovení rutinu v nažkách pohanky seté s využitím HPLC. Z extrakčních postupů popsaných v literatuře byla po odzkoušení vybrána extrakce, která využívá extrakční směs methanol, kyselina octová, voda (v poměru 100 :2 : 100). Byly optimalizovány podmínky pro měření na HPLC. Rutin se stanoví izokratickou elucí buď na HPLC 1260 s chromatografickou kolonou s reverzní fází a pevným jádrem Kinetex (15 cm × 4,6 mm, 2,6mm) nebo na HPLC 1100 s chromatografickou kolonou s reverzní fází Luna (25 cm × 4,6 mm ID, 4,6mm) a detekuje se při 355 nm. Byly optimalizovány podmínky pro přípravu zkušebního vzorku a extrakce. Bylo zjištěno, že je při mletí vhodné použít síto s velikostí ok 0,25 mm. Byla vybrána délka extrakce i množství vzorku k extrakci (doba extrakce v ultrazvukové lázni 60 min., 0,5 g pomletého vzorku).

Z uvedených výsledků vyplývá, že v případě skladování připraveného vzorku sice dochází k mírnému zvýšení nebo snížení hodnot rutinu. Tento rozdíl je v rozmezí zjištěných hodnot opakovatelnosti. Uchovávání extraktu i pomletého vzorku s následnou extrakcí a měření na HPLC lze využít.

Po ukončení optimalizace metody byla metoda validována. Byla stanovena opakovatelnost, střední přesnost, linearita, citlivost, meze detekce a stanovitelnosti a nejistota stanovení. Do laboratorního informačního a řídícího systému Labsystém 7 byly po zaokrouhlení vloženy následující parametry. Povolený rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními byl nastaven na hodnotu u obsahu rutinu 10mg/kg do 250 mg/kg a 30mg/kg pro obsahy do 500mg/kg rutinu ve vzorku. Pro mez stanovitelnosti byla zadána hodnota 5mg/kg a pro rozšířenou nejistotu stanovení hodnota 20 %.

Závěr: metodu, tak jak byla výše popsána, lze použít pro stanovení rutinu v nažkách pohanky seté.

5 Literatura

1. Prugar Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí.
2. https://cs.wikipedia.org/wiki/Rutin#Obsah_rutinu_v_pohance
3. Malotová Předínská, Kateřina. Analytické hodnocení výrobků z pohanky a prosa. Kroměříž, 2010. diplomová práce (Ing.). Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická
4. Štočková L., Matějová E., Janovská D., Sýkorová S.: Porovnání výsledků tří analytických metod pro stanovení rutinu v pohance tatarské, Chem. Listy 103, 827-831 (2009)
5. Stratil, P., Klejdus. B., Kuban. V.; Determination of total content phenolic compounds and thein antioxidant aktivity in vegetables – evaluation of spectrophotometric methods, J. Agric. Food Chem., 54, 607-616 (2006)
6. Krejzová E.: Kapalinová chromatografie extraktů pohanky-stanovení rutinu, MU PřF, UCh BcP, DP 2011
7. Válová A.: Kvercerin, rutin: jejich stabilita a vliv na zdraví člověka: UP FCHT, BcP, DP 2017
8. Kaňová K.: Stanovení rutinu v plodech bezu černého , VUT Brno, DP, 2013
9. Hynštová V.: Monitoring flavonoidních látek a karotenoidů ve vybraných doplňcích stravy, DP, 2014
10. Český Lékopis 2009
11. Mikšáková P.: Antiradikálová aktivita extraktů nati a plodů, RP UK Praha, FF Hradec Králové, 2012
12. Jagerová K.: Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných aktivních látek v potravních doplňcích, DP UK Praha, FF Hradec Králové, 2012
13. Hohnová B.: Studium přírodních látek obsažených ve vybraných bylinách a méně obvyklých druzích drobného ovoce, VUT Brno, RP, 2010

14. Grulichová H.: Extrakce vybraných flavonoidů bezu černého pro potravinářské účely, VUT Brno, DP, 2010
15. Píštková M.: Obsah rutinu ve vybraných odrůdách bezu černého, VUT Brno, DP, 2011
16. Brunori a., Baviello G., Kajdi F., Silva J., Gyori T., Végvári G.: Grain Yield and Rutin Content of Common and Tartary Buckwheatvarieties Grown in North-Western Hungary, The europien Journal of Plant Science and Biotechnology 2012
17. Holasová P., PSE ectrakce rostlinného materiálu pro potravinářské účely, VUT Brno, DP, 2008
18. Belajová E.: Stanovení rutínu v múkach a pekárenských výrobkoch metódou HPLC, NPPC Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Odbor chémie a analýzy potravin,VÚP Bratislava, Slovenská republika
19. Tobolková B., Belajová E., Benčičová M., Jelemenská V., Kukurová K., Ciesarová Z.: Antioxidační vlastnosti rakytníku a produktů s jeho obsahem Výskumný ústav potravinársky, Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Bratislava
20. Eckschlager, K., Horsák, I.: Dovolená diference výsledků paralelních stanovení. *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*, 1. vydání, SNTL Praha, 1980
21. Centner, V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0

Bulletin Národní referenční laboratoře XXVII, 2023/3

Ročník:	XXVII, č. 3
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2023
Odpovědný redaktor:	Ing. Iva Strížová
Počet stran:	59

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196