Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř

Bulletin 2022

Ročník XXVI, číslo 1/2022

Brno 2022

Toto číslo Bulletinu NRL věnujeme našemu předčasně zesnulému spolupracovníkovi Ing. Janu Baráčkovi, PhD.

Ing. Jan Baráček, PhD. a Ing. Dagmar Julínková

Vzpomínka na Ing. Jana Baráčka, Ph.D.

Dne 21. října 2021 ve věku 40 let nečekaně zemřel náš spolupracovník a milý kolega pan Ing. Jan Baráček, Ph.D. Ačkoli působil na Oddělení zkoušení přípravků na ochranu rostlin (OdZPOR) o něco déle než rok, zapsal se nesmazatelně do vzpomínek všech spolupracovníků. Honza byl prvé řadě velmi slušný a zdvořilý člověk, který se vynikal svou pečlivostí.

Po ukončení vysokoškolského a doktorandského studia na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně pracoval Honza převážně na administrativních postech. Nicméně touha po laboratorní činnosti v něm přetrvávala již od středoškolského studia na Střední průmyslové škole chemické v Brně. Jeho sen se konečně splnil na začátku roku 2020 po nástupu do laboratoří NRL na OdZPOR, kde začínal na pozici laboranta na pracovišti fyzikálně-chemických a technických metod. Zde se mu dostalo vynikajícího zaškolení pod zkušeným vedení Ing. Jindřicha Foltýna. Krůček po krůčku se propracovával od nejjednodušších fyzikálně-chemických metod zkoušení přípravků na ochranu rostlin (POR) ke složitějším instrumentálním metodám. Nad každým problémem dlouze přemýšlel a rozvíjel si své teoretické znalosti.

Od října 2020 na základě výběrového řízení postoupil na vysokoškolskou pracovní pozici přírodovědný analytik-diagnostik. Na tomto postu se již věnoval laboratornímu zkoušení vzorků POR vyspělými laboratorními technikami zavedenými pro kontrolu POR, jako je FTIR a Ramanova spektrometrie, termogravimetrická analýza (TGA), stanovení velikosti částic, či diferenční scanovací kalorimetrie (DSC).

V roce 2021 úspěšně započal pracovat na vývojovém úkolu VÚ 90.03/2021 na téma „Měření velikosti částic a jejich distribuce ve vzorcích POR s využitím Mie a Fraunhoferovy difrakce a jejich vzájemné porovnání“. Honza stihl naměřit počáteční soubor dat a optimalizovat podmínky měření vzorků POR. Do měření byly zahrnuty vzorky čtyř různých formulací POR. Bohužel již nestihl naměřený soubor dat vyhodnotit a na základě výsledků pokračovat v dalších měřeních.

Honza byl vždy tichý, pracovitý a bezkonfliktní kolega, který byl ochotný každému pomoci. Na takové kolegy se opravdu nikdy nezapomíná.

Čest jeho památce.

Za kolektiv OdZPOR Ing. Olga Nováková, vedoucí

Obsah

1 **Stanovení obsahu spalitelných látek v hnojivech výpočtem**
Václav Rypl
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení NRL Plzeň,
Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň
1

2 **Stanovení tropanových alkaloidů metodou LC-MS**
Martina Čumová, Simona Wawroszová, Zuzana Nehybová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, ONRL Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 15

3 **Zavedení kvalitativního stanovení screeningového elementu *bar* pomocí qPCR**
Jiří Čuhel
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Oddělení mikrobiologie a biochemie,
Hroznová 2, 656 06 Brno 24

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Stanovení obsahu spalitelných látek v hnojivech výpočtem

Václav Rypl

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Plzeň, Slovanská alej 20, 326 00 Plzeň
vaclav.rypl@ukzuz.cz

1 Úvod

Tato práce byla zaměřena na stanovení obsahu spalitelných látek v hnojivech výpočtem s využitím hodnoty celkového obsahu uhlíku a dusíku stanovené pomocí CN analyzátoru. Tento postup nahrazuje časově náročné stanovení celkového dusíku Kjeldahlovou metodou, umožňuje získat skutečnou hodnotu C : N. Tento postup nahrazuje pracný postup stanovení spalitelných látek gravimetrickou metodou, produktivita práce v laboratoři se zvyšuje.

2 Materiál a metody

2. 1 Přístroje a pomůcky

CN analyzátor Primacs SNC-100 firmy Skalar.

Laboratorní váhy Sartorius CP64.

Sada kelímků pro stanovení TC a TN.

2.2 Chemikálie

EDTA, (99,4 – 100,6) %, Merck.

Sulfadiazin, min. 99,0 %, Sigma.

Set chemikálií pro přístroj Primacs SNC100 firmy Skalar.

2.3 Vzorky

2.3.1 Vzorky pro vytvoření modelu

Na sadě nezávislých vzorků byl vytvořen regresní model pro popis vztahu vysvětlované proměnné (spallat) a vysvětlujících proměnných (Cs, Ns, Ns-N). V tabulce 1 jsou výsledky měření jednotlivých parametrů, vlastnosti vzorků a regresním modelem vypočítané hodnoty spalitelných látek.

Popisky a vysvětlení jednotlivých sloupců tabulky 1:

- Vzorek – číslo vzorku a rok analýzy.
- Skup – skupenství vzorku (pev = pevné, kap = kapalné).
- Spallat – spalitelné látky v % změřené referenční metodou.
- Cs – uhlík v sušině v % změřený pomocí CN-elementárního analyzátoru.
- Ns – dusík v sušině v % změřený pomocí CN-elementárního analyzátoru.
- Ns-N – rozdíl dusík v sušině mínus dusík v původním vzorku.
- Matr – typ vzorku (komp = kompost, orgmin = organominerální hnojivo, organic = organické hnojivo, sub = pěstební substrát, sep = separát, stat = statkové hnojivo, zem = zemina, wag = kal a sediment, biostim = biostimulant, dig = digestát, hydrol = hydrolyzát, mineral = minerální hnojivo, pel_kun = peletkovaný koňský hnůj, pom_rost_pr = pomocný rostlinný přípravek, ziv_mouc = živočišná moučka, kal = kal, sedim = sediment, cvrcek = hnojivo z cvrčků, sapro = sapropel, výpalky = zbytky po lihovarnické výrobě, hnuj = hnůj, verm = vermikompost, Cerer+guan = cererit s guánem, humin = huminové látky, prir_hnoj = přírodní hnojivo, mrva-kejda = mrva s kejdou, neuvedeno).
- Matr_zk – převažující matrice (min = minerální, org = organické, orgmin = organominerální, neuvedeno).
- m1701 – hodnoty vypočítané pomocí vytvořeného regresního modelu v %.

Tabulka 1. Zkrácená tabulka výsledků pro tvorbu modelu.

Vzorek	Skup	Spallat	Cs	Ns	Ns_N	matr	matr_zk	m1701
143_2019	pev	81,2	47,2	4,2	2,6	komp	org	83,0
144_2019	pev	40,0	21,1	1,9	0,7	komp	org	39,2
145_2019	pev	44,2	22,5	1,7	0,8	komp	org	40,9
146_2019	pev	32,3	16,8	1,9	0,7	komp	org	32,3

Pro vytvoření modelu bylo použito 105 vzorků, z toho:

- 1 × biostimulant,
- 8 × digestát,
- 1 × hydrolyzát,
- 55 × kompost,
- 3 × minerální hnojivo,
- 7 × organické hnojivo,
- 4 × organominerální hnojivo,
- 1 × peletkovaný koňský hnůj,
- 1 × pomocný rostlinný prostředek,
- 2 × separát,
- 2 × statkové hnojivo,
- 14 × substrát,
- 4 × kontrolní vzorek kalu a sedimentu,
- 1 × zemina,
- 1 × neuvedeno.

Z hlediska skupenství bylo použito 91 pevných vzorků a 14 kapalných vzorků.

Z hlediska převažující matrice byly použity 3 vzorky čistě minerálních hnojiv, 94 vzorků s převažující organickou matricí, 7 vzorků s matricí organickou i minerální, u jednoho vzorku matrice nebyla uvedena.

2.3.2 Vzorky pro ověření modelu

Na sadě nezávislých vzorků byl ověřován vypočítaný regresní model. V tabulce 2 jsou výsledky měření jednotlivých parametrů, vlastnosti vzorků a regresním modelem vypočítané hodnoty spalitelných látek.

Popisky a vysvětlení jednotlivých sloupců tabulky 2 jsou stejné jako u tabulky 1.

Tabulka 2. Zkrácená tabulka výsledků pro ověření modelu.

Vzorek	Skup	Spallat	Cs	Ns	Ns_N	matr	matr_zk	m1701
2019_355	kap	57,3	76,2	15,1	14,5	dig	org	126,6
2019_368	pev	73,6	44,8	8,6	0,1	ziv_mouc	org	99,5
2019_371	pev	44,0	21,7	3,2	0,0	kal	org	46,4
2019_372	pev	6,6	2,9	0,2	0,0	sedim	org	6,9

Pro ověření modelu bylo použito 117 vzorků hnojiv, z toho:

- 3 × cererit s guánem,
- 1 × hnojivo z cvrčků,
- 7 × digestát,
- 7 × hnůj (dále nespecifikovaný),
- 1 × huminové látky,
- 1 × hydrolyzát,
- 1 × kal,
- 62 × kompost,
- 4 × minerální hnojivo,
- 2 × mrva-kejda,
- 4 × organické hnojivo,
- 5 × organominerální hnojivo,
- 2 × přírodní hnojivo,
- 1 × sapropel,
- 1 × sediment,
- 4 × statkové hnojivo,
- 6 × substrát,

- 3 × vermikompost,
- 1 × lihovarnické výpalky,
- 1 × živočišná moučka.

Z těchto vzorků bylo 100 v pevném skupenství a 17 v kapalném skupenství.

Z hlediska převažující matrice byly 4 vzorky čistě minerální hnojiva, 101 s převažující organickou matricí, 12 vzorků s matricí organickou i minerální.

Z následujícího porovnání byly vyloučeny vzorky, které nesplňovaly kritérium platnosti regresního modelu, tj. nacházely se mimo interval (4 – 96) % spalitelných látek předpovězených regresním modelem. Vyloučeny tak byly vzorky: 2019_355, 2019_368, 2020_28, 2020_107. Dále byl vyloučen vzorek 2020_63, protože byl ve výběru dvakrát; byl sice dvakrát změřen, ale pro ověření je třeba použít nezávislé vzorky a v tomto případě by došlo k opakování, a tedy k porušení jednoho z předpokladů statistického testování.

Pro vlastní statistické testování bylo tedy využito 112 vzorků.

2.4 Metody

2.4.1 TC – celkový uhlík

Uhlík přítomný ve vzorku se oxiduje na oxid uhličitý termickým rozkladem v proudu kyslíku při teplotě 1100 °C. Množství uvolněného oxidu uhličitého se stanoví pomocí detektoru pracujícím v infračervené oblasti spektra. Během ohřevu vzorku na teplotu 900 °C nebo vyšší než 900 °C se kvantitativně rozloží organický uhlík i přítomné uhličitany.

2.4.2 TN – celkový dusík

Vzorky se spalují při teplotě 1100 °C v proudu kyslíku. Ze vniklé směsi plynů se odebere alikvot, ze kterého je po redukci oxidů dusíku separován N2, jenž se pomocí helia přivede na teplotně vodivostní detektor (TCD).

2.4.3 Stanovení sušiny

Obsah sušiny byl stanoven podle Jednotných pracovních postupů – Zkoušení hnojiv, postup č. 20001.1 – Stanovení obsahu vlhkosti gravimetricky a dopočet sušiny.

2.4.4 Stanovení spalitelných látek (spallat = LOI)

Obsah spalitelných látek byl stanoven podle Jednotných pracovních postupů – Zkoušení hnojiv, postup č. 20010.1 – Stanovení obsahu popela a spalitelných látek gravimetricky.

Obsahy byly vypočteny podle výpočetních vztahů:

$$Cs = C \times \frac{100}{su\check{s}}$$

$$Ns = N \times \frac{100}{su\check{s}}$$

Kde
Cs je – celkový obsah uhlíku v sušině (%),
C – celkový obsah uhlíku v původním vzorku (%),
Ns – celkový obsah dusíku v sušině (%),
N – celkový obsah dusíku v původním vzorku (%),
suš – obsah sušiny (%).

Pro konstrukci regresního modelu je nicméně nutné zavést ještě další parametr, kterým je rozdíl dusíku v sušině a dusíku v původním vzorku (Ns – N).
Výpočet:

$$Ns_N = Ns - N$$

Kde
Ns_N – je rozdíl celkový dusík v sušině mínus celkový dusík v původním vzorku,
Ns – celkový obsah dusíku v sušině (%),
N – celkový obsah dusíku v původním vzorku (%).

Potřebnost parametru Ns_N vyplyne při tvorbě regresní závislosti. Z parametrů této závislosti je pak zjevné, že tento parametr má v regresní rovnici velký význam. Z grafických vyhodnocení pak zase vyplyne, že tento význam se projevuje jen u některých vzorků. Jsou to především vzorky kapalné.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Vytvoření regresního modelu

Regresní model byl vytvořen na základě dat uvedených v tabulce 1, která je uvedena v oddílu 2.3.1. Ze změřených hodnot sušiny (suš), celkového uhlíku a celkového dusíku (TC a TN) v původním vzorku byly vypočítány obsahy obou prvků v sušině vzorku Cs a Ns. Dále byl vypočten rozdíl hodnot Ns – N. Ze získaných parametrů Cs, Ns a Ns – N byl vytvořen regresní model (m1701).

Regresní statistika								
Násobné R	0,972981							
Hodnota spolehlivosti R	0,946692							
Nastavená hodnota spolehlivosti R	0,945109							
Chyba stř. hodnoty	5,438617							
Pozorování	105							
ANOVA								
	Rozdíl	*SS*	*MS*	*F*	*ýznamnost F*			
Regrese	3	53054,07	17684,69	597,8888	3,97E-64			
Rezidua	101	2987,434	29,57856					
Celkem	104	56041,5						
	Koeficienty	*ba stř. hodr*	*t Stat*	*Hodnota P*	*Dolní 95%*	*Horní 95%*	*Dolní 99,0%*	*Horní 99,0%*
Hranice	1,503709	1,261259	1,192228	0,235966	-0,99829	4,005708	-1,80758	4,815002
Cs	1,626536	0,043911	37,04129	1,37E-60	1,539427	1,713644	1,511251	1,74182
Ns	2,969736	0,216066	13,74458	7,3E-25	2,54112	3,398353	2,40248	3,536993
Ns_N	-3,01385	0,290241	-10,3839	1,28E-17	-3,58961	-2,43809	-3,77584	-2,25185

Obrázek 1. Regresní model m1701.

Regresní koeficienty: pro úsek byla vypočítána hodnota 1,503709, pro Cs hodnota 1,626536, pro Ns 2,969736 a pro parametr Ns-N −3,01385.

Pro odhad hodnoty spalitelných látek tak lze využít rovnici:

spallat = 1,503709 + Cs × 1,626536 + Ns × 2,969736 + Ns-N × (−3,01385)

Kde

spallat – spalitelné látky (LOI) (%),

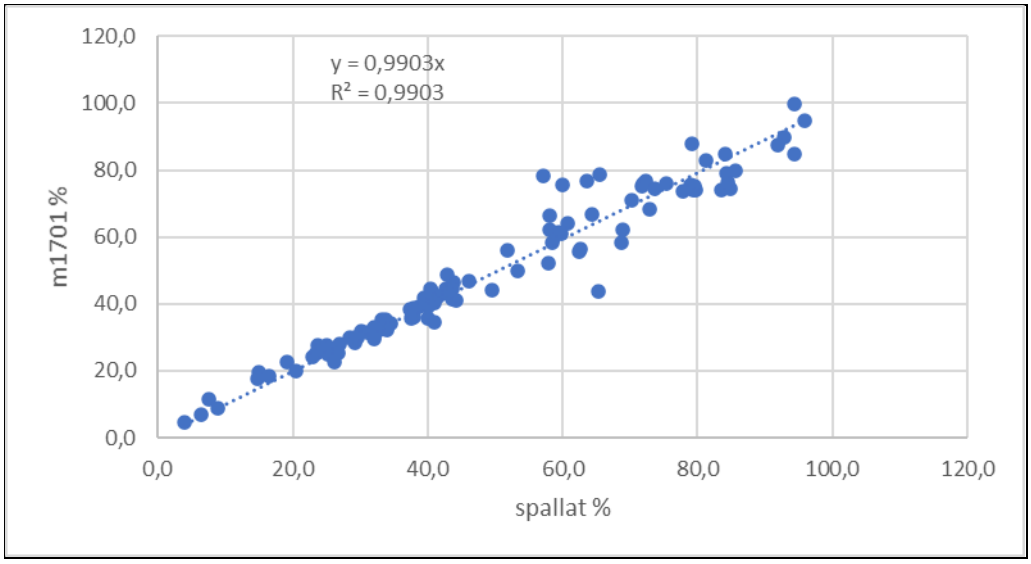
Cs – celkový uhlík v sušině (%),

Ns – celkový dusík v sušině (%),

Ns-N – rozdíl dusík v sušině mínus dusík v původním vzorku (Ns-N = Ns – N),

N – dusík v původním vzorku (%).

Kvalita regresního modelu je graficky znázorněna na obrázku 2, odkud je zřejmé, že shoda naměřených hodnot a hodnot předpovězených modelem je vysoká.



Obrázek 2. Závislost hodnot spalitelných látek vypočítaná pomocí regresního modelu (m1701).

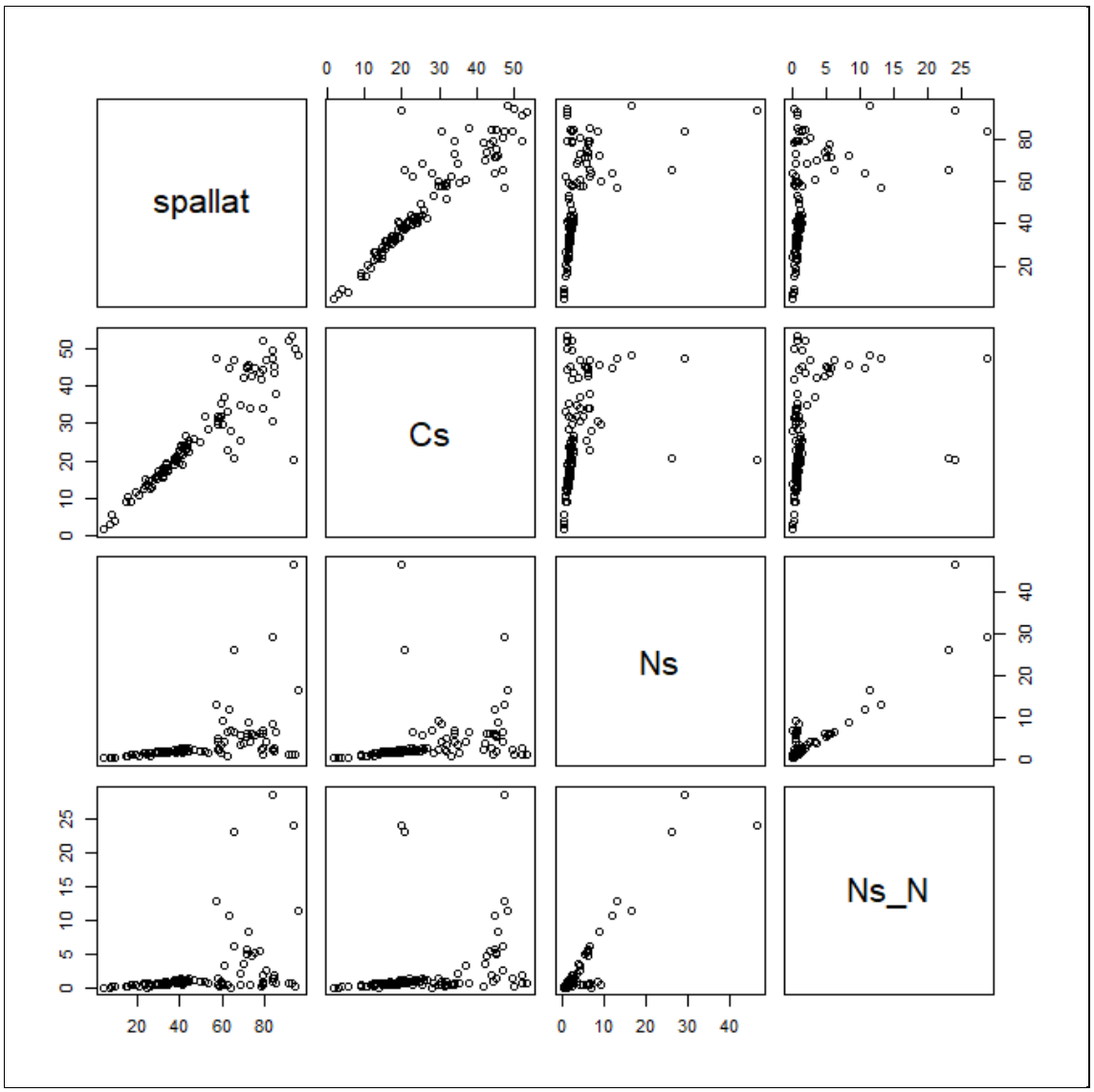
Přehledové statistiky

	mean	sd	IQR	0%	25%	50%	75%
Cs	26.186565	12.867869	17.4163563	1.7233814	16.7528473	22.7233224	34.169204
Ns	3.731677	6.076639	2.3202461	0.1213136	1.3566949	1.9016456	3.676941
Ns_N	2.105388	4.609820	0.5889326	0.0000000	0.4899564	0.7262776	1.078889
spallat	48.833879	23.213371	36.7848662	3.9772366	31.9850224	42.7528571	68.769889

	100%	n
Cs	53.64358	105
Ns	46.61980	105
Ns_N	28.74816	105
spallat	95.96750	105

Obrázek 3. Přehledové statistiky (mean = aritmetický průměr, sd = směrodatná odchylka, IQR = mezikvartilové rozpětí, 0% = minimum, 25% = 1. kvartil, 50% = medián, 75% = 3. kvartil, 100% = maximum, n = počet vzorků).

Koncentrační rozvrstvení je pro obsahy spalitelných látek a pro Cs (uhlík v sušině) přibližně rovnoměrné, kdy jednotlivé kvartily jsou obsazeny přibližně stejným počtem vzorků a jejich rozdělení bude přibližně normální, protože medián a aritmetický průměr jsou přibližně stejné. To však neplatí pro parametry Ns a Ns-N, kde jsou významně více zastoupeny vzorky s nízkými hodnotami. Regresní model může být platný v intervalu 4 % až 96 % obsahu spalitelných látek.



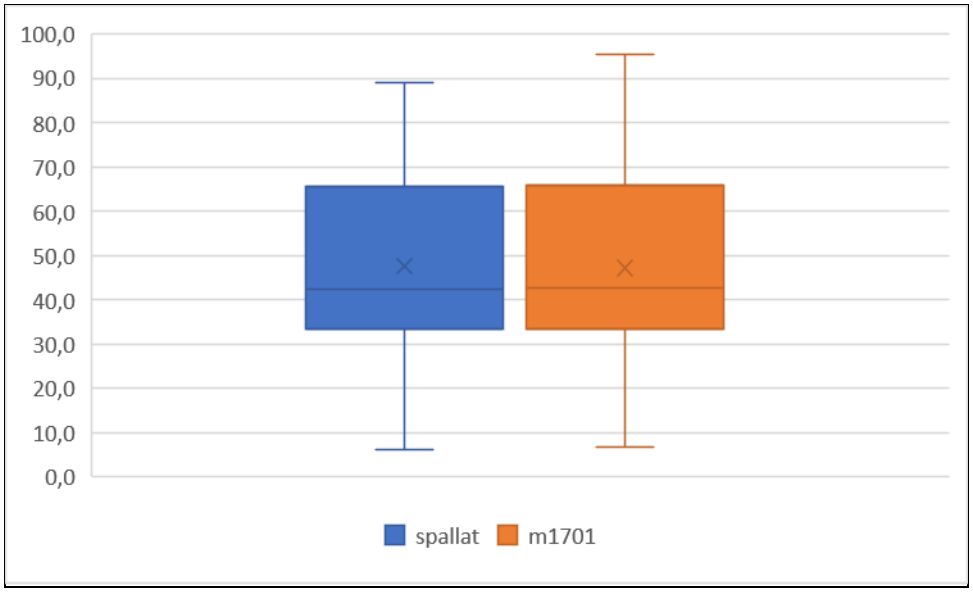
Obrázek 4. Párové porovnání proměnných.

Grafy na obrázku 4 byly vytvořeny ve statistickém softwaru R. Vztah mezi spalitelnými látkami (spallat) a uhlíkem v sušině (Cs) je lineární, ale v horní části grafu jsou velké odchylky. Tyto odchylky říkají, že pokud bychom se pokusili vysvětlit parametr spallat jen pouze pomocí uhlíku v sušině, výsledek by byl zatížen velkými chybami, které nejsou náhodné. Na základě tohoto výsledku byly do regresního modelu přidány i další parametry, a to dusík v sušině (Ns) a parametr Ns-N (nevázaný těkavý dusík). Vztah mezi spalitelnými látkami a oběma dusíkovými parametry nelze snadno interpretovat, protože při nižších obsazích se vztah těchto proměnných jeví jako lineární, naopak při vyšších obsazích se vztahy mezi těmito parametry vytrácí. Stejně jako spalitelné látky lze popsat i vztah parametru Cs k parametrům Ns a Ns-N.

Jako poslední zbývá k popisu vztah parametrů Ns a Ns-N. Jsou zde dvě skupiny látek. V první skupině se s rostoucí hodnotou Ns-N (nevázaný těkavý dusík) zvyšuje i hodnota Ns (celkového dusíku), což odpovídá vzorkům s vyššími obsahy vlhkosti nebo kapalným vzorkům. Ve druhé skupině je parametr Ns-N prakticky konstantní a na hodnotě celkového dusíku nezávisí, což odpovídá vzorkům s nízkým obsahem vlhkosti přibližně do 10 %. Zároveň to jsou často vzorky tzv. organominerální tj. s přidaným anorganickým hnojivem k organické matrici nebo to jsou peletky apod., zpravidla vzorky nějak průmyslově upravené. Velmi suché vzorky nemohou ztrácet dusík v sušící 105 °C fázi stanovení spalitelných látek a není zde tedy korelace „Ns vs Ns-N“. Křivka proložená těmito body je téměř rovnoběžná s osou y nebo x v závislosti na uspořádání grafu.

3.2 Ověření modelu na sadě nezávislých vzorků

Regresní model byl ověřen pomocí sady neznámých nezávislých vzorků uvedených v tabulce 2, která se se nachází v oddílu 2.3.2. Byla porovnána data vypočítaná regresním modelem (m1701) s hodnotami naměřenými referenční metodou (spallat).



Obrázek 5. Porovnání dat naměřených referenční metodou (spallat) a vypočítaných pomocí regresního modelu (m1701) %.

Číselně byly oba výběry porovnány pomocí přehledových statistik

spallat			*m1701*	
Stř. hodnota	47,66074		Stř. hodnota	47,16725
Chyba stř. hodnoty	2,036896		Chyba stř. hodnoty	1,985083
Medián	42,56035		Medián	42,80017
Modus			Modus	
Směr. odchylka	21,55648		Směr. odchylka	21,00815
Rozptyl výběru	464,6817		Rozptyl výběru	441,3423
Špičatost	-0,93814		Špičatost	-0,84273
Šikmost	0,302691		Šikmost	0,343366
Rozdíl max-min	82,976		Rozdíl max-min	88,48821
Minimum	6,204		Minimum	6,886487
Maximum	89,18		Maximum	95,3747
Součet	5338,003		Součet	5282,732
Počet	112		Počet	112
Hladina spolehlivosti (95,0 %)	4,036244		Hladina spolehlivosti (95,0 %)	3,933575

Obrázek 6. Přehledové statistiky výběrů spallat a m1701.

Z grafu na obrázku 5 a z tabulky na obrázku 6 vyplývá, že oba výběry jsou si velmi podobné, mají podobnou střední hodnotu jak aritmetický průměr, tak i medián. Rozptyly obou výběrů jsou podobné, výběry se liší jen mírně u nejvyšších hodnot. Lze tedy předpokládat shodu rozptylů obou výběrů. Z hlediska rozdělení lze usuzovat, že výběry jsou blízké normálnímu rozdělení.

Shoda rozptylů obou výběrů byla otestována pomocí F-testu.

Dvouvýběrový F-test pro rozptyl

	spallat	*m1701*
Stř. hodnota	47,66074	47,16725
Rozptyl	464,6817	441,3423
Pozorování	112	112
Rozdíl	111	111
F	1,052883	
P(F<=f) (1)	0,393259	
F krit (1)	1,368324	

Obrázek 7. Dvouvýběrový F-test pro rozptyl.

Vypočítané F kritérium 1,052883 je menší než kritická hodnota 1,368324, rozptyly obou výběrů jsou shodné.

Shoda středních hodnot obou výběrů byla porovnána pomocí dvouvýběrového párového t-testu na střední hodnotu.

	spallat	*m1701*
Stř. hodnota	47,66074	47,16725
Rozptyl	464,6817	441,3423
Pozorování	112	112
Pears. korelace	0,972565	
Hyp. rozdíl stř. hodnot	0	
Rozdíl	111	
t Stat	1,041414	
P(T<=t) (1)	0,149973	
t krit (1)	1,658697	
P(T<=t) (2)	0,299947	
t krit (2)	1,981567	

Obrázek 8. Dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu.

Přijímá se hypotéza o nulovém rozdílu párů hodnot, protože vypočtené statistické kritérium tStat=1,041414 je menší než oboustranná kritická hodnota $\alpha = 0,05$ Studentova rozdělení t krit (2)=1,981567. Regresní model tedy poskytuje stejné výsledky jako referenční metoda.

Dále bylo porovnání provedeno pomocí lineární regrese.

	Koeficienty	*Chyba stř. hodnoty*	*t Stat*	*Hodnota P*	*Dolní 95%*	*Horní 95%*	*Dolní 99,0%*	*Horní 99,0%*
Hranice	1,993158	1,129868	1,764063	0,080498	-0,24597	4,232292	-0,96852	4,954842
spallat	0,947826	0,021616	43,84777	1,68E-71	0,904988	0,990665	0,891164	1,004488

Obrázek 9. Lineární regrese - hodnocení úseku (Hranice).

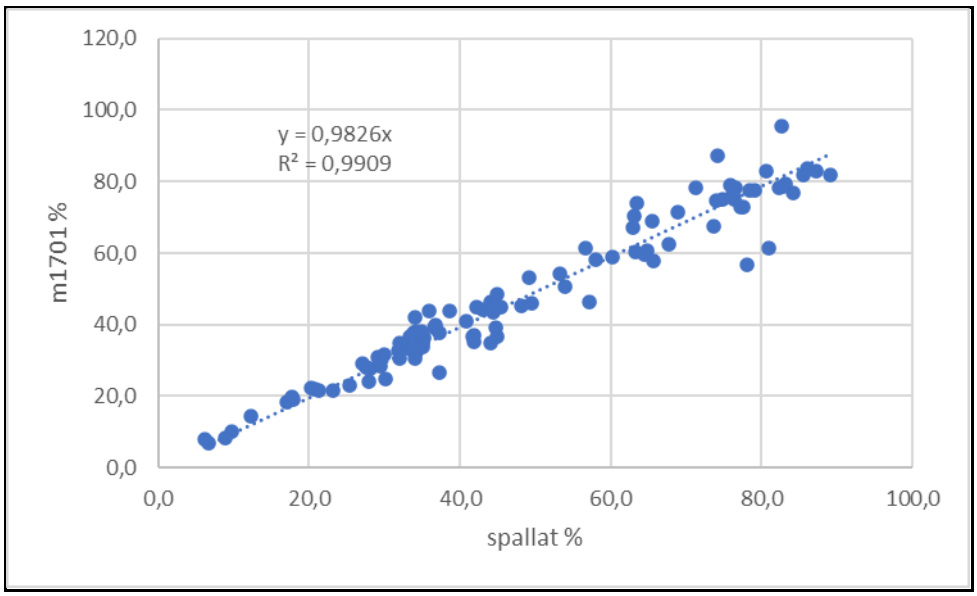
Na obrázku 9 je vidět, že dolní 95% a horní 95% mez intervalu spolehlivosti (−0,24597;4,232292) v sobě zahrnuje nulu. Nemůže být tedy zamítnuta hypotéza, že úsek (Hranice, Koeficienty) je roven nule, a tedy se musí provést i druhá regrese, kde se prohlásí, že regresní křivka prochází nulou.

	Koeficienty	*Chyba stř. hodnoty*	*t Stat*	*Hodnota P*	*Dolní 95%*	*Horní 95%*	*Dolní 99,0%*	*Horní 99,0%*
Hranice	0							
spallat	0,982597	0,008959	109,6775	5,3E-115	0,964844	1,000349	0,959116	1,006077

Obrázek 10. Lineární regrese - hodnocení směrnice.

Na obrázku 10 je vidět, že směrnice vypočítané regresní přímky je 0,982597. Vypočítané dolní a horní meze intervalu spolehlivosti v sobě zahrnují hodnotu 1, proto lze prohlásit, že hodnoty naměřené referenční metodou jsou stejné jako vypočítané pomocí regresního modelu.

Grafické vyhodnocení



Obrázek 11. Porovnání obsahů spalitelných látek na sadě nezávislých vzorků, kde spallat (%) byly naměřeny referenční metodou a m1701 (%) vypočítány pomocí regresního modelu.

Na obrázku 11 je hodnota směrnice 0,9826. Hodnota koeficientu determinace R2 je 0,9909, tato hodnota vyjadřuje, jaké procento základního souboru daný regresní model popisuje, v tomto případě to je 99,09 %. Takový výsledek naznačuje velkou předpovědní sílu regresního modelu a jeho velkou robustnost. Dvouvýběrový párový t-test i lineární regrese potvrdily, že model správně předpověděl hodnoty spalitelných látek na sadě nezávislých vzorků.

Ze statistického testování vyplývá, že získaný regresní model tvoří solidní základ pro odhad obsahu spalitelných látek v organických a organominerálních hnojivech. V dalších letech bude

však nutné do modelu průběžně doplňovat další data, aby se zvýšila jeho vydatnost. Byly identifikovány tři skupiny vzorků, na které se bude nutné zaměřit. Nejprve jsou to vzorky kapalné, dále pak vzorky organominerální s vysokým obsahem dusíku a jako další skupina jsou to vzorky vykazující vysoké hodnoty Ns a Ns-N. Tyto skupiny se mohou překrývat a jakékoliv rozdělení do těchto skupin tedy nemůže být zcela přesné.

4 Závěr

Na základě získaných výsledků je možné nahradit klasické stanovení spalitelných látek výpočtem pomocí regresního modelu z dat naměřených CN-elementárním analyzátorem.

Poměr C : N jako významný agrochemický parametr je pak možné vypočítat přímo z výsledků CN-elementárního analyzátoru.

Parametr spalitelné látky dříve používaný pro odhad obsahu uhlíku se tak stává nadbytečným, a v rámci zefektivňování práce není nutné provádět jeho pracné a pomalé stanovení. Parametr jako takový je nicméně z historického hlediska velmi cenný a je vhodné ho zachovat pro jeho snadnou srozumitelnost a možnost porovnání s historickými daty.

5 Literatura

1. Jednotné pracovní postupy − Zkoušení hnojiv, 2. vydání, ÚKZÚZ, Brno 2015.
2. Meloun M., Militký J.: Kompendium statistického zpracování dat, Academia 2002.

Stanovení tropanových alkaloidů metodou LC-MS

Martina Čumová, Simona Wawroszová, Zuzana Nehybová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
ONRL Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
simona.wawroszova@ukzuz.cz

1 Úvod

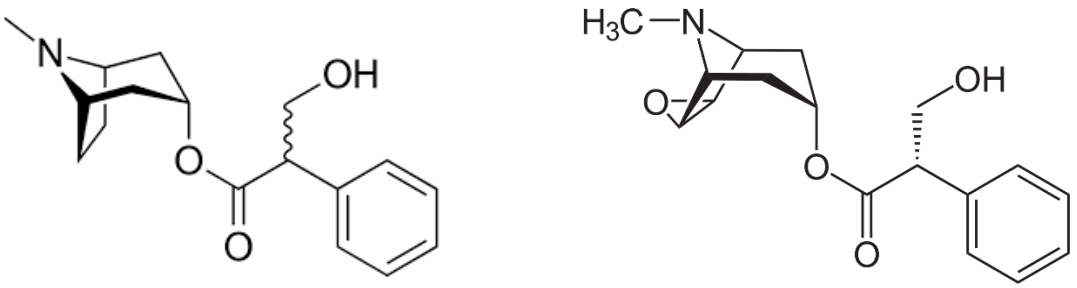
Tropanové alkaloidy jsou přírodní toxiny produkované rostlinami, zejména z čeledi lilkovitých (např. mandragora, blín, rulík zlomocný, durman obecný), rudodřevovitých (rudodřev koka) a brukvovitých. Mezi nejvýznamnější látky této skupiny patří atropin a skopolamin. Ačkoliv se v určité míře využívají v lékařství, konzumace vyššího obsahu těchto látek představuje vážné zdravotní riziko. Z tohoto důvodu by se obsah atropinu a skopolaminu v krmivech a surovinách pro jejich výrobu měl sledovat.
V laboratoři byla zavedena metoda pro stanovení atropinu a skopolaminu založená na QuEChERS extrakci s následnou analýzou pomocí LC-MS. Metoda je vhodná pro sledování těchto látek v surovinách rostlinného původu a splňuje všechny legislativní požadavky na výkonnostní kritéria.

2 Teoretická část

Tropanové alkaloidy jsou odpovědné za toxické efekty některých jmenovaných rostlin a mohou se vyskytovat ve všech jejich částech. Potravinářské plodiny, zejména obiloviny, mohou být kontaminovány, pokud se sklízejí společně s plevelem, v němž jsou tropanové alkaloidy obsaženy. Hlavní praktiky pro čištění obilovin nemusejí být vždy dostačující k odstranění části rostlin a semen plevelů. Proto byly tropanové alkaloidy shledány jako nežádoucí látky kontaminující potraviny a krmiva a z tohoto důvodu také v roce 2013 EFSA vydala vědecké stanovisko [1]. V roce 2016 byl stanoven legislativní limit pro atropin a skopolamin v některých potravinách na bázi obilovin pro kojence a malé děti [2]. Pro krmiva limity

stanoveny nebyly, ovšem je žádoucí a doporučuje se sledování a monitorování těchto látek jak v krmivech, tak v surovinách pro jejich výrobu [1].

Ačkoli bylo identifikováno více než 200 tropanových alkaloidů, dostatečné množství dat na zhodnocení toxicity a výskyt v potravinách a krmivech je dostupné pouze pro atropin a skopolamin (Obrázek 1). Jako nejvýznamnější z této skupiny látek byly shledány právě (-)-hyoscyamin a (-)-skopolamin, které na rozdíl od (+)-enantiomerů jsou tvořeny přirozeně. (+)-hyoscyamin není stabilní a rapidně podléhá racemizaci na atropin, který je racemickou směsí (±)-hyoscyaminu v poměru 1 : 1 [1, 3].



Atropin **Skopolamin**

Obrázek 1. Strukturní vzorce atropinu a skopolaminu

Tropanové alkaloidy jsou tvořeny tzv. tropanovým skeletem. Jedná se o cyklický pyrrolidinový a piperidinový kruh, které spojuje atom dusíku – ten je v této skupině látek charakteristicky methylovaný. Tropanové alkaloidy vznikají esterifikací tropinu s mnoha různými kyselinami, jako je kyselina octová, kyselina propanová, kyselina isobutyrová, kyselina isovalerová, kyselina tropová, kyselina atropová a další. V případě atropinu a skopolaminu se jedná o esterifikaci s kyselinou tropovou [1].

Atropin a skopolamin se vyznačují silným antimuskarinovým účinkem, kdy dochází k inhibici muskarinových acetylcholinových receptorů v centrální nervové soustavě. U intoxikovaného jedince tyto látky vyvolávají útlum žlázové sekrece, relaxaci hladkého svalstva, halucinace a dezorientaci. Způsobují poruchu srdeční činnosti, zejména pak poruchy srdeční frekvence, nejčastěji tachykardii (zrychlení srdeční činnosti) [1].

Tato práce se zabývá validací metody pro stanovení atropinu a skopolaminu v materiálech rostlinného původu. Metoda pro jejich stanovení se používá k monitoringu těchto toxických rostlinných metabolitů v krmivech a surovinách určených pro jejich výrobu.

3 Praktická část

3.1 Chemikálie

Methanol (čistota LC-MS), Fluka.
Kyselina mravenčí (čistota LC-MS), Fluka.
Mravenčan amonný (pro MS), Fluka.
Ultračistá voda připravena Milli-Q systémem, Millipore Corporation.
Acetonitril (čistota HPLC), Sigma Aldrich.
Standardy atropin a skopolamin, Sigma Aldrich. Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním standardů v acetonitrilu. Takto připravené zásobní roztoky byly uchovávány při teplotě –20 °C.

3.2 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 polypropylenové (PP) 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.

3.3 Postup přípravy vzorku

Homogenní vzorek byl navážen do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Ke vzorku bylo následně přidáno 10 ml 0,1% HCOOH. Poté bylo do zkumavky přidáno 10 ml acetonitrilu. Tropanové alkaloidy byly ze vzorku extrahovány třepáním 20 min na horizontální třepačce při 150 kmitech/min. Poté byla přidána pevná směs solí ($MgSO_4$ a NaCl) a směsí bylo intenzivně třepáno, aby došlo k rozrušení vzniklých hrudek. Vzorek byl poté odstředěn 5 min při 5000 ot/min. Vrchní acetonitrilová vrstva byla převedena do 15ml polypropylenové zkumavky. Zkumavka byla poté uchovávána 2 h při –20°C tak, aby došlo k vytěsnění lipidových koextraktů vzorku. Takto vymražený extrakt byl opět odstředěn 5 min při 3900 ot/min. Přesně 0,5 ml acetonitrilové vrstvy bylo převedeno do zkumavky Eppendorf, která byla poté doplněna vodou na celkový objem 1 ml. Po promíchání byl roztok zfiltrován přes membránový filtr a převeden do vialky.

3.4 UPLC-MS/MS stanovení

Extrakty převedené do 2ml vialky byly analyzovány 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 byla ověřena citlivost systému analýzou nejnižšího kalibračního bodu a zároveň stabilita retenčního chování v daném chromatografickém systému. Selektivita analýzy byla 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 (5 % B) – 0,2 min (5 % B) – 1,2 min (45 % B) – 4,5 min (99,5 % B) – 8 min (99,5 % B) – 8,1 min (5 % B) – 10 (5 % B)

Tabulka 2. Podmínky stanovení pro Xevo TQ MS Waters.

	RT*	Prekurso	CV (eV)	Produktový ion	CE (eV)	Produktový ion	CE (eV)
Atropin	0,93	290	35	93,1	35	124,1	30
Skopolamin	0,87	304	30	103	35	138	25
Teplota iontového zdroje – 150 °C, teplota sušícího plynu – 450 °C, průtok sušícího plynu – 700 l/h, průtok „cone gas“ – 15 l/h, průtok kolizního plynu – 0,18 ml/min, napětí na kapiláře – 3 kV, ionizace elektrosprejem v pozitivním modu							

*retenční čas (min)

4 Výsledky a diskuse

4.1 Validace stanovení tropanových alkaloidů

Metoda pro stanovení tropanových alkaloidů je založena na QuEChERS extrakci s následnou LC-MS analýzou. Stanovení tropanových alkaloidů bylo validováno ve vzorcích rostlinného původu (pšenice a seno). Blankové matrice byly obohaceny standardy atropinu a skopolaminu na třech koncentračních hladinách (pšenice – 5 μg/kg, 10 μg/kg a 1000 μg/kg; seno – 50 μg/kg, 100 μg/kg a 1000 μg/kg). Obohacení bylo provedeno v šesti opakováních pro každou matrici zvlášť. V rámci validace byla hodnocena citlivost, správnost, opakovatelnost, selektivita

a nejistota. V obou testovaných materiálech byla splněna všechna validační kritéria, a to podle SANTE 11945/2015 [4]. Mezí stanovitelnosti (LOQ) byla nejnižší validovaná hladina a lze ji tedy nazývat jako tzv. reportovací limit (RL). Extrakt sena vykazoval velmi vysokou supresi signálu – matriční efekt, a proto bylo nutné navýšit RL z původně testovaných 5 µg/kg až na 50 µg/kg. Lineární kalibrační rozsah byl pro oba analyty ve validovaném rozpětí s korelačním koeficientem větším než 0,999. Výsledná validační data jsou uvedena v tabulce 3. Selektivita je schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V případě LC-MS analýz jsou pozorovány matricové efekty (ME) v jejichž důsledku je ovlivněn signál analytu přítomností matrice (Tabulka 3). V rámci validace byly ME sledovány v extraktech obou testovaných matric. Matriční efekt byl počítán podle následující rovnice: ME = směrnice kalibrační křivky v matrici/směrnice kalibrační křivky v rozpouštědle *100. Vzhledem k přítomnosti ME v obou testovaných materiálech byla kvantifikace obsahu mykotoxinů provedena s využitím matricové kalibrace.

Stanovení opakovatelnosti vychází z vícenásobného měření matrice obohacené standardem alkaloidu na různých hladinách (Tabulka 3).

Správnost metody (70 – 120) % pro stanovení tropanových alkaloidů s požadavkem na maximální rozšířenou nejistotu (≤ 50) podle SANTE 11945/2015 [4] byl splněn v extraktu pšenice na hladině 5 µg/kg a v extraktu sena díky výrazným matričním efektům až na hladině 50 µg/kg. Tyto hladiny mohou být tedy LOQ, tj. RL metody.

Tabulka 3. Validační parametry atropinu a skopolaminu.

Matrice	Pšenice						Seno					
Analyt	Atropin			Skopolamin			Atropin			Skopolamin		
Koncentrace µg/kg	5	10	1000	5	10	1000	50	100	1000	50	100	1000
Správnost (%)	85	91	86	92	93	76	96	84	86	114	89	82
Opakovatelnost (%)	17	12	4	17	8	2	8	7	3	16	9	4
LOQ	5			5			50			50		
ME	89			89			26			13		
RT	0,93			0,87			0,93			0,87		

Pro identifikaci tropanových alkaloidů ve vzorcích byla použita kritéria podle SANTE 11945/2015 [4], tj. retenční čas (RT) a poměr sledovaných kvantifikačních a konfirmačních iontů. Povolená odchylka RT pro LC je ± 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.

Správnost metody byla navíc ověřena porovnáním výsledků se Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí. Výsledky jsou uvedeny v následující Tabulce 4.

Tabulka 4. Ověření správnosti.

Analyt	Název	Předložená hodnota (μg/kg)	Změřená hodnota (μg/kg)	z-score/výtěžnost (%)
Atropin	SZPI vz. P2063	1700 ± 850	1310	-0,46/77
Skopolamin	SZPI vz. P2063	300 ± 150	314	0,09/105

Výsledky validace potvrdily schopnost, správně stanovit atropin a skopolamin ve vzorcích rostlinného původu.

4.2 Analýza reálných vzorků

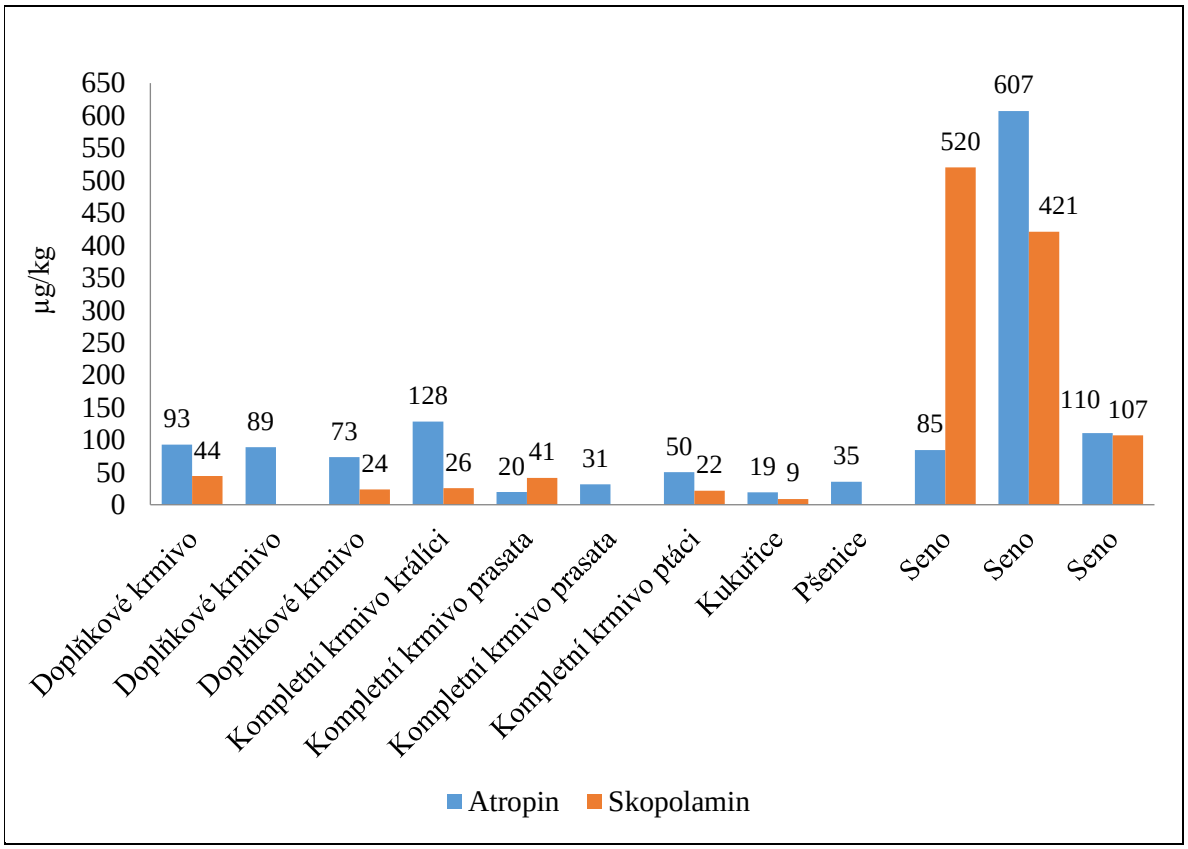
Vyvinutá metoda byla použita pro sledování tropanových alkaloidů v reálných vzorcích krmiv. V rámci monitoringu bylo během let 2016 a 2017 v ÚKZÚZ testováno vyvinutou metodou celkem 106 vzorků krmiv a surovin pro jejich výrobu. Atropin byl kvantifikován ve 12 vzorcích a skopolamin v 9 vzorcích (Tabulka 5).

Tabulka 5. Přehled analyzovaných vzorků a jejich kontaminace tropanovými alkaloidy.

Materiál	Počet testovaných vzorků	Počet kontaminovaných vzorků	
		Atropin	Skopolamin
Doplňkové krmivo	9	3	2
Ječmen	17	0	0
Kompletní krmivo	12	4	3
Kukuřice	7	1	1
Ostropestřec	1	0	0
Oves	4	0	0
Pivovarské mláto	1	0	0
Pšenice	31	1	0
Seno	18	3	3
Triticale	3	0	0
Vojtěška	1	0	0
Žito	2	0	0
Celkem	106	12	9

Obsah atropinu se ve většině vzorků pohyboval do 128 µg/kg a skopolaminu do 107 µg/kg. Takové nálezy jsou v souladu s publikací Any Romera-Tores [5], kde se maximální množství atropinu v krmivech nacházelo do 148 µg/kg a skopolaminu do 222 µg/kg.

Vyšší nálezy tropanových alkaloidů byly obsaženy ve dvou vzorcích sena z 18 testovaných (Obrázek 2). Takto vysoké nálezy mohou být důsledkem například kontaminace sena durmanem obecným, který obsahuje vysoká množství tropanových alkaloidů. O takové možnosti kontaminace pojednává dokument EFSA [1]. Někdy může být kontaminace sena tak významná, že vysoký obsah tropanových alkaloidů může zvířatům po požití způsobit vážné intoxikace, dokonce i smrt [6].



Obrázek 2. Obsahy atropinu a skopolaminu v pozitivních vzorcích.

V krmivech a surovinách pro jejich výrobu nejsou k datu stanoveny maximální limity pro atropin a skopolamin, a proto nelze zjištěné obsahy těchto látek v testovaných vzorcích z tohoto pohledu hodnotit. Nicméně z výsledku monitoringu vyplývá, že se tyto nebezpečné alkaloidy v testovaném materiálu vyskytují.

Vyvinutá metoda může být použita ke sledování obsahu těchto nežádoucích látek a jejich výskyt lze ohlašovat Evropskému úřadu pro bezpečnost potravin EFSA tak, jak požaduje Evropská komise. Poskytnutá data mohou sloužit pro budoucí nastavení legislativních limitů.

5 Závěr

V rámci práce bylo validováno stanovení tropanových alkaloidů atropinu a skopolaminu ve vzorcích rostlinného původu. Validované parametry splňovaly požadavky uvedené v SANTE 11945/2015 [4]. Správnost metody byla navíc ověřena porovnáním se vzorkem, který laboratoři poskytla Státní zemědělská a potravinářská inspekce. Vyvinutá metoda je vhodná pro stanovení atropinu a skopolaminu v krmivech a surovinách pro jejich výrobu. Metoda je snadná, rychlá, finančně úsporná a lze ji rozšířit o stanovení nových analytů.
Monitoring tropanových alkaloidů potvrzuje přítomnost těchto analytů ve vzorcích. Je vhodné sledovat obsahy těchto látek a pozitivní nálezy hlásit EFSA tak, jak požaduje Evropská komise.

6 Literatura

1. EFSA. 2013 EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. EFSA Journal. 11:3386, 113 pp.
2. Nařízení komise (EU) 2016/239 ze dne 19. února 2016, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity tropanových alkaloidů v některých obilných příkrmech pro kojence a malé děti.
3. Kohnen-Johannsen, K. L., Kayser, O. Tropane alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Biosynthesis and Production. Molecules, 2019, 24(4), 796.
4. SANTE/11813/2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.
5. A. Romera-Torres, R. Romero-González, A. G. Frenich, Study of the occurrence of tropane alkaloids in animal feed using LC-HRMS. *Analytical methods*, 2018 10(27).
6. M. R. Cooper, A. W. Johnson, 1984. Poisonous plants in Britain and their effects on animals and man. *Her Majesty's Stationery Office*, London, England, 305 pp.

Zavedení kvalitativního screeningového elementu *bar* pomocí qPCR

Jiří Čuhel
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
OdMB Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno
jiri.cuhel@ukzuz.cz

1 Úvod

Screeningový element *bar* (z angl. „bialaphos resistence“) se využívá při detekci genetických modifikací (GM) v rostlinném materiálu, osivech, krmivech a krmných směsích. Jedná se o gen kódující phosphinothricin N-acetyl transferasu a do transgenních plodin byl přenesen z bakterie *Streptomyces hygroscopicus*. Stávající analýza tohoto screeningového elementu v NRL ÚKZÚZ pomocí klasické PCR poskytuje nejednoznačné výsledky a často se musí opakovat. Stanovení pomocí qPCR významně zlepší specificitu amplifikovaného úseku DNA. Cílem této práce bylo verifikovat validovanou metodu kvalitativního stanovení screeningového elementu *bar* pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) a zavést ji do laboratorní praxe Oddělení mikrobiologie a biochemie (OdMB).

2 Materiál a metody

Chemikálie

Rotor-Gene Probe PCR Kit (QIAGEN).

PCR voda.

Rotor-Gene Probe PCR Master Mix (dále Rotor-Gene Mix).

Amplifikační primery

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

Forward primer pro vnitřní (referenční) gen rýže (gen *PLD* pro fosfolipasu D)

- KVM159: 5’- TGG TGA GCG TTT TGC AGT CT -3’.

Reverse primer pro vnitřní (referenční) gen rýže (gen *PLD* pro fosfolipasu D)

- KVM160: 5’-CTG ATC CAC TAG CAG GAG GTC C-3’.

Forward primer pro screeningový element *bar*

- BAR-F (RapB-F1): 5’-ACA AGC ACG GTC AAC TTC C-3’.

Reverse primer pro screeningový element *bar*

- BAR-R (RapB-R1): 5’-GAG GTC GTC CGT CCA CTC-3’.

Sondy

Pro analýzy byly použity hydrolyzační sondy TaqMan se značením FAM (6-carboxyfluorescein) a BHQ1 (Black Hole Quencher 1) od firmy Elisabeth Pharmacon. Tyto sondy jsou čteny v zeleném kanálu, který má rozsah vlnových délek (470 – 510) ± 10 nm.

Sonda pro vnitřní (referenční) gen rýže (gen *PLD* pro fosfolipasu D)

- TM013: 5’-FAM-TGT TGT GCT GCC AAT GTG GCC TG-BHQ1-3’.

Sonda pro screeningový element *bar*

- BAR-P (RapB-S1): 5’-FAM-TAC CGA GCC GCA GGA ACC-BHQ1-3’.

Použité referenční materiály

AOCS 0306-D4

Interní označení CRM 4/2019, obsahuje 0 % m/m geneticky modifikované rýže (blank). Certifikovaný referenční materiál byl dodán od AOCS (The American Oil Chemists' Society) ve formě genomové DNA izolované z listů. Byly k dispozici dva izoláty DNA, tj. dvě mikrozkumavky s DNA interně označené A a B stejné šarže.

AOCS 0306-I9

Interní označení CRM 5/2019, obsahuje 100 % m/m geneticky modifikované rýže LLRice62. GM rýže LLRice62 obsahuje screeningový element *bar*. Certifikovaný referenční materiál byl dodán od AOCS (The American Oil Chemists' Society) ve formě genomové DNA izolované z listů.

ERM® - BF410dp

Interní označení CRM 2/2018, obsahuje 1% m/m geneticky modifikované sóji MON40-3-2. Certifikovaný referenční materiál byl dodán od IRMM (Institute for Reference Material and Measurements) ve formě kukuřičného šrotu, ze kterého byla vyextrahována DNA podle JPP č. 10252.1.

IRM 1/2010

Interní referenční materiál (rýže), ze kterého byla vyextrahována DNA podle JPP č. 10252.1.

Přístroje a pomůcky

Termocykler Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen).

3 Pracovní postup

Popis metody

Metoda je plně v souladu s JPP ÚKZÚZ

- 10262.1 Kvalitativní stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu,
- 10263.1 Vyhodnocení kvalitativního stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR)

a s validovanou metodikou JRC pro stanovení screeningového elementu *bar* (Grohmann et al., 2009). Sekvence amplifikačních primerů, sond, programy a koncentrace PCR směsí vycházejí z validované metodiky JRC pro stanovení screeningového elementu *bar* (Grohmann et al., 2009):

Primery: BAR-F (RapB-F1), BAR-R (RapB-R1).

Sonda: BAR-P (RapB-S1).

Délka amplikonu: 60 bp.

V tabulce 1 je uveden amplifikační program PCR a tabulka 2 popisuje složení reakční směsi PCR.

Tabulka 1. Amplifikační program pro screeningový element *bar*.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Akvizice dat fluorescence (zelený kanál)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	ne	1
Denaturace	95	15	ne	45
Annealing a elongace	60	60	ano	

Tabulka 2. Složení reakční směsi PCR pro screeningový element *bar*.

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (µl/reakce)
PCR voda			7,025
Rotor-Gene Mix	2 ×	1 ×	12,5
Primer F: BAR-F (RapB-F1)	20 µM	0,14 µM	0,175
Primer R: BAR-R (RapB-R1)	20 µM	0,14 µM	0,175
Sonda: BAR-P (RapB-S1)	20 µM	0,1 µM	0,125
Templátová DNA	20 ng/µl		5
Objem směsi vč. templátu			25

Verifikace metody

Verifikace metody proběhla v souladu s verifikační metodikou pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017). Z validačních parametrů se stanovovala pouze mez detekce (LOD), protože se jednalo o kvalitativní analýzu.

Izoláty DNA (CRM 4/2019, CRM 5/2019, IRM 1/2010) byly otestovány na přítomnost inhibitorů PCR podle verifikační metodiky pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017). Každý izolát DNA byl postupně naředěn na koncentraci 20 ng/µl a dále 4 × na 5 ng/µl a obě dvě ředění byla podrobena kvantitativnímu stanovení vnitřního rýžového genu *PLD* podle Mazzara et al. (2006). Při této analýze byly použity primery KVM159 a KVM160 a sonda TM013. V tabulce 3 je uvedeno složení reakční směsi PCR a amplifikační program je stejný jako v případě screeningového elementu *bar* (tabulka 1). Poté se vypočítal rozdíl mezi stanovenými hodnotami Ct (počet cyklů, při kterém fluorescence

vytvořená amplifikací cílové DNA překročí prahovou hodnotu) u jednotlivých ředění (ΔCt) a ten se porovnal s teoretickou hodnotou ΔCt (v tomto případě = 2). Absolutní hodnota rozdílu mezi stanovenou a teoretickou hodnotou ΔCt musí být < 0,5. Všechny izoláty DNA prošly tímto testem úspěšně, účinek inhibitorů PCR u nich nebyl prokázán.

Po provedení testu inhibice byly oba dva izoláty DNA A a B s 0 % GM m/m (CRM 4/2019) smíchány. Výsledná směs pak sloužila k ředění DNA se 100 % GM m/m (CRM 5/2019) na nižší hodnoty obsahu GM. CRM s jinými hodnotami obsahu GM než 0 a 100 % GM m/m totiž nejsou v případě LLRice62 komerčně dostupné a je nutné si je připravit. Postup tohoto ředění je detailně popsán ve verifikační metodice pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017). Pětibodová kalibrační křivka pro účely přesného stanovení koncentrace DNA v CRM 4/2019 a CRM 5/2019 byla vytvořena postupným ředěním (1 : 4) izolátu DNA z IRM 1/2010. Jako negativní kontrola byla využita DNA izolovaná z CRM 2/2018. Tímto postupem byly připraveny tři roztoky DNA s nízkou hodnotou genetické modifikace (GM) LLRice62, a to 0,1; 0,05 a 0,02 % GM m/m. Ty byly poté využity při stanovení meze detekce (LOD).

Podle verifikační metodiky pro implementaci validovaných metod testování GMO (Hougs et al., 2017) je při stanovení meze detekce (LOD) materiál s nízkým obsahem GM analyzován v celkem 10 opakováních a pokud jsou všechna opakování pozitivní, potom je LOD ≤ daný obsah GM. Při validaci metody pro kvalitativní stanovení screeningového elementu *bar* byl LOD stanoven na ≤ 0,02 % (Grohmann et al., 2009). Samotná verifikace proběhla na třech hladinách GM: 0,1; 0,05 a 0,02 % GM m/m. Jako negativní kontrola byla při qPCR použita CRM 4/2019 (negativní pro *bar*).

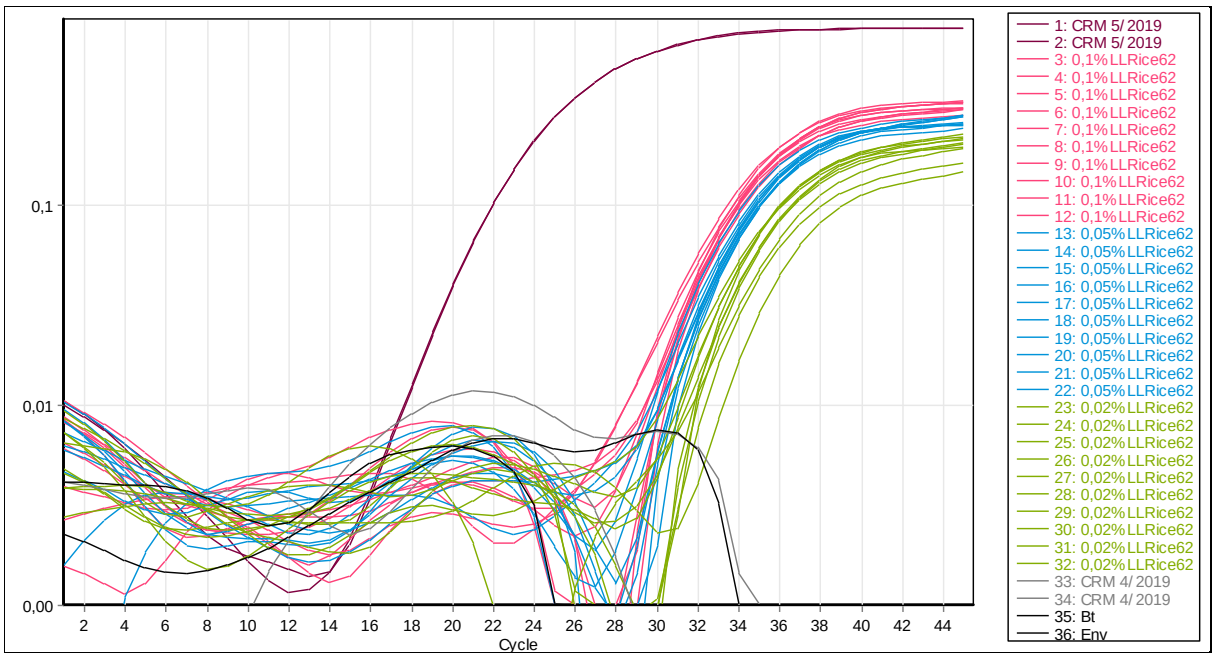
Tabulka 3. Složení reakční směsi PCR pro vnitřní rýžový gen *PLD.*

Složka	Koncentrace roztoků	Finální koncentrace	Objem (µl/reakce)
PCR voda			6,75
Rotor-Gene Mix	2 ×	1 ×	12,5
Primer F: KVM159	20 µM	0,2 µM	0,25
Primer R: KVM160	20 µM	0,2 µM	0,25
Sonda: TM013	20 µM	0,2 µM	0,25
Templátová DNA	20 ng/µl		5
Objem směsi vč. templátu			25

3 Výsledky a diskuse

Při zavádění a verifikaci metody pro kvalitativní stanovení screeningového elementu bar pomocí qPCR na OdMB se nevyskytly žádné potíže. Bylo možné v plné míře pracovat podle validované metodiky pro analýzu tohoto screeningového elementu (Grohmann et al., 2009). Obrázek 1 ukazuje amplifikační křivky (závislost fluorescence na počtu cyklů PCR) při stanovení meze detekce (LOD). Jelikož získané výsledky byly kvalitativní (detekován/nedetekován) (tabulka 4), nebylo nutné je statisticky zpracovávat, ale pouze vyhodnotit, zda všech 10 opakování s nízkou hladinou GM bylo při analýze pozitivních. Bylo ověřeno, že lze detekovat obsah screeningového elementu *bar* i na hladině 0,02 % GM m/m a nižší, protože všech 10 opakování s touto hladinou bylo na detekci bar pozitivních. Limity pro minimálně akceptovatelnou výkonnost metody byly dosaženy – ve validačním plánu bylo uvedeno 0,1 % GM m/m.

Metoda Kvalitativní stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu (JPP č. 10262.1) je již zavedena a akreditována. Stanovení screeningového elementu *bar* tak bylo zavedeno jako stanovení nového parametru.



Obrázek 1. Amplifikační křivky (závislost fluorescence na počtu cyklů PCR) při stanovení meze detekce (LOD) u screeningového elementu *bar*. Bt – beztemplátová kontrola, Env – kontrola čistoty prostředí při přípravě PCR, CRM 4/2019 – negativní kontrola, CRM 5/2019 – pozitivní kontrola.

Tabulka 4. Získané výsledky při verifikaci metody kvalitativního stanovení screeningového elementu *bar* v DNA se třemi hladinami GM LLRice62.

Hladina GM	**Laboratorní opakování**	**Detekce *bar***
0,1 % GM m/m	1	detekován
	2	detekován
	3	detekován
	4	detekován
	5	detekován
	6	detekován
	7	detekován
	8	detekován
	9	detekován
	10	detekován
0,05 % GM m/m	1	detekován
	2	detekován
	3	detekován
	4	detekován
	5	detekován
	6	detekován
	7	detekován
	8	detekován
	9	detekován
	10	detekován
0,02 % GM m/m	1	detekován
	2	detekován
	3	detekován
	4	detekován
	5	detekován
	6	detekován
	7	detekován
	8	detekován
	9	detekován
	10	detekován

4 Závěr

Verifikace potvrdila vhodnost použití metody pro daný účel a odpovídá zamýšlenému použití. Zjištěné validační parametry prokázaly způsobilost metody k používání v rámci NRL a její zahrnutí do akreditovaných metod. Metoda kvalitativního stanovení screeningového elementu *bar* pomocí qPCR se zařadí do postupů zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv, krmných směsí a osiv.

5 Literatura

1. Grohmann L., Brunen-Nieweler C., Nemeth A., Waiblinger H-U, 2009. Collaborative Trial Validation Studies of Real-Time PCR-Based GMO Screening Methods for Detection of the bar Gene and the ctp2-cp4 epsps Construct. J. Agric. Food Chem. 57, 8913-8920.
2. Hougs L., Gatto F., Goerlich O., Grohmann L., Lieske K., Mazzara M., Narendja F., Ovesna J., Papazova N., Scholtens I., Žel J., 2017. Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. EUR 29015 EN – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection, Luxembourg: Publication Office of the European Union, ISBN 978-92-79-77310-5, doi:10.2760/645114, JRC 109940.
3. JPP č. 10252.1. Izolace DNA pro stanovení GMO metodou PCR (kit Nucleospin Food). ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – Zkoušení krmiv.
4. JPP č. 10262.1. Kvalitativní stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR pomocí Rotor-Gene Probe PCR kitu. ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – Zkoušení krmiv.
5. JPP č. 10263.1. Vyhodnocení kvalitativního stanovení screeningových elementů a genetických modifikací metodou qPCR. ÚKZÚZ, Jednotné pracovní postupy ÚKZÚZ – Zkoušení krmiv.
6. Mazzara M., Grazioli E., Savini C., Van den Eede G., 2006. Event-Specific Method for the Quantification of Rice Line LLRICE62 Using Real-Time PCR. Validation Report and Protocol. EUR 22490 EN – Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, ISBN 92-79-03129-5.

Bulletin Národní referenční laboratoře XXVI, 2022/1

Ročník:	XXVI, č. 1
Vydal:	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2022
Odpovědný redaktor:	Ing. Iva Strížová
Počet stran:	32

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196