

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2016

Ročník XX, číslo 1/2016

Brno 2016

Obsah

1. **Stanovení ergotových alkaloidů**
Martina Čumová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
2. **Zavedení detekce DP 356043 u sóji a MS8, Rf3, MS8xRf3 u řepky**
Kateřina Staňková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OMB,
Hroznová 2, 656 06 Brno 11
3. **Stanovení organických forem selenu ve vzorcích krmiv**
Eva Niedobová, Eva Čižmarová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 40

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení ergotových alkaloidů

Martina Čumová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno
martina.cumova@ukzuz.cz

1 Souhrn

Ergotové alkaloidy (EAs) jsou sekundární metabolity plísní, které mohou být toxické pro lidi a zvířata. Výskyt těchto látek by se měl sledovat v potravinách i krmivech. V laboratoři ONRL Brno byla zavedena metoda pro stanovení dvanácti ergotových alkaloidů, které byly vybrány dle požadavků evropské unie [1]. Metoda umožňuje kvantitativní stanovení vybraných parametrů, které je v souladu s požadovanými výkonnostními kritérii metody.

2 Úvod

Alkaloidy jsou přírodní látky, které produkují některé organismy z řad živočichů, hub, bakterií a řas. Tyto látky nejsou nezbytné pro životaschopnost organismu, který si je vytváří, ale pomáhají mu k jeho přežití. Alkaloidy se člení podle svých typických strukturních charakteristik do několika skupin. Mezi nejznámější skupiny alkaloidů patří například tropanové (např. atropin), purinové (např. kofein) a ergotové alkaloidy (např. ergotamin), které se též nazývají námelové alkaloidy. Na základě požadavků EU by se měl výskyt ergotových alkaloidů v potravinách a krmivech sledovat.

Ergotové alkaloidy jsou sekundární metabolity produkované některými druhy hub z rodu *Claviceps*. V Evropě je nejvíce rozšířen rod *Claviceps purpurea*, který parazituje nejen na ekonomicky důležitých obilninách, kterými jsou např. pšenice, ječmen a žito, ale i na některých travách (Obrázek 1) [2].



Obrázek 1. Rostliny napadené paličkovcí nachovou (*Claviceps purpurea*). Zprava: pšenice, ječmen, žito, tráva *Arrhenatherum elatius*.

Z hub bylo izolováno již více než 70 různých alkaloidů, které lze rozdělit do několika skupin na základě jejich chemické struktury: deriváty kyseliny isolysegové (např. ergotaminin), deriváty kyseliny lysergové (např. ergotamin), deriváty dimethylergolinu (např. ergoklavin).

Obsah EAs v krmivech není k datu legislativně limitován. Limitováno je pouze množství tzv. sklerocií, jejichž maximální povolený obsah v krmivech obsahujících nemleté obiloviny je stanoven na 1 g/kg [3].

Sklerocie jsou posledním vývojovým stadiem vřeckovýtrusné tvrdohouby *Claviceps purpurea*. Jedná se o přezimující stadium, ze kterého na jaře následujícího roku vyrůstají tzv. stroma, ze kterých se uvolňují výtrusy, infikující obiloviny během jejich květenství.

Cílem této práce bylo vyvinout metodu pro stanovení EAs v krmivech a v surovinách učených pro výrobu krmiv. Vyvinutá metoda má být rychlá, s minimálními náklady a s možností aplikace na rozdílné matrice. Metoda má být také dostatečně univerzální na to, aby v případě potřeby umožnila sledování analytů podle dalších požadavků Evropské unie.

Pro extrakci analytů z matrice byla aplikována modifikovaná metoda QuEChERS [4, 5], která se v různých obměnách často používá pro analýzu pesticidů, mykotoxinů, alkaloidů a jiných látek. Metoda zahrnuje extrakci do acetonitrilu, přečištění ve formě vysolení analytů do acetonitrilové fáze a separaci vodné fáze. Kvantitativní stanovení obsahu EAs probíhá pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS).

3 Chemikálie

Methanol (čistota LC-MS), mravenčan amonný (pro MS) a kyselina mravenčí (čistota LC-MS) byly pořízeny od firmy Fluka. Ultra čistá voda byla připravena Milli-Q systémem (Millipore Corporation, USA). Acetonitril (čistota HPLC) byl pořízen od firmy Sigma Aldrich (Německo). Jednotlivé standardy EAs jsou od firmy Sigma Aldrich (Německo).

4 Přístroje a pomůcky

Ultraúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem, ACQUITY UPLC-TQ MS Xevo (Waters, USA), vybavený UPLC kolonou, ACQUITY UPLC BEH C18, 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters, USA) a předkolonou, ACQUITY BEH C18 VanGuard, 5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm (Waters, USA). Analytické váhy, ultrazvuková lázeň, horizontální třepačka s rychlostí do 300 kmitů/min, centrifuga s rozsahem otáček nad 3000 ot/min, centrifugační zkumavky plastové se šroubovacím víčkem o objemech 15 ml a 50 ml, centrifugační zkumavka Eppendorf o objemu 1,5 ml, stříkačkové filtry nylonové o velikosti pórů 0,2 μm (Labicom, Česká republika), skleněné vialky o objemu 2 ml.

5 Pracovní postup

5.1 Příprava vzorku

Homogenní vzorek se naváží do 50ml centrifugační plastové zkumavky. K matici se přidá 10 ml 0,1% HCOOH. Extrakce analytů se provede 10 ml acetonitrilu třepáním 20 min na horizontální třepačce při alespoň 150 kmitech/min. Poté se přidá pevná směs solí (MgSO₄ a NaCl). Směs se opět intenzivně třepe. Vzorek se odstředí 5 min při 5000 ot/min, vrchní acetonitrilová vrstva se převede do 15ml plastové zkumavky a nechá se vymrazit. Vymražený extrakt se opět odstředí 5 min při 3900 ot/min. Přesně 0,5 ml acetonitrilové vrstvy se převede do zkumavky Eppendorf, poté se doplní vodou na celkový objem 1 ml. Po promíchání se roztok zfiltruje přes membránový filtr nebo se odstředí při 12000 ot/min a převede do vialky.

5.2 UPLC-MS/MS stanovení

Extrakty převedené do 2ml vialky se analyzují metodou UPLC-MS/MS ve vhodné sekvenci vzorků a standardů. Kompletní nastavení přístroje a podmínky měření jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. Před analýzou reálných vzorků se ověří citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy je zajištěna využitím MRM módu při MS detekci.

Tabulka 1. Chromatografické podmínky UPLC stanovení.

UPLC – Acquity Waters	
Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Předkolona	ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)
Nástřik	2,5 μl
Slabý promývací roztok	Deionizovaná voda/methanol (90/10)
Silný promývací roztok	Methanol
Mobilní fáze A	0,1% kyselina mravenčí v deionizované vodě
Mobilní fáze B	0,1% kyselina mravenčí a 1mM mravenčan amonný v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Gradient mobilní fáze	0 min (10% B) – 0,3 min (20 % B) – 4,5 min (99,5 % B) – 7 min (99,5% B) – 7,1 min (10% B) – 10 min (10% B)

Tabulka 2. Podmínky stanovení pro Xevo TQ MS Waters.

Látka	RT (min)	Prekursor ion	CV (eV)	Produktový ion 1	CE (eV)	Produktový ion 2	CE (eV)
Ergokornin	2,49	562,5	38	223,3	35	268,3	27
Ergokorninin	2,71	544,4	38	223,3	37	277,5	30
Ergokryptin	2,71	576,3	21	268,6	25	208,1	25
Ergokryptinin	2,85	576,3	38	223,3	35	305,3	27
Ergosin	2,35	548,3	38	223,2	33	208,1	35
Ergosinin	2,40	548,3	20	223,2	28	208,1	30
Ergokrystin	2,74	610,4	23	208,1	25	268,4	35
Ergokrystinin	2,88	592,4	35	223,3	35	305,3	29
Ergometrine	1,13	326	30	208	30	223	25
Ergometrinine	1,5	326	30	208	30	208	25
Ergotamine	2,51	582	30	208,2	45	268	25
Ergotaminine	2,46	564	30	223,2	30	277	25
Teplota iontového zdroje – 150 °C, teplota sušícího plynu – 450 °C, průtok sušícího plynu – 700 l/h, průtok „cone gas“ – 45 l/h, průtok kolizního plynu – 0,18 ml/min, napětí na kapiláře – 3 kV, ionizace elektrosprejem v pozitivním modu							

6 Výsledky a diskuse

6.1 Validace stanovení ergotových alkaloidů

Pro validaci stanovení 12 EAs byly použity dvě matrice: vojtěška a ječmen, které byly obohaceny na dvou koncentračních hladinách. Obohacení bylo provedeno v 6 opakováních pro každou matici zvlášť. V rámci validace byla hodnocena citlivost, správnost, přesnost, selektivita a rozšířená nejistota. Pro všechny testované analyty byla splněna validační kritéria podle rozhodnutí komise (2002/657/ES) [6]. Mez stanovitelnosti LOQ, byla stanovena podle požadavků SANCO/12495/2011 [7]. Mezi stanovitelnosti byla tedy nejnížší validovaná hladina, tzv. reportovací limit (RL), který byl pro všechny parametry 5 µg/kg, a to ve všech validovaných maticích. Ostatní validační data jsou uvedena v tabulkách 3 a 4. Kvantifikace obsahu EAs byla provedena s využitím maticové kalibrace.

Tabulka 3. Hodnocení linearity hodnocením stupně korelace (korelační koeficient R^2) pro EAs v rozpouštědle a v různých maticích.

Látka	SS	Ječmen	Vojtěška
Ergokornin	0,9975	0,9989	0,9989
Ergokorninin	0,9979	0,9984	0,9994
Ergokryptin	0,9979	0,9987	0,9989
Ergokryptinin	0,9997	0,9997	0,9995
Ergosin	0,9987	0,9942	0,9991
Ergosinin	0,9992	0,9991	0,9999
Ergokrystin	0,9990	0,9988	0,9994
Ergokrystinin	0,9994	0,9998	0,9987
Ergometrin	0,9968	0,9978	0,9978
Ergometrinin	0,9998	0,9992	0,9992
Ergotamin	0,9973	0,9993	0,9985
Ergotaminin	0,9967	0,9990	0,9981

Tabulka 4. Výťažnost a přesnost metody.

	Výtěžnost (RSD) (%); n = 6			
	Ječmen		Vojtěška	
	5 µg/kg	100 µg/kg	5 µg/kg	100 µg/kg
Ergokornin	88 (21,1)	86 (1,0)	90 (22,1)	99 (1,3)
Ergokorninin	106 (6,2)	92 (0,7)	82 (23,6)	95 (2,2)
Ergokryptin	88 (21,1)	86 (3,4)	90 (19,7)	100 (2,4)
Ergokryptinin	87 (13,3)	89 (2,5)	97 (9,2)	99 (2,8)
Ergosin	92 (11,5)	98 (1,5)	102 (6,5)	96 (1,6)
Ergosinin	82 (19,6)	90 (1,8)	74 (16,8)	84 (1,5)
Ergokrystin	81 (25,0)	89 (2,4)	77 (24,9)	87 (3,5)
Ergokrystinin	89 (11,5)	84 (1,1)	83 (12,4)	95 (0,7)
Ergometrin	80 (4,2)	88 (4,1)	86 (13,6)	96 (3,5)
Ergometrinin	74 (2,4)	86 (3,6)	84 (5,7)	89 (3,8)
Ergotamin	89 (7,5)	95 (4,1)	95 (6,1)	93 (4,7)
Ergotaminin	104 (4,9)	98 (2,9)	85 (8,0)	96 (3,7)

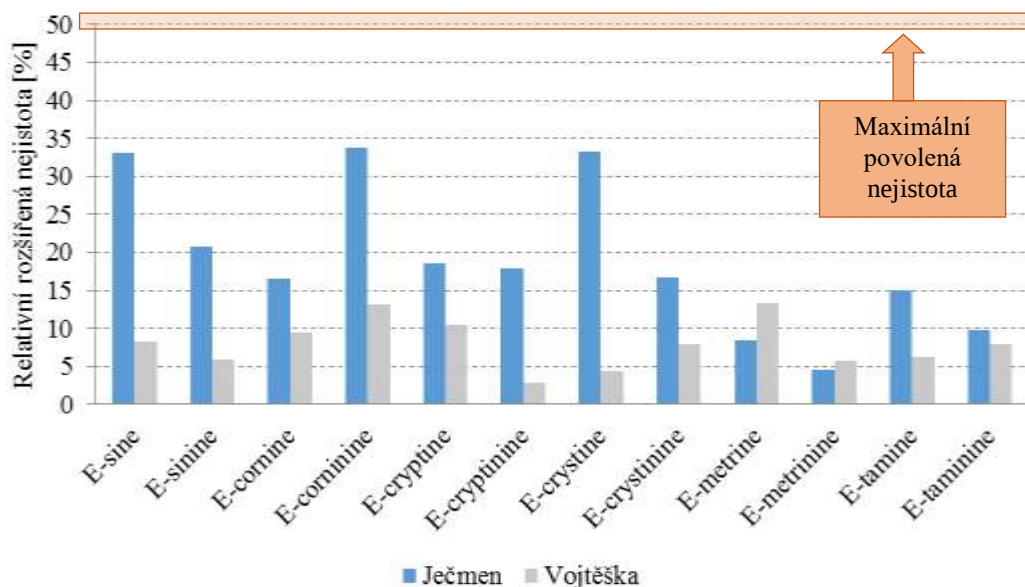
Dalším důležitým validačním parametrem je selektivita stanovení. Selektivita je definována jako schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V případě LC-MS analýz pozorujeme maticové efekty (ME), což znamená ovlivnění signálu analytu přítomností matrice. V rámci validace byly ME sledovány v extraktech všech matric. Matriční efekt byl počítán dle následující rovnice: $ME = \frac{\text{směrnice kalibrační křivky v matrici}}{\text{směrnice kalibrační křivky v rozpouštědle}} \cdot 100$. Výsledné porovnání matričních efektů je uvedeno v tabulce 5. Ze získaných údajů vyplývá, že matrice má rozdílný vliv na jednotlivé analyty.

Tabulka 5. Porovnání maticových efektů v různých maticích při LC-MS/MS detekci [%].

Alkaloid	Ječmen	Vojtěška
E-sine	97	102
E-sinine	100	102
E-cornine	101	101
E-corninine	100	102
E-cryptine	100	100
E-cryptinine	99	99
E-crystine	99	100
E-crystinine	100	99
E-metrine	101	100
E-metrinine	99	99
E-tamine	102	104
E-taminine	102	102

Pro sledované analyty nebyl pozorován ME, z toho důvodu lze použít pro jejich stanovení kalibraci v rozpouštědle.

Stanovení nejistoty vychází z vícenásobného měření matrice obohacené standardy PAs na různých hladinách. Rozšířená nejistota odpovídá směrodatné odchylce stanovených dat vynásobené faktorem pokrytí 2 (Obrázek 3). Požadavek na maximální rozšířenou nejistotu byl splněn u všech validovaných EAs podle 2002/657/ES.



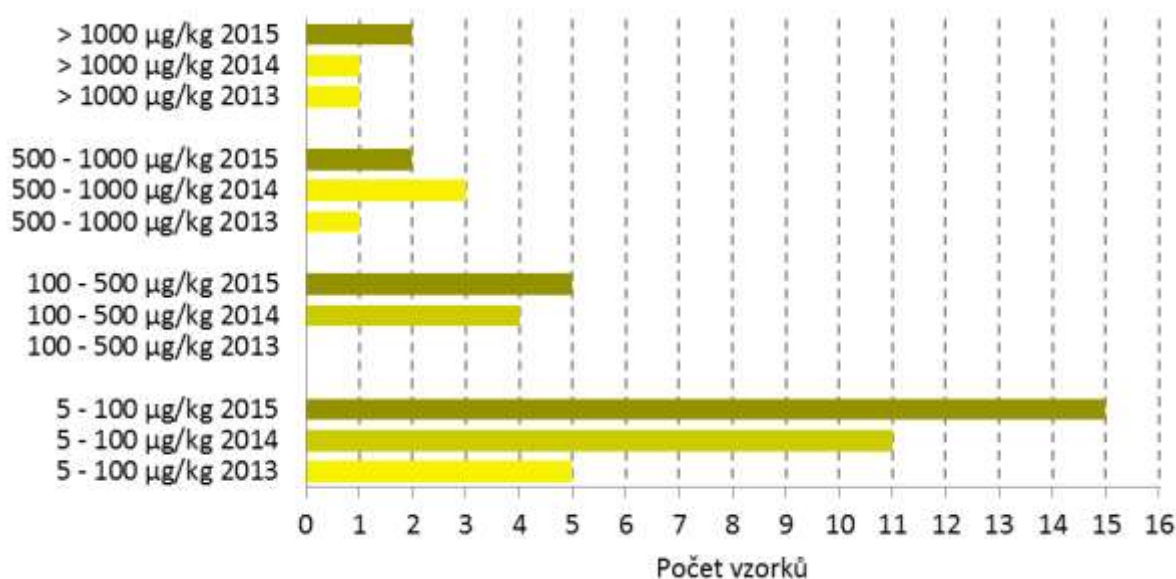
Obrázek 2. Relativní rozšířená nejistota stanovená v různých matricích pro hladinu RL.

K identifikaci byla použita kritéria podle rozhodnutí komise (2002/657/ES) [6], tj. retenční čas (RT) a poměr sledovaných kvantifikačních a konfirmačních iontů. Povolená odchylka RT pro LC je $\pm 2,5 \%$. Povolený rozsah poměrů sledovaných iontů je závislý na relativní intenzitě sledovaných iontů. Přítomnost sledované látky ve vzorku je potvrzena, pokud poměr intenzity sledovaných iontů stanovený ve vzorku odpovídá poměru stanoveného ve standardu. Všechna identifikační kritéria pro sledované analyty byla v souladu s legislativními požadavky.

6.2 Analýza reálných vzorků

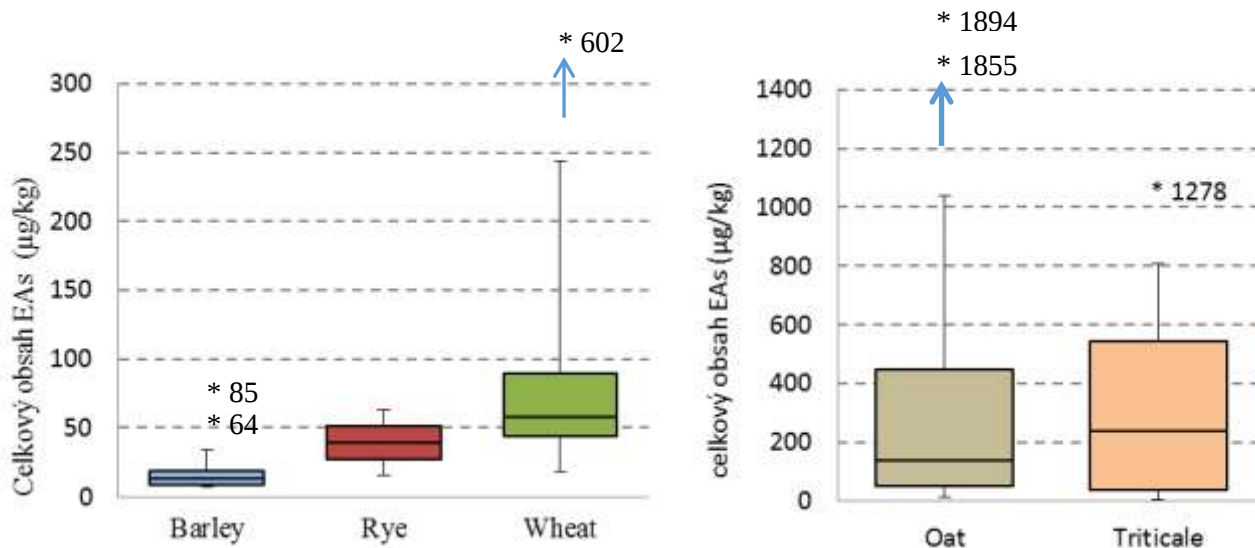
Vyvinutá metoda byla aplikována pro sledování EAs v reálných vzorcích surovin pro výrobu krmiv. Ze vzorků odebraných v rámci kontroly krmiv na ÚKZÚZ bylo vybráno a testováno 161 vzorků, u nichž byla přítomnost EAs předpokládána.

Ergotové alkaloidy byly přítomny v 50 vzorcích. Většina kontaminovaných vzorků obsahovala sumu ergotových alkaloidů do $100 \mu\text{g/kg}$ (Obrázek 3).



Obrázek 3. Histogramy zobrazující množství vzorků v rámci daného koncentračního rozsahu celkového množství ergotových alkaloidů.

Nízké obsahy ergotových alkaloidů byly obsaženy ve vzorcích ječmene, žita a pšenice. Zatímco oves a tritikále obsahovalo vyšší množství EAs (Obrázek 4).



Obrázek 4. Distribuce EAs v testovaných vzorcích ječmene, žita, pšenice, ovsu a tritikále.

Testovaná krmiva obsahovala vysoce variabilní celkové množství EAs, které se pohybovalo od 5 µg/kg do 1894 µg/kg. Požití krmiva s vysokým obsahem ergotových alkaloidů může vést k vážným zdravotním potížím krmených zvířat. Nastavení vhodných legislativních limitů pro ergotové alkaloidy v krmivech je velmi žádoucí a vzhledem k reálným nálezům aktuální.

7 Závěr

V rámci práce byla provedena validace stanovení dvanácti ergotových alkaloidů. Validované parametry splňovaly požadavky uvedené v rozhodnutí komise (2002/657/ES) a SANCO/12495/2011. Vyvinutá metoda je vhodná pro účely multireziduálního stanovení ergosinu, ergokorninu, ergotaminu, ergometrinu, ergokryptinu, ergokrystinu a jejich odpovídajících epimerů v krmivech a surovinách pro jejich výrobu. Metoda je snadná, rychlá, finančně úsporná a lze ji rozšířit o nové analyty. Výsledky analýzy obilovin testovaných na přítomnost ergotových alkaloidů, byly prezentovány na mezinárodních konferencích se zaměřením na kontrolu potravin a krmiv [8,9].

8 Literatura

1. Doporučení komise ze dne 15. března 2012 o monitorování přítomnosti námelových alkaloidů v krmivech a potravinách (2012/154/EU).
2. EFSA. Scientific opinion on Ergot alkaloids in food and feed. EFSA Panel on Contaminants in the Food. EFSA Journal 2012;10(7):2798.
3. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2015/1940 ze dne 28. října 2015, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity námelových sklerocií v některých nezpracovaných obilovinách a ustanovení o monitorování a předkládání zpráv.
4. Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J.: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. J AOAC Int, 2003, vol. 96, no. 2, p. 412 – 431.
5. Bolechová, M.; Čáslavský, J.; Pospíchalová, M. and Kosubová, P. UPLC–MS/MS method for determination of selected pyrrolizidine alkaloids in feed. Food Chemistry, 170 (2015) 265–270.
6. Rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků (2002/657/ES).
7. Dokument SANCO/12495/2011 – Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
8. Bolechová-Čumová, M; Pospíchalová, M. Occurrence of ergot alkaloids and their corresponding epimers in feed in the Czech Republic. 37th Mycotoxin Workshop. June 1-3, 2015 Bratislava – Slovakia.
9. Bolechová-Čumová, M; Pospíchalová, M.: Occurrence of ergot alkaloids in feed and rye sclerotia in the Czech Republic. 7th International Symposium on recent advances in food analysis. November 3-6, 2015 Praha – Česká republika.

Zavedení detekce DP 356043 u sóji a MS8, Rf3, MS8xRf3 u řepky

Kateřina Staňková

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

Úvod

Geneticky modifikované neboli transgenní 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. Nejedná se však o tvorbu a vnášení uměle vytvořených genů.

Geneticky modifikované plodiny se vyznačují různými specifickými vlastnostmi, a to zejména odolností vůči škodlivým činitelům – škůdcům, chorobám, chladu, suchu, apod. anebo tolerantní vůči postřiku neselektivním herbicidům.

Další generace geneticky modifikovaných plodin, jejichž komerční využití prozatím není význačně rozšířené, mají přímý přínos také pro spotřebitele (např. geneticky modifikované plodiny s vyšším obsahem či lepší skladbou nutričních látek), příp. pro zemědělské účely (např. jedlé vakcíny, biodegradovatelné plasty, odstraňovače znečištění, aj.)

Geneticky modifikované olejninu hrají významnou roli ve světovém zemědělském sektoru, zejména geneticky modifikovaná sója. Přesto v EU není povoleno pěstovat žádnou geneticky modifikovanou olejninu. Geneticky modifikované olejninu a jejich produkty se v EU používají pouze v omezené míře. Některé typy geneticky modifikované sóji, řepky olejky a bavlny se mohou dovážet a zpracovávat v EU za účelem získání různých typů potravin nebo krmiv.

U sóji jsou genetické modifikace zaměřeny především na získání tolerance k neselektivním herbicidům (herbicid-tolerantní sója). Herbicid-tolerantní sója obsahuje gen tolerance k některému z neselektivních herbicidů (zpravidla *glyphosátu* nebo *glufosinátu*). Tato genetická

modifikace usnadňuje boj proti plevelům a snižuje riziko poškození sóji rezidui standardně používaných herbicidů. Výsledkem je snížení nákladů na herbicidy a zvýšení ohleduplnosti k životnímu prostředí.

Genetické modifikace se u sóji využívají také ke zlepšení kvality sójového oleje (vyšší obsah kyseliny olejové nebo nízký obsah kyseliny linolenové). Jedná se o tzv. druhou generaci rostlin, která přináší užitnou hodnotu pro spotřebitele, zatímco tzv. první generace geneticky modifikovaných rostlin (např. herbicid-tolerantní sója) pro pěstitele. Sójový olej získaný z takto modifikované sóji se vyznačuje vyšší stabilitou (nežlukne) a celkovou lepší trvanlivostí.

U sóji se zkouší řada genetických modifikací, např. odrůdy se změněným obsahem zásobních proteinů nebo odrůdy rezistentní k některým hmyzím škůdcům a hád'átkům.

U geneticky modifikované řepky olejné se komerčně pěstují odrůdy s tolerancí k neselektivním herbicidům (*glyfosátu*, *glufosinátu* aj.), s lepší kvalitou řepkového oleje (vyšší obsah *kyseliny laurové* nebo *olejové* v řepkovém oleji) a hybridy vzniklé pomocí genetických modifikací.

Pěstování herbicid-tolerantní řepky usnadňuje herbicidní ochranu a snižuje riziko poškození rostlin standardně používanými herbicidy. Výsledkem jsou pak vyšší výnosy semene, úspora času a zlepšení střídání plodin.

Za pomoci genetických modifikací lze levněji produkovat hybridní osivo řepky využitím geneticky řízené samčí sterility v kombinaci s herbicidní tolerancí. Tento způsob výroby hybridního osiva je velmi efektivní při nízkých nákladech a využívá se nejen u řepky, ale také u kukuřice a zeleniny.

Olej získaný z geneticky modifikované řepky s vyšším obsahem kyseliny laurové je svým složením podobný kokosovému nebo palmovému oleji. Je možné ho použít v potravinářském průmyslu při výrobě čokolád, cukrovinek, polev, aj.

Olej z geneticky modifikované řepky s vyšším obsahem kyseliny olejové je svým složením podobný podzemnicovému nebo olivovému oleji, vyniká vyšší stabilitou a trvanlivostí a je pro lidskou konzumaci nutričně hodnotnější.

Jsou také zkoušeny řepky s vyšším obsahem některých aminokyselin (methionin a lysin) pro zlepšení výživové hodnoty řepkových pokrutin. Prostřednictvím geneticky modifikované řepky je možné produkovat i některá léčiva a farmakologicky významné látky (např. krevní antikoagulant – hirudin).

Cílem práce bylo rozšířit spektrum dosud stanovovaných genetických modifikací u sóji a řepky. Nově zaváděnými transgeny jsou u sóji DP 356043 a u řepky MS8, Rf3 a MS8xRf3.

Sója DP 356043

Jedná se o geneticky modifikovanou sóju, která je odolná vůči dvěma typům herbicidů, a to ke glyfosátu a k herbicidům inhibujícím acetolaktát syntázu (ALS inhibitory). Vloženými genetickými elementy u této plodiny jsou dva geny, a to gen *gat4601* (glyphosate N-acetyltransferase z bakterie *Bacillus licheniformis*) nesoucí odolnost vůči glyfosátu a gen *gm-hra* (acetolactate synthase (*Glycine max*)) nesoucí odolnost k herbicidům inhibujícím acetolaktát syntázu. Elementy stanovitelné v rámci screeningu této genetické modifikace neobsahuje.

Sója DP356043 je v EU povolena v krmivech, které ji obsahují, sestávají se z ní nebo jsou z ní vyrobeny.

GM řepka MS8, Rf3, MS8 x Rf3

Geneticky modifikované řepky MS8 a Rf3 byly vyvinuty pro vytvoření hybridu MS8xRf3, který má větší výnos než rodičovská linie.

Linie MS8 je nositelkou genu *barnase* (phosphinothricin N-acetyltransferase) (*S. hygroscopicus*), který je odpovědný za samčí sterilitu. Transgenní linie Rf3 byla vytvořena pro obnovení plodnosti hybridní linie, za kterou je odpovědný gen *barstar* (barnase ribonuclease inhibitor (*Bacillus amyloliquefaciens*)) a pro toleranci ke glufosinátovým herbicidům, za kterou je odpovědný gen *bar* (phosphinothricin N-acetyltransferase (*S. hygroscopicus*)). Gen *bar* je element, který lze stanovit v rámci screeningu.

Krmiva, která obsahují nebo sestávají z MS8, Rf3, MS8 x Rf3 řepky jsou v Evropské Unii povolena. U krmiv z nich vyrobených probíhá proces prodloužení povolení.

1 Princip

Základem metod detekce genetických modifikací DP356043, MS8, Rf3 a MS8xRf3 je polymerázová řetězová reakce (dále PCR). Jedná se o hojně používanou metodu, při které dochází k mnohonásobnému zmnožení určitého úseku DNA.

PCR se provádí automatizovaně v termálním cykleru. Před vlastní PCR je důležité provést úplnou počáteční denaturaci DNA. Tím se zajistí, že při prvním kroku cyklu nedojde pouze k částečnému oddělení komplementárních řetězců, ale všechny molekuly původní DNA budou jednořetězcové a přístupné primerům. Následuje denaturační krok prvního cyklu. Během druhého kroku, tzv. annealingu přisedají primery ke specifickým sekvencím matricové DNA. Primery jsou navrženy tak, že se vážou k protilehlým řetězcům dvoušroubovice 3'-konci směrem k sobě a vymezují délku amplifikovaného úseku. Ve třetím kroku cyklu jsou primery prodlužovány DNA-polymerázou ve směru od 5'-konce ke 3'-konci, tzv. extenze. Následující cyklus začíná opět denaturací dvouvláknové DNA a vše se opakuje. Vzhledem ke specifické sekvenci primerů je amplifikovaný úsek mezi nimi stále stejný. Celkový produkt PCR se nazývá amplikon. Má definovanou délku pohybující se od desítek až po tisíce párů bazí (bp), která se stanoví pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

2 Materiál a metody

2.1 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy.
- 2 Váhy s přesností 0,01 g.
- 3 Vortex.
- 4 Centrifuga.
- 5 Vodní lázeň.
- 6 Nízkoobjemový spektrofotometr, vlnové délky (230, 260, 280) nm.
- 7 Minitřepačka.
- 8 Laminární box.
- 9 Termální cykler.
- 10 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 11 Elektroforetická vana a zdroj napětí.
- 12 Transiluminátor.

- 13 Fotodokumentační zařízení a příslušný software.
- 14 pH metr.
- 15 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) μ l a sterilní špičky s filtrem.
- 16 Plastové zkumavky o objemu 0,20 ml, 0,5 ml, 2 ml.
- 17 Výrobník ledu.
- 18 Přenosná UV lampa.
- 19 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, stojánky na zkumavky, nádoba na uchování ledu, odpadní nádoby.

Podle charakteru materiálu se materiál sterilizuje a dekontaminuje buď tepelně (v sušárně 1 h při (115 – 120) °C) nebo chemicky, např. 70% etanolem, (0,5 – 1) % chlornanem sodným, apod.).

2.2 Chemikálie

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

- 20 Lysis Buffer CF.
- 21 Buffer C2.
- 22 Buffer C3.
- 23 Wash buffer CQW.
- 24 Wash buffer C5 (koncentrát).
- 25 Elution buffer CE.
- 26 NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).
- 27 Proteinase K (lyofilizát).
- 28 Proteinase buffer PB.

REDTaq®ReadyMix™PCR Reaction Mix with MgCl₂, Sigma-Aldrich

- 29 REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ (dále REDTaq).
- 30 PCR voda.

REDExtract–N–Amp™ Plant PCR Kits, výrobce Sigma-Aldrich, univerzální kit pro PCR

- 31 Extraction solution.
- 32 Dilution solution.
- 33 REDExtract–N–Amp PCR Ready Mix (dále REDEx).

Amplifikační primery

- 34 DP356-f1 F: GTC GAA TAG GCT AGG TTT ACG AAA AA
35 DP356-r1 R: TTT GAT ATT CTT GGA GTA GAC GAG AGT GT
36 KVM085 F: GTT AGA AAA AGT AAA CAA TTA ATA TAG CCG G
37 HCA048 R: GGA GGG TGT TTT TGG TTA TC
38 KVM084 F: AGC ATT TAG CAT GTA CCA TCA GAC A
39 DPA165 R: CAT AAA GGA AGA TGG AGA CTT GAG
40 SOJGMO4F: GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C
41 SOJGMO4R: GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG
42 HMG-1 F: GGT CGT CCT CCT AAG GCG AAA G
43 HMG-2 R: GCA ACC AAC AGG CAC CAT C
44 RapB-F1: ACA AGC ACG GTC AAC TTC C
45 RapB-R1: GAG GTC GTC CGT CCA CTC

Příprava amplifikačních primerů

Primery se rozpustí, ředí a rozdělí do potřebných množství následujícím způsobem.

Zásobní roztok o koncentraci 100 μ M:

Do zkumavky s primerem v podobě prášku na dně, který nemusí být viditelný, se přidá voda vhodná pro PCR v množství uvedeném výrobcem. Jemným pipetováním se promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se rozpipetuje po 50 μ l do sterilních zkumavek o objemu 0,5 ml. Pokud se rozdělí zásobní roztok v jiných množstvích, uvede se objem na zkumavku. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají při teplotě $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Pracovní roztok o koncentraci 20 μ M:

Do jedné zkumavky zásobního roztoku se přidá čtyřnásobný objem vody vhodné pro PCR. Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se po (20 – 25) μ l a zamrazí na teplotu $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Do reakční směsi PCR se přidávají pracovní roztoky primerů.

Chemikálie pro přípravu elektroforetického pufru TAE

Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na₂EDTA.

Trizma base.

Ledová kyselina octová.

Hydroxid sodný, c (NaOH) = 1 mol/l. 10 g NaOH se rozpustí ve vodě a doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

Příprava TAE pufru

Příprava zásobního roztoku $50 \times$ TAE

1. Příprava 0,5 M zásobního roztoku EDTA:

186,1 g Na_2EDTA se vmíchá do 750 – 800 ml (re)destilované vody. Na_2EDTA se úplně nerozpustí, dokud nebude pH vyšší než 7,0. pH se upraví na 8,5 přidáním NaOH. Potom se doplní (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml. Přefiltruje se přes fritu předem ošetřenou teplotou (115 – 120) °C po dobu 30 min až 1 hod. Roztok se skladuje neomezeně při laboratorní teplotě.

2. Příprava 2 M Tris:

Náváží se 242 g Trizma base a rozpustí v 650 ml (re)destilované vody. Přidá se 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml předem připraveného 0,5 M zásobního roztoku EDTA (pH 8,5). Doplní se (re)destilovanou vodou do celkového objemu 1000 ml. Neautoklávuje se. Uchovává se v těsně uzavřené láhvi při laboratorní teplotě.

Příprava pracovního roztoku $1 \times$ TAE pro elektroforézu

Odměří se 20 ml zásobního roztoku $50 \times$ TAE a doplní se (re)destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

Příprava agarózového gelu

Používá se 0,8% gel pro stanovení kvality vyizolované DNA (0,64 g agarózy) a 2% gel pro hodnocení amplifikačních fragmentů (1,6 g agarózy). Do Erlenmeyerovy baňky se naváží dané množství práškové agarózy a přidá se 80 ml pracovního $1 \times$ TAE pufru. Vaří se (15 – 20) min při (150 – 200) °C na elektromagnetickém míchadle do doby, až se roztok vyčeří a vzduchové bubliny vymizí i po krouživém zamíchání. Mezitím se připraví nalévací vana a vhodný hřebínek.

Po mírném zchladnutí se přidá 10 μl pracovního roztoku ethidiumbromidu (interkalační barvivo sloužící ke zviditelnění DNA v gelu) a míchá se 1 min. Poté se míchadélko vyjme a agar se nalije do vany s hřebínkem. Asi po (20 – 30) min, v závislosti na teplotě prostředí, lze opatrně vyjmout hřebínek a přenést gel z nalévací vany do elektroforetické vany s pracovním roztokem $1 \times$ TAE pufru.

Ostatní

Voda vhodná pro PCR.

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

(re)destilovaná voda.

Agaróza.

Zásobní roztok ethidium bromidu. Pracovní roztok se získá zředěním zásobního roztoku $10 \times$ (re) destilovanou vodou.

Elektroforetický marker pro amplifikáty (např. GeneRuler™50bp DNA Ladder).

$6 \times$ Loading Dye Solution.

Elektroforetický hmotnostní marker pro genomovou DNA (např. EZ Load™ Molecular Ruler Precision Mass, Biorad).

(0,5 – 1)% roztok chlornanu sodného.

70% etanol.

Testovaný materiál

Pozitivní kontroly se používají pro potvrzení přítomnosti amplifikovaného úseku. Negativní kontroly se používají pro prokázání specifity reakce, a to jen v případě nově zaváděných genetických modifikací.

DP 356043

ERM®BF425b (naše označení CRM 11/2012) obsahující 0,1 % sóji DP356043 a ERM®-BF425c (naše označení CRM 12/2012) obsahující 0,85% sóji DP356043z IRMM Institute for reference Material and Measurements. Tyto pozitivní kontroly jsou ve formě sojového prášku, proto sez nich musí vyizolovat DNA.

MS8xRf3

pozitivní kontrola s naším označením CRM 13/2012 ze setu Rapeseed GMO Standard Set for Rapeseed GT73, GS40/90,MS8xRf3 and Oxy235 obsahující 1% geneticky modifikované DNA od Sigmy-Aldrich. Tato pozitivní kontrola je ve formě lyofilizátu a je nutné ji před použitím rozpustit.

3 Pracovní postup

3.1 Izolace DNA

Před začátkem vlastní izolace DNA je nutno připravit tyto roztoky:

Pufr C4: převede se kvantitativně celý obsah tuby obsahující pufr C2 do tuby s obsahem pufru C3 a dobře promíchá. Výsledný pufr C4 je stabilní po dobu 1 roku uskladněný při laboratorní

teplotě. Pro dokonalejší rozpuštění obou komponent se doporučuje inkubace při teplotě 45 °C po dobu 5 min.

Pufr C5: ke koncentráту pufru C5 se přidá (95 – 100)% etanol, a to v množství uvedeném na lahvičce pufru. Po zředění se označí přidání etanolu. Takto upravený pufr lze uchovávat při laboratorní teplotě 1 rok.

Proteináza K: k lyofilizované Proteináze K se přidá množství proteinázového pufru uvedené na jejím obalu. Roztok proteinázy K je stabilní při teplotě –20 °C po dobu 6 měsíců.

Vlastní izolace DNA probíhá v několika krocích, nejdřív se musí připravit pracovní plocha. Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením povrchů 70% etanolem a působením UV záření po dobu 30 min.

Vodní lázeň se předehřeje na 65 °C a dá se předehřát lyzační pufr CF na teplotu 65 °C. Do 2ml zkumavky se naváží 200 mg zhomogenizovaného vzorku (pozitivní kontroly). Prvním krokem izolace DNA je buněčná lyze, kdy se ke vzorku přidá 550 µl lyzačního pufru CF, dobře promíchá (15 s), přidá se 10 µl proteinázy K a 10 µl RNázy A a opět se promíchá (2 – 3) s. Inkubuje se 30 min při 65 °C. Poté se směs 10 min centrifuguje (>10000 g), až se buněčné zbytky usadí. Připraví se podmínky pro vázání DNA na silikagel tak, že se převede 300 µl čistého supernatantu z kroku 3 do nové 2 ml zkumavky. Přidá se 300 µl pufru C4 a 200 µl etanolu (96 – 100)% a vortexuje se 30 s. Tuba NucleoSpin se umístí do nové 2 ml centrifugační zkumavky a přidá se 750 µl směsi z předchozího kroku. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Následuje promývání DNA, které probíhá ve třech po sobě následujících krocích. V prvním promytí se napipetuje 400 µl pufru CQW do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Ve druhém promytí se napipetuje 700 µl pufru C5 do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 1 min při 11000 g. Proteklá tekutina se vylije. Ve třetím promytí se napipetuje dalších 200 µl pufru C5 do NucleoSpin tuby. Centrifuguje se 2 min při 11000 g, aby se úplně odstranil pufr C5 (rezidua etanolu v promývacím pufru C5 mohou inhibovat enzymatickou reakci). Posledním krokem izolace DNA je eluce. Předehřeje se eluční pufr CE na 70 °C. Tuba NucleoSpin se umístí do nové 1,5ml centrifugační zkumavky. Na membránu v NucleoSpin tubě se napipetuje 100 µl předehřátého elučního pufru CE. Inkubuje se 5 min při laboratorní teplotě, a poté se centrifuguje se 1 min při 11000 g, aby se shromáždila DNA.

Eluát obsahuje čistou genomovou DNA. Pro krátkodobé skladování se uchovává při teplotě (2 – 8) °C, pro dlouhodobé při -20 °C.

3.2 Měření koncentrace a určení kvality vyizolované DNA

Důležitým krokem po vyizolování DNA je orientační spektrofotometrické stanovení její koncentrace, případně dalších příměsí a zjištění její kvality – celistvosti pomocí gelové elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu.

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

Měření při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm umožní vedle stanovení koncentrace získané DNA i hodnocení čistoty vzorku. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při (260 a 280) nm a (260 a 230) nm.

Hodnoty poměru 260/280 se nejčastěji pohybují v rozmezí (1,7 – 2,0). Ideální hodnoty jsou (1,7 – 1,8). Jestliže je naměřená hodnota pod 1,7, je DNA znečištěná proteiny nebo jinými organickými látkami. Pokud je naměřená hodnota nad 1,9, je DNA znečištěná RNA nebo organickými látkami.

Hodnoty poměru 260/230 musejí být vyšší než 1,5. Ideální hodnoty jsou (2,0 – 2,2). Pokud je naměřená hodnota nižší než 1,5, je získaná DNA kontaminována látkami jako jsou fenol a guanidinové soli.

Vlastní měření DNA

Koncentrace DNA se měří proti slepému vzorku, kterým je roztok, v němž je DNA rozpuštěná (v našem případě se jedná o eluční roztok z kitu NucleoSpin® Food). Použijí se 2 µl vzorku. Každý vzorek se měří 2 ×. Naměřené hodnoty se zprůměrují. Pro následnou PCR zpravidla vyhovuje koncentrace 5 ng / µl templátové DNA. Pokud je její koncentrace vyšší, je třeba ji na tuto hodnotu naředit vodou vhodnou pro PCR.

Určení kvality vyizolované DNA

Pomocí elektroforézy v 0,8% agarózovém gelu se zjistí kvalita vyizolované DNA (zda je celistvá nebo degradovaná) a přítomnost RNA.

Vzorky se smíchají s barvivem 6 × Loading Dye Solution v množství 2 µl barviva a 3 µl vyizolované DNA a spolu s Load Precision Molecular Mass standardem se nanesou do jamek gelu a spustí se elektroforéza (70 V, 75 min).

3.3 Polymerázová řetězová reakce

Pro zavedení detekce nových genetických modifikací byly využity již zavedený JPP postup Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR (postup č. 10250.1) a metody validované EURL. Sekvence jednotlivých amplifikačních primerů a amplifikační programy byly převzaty z metod validovaných EURL. Při zavádění nových PCR detekcí se provede z důvodu opakovatelnosti pět na sobě nezávislých PCR reakcí (amplifikací).

Vnitřní gen sója

primery: SOJGMO4F, SOJGMO4R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	60	1
Denaturace	94	50	35
Annealing	57	60	
Extenze	72	115	1
Závěrečná extenze	72	300	1

délka amplikonu: 118 bp

Transgenní sója DP356043

primery: DP356-f1, DP356-r1

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a extenze	60	60	

délka amplikonu: 99 bp

Vnitřní gen řepka

primery: HMG-1 F, HMG-2 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	180	1
Denaturace	94	30	40
Annealing a extenze	59	30	
Závěrečná extenze	72	180	1

délka amplikonu: 219 bp

Screeningový element bar

primery: RapB-F1, RapB-R1

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	40
Annealing a extenze	60	60	

délka amplikonu: 60 bp

Transgenní řepka MS8

primery: KVM085 F, HCA048 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing a extenze	60	60	

délka amplikonu: 130bp

Transgenní řepka Rf3

primery: KVM084 F, DPA165 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing	60	60	

délka amplikonu: 139bp

Transgenní řepka MS8xRf3

primery: KVM085 F, HCA048 R, KVM084 F, DPA165 R

amplifikační program:

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Dekontaminace	50	120	1
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	15	45
Annealing	60	60	

délka amplikonu: 130, 139 bp

Provedení vlastní PCR reakce

Používané amplifikační kity REDTaq a REDEx nejsou zcela zaměnitelné. REDEx se používá pro duplexní PCR, pro ostatní jednoduché reakce postačující REDTaq (v případě potřeby mohou být provedeny i kitem REDEx, neboť specifita je dána amplifikačními primery).

Laminární box se (20 –30) min vysvítí UV zářením. Předměty v něm umístěné a jeho prostor se dekontaminují 70% etanolem. Připraví se pipety, sterilní špičky s filtrem, sterilní zkumavky, odpadní nádoba s vloženým sáčkem na použitý materiál, stojánky, apod. Stanoví se počet reakcí (tj. počet vzorků, beztemplátová, negativní kontrola, použije-li se, a pozitivní kontrola). Podle tabulek reakčních směsí (Tabulka 1 a Tabulka 2) se vypočítají celkové objemy všech součástí reakce. Jednotlivé reagenty se uchovávají v mrazáku, proto se musejí předem rozmrazit, buď při laboratorní teplotě, nebo v lednici. Rozpuštěné obsahy zkumavek se promíchají jejím převrácením nebo krátkým vortexováním a centrifugují na minicentrifuze. PCR směs se připravuje na ledu.

REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂

Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce (Tabulka 1). Reakční směs se důkladně, ale opatrně promíchá (obracení zkumavky, vortex) a rozdělí se po 22,5 µl do označených zkumavek. Poté se do zkumavek přidá 2,5 µl templátové DNA. Do beztemplátové kontroly se místo DNA přidá voda vhodná pro PCR.

Pipetuje se v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, negativní kontrola a nakonec pozitivní kontrola. Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo vypařování směsi během reakce. Mírným poklepáním se promíchají, zcentrifugují na minicentrifuze, vloží se do termálního cykleru a zahájí se příslušná PCR amplifikace.

REDExtract-N-Amp™ Plant PCR Kits

Izoláty DNA získané pomocí výše uvedených izolačních kitů se musí pro amplifikaci tímto kitem upravit tak, že se smíchají v poměru 1 : 1 se směsí Extraction Buffer : Dilution Buffer (1 : 1). Požadovaný objem 4 µl roztoku templátu vkládaný do 1 PCR reakce tedy tvoří 2 µl izolátu DNA a 2 µl této směsi pufrů na 20 µl celkové reakční směsi v 1 PCR. Celková reakční směs se sterilně smíchá v pořadí, v jakém jsou její složky uvedeny v tabulce (Tabulka 2). Reakční směs se důkladně, ale opatrně promíchá (obracení zkumavky, vortex) a rozdělí se po 16 µl do označených zkumavek. Poté se do zkumavek přidá 4 µl templátové DNA. Do beztemplátové kontroly se místo DNA přidá voda vhodná pro PCR.

Pipetuje se v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, negativní kontrola a nakonec pozitivní kontrola. Zkumavky se pečlivě zavíčkují, aby se zabránilo vypařování směsi během reakce. Mírným poklepem se promíchají, zcentrifugují na minicentrifuze, vloží se do termálního cykleru a zahájí se příslušná PCR amplifikace.

Tabulka 1. Složení reakční směsi REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂.

Složka	1 reakce (µl)
PCR voda	9
REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl ₂	12,5
Primer F	0,5
Primer R	0,5
Templát	2,5

Tabulka 2. Složení reakční směsi REDExtract–N-Amp™ Plant PCR Kits - duplexní PCR.

Složka	1 reakce (μl)
PCR voda	4,4
REDExtract–N-Amp™ Plant PCR Kits	10
Primer F	0,4
Primer R	0,4
Primer F	0,4
Primer R	0,4
Templát	4

Elektroforéza v agarózovém gelu

2% gel se vloží do elektroforetické vany a převrství pracovním 1 × TAE pufrem několik mm nad jeho povrch. Vzorky se nanesou do jamek gelu v tomto pořadí: beztemplátová kontrola, negativní kontrola, elektroforetický marker a pozitivní kontrola. Objem vzorku nanášeného do jedné jamky závisí na typu hřebínku a jeho potřebném množství. Amplifikáty získané pomocí obou kitů se nanáší přímo z PCR zkumavek, protože obsahují nanášecí barvivo pro elektroforézu. Po nanesení kontrol a markerů do jamek v gelu se spustí elektroforéza. Doporučuje se nastavení zdroje (100 – 140) V, maximum mA, (30 – 60) min chodu. Tyto hodnoty lze měnit dle potřeby a pokynů v návodu pro použití elektroforetického zdroje. Rozdělení a uspořádání pruhů se sleduje prosvícením na transiluminátoru, vyfotografováním a přenesením do počítače.

4 Výsledky a diskuze

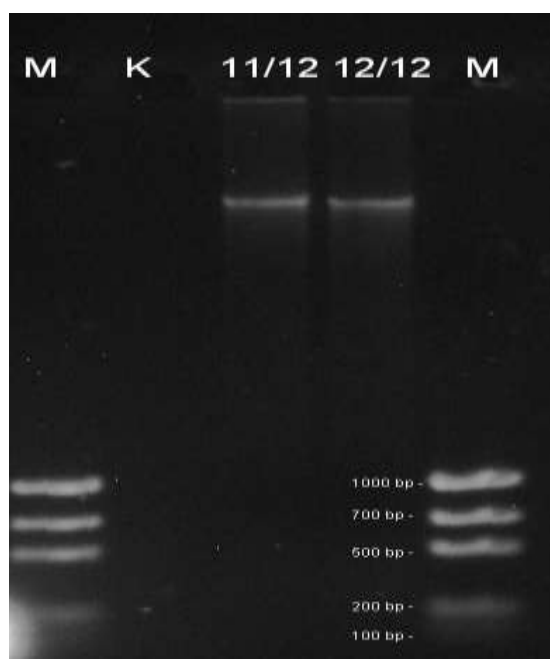
DP 356043

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

Tabulka 3. Naměřené koncentrace a hodnoty určujících čistotu vyextrahované DNA.

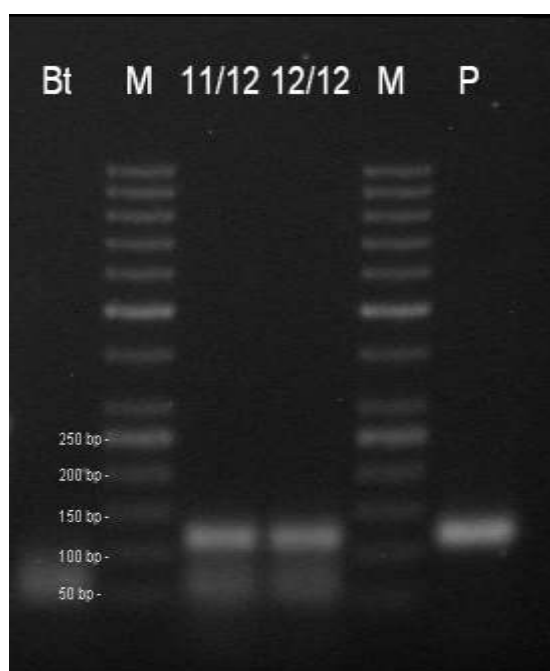
Vzorky	Koncentrace (ng/μl)	A 260/A 280	A 260/A 230
CRM 11/2012	1874,1	2,22	2,3
CRM 11/2012	1870,1	2,21	2,31
CRM 12/2012	2176,4	2,2	2,3
CRM 12/2012	2170,8	2,19	2,29

Určení kvality vyizolované DNA



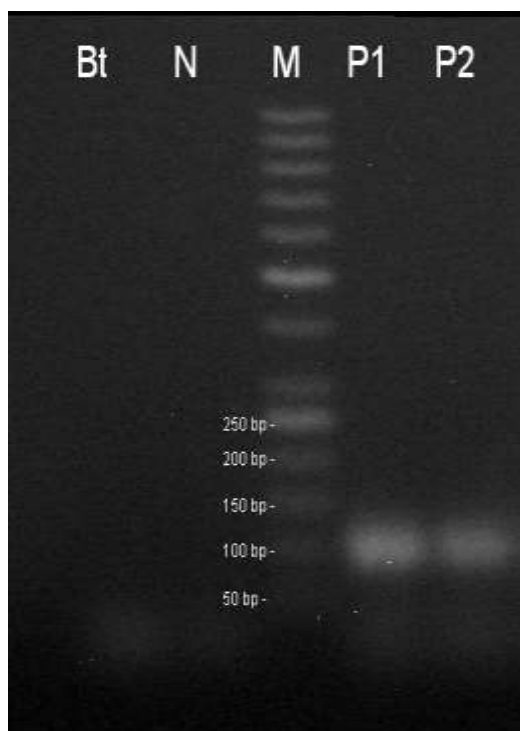
Obr 1. Určení kvality vyizolované DNA pozitivních kontrol CRM 11/2012 (11/12) a CRM 12/2012 (12/12), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.

Stanovení vnitřního genu sóji

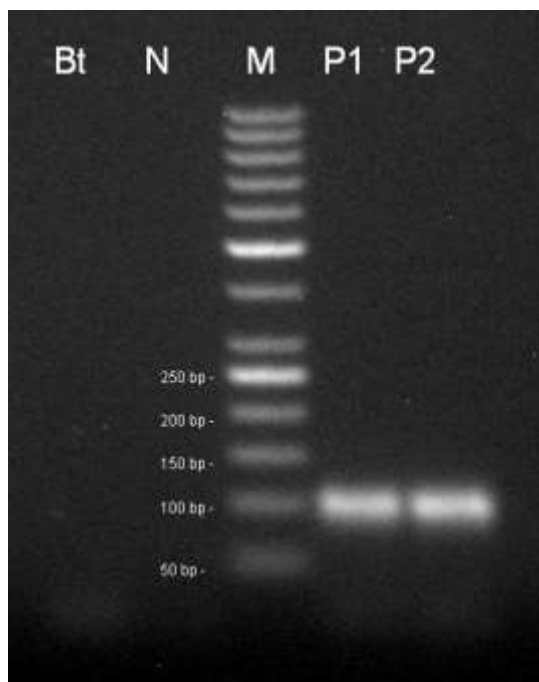


Obr 2. Stanovení vnitřního genu sóji 118bp u pozitivních kontrol CRM 11/2012 (11/12) a CRM 12/2012 (12/12), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 1/2001. Amplifikační kit REDTaq.

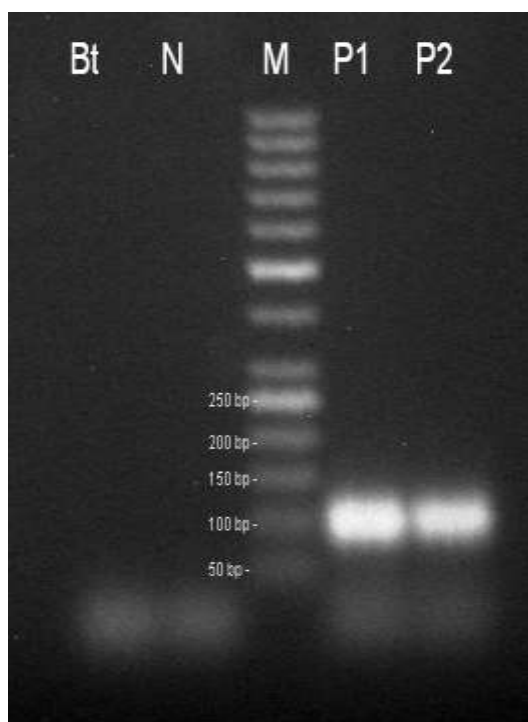
Stanovení transgenu DP356043



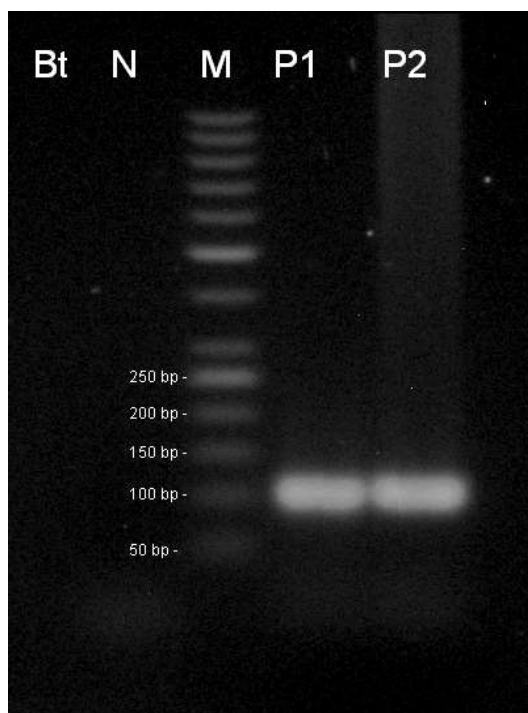
Obr 3. Stanovení transgenu DP356043 sóji 99bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 1/2001 (negativní sója), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 11/2012 a P2 pozitivní kontrola CRM 12/2012. Amplifikační kit REDTaq.



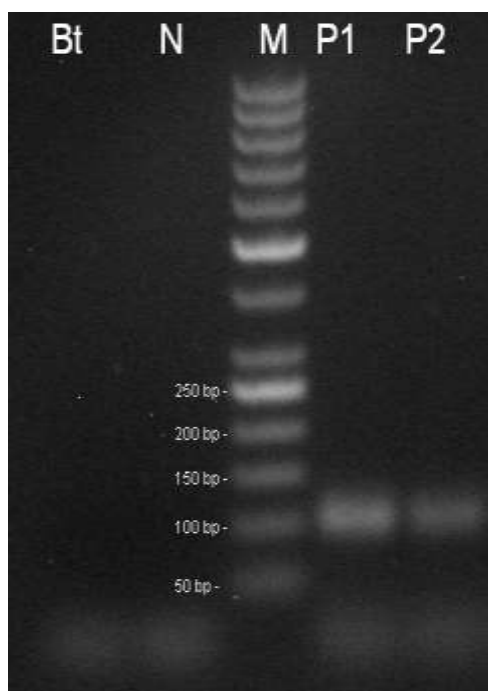
Obr 4. Stanovení transgenu DP356043 sóji 99bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 (negativní kukuřice), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 11/2012 a P2 pozitivní kontrola CRM 12/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 5. Stanovení transgenu DP356043 sóji 99bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 5/2006 (negativní řepka), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 11/2012 a P2 pozitivní kontrola CRM 12/2012. Amplifikační kit REDTaq.



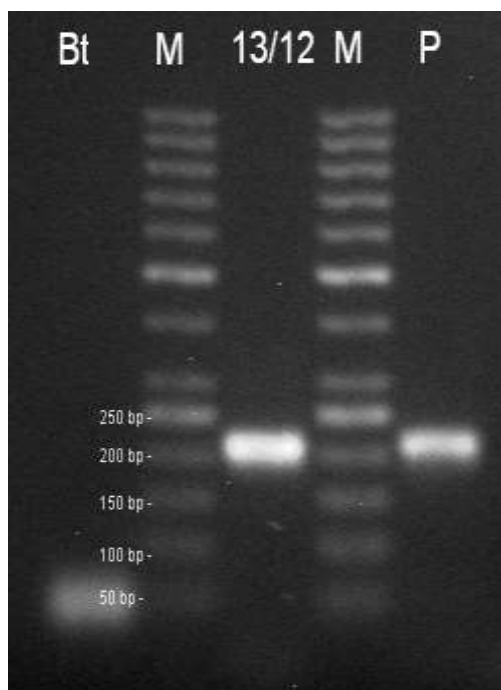
Obr 6. Stanovení transgenu DP356043 sóji 99bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola IRM 1/2010 (negativní rýže), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 11/2012 a P2 pozitivní kontrola CRM 12/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 7. Stanovení transgenu DP356043 sóji 99bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2011 (negativní brambory), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 11/2012 a P2 pozitivní kontrola CRM 12/2012. Amplifikační kit REDTaq.

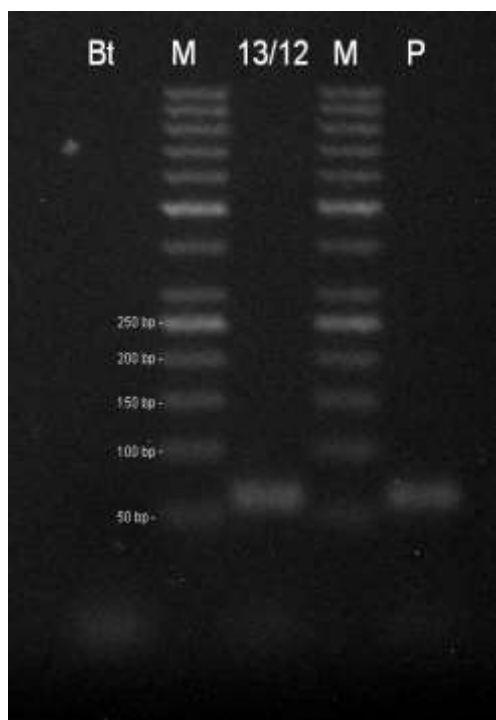
MS8, Rf3, MS8 x Rf3

Stanovení vnitřního genu řepky



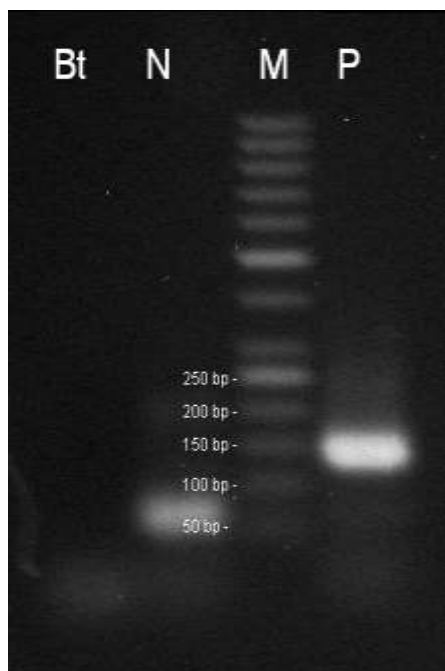
Obr 8. Stanovení vnitřního genu řepky 219bp u pozitivní kontroly CRM 13/2012 (13/12), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 5/2006. Amplifikační kit REDTaq.

Stanovení screeningového elementu bar

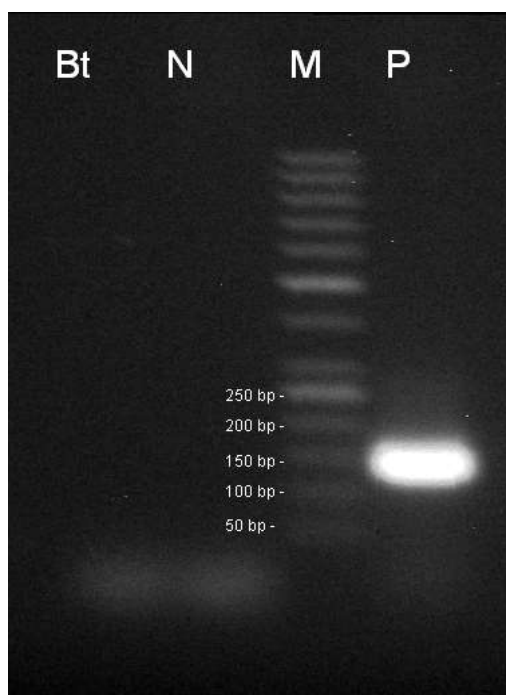


Obr 9. Stanovení screeningového elementu bar 60bp u pozitivní kontroly CRM 13/2012 (13/12), Bt – beztemplátová kontrola, M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 6/2009. Amplifikační kit REDTaq.

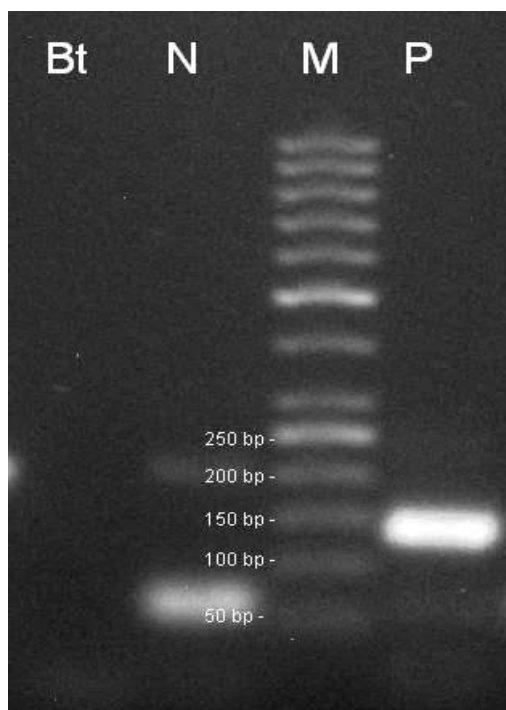
Stanovení transgenu Rf3



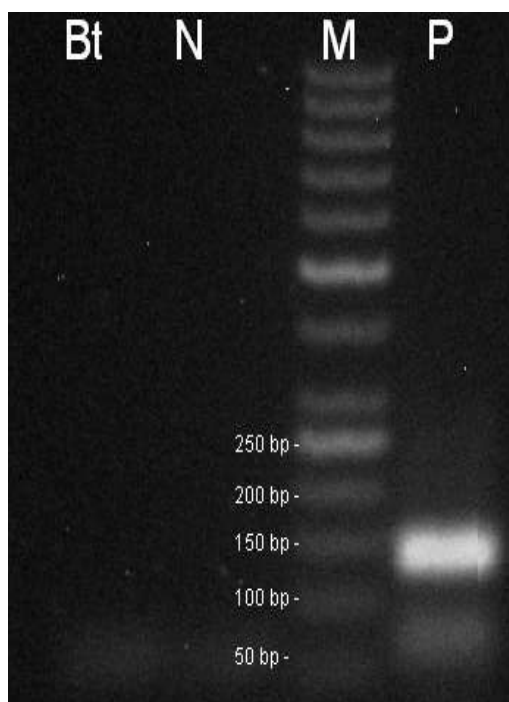
Obr 10. Stanovení transgenu Rf3 řepky 130bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 5/2006 (negativní řepka), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDTaq.



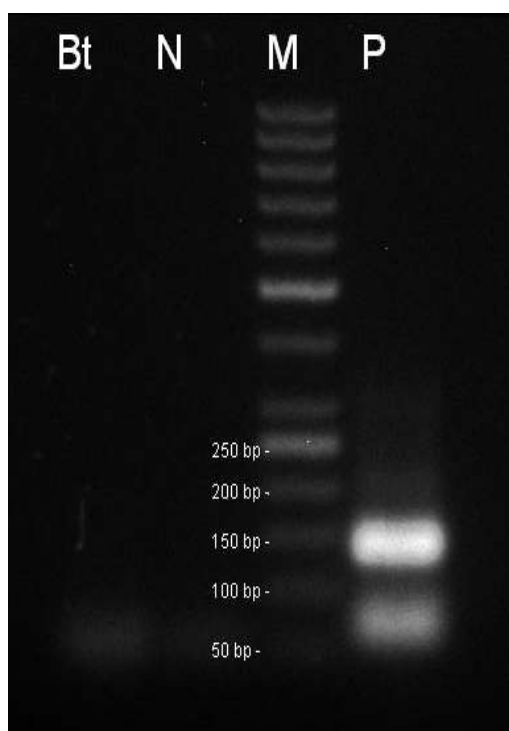
Obr 11. Stanovení transgenu Rf3 řepky 130bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 (negativní kukuřice), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 12. Stanovení transgenu Rf3 řepky 130bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola IRM 1/2010 (negativní rýže), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDTaq.

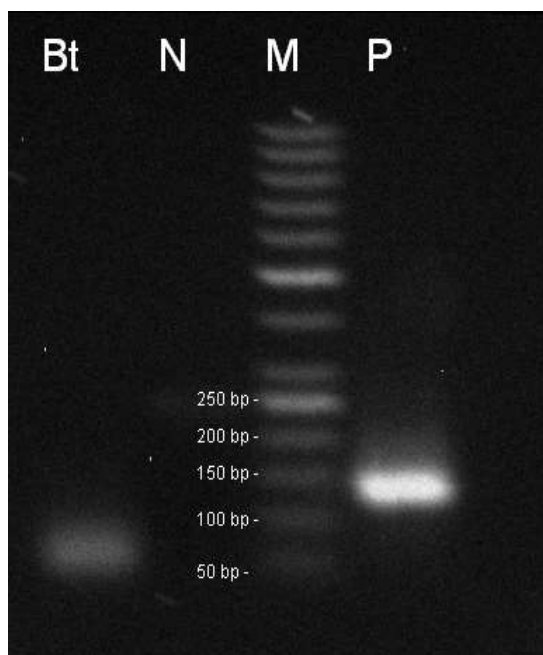


Obr 13. Stanovení transgenu Rf3 řepky 130bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2011 (negativní brambory), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDTaq.

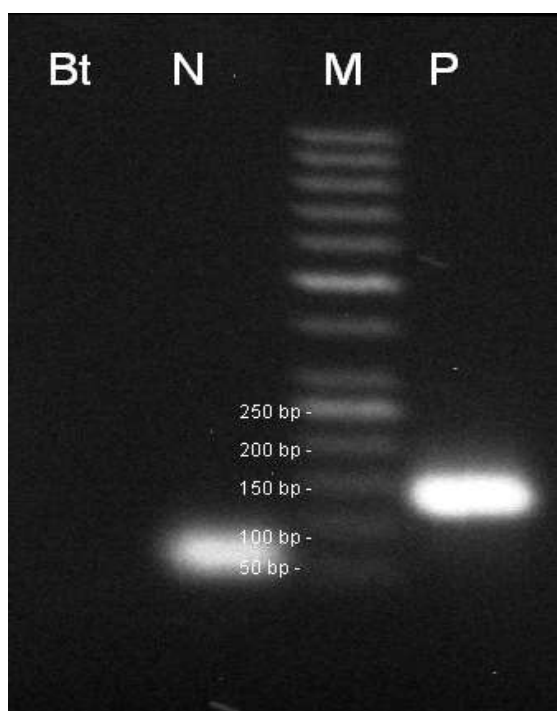


Obr 14. Stanovení transgenu Rf3 řepky 130bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 1/2001 (negativní sója), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDTaq.

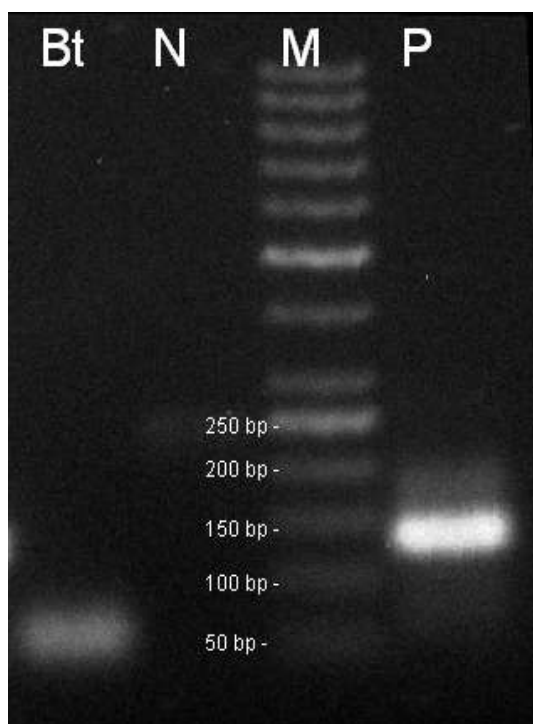
Stanovení transgenu MS8



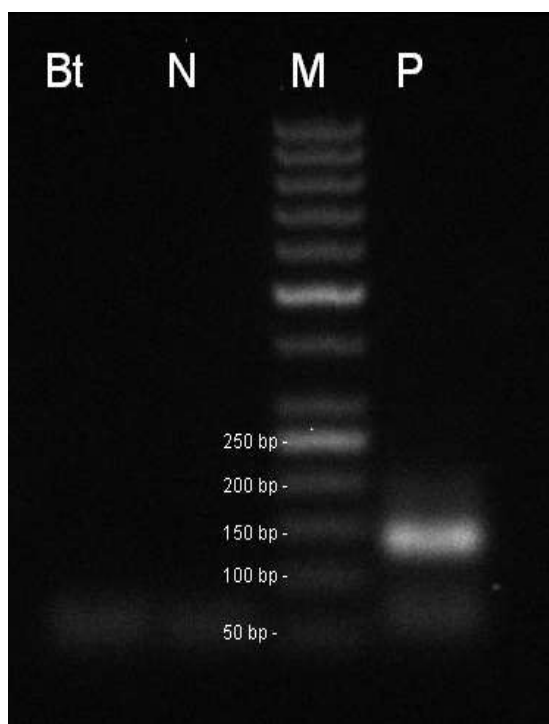
Obr 15. Stanovení transgenu MS8 řepky 139bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 5/2006 (negativní řepka), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDTaq.



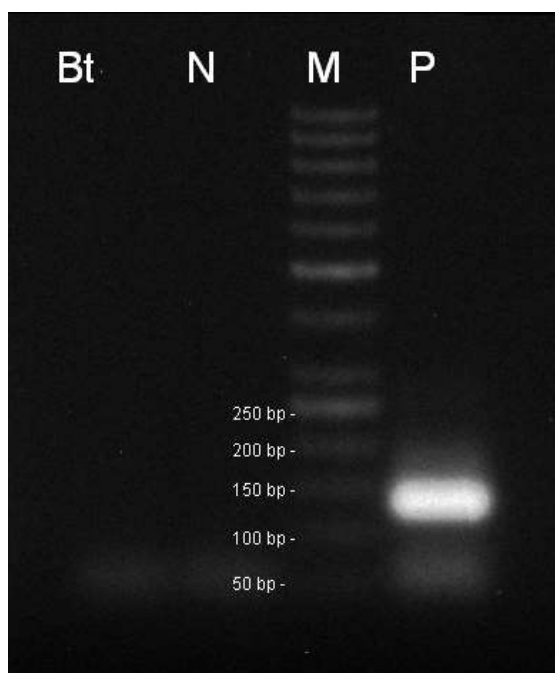
Obr 16. Stanovení transgenu MS8 řepky 139bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 (negativní kukuřice), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDTaq.



Obr 17. Stanovení transgenu MS8 řepky 139bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola IRM 1/2010 (negativní rýže), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDTaq.

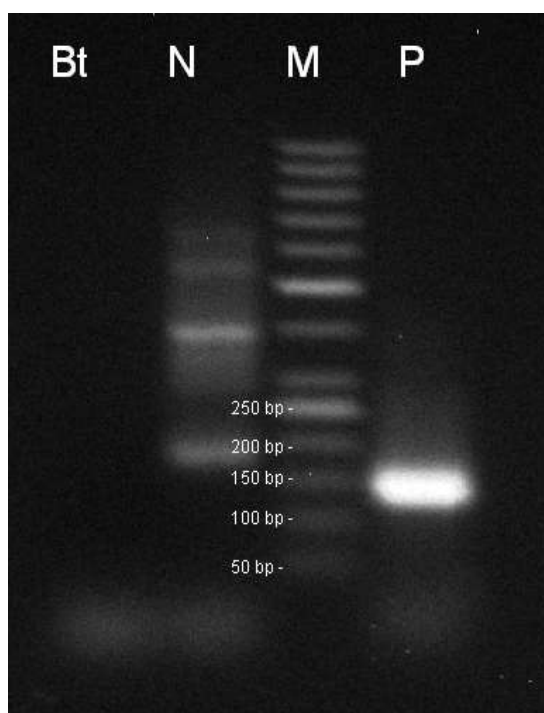


Obr 18. Stanovení transgenu MS8 řepky 139bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2011 (negativní brambory), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDTaq.

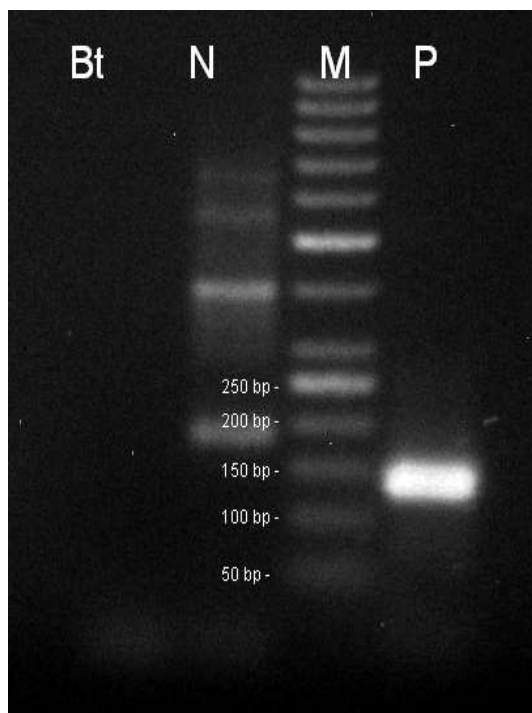


Obr 19. Stanovení transgenu MS8 řepky 139bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 1/2001 (negativní sója), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDTaq.

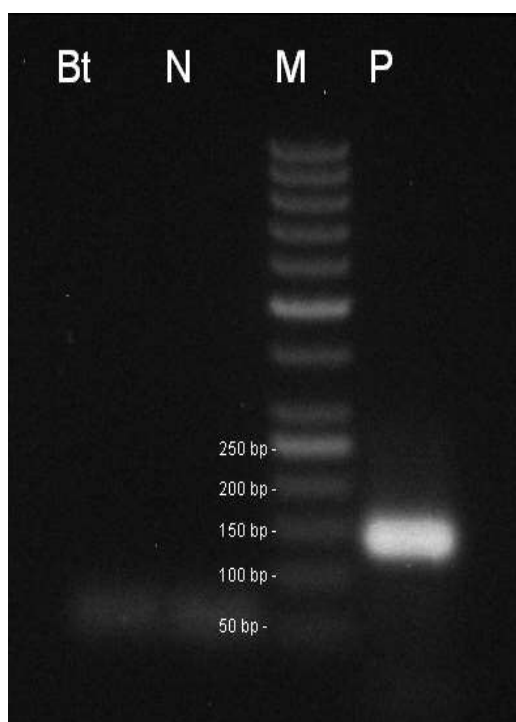
Stanovení transgenu MS8xRf3



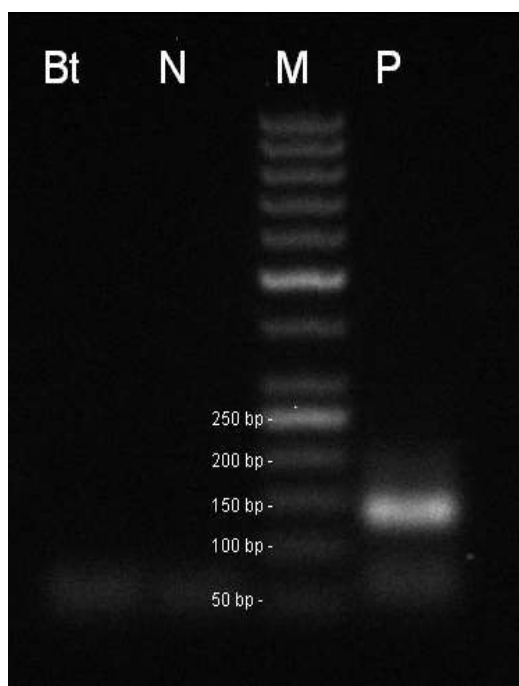
Obr 20. Stanovení transgenu MS8xRf3 řepky 130, 139bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 5/2006 (negativní řepka), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDEx.



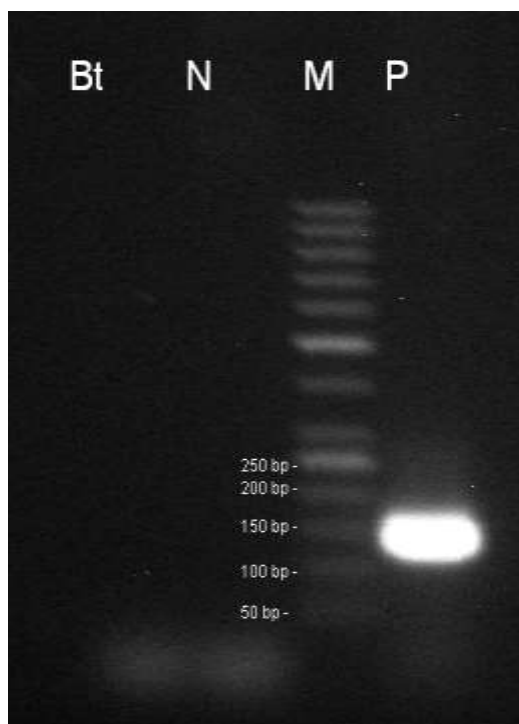
Obr 21. Stanovení transgenu MS8xRf3 řepky 130, 139bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 (negativní kukuřice), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDEx.



Obr 22. Stanovení transgenu MS8xRf3 řepky 130, 139bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola IRM 1/2010 (negativní rýže), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDEx.



Obr 23. Stanovení transgenu MS8xRf3 řepky130, 139bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2011 (negativní brambory), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDEx.



Obr 24. Stanovení transgenu MS8xRf3 řepky 130, 139bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 1/2001 (negativní sója), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 13/2012. Amplifikační kit REDEx.

U hybridní řepky MS8xRf3 je na gelu viditelný pouze jeden produkt, a to z důvodu, že MS8 i Rf3 mají téměř srovnatelný počet bp a pruhy nelze na 2% agarózovém gelu od sebe odlišit. Vzhledem k tomu, že se na trhu v EU vyskytuje pouze hybrid obsahující jak transgen MS8, tak Rf3, záleží na laboratoři, jestli zvolí jednoduchou PCR reakci s použitím amplifikačního kitu REDTaq a jednoho páru primerů pro stanovení buď MS8 nebo Rf3 a nebo použije duplexní PCR reakci s použitím amplifikačního kitu REDEx a 4 párů primerů pro stanovení hybridu MS8xRf3.

Během verifikace se postupovalo podle metody JPP (postup č. 10250.1) a metod validovaných EURL. Zachovaly se jednotlivé objemy a složky PCR reakce, sekvence primerů i amplifikační programy.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že testovaný certifikovaný referenční materiál vykazuje pruh v příslušném místě. Některé z těchto pruhů, zejména u nižší koncentrace DNA, jsou však na hranici viditelnosti (především v tištěné verzi, která má poněkud horší kvalitu oproti původním snímkům uloženým v počítači).

Detekovatelnost pruhů DNA je závislá na těchto faktorech:

- Koncentraci templátové DNA.
- Kvalitě templátové DNA, která závisí jak na způsobu izolace, tak na opakovaném rozmrazování a zmrazování alikvotů ve zkumavkách.
- Kvalitě amplifikačních primerů. Jejich kvalita je také závislá na opakovaném rozmrazování a zmrazování.
- Kvalitě gelu a provedení elektroforézy.

5 Závěr

Cílem práce bylo zavést metody pro detekci nových genetických modifikací, a to transgenů DP 356043 u sóji a transgenů MS8, Rf3 a MS8xRf3 u řepky, a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných transgenů v laboratoři OMB. Úkol se podařilo splnit. Tyto metody se zařadily do postupu zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv a osiv.

6 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postup 10250.1.
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. Genetické modifikace v České republice a opatření k zajištění biologické bezpečnosti, Roudná M. (Ed.) et al., **2011**, Ministerstvo životního prostředí, Praha.

Stanovení organických forem selenu ve vzorcích krmiv

Eva Niedobová, Eva Čížmárová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,

Hroznová 2, 656 06 Brno

eva.niedobova@ukzuz.cz

1 Souhrn

V rámci vývojového úkolu byla optimalizována metoda pro stanovení organických a anorganických forem selenu v minerálních krmivech metodou HPLC-ICP-MS za účelem úřední kontroly různých forem selenu v krmivech.

2 Úvod

Selen jako jeden z hlavních nutričních prvků hraje významnou roli v metabolismu lidí a zvířat. Je součástí různých enzymů (v současné době je identifikováno více než 30 selenoproteinů), které jsou navázány na metabolismus thyroidních hormonů, regulaci redoxního potenciálu, ale zejména jako součást glutathionperoxidázy, která má „antioxidační“ úlohu. (1, 2, 3). Proto jsou selenu připisovány antikarcinogenní účinky. Při nedostatku selenu proto mohou být všechny zmíněné procesy negativně ovlivněny. Naproti tomu jeho nadbytek je považován taktéž za nebezpečný. Jedním z hlavních důvodů je selenóza. Některé prameny uvádějí také karcinogenní účinky, nicméně oficiálně není selen klasifikován jako karcinogen. Selen se vyskytuje jak v anorganických, tak v organických formách, které se liší biodostupností. Obecně jsou organicky vázané formy selenu biodostupnější, a proto jsou v posledních letech populární jak ve výživě lidí, tak i zvířat. (4, 5, 6)

Jediný možný příjem selenu je potravou, přičemž hovoříme-li o obsahu selenu v krmivech pro zvířata, je jeho přirozený obsah nízký. Proto se do krmiv selen přidává. Je klasifikován jako doplňková látka a podléhá úředním kontrolám. V rámci EU jsou povoleny tyto sloučeniny selenu: seleničitan sodný, selenan sodný, organické formy selenu produkované *Saccharomyces cerevisiae* (CNCM I-3060, NCYC R397), selenomethionin produkovaný

Saccharomyces cerevisce (CNCM I-3399, NCYC R646), a nově hydroxyanalog selenomethioninu (R,S-2-hydroxy-4-methylselenobutanová kyselina) a L-selenomethionin (7).

Tabulka 1. Seznam povolených doplňkových látek s maximálním povoleným obsahem selenu.

Typ doplňkové látky	Maximální obsah Se (mg/kg) v kompletním krmivu (vlhkost 12%)	Maximální obsah organicky vázaného selenu (mg/kg) v kompletním krmivu (vlhkost 12%)
Seleničitan sodný	0,5	-
Selenan sodný	0,5	-
Organické formy selenu produkované Saccharomyces cerevisce CNCM I-3060	0,5	0,2
Organické formy selenu produkované Saccharomyces cerevisce NCYC R397	0,5	-
Selenomethionin produkovaný Saccharomyces cerevisce CNCM I-3399	0,5	-
Selenomethionin produkovaný Saccharomyces cerevisce NCYC R646	0,5	0,2
Hydroxyanalog selenomethioninu (R,S-2- hydroxy-4- methylselenobutanová kyselina)	0,5	0,2
L-selenomethionin	0,5	0,2

Je nutné rozlišovat jednotlivé formy selenu. Proto je stanovení pouze celkového obsahu selenu v krmivech nedostačující. Pro speciální stanovení selenu je potřeba zvolit extrakci, která bude dostatečná i pro extrakci organicky vázaných forem selenu v proteinech. Nejčastěji se v literatuře objevuje enzymatická extrakce, případně „kyselá“ hydrolýza. Obě techniky jsou

schopny extrahovat z proteinu potřebné selenové aminokyseliny. Ke stanovení obsahu jednotlivých specií selenu se používají kombinované techniky kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, tzn. HPLC-ICP-MS, případně LC-MS. V porovnání s metodou LC-MS je výhodnější použití techniky HPLC-ICP-MS, protože naměřené chromatogramy jsou jednodušší, vzhledem k tomu, že ICP-MS technika zobrazuje pouze píky sloučenin, které obsahují selen (8-13).

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- 3.1.1 Demineralizovaná voda, ultračistá.
- 3.1.2 Amoniak, p.a.
- 3.1.3 Kyselina salicylová, p.a.
- 3.1.4 Kyselina mravenčí, p.a.
- 3.1.5 Dihydrogen fosforečnan draselný, p.a.
- 3.1.6 Pyridin, p.a.
- 3.1.7 Methanol, p.a.
- 3.1.8 Proteáza, typ XIV.
- 3.1.9 Selenan sodný, p.a.
- 3.1.10 Seleničitan sodný pentahydrát, p.a.
- 3.1.11 Seleno-DL-methionin, p.a.
- 3.1.12 Seleno-L-cystin, p.a.
- 3.1.13 Se-methyl-seleno-cystein, p.a.

3.2 Pomůcky a přístroje

- 3.2.1 Analytické váhy.
- 3.2.2 Temperovaná třepací lázeň.
- 3.2.3 Plastové uzavíratelné nádobky.
- 3.2.4 Centrifuga.
- 3.2.5 Membránové filtry (velikost pórů 0,45 μm).
- 3.2.6 Skleněné vialky.
- 3.2.7 ICP-MS spektrometr Agilent 7500ce (Agilent, Japonsko).
- 3.2.8 HPLC Agilent 1200 (Agilent, Německo).

- 3.2.9 Chromatografická kolona ICsep ION-120, včetně předkolony (TRANSGENOMIC, USA).
- 3.2.10 Chromatografická kolona Ionospher 5C, včetně předkolony (VARIAN, Nizozemí).
- 3.2.11 Zařízení na přípravu ultračisté vody MilliQ Advantage A10 (Millipore, Francie)

3.3 Příprava vzorků

3.3.1 Jednonásobná enzymatická extrakce

Do plastových uzavíratelných nádobek se naváží 0,1000 g vzorku, dále se přidají 3 ml roztoku proteázy (10 mg proteázy ve 3 ml 50mM KH_2PO_4). Nádobky se uzavřou a umístí do temperované třepací lázně. Extrakce probíhá 24 h při $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Po extrakci se extrakty odstředí a přefiltrují přes membránové filtry. Přefiltrované extrakty se uchovávají při -20°C .

3.3.2 Vícenásobná enzymatická extrakce

Do plastových uzavíratelných nádobek se naváží 0,1000 g vzorku, dále se přidají 3 ml roztoku proteázy (10 mg proteázy ve 3 ml 50mM KH_2PO_4). Nádobky se uzavřou a umístí do temperované třepací lázně. Extrakce probíhá 4 h při $(37,5 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Po extrakci se extrakty odstředí a odebere se čistý supernatant. Opět se ke vzorku přidají 3 ml roztoku proteázy a nádobky se umístí do temperované třepací lázně. Dále extrakce probíhá 4 h při stejné teplotě jako v předchozím kroku. Následně se extrakty odstředí a odebere se supernatant. V posledním kroku extrakce se přidají opět 3 ml proteázy a dále extrakce probíhá za stejných teplotních podmínek po dobu 16 h. Po skončení extrakce se opět odebere supernatant. Všechny tři extrakční podíly se slíjí do jednoho a přefiltrují se přes membránové filtry. Takto připravené extrakty se uchovávají při -20°C .

3.4 Měření

Speciační analýza extraktů se provádí metodou HPLC-ICP-MS. Selen se měří na hmotách 78 a 80 v módu kolizní/reakční cely. V tabulkách 2 a 3 jsou uvedeny pracovní podmínky pro HPLC a ICP-MS techniku.

Tabulka 2. Chromatografické parametry.

Parametr	Hodnoty	
	Aniotová kolona	Kationtová kolona
Mobilní fáze	A: 0,2 mM salicylová kyselina pH 8,5 B: 20 mM salicylová kyselina pH 8,5	8 mM pyridin pH 3
Typ eluce	gradientová	isokratická
Průtok mobilní fáze	1,2 ml/min	1,2 ml/min
Teplota kolony	25 °C	30 °C
Nástřik	50 µl	50 µl
Doba analýzy	840 s	840 s

Tabulka 3. Pracovní podmínky ICP-MS spektrometru.

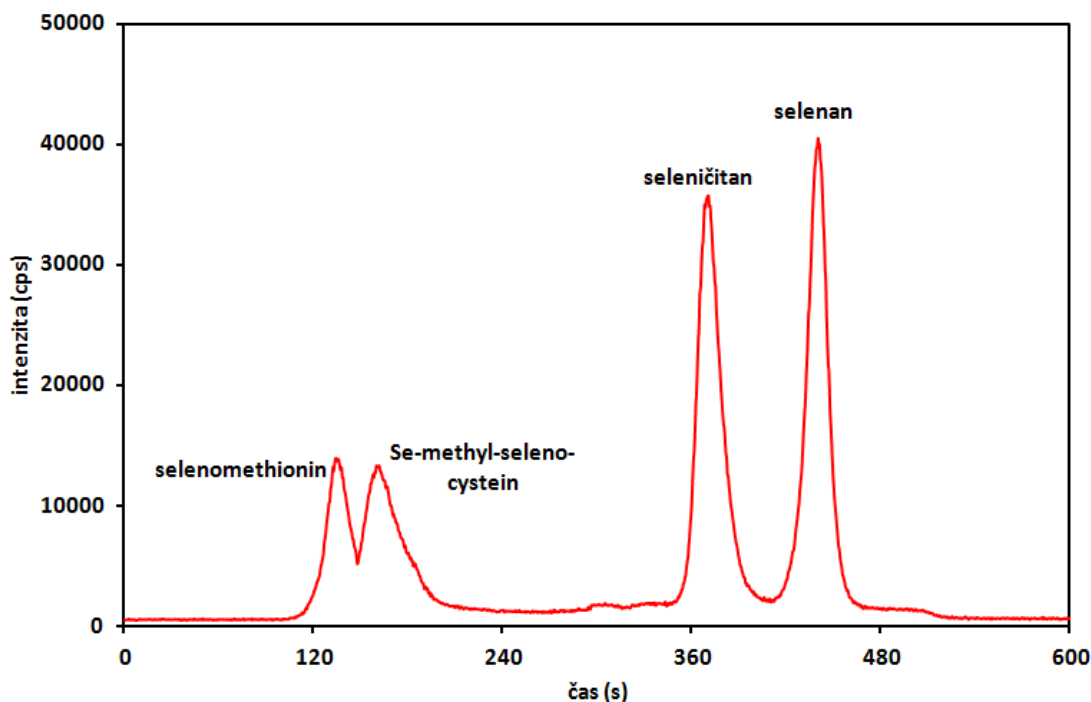
Parametr	Vodíkový mód
RF power	1500 W
Sampl. Depth	6 mm
Carrier Gas	0,8 l/min
Makeup Gas	0,2 l/min
Nebulizer pump	0,5 rps
S/C Temp	2 °C
Extract 1	1 až 5 V
Extract 2	-150 až -120 V
Omega Bias-ce	-18 až -24 V
Omega Lens-ce	0,4 až 1,2V
Cell Entrance	-22 V
QP Focus	-8 V
Cell Exit	-22 V
OctP Bias	-19 V
QP Bias	-15 V
Vodík	3,5 ml/min
Data Acquisition	Time resolved analysis
Acquisition Time	720 s

Kalibrační roztoky se připravují vždy čerstvé před vlastním měřením v roztoku mobilní fáze a obsahují (25; 50; 100) $\mu\text{g/l}$ jednotlivých standardů selenu vyjádřených jako obsah selenu pro každou specií (seleničitan, selenan, selenomethionin, selenocystin a Se-methyl-seleno-cystein).

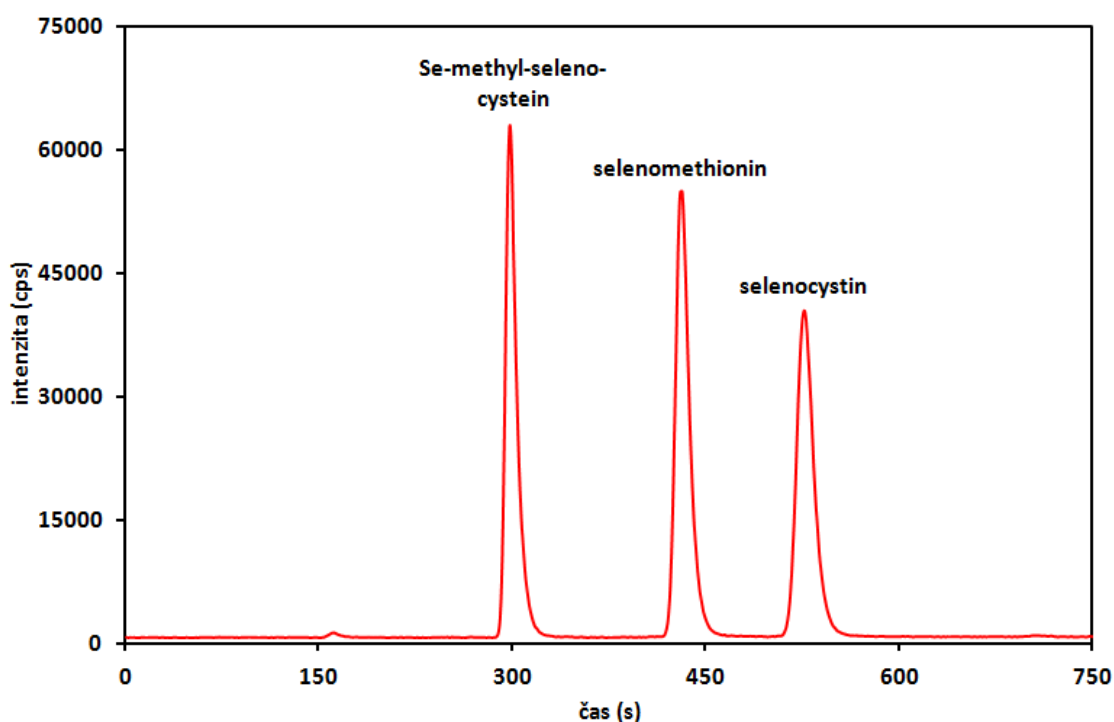
4 Výsledky a diskuse

V rámci optimalizace analytické metody pro stanovení organických specií selenu v krmivech, zejména selenomethioninu, byl kladen důraz na výtěžnost extrakční techniky. Proto musí být analytická metoda schopna detekovat i anorganické specií selenu, aby bylo možné v rámci hodnocení výtěžnosti extrakce provést tzv. „mass balance“. Rovněž stanovení celkového obsahu selenu ve vzorku je nezbytnou součástí speciální analýzy.

Pro stanovení 5 specií selenu byly použity dvě kolony a dvě techniky eluce. Při stanovení na aniontové koloně je možné separovat selenomethionin, Se-methyl-seleno-cystein, seleničitan a selenan) za podmínek gradientové eluce. Na kationtové koloně v izokratickém módu je možné separovat Se-methyl-seleno-cystein, selenomethionin a selenocystin. Na obrázcích 1 a 2 jsou zobrazeny chromatogramy standardů nejběžnějších specií selenu.

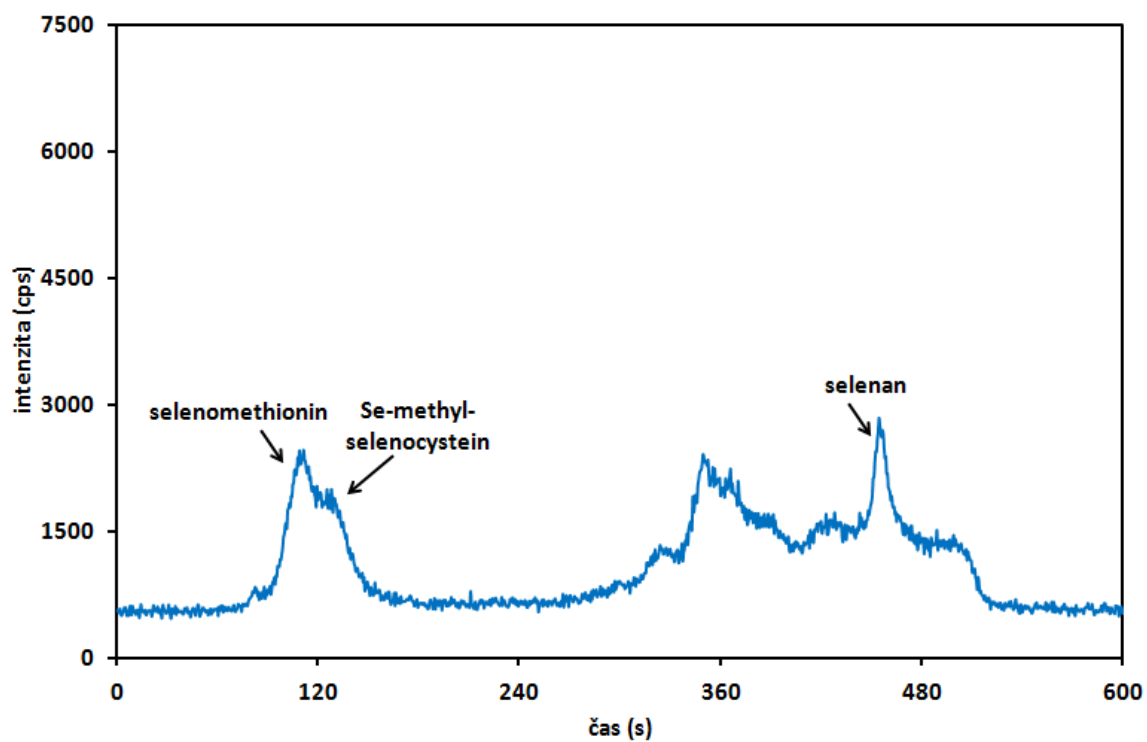


Obr. 1. Chromatogram aniontová kolona (gradientová eluce).

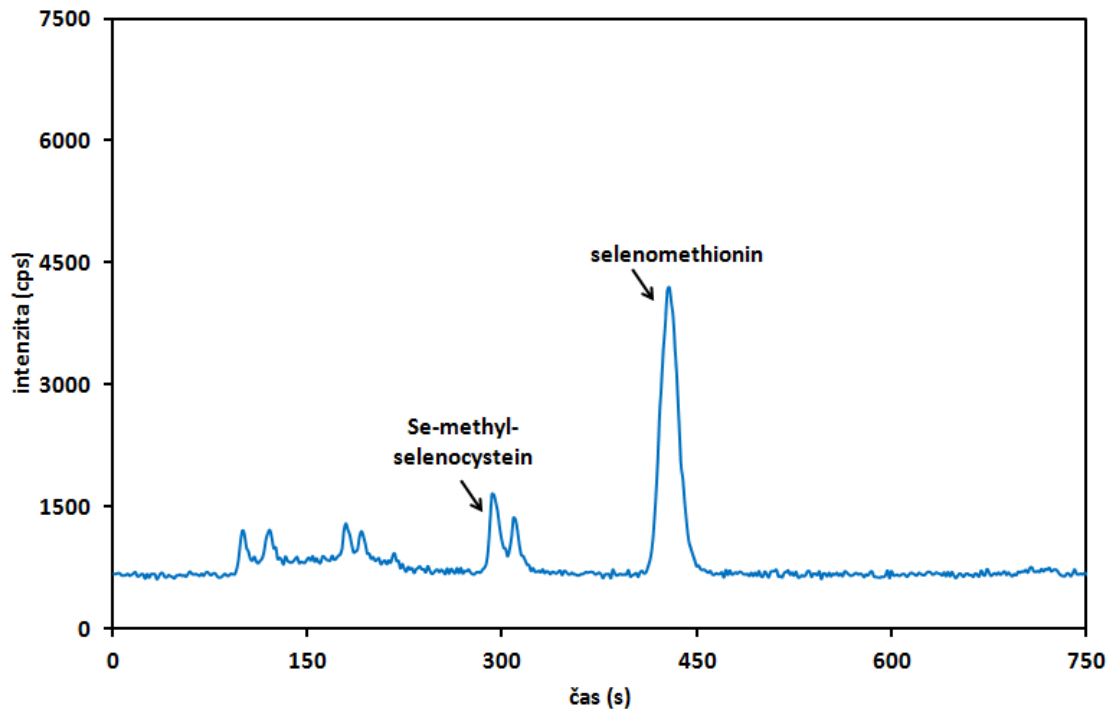


Obr. 2. Chromatogram kationtová kolona (izokratická eluce).

Majoritně zastoupenou specií selenu v selenem obohacených kvasnicích (*Saccharomyces cerevisiae*), které mohou být součástí krmiv, je selenomethionin, který představuje minimálně 60 % organicky vázaného selenu. Zbylých asi 35 % organicky vázaného selenu představují ostatní nízkomolekulární látky, které nejsou dále specifikovány. Z toho vyplývá, že při stanovení organicky vázaného selenu v krmivech je potřeba se soustředit na selenomethionin, případně anorganické spécie jako je selenan a seleničitan. Na obrázcích 3 a 4 jsou prezentovány chromatogramy extraktu reálného vzorku jak na aniontové, tak kationtové koloně. Stanovení anorganických specií je důležité z hlediska sledování výtěžnosti extrakce vůči celkovému obsahu selenu ve vzorku, zejména při vývoji metody. Stejně tak můžeme ověřit, zda vzorek s anorganickým selenem není vydáván za vzorek s organicky vázaným selenem.



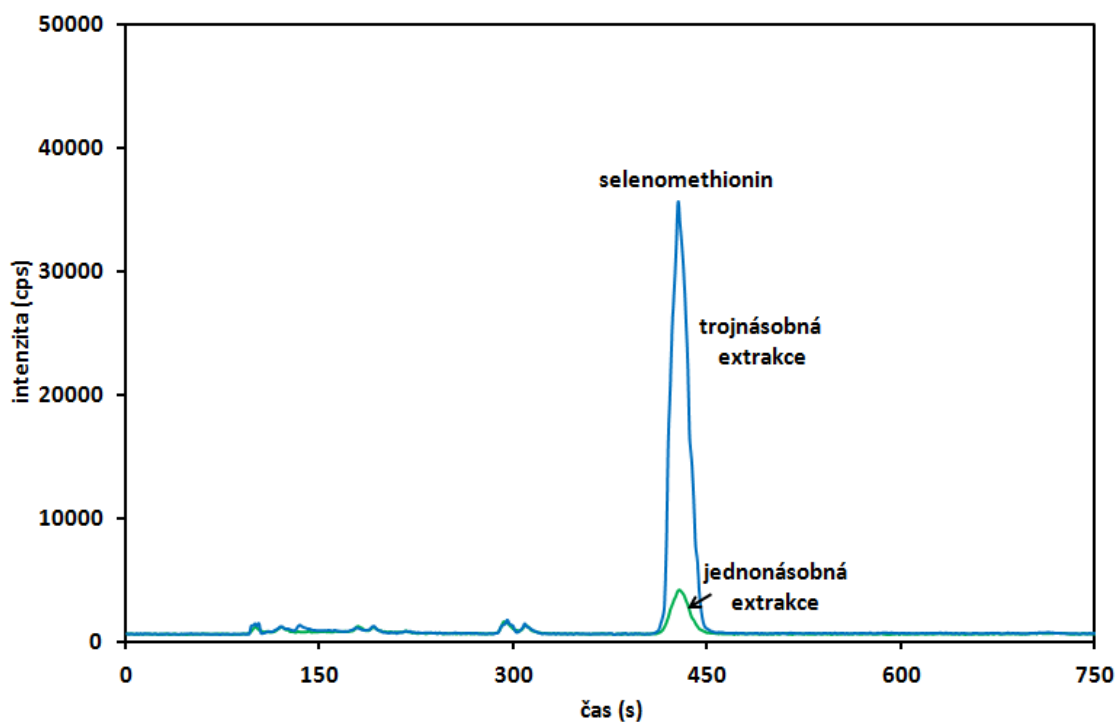
Obr. 3. Chromatogram vzorku krmiva - aniontová kolona.



Obr. 4. Chromatogram vzorku krmiva - kationtová kolona.

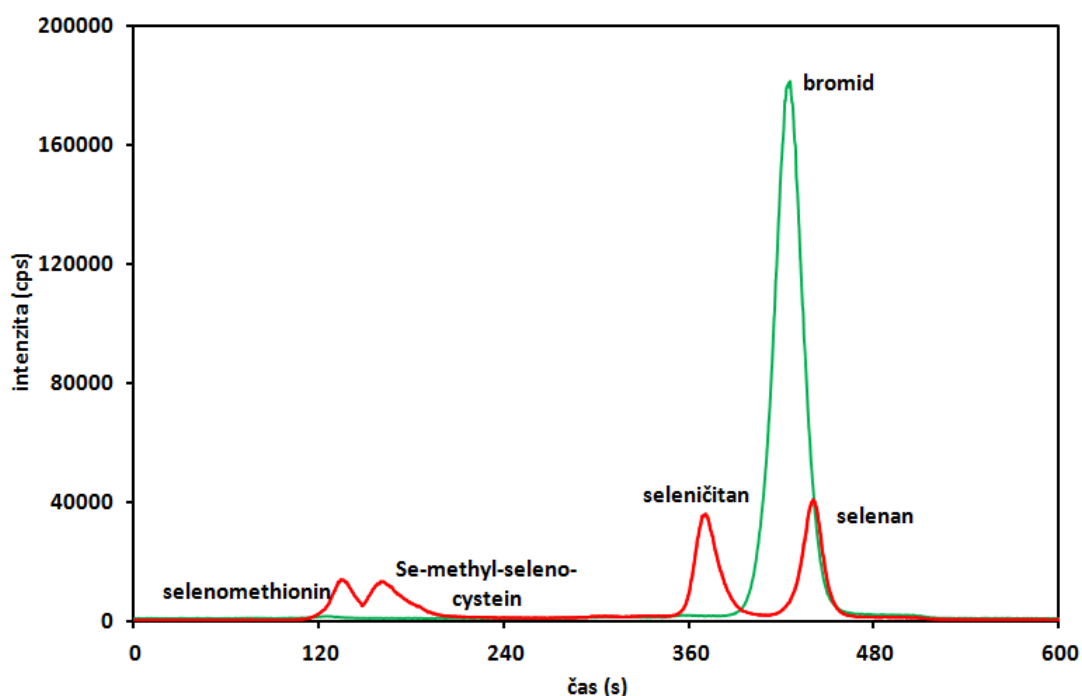
Při rutinních analýzách vzorků krmiv s deklarovaným obsahem organicky vázaného selenu/selenomethioninu je vhodné použít separaci na kationtové koloně s izokratickou elucí, která poskytuje vyšší citlivost stanovení, což je patrné z obrázků 3 a 4 při porovnání jednotlivých intenzit standardů a vzorku u různých typů separací. Vzorky je nutné s ohledem na minerální matrici ředit přibližně dvacetkrát.

V případě nevyhovujícího výsledku v rámci deklarovaného obsahu je vhodné přistoupit ke komparativnímu stanovení s využitím separace na aniontové koloně. Pokud dojde ke shodě výsledků u obou typů separací, je potřeba se zaměřit na přítomnost anorganických specií selenu ve vzorku. Pokud nejsou přítomny, případně jejich obsahy jsou nízké (suma anorganických specií a selenomethioninu je nižší než celkový obsah selenu) a celkový obsah selenu vyhovuje deklarovanému obsahu, je zřejmé, že extrakce byla nedostačující. V tomto případě je potřeba provést vícenásobnou extrakci. K nízkým extrakčním výtěžnostem dochází často u vzorku minerálních krmiv nebo premixů, kde je velká část matrice minerálního původu a snadno a rychle přechází do roztoku. Ve srovnání s enzymatickou extrakcí, která probíhá delší dobu, pak může docházet k nasycení roztoku matricí, případně změně pH extrakčního roztoku a tím pádem nedochází k žádané extrakci. Na obrázku 5 jsou zobrazeny chromatogramy vzorku minerálního krmiva s jednonásobnou a trojnásobnou extrakcí.



Obr. 5. Chromatogram vzorku krmiva – srovnání jednonásobné a vícenásobné extrakce (kationtová kolona).

Jako poslední část optimalizace metody byly zkoumány možné interferenty při stanovení. Pozornost byla soustředěna na měření metodou ICP-MS a to z důvodu, že stanovení probíhá na hmotách 78 a 80 v reakčním módu s použitím vodíku. Ten vysoce efektivně odstraňuje interferenty (ArAr^+) na hmotách 78 a 80, ale může také vytvářet nové polyatomické adukty, které mohou na výše zmíněných hmotách stanovení nadhodnocovat. Z tohoto důvodu byl sledován bróm (izotop 79) jako potencionální interferent. V reakční cele může vznikat polyatomický ion BrH^+ , který by mohl rušit stanovení na hmotě 80. Po nástřiku bromidů na aniontovou kolonu bylo zjištěno, že retenční čas bromidu je velmi blízký s retenčním časem selenanu (obrázek 6). Z tohoto důvodu bylo měření reálných vzorků omezeno pouze na izotop selenu 78.



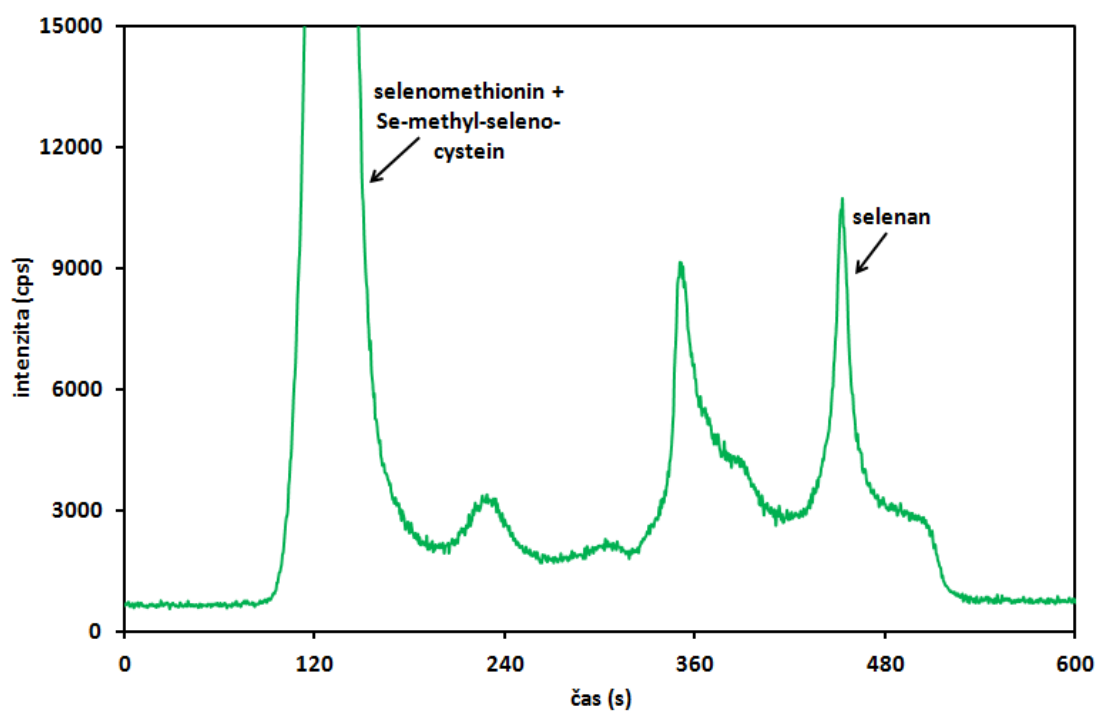
Obr. 6. Chromatogram bromidu – aniontová kolona.

Pro ověření účinnosti extrakce byl analyzován certifikovaná referenční materiál Selm-1 (selenem obohacené kvasnice). V tabulce 4 jsou uvedeny naměřené obsahy celkového selenu a selenomethioninu.

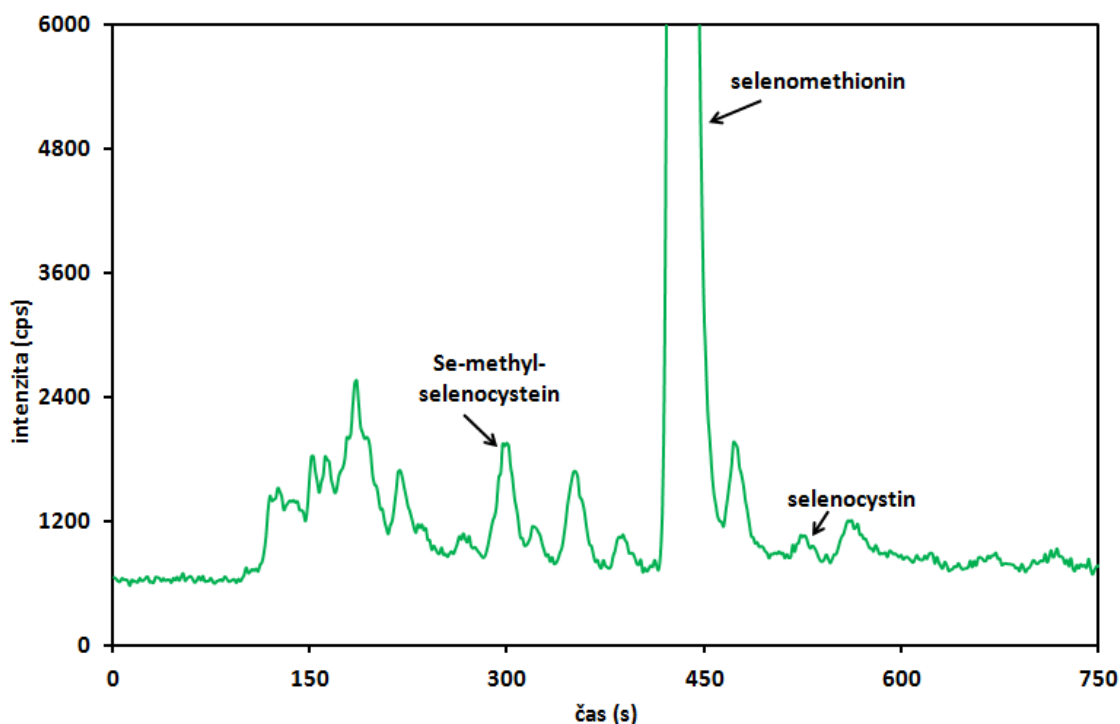
Tabulka 4. Obsahy selenomethioninu a celkového selenu v certifikovaném referenčním materiálu Selm-1.

Vzorek	Selenomethionin		Selen (celkový)	
	Naměřená hodnota	Deklarovaný obsah	Naměřená hodnota	Deklarovaný obsah
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
SELM-1	3223 ± 325	3389 ± 173	1970 ± 236	2059 ± 64

Ostatní spíše selenu nejsou v CRM uvedeny. V chromatogramu Selm-1 byly přidavkem známého standardu dále identifikovány Se-methyl-seleno-cystein, selenan a selenocystin viz Obrázky 7 a 8.



Obr. 7. Chromatogram Selm-1 – aniontová kolona (400 x ředěný CRM Selm-1).



Obr. 8. Chromatogram Selm-1 – kationtová kolona (400x ředěný CRM Selm-1).

V tabulce 5 jsou uvedeny naměřené a deklarované obsahy celkového selenu a selenomethioninu v reálných vzorcích.

Tabulka 5. Obsahy selenomethioninu (kationtová kolona) a celkového selenu v analyzovaných vzorcích krmiv.

Vzorek	Selen (selenomethionin)		Selen (celkový)		Se _{SeMet} /Se _{celkový}
	Naměřená hodnota	Deklarovaný obsah	Naměřená hodnota	Deklarovaný obsah	
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%
711	0,16 ± 0,03	0,21	0,30 ± 0,04	0,24	53 ± 12
750	0,20 ± 0,04	0,20	0,34 ± 0,04	max. 0,5	59 ± 7
751	15,4 ± 3,1	20	19,1 ± 1,3	max. 50	81 ± 11
525	1130 ± 226	-	1947 ± 253	2000	58 ± 12
526	<0,10	-	20,0 ± 2,4	23	<0,50
527	2,56 ± 0,51	-	26,4 ± 3,2	30	10 ± 11

U vzorků 526 a 527 byly zjištěny nízké obsahy selenomethioninu (obsah selenomethioninu vyjádřený jako selen je menší než přibližně 60 % z celkového naměřeného obsahu selenu).

Při analýze s použitím aniontové kolony byly naměřeny vyšší obsahy anorganických specií, konkrétně selenanu (tabulka 6).

Tabulka 6. Obsahy selenomethioninu a selenanu (kationtová a aniontová kolona) v analyzovaných vzorcích krmiv, v mg/kg.

Vzorek	Se (selenomethion)	Se (selenan)	Suma	Se (celkový)
526	-	18,7 ± 3,7	18,7 ± 3,7	20,0 ± 2,4
527	2,56 ± 0,51	22,1 ± 4,4	24,7 ± 4,4	26,4 ± 3,2

Výsledky získané separací na aniontové koloně potvrdily, že majoritní specií selenu ve vzorcích 526 a 527 je selenan.

Z výsledků analýz reálných vzorků metodou HPLC-ICP-MS byly vypočítány analytické parametry metody pro jednotlivé specié selenu. Linearita kalibrační závislosti byla ověřena v rozsahu (0 – 100) µg/l.

Tabulka 7. Analytické parametry.

Parametr	Mez detekce	Mez stanovitelnosti	Opakovatelnost	Nejistota
	mg/kg	mg/kg	%	%
Selenomethionin	0,03	0,10	10	20
Se-methyl-seleno-cystein	0,03	0,10	15	30
Selenocystin	0,03	0,10	-	-
Seleničitan	0,02	0,07	-	-
Selenan	0,02	0,07	15	30

U selenocystinu a seleničitanu nebyly vypočítány opakovatelnost a nejistota, protože tyto specié nebyly identifikovány v žádném nebo malém počtu reálných vzorků.

5 Závěr

V rámci vývoje metody pro stanovení anorganických forem selenu a selenomethioninu v krmivech bylo zjištěno, že extrakce selenomethioninu z minerálních krmiv a premixů je nedostačující a je nutno ji opakovat. Jako dostačující se jeví trojnásobná enzymatická extrakce. Byly optimalizovány dva typy separace, a to kationtová (Se-methyl-seleno-cystein, selenomethionin a selenocystin) a aniontová (selenomethionin, Se-methyl-seleno-cystein, seleničitan a selenan). Z důvodů možné interference brómu na hmotě selenu (izotop 80), je vhodnější použít při stanovení hmotu 78. Správnost stanovení byla úspěšně ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu (selenem obohacené kvasnice Selm-1). Analytické parametry pro selenomethion - mez detekce (0,03 mg/kg) a mez stanovitelnosti (0,1 mg/kg) jsou vyhovující pro úřední kontrolu organicky vázaného selenu v krmivech, který se pohybuje v obsazích nad 0,1 mg/kg.

6 Literatura

1. M. Navarro-Alarcon, C. Cabrera-Vique, Selenium in food and human body: A review, *J. Sci. Tot. Env.*, 400, **2008**, 115-141.
2. A. E.G. Hefnawy, J. L. Tórtora-Pérez, The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health, *J. Small Rum. Res.*, 89(2-3), **2010**, 185-192.
3. G. N. Schrauzer, Selenomethionine: A Review of its nutritional significance, metabolism and toxicity, *J. Nutr.*, 130, **2000**, 1653-1656.
4. H. Guyot, P. Spring, S. Andrieu, F. Rollin, Comparative responses to sodium selenite and organic selenium supplements in Belgian Blue cows and calves, *J. Liv. Sci.*, 111, **2007**, 259-263.
5. D. T. Juniper, R. H. Phipps, E. Ramos-Morales, G. Bertin, Effects of dietary supplementation with selenium enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in lambs, *J. Ani. Feed Sci.*, 149, **2009**, 228-239.
6. L. Calamari, F. Petrera, G. Bertin, Effects of either sodium selenite or Se yeast (Sc CNCM I-3060) supplementation on selenium status and milk characteristics in dairy cows, *J. Liv. Sci.*, 128, **2010**, 154-165.
7. European Union, Register of feed additives, podle Nařízení EC 1831/2003.
8. J. R. Encinar, M. Sliwka-Kasczynska, A. Polatajko, V. Vacchina, J. Szpunar, Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast, *Anal. Chim. Acta*, 500, **2003**, 171-183.
9. A. Polatajka, M. Sliwka-Kasczynska, M. Dernovics, R. Ruzik, J. R. Encinar, J. Szpunar, A systematic approach to selenium speciation in selenized yeast, *J. Anal. At. Spectrom*, 19, 2004, 114-120.
10. E. H. Larsen, M. Hansen, H. Paulin, S. Moesgaard, M. Reid, M. Rayman, Speciation and bioavailability of selenium in yeast-based intervention agents in cancer chemoprevention studies, *J. AOAC Int.*, 87(1), **2004**, 225-232.

11. O. Palacios, J. R. Encinar, G. Bertin, R. Lobinski, Analysis of the selenium species distribution in cow blood by size exclusion liquid chromatography-inductively coupled plasma collision cell mass spectrometry (SEC-ICPccMS), *Anal. Bioanal. Chem.*, 383, **2005**, 516-522.
12. F. Gosetti, P. Frascarolo, S. Polati, C. Medana, V. Gianotti, P. Palma, R. Aigotti, C. Baiocchi, M. C. Gennaro, *J. Food Chem.*, 105, **2007**, 1738-1747.
13. K. Pyrzynska, Selenium speciation in enriched vegetables, *J. Food Chem.*, 114, **2009**, 1183-1191.

Bulletin Národní referenční laboratoře XX 2016/1

Ročník: XX, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2016

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 54

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196