

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Národní referenční laboratoř



Bulletin 2016

Ročník XX, číslo 2/2016

Brno 2016

Obsah

- 1 Zavedení flash metody pro měření inhibice luminiscence bakterie *Vibrio fischeri***
Martin Váňa
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL, OMB Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
- 2 Zavedení detekce vnitřního genu bavlny a modifikace 281-24-236 x 3006-210-23 pro syntézu proteinů Cry1F a Cry1Ac**
Kateřina Staňková
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL, OMB,
Hroznová 2, 656 06 Brno 16
- 3 Stanovení obsahu karvonu v kmínové silici**
Naděžda Kabátová, Radvana Šulová
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno
Hroznová 2, 656 06 Brno 35

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Zavedení flash metody pro měření inhibice luminiscence bakterie *Vibrio fischeri*

Martin Váňa

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL, OMB Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno
martin.vana@ukzuz.cz

1 Úvod

Flash test s bakterií *Vibrio fischeri* využívá přirozené bioluminiscence tohoto mořského prokaryotního organismu. Jelikož proces bioluminiscence je přímo spojen s metabolickými drahami bakterie, jeví se jako velice vhodný parametr pro sledování účinku toxických látek obsažených v testovaných vzorcích na organismus. Flash test překonává problémy vyplývající z intenzivního zabarvení a zakalení vzorku. Test vychází z poznatku, že světelná produkce nestresovaných luminiscenčních bakterií zůstává prvních přibližně 1000 s trvání testu konstantní a teprve potom klesá, zatímco světelná produkce toxickou látkou zasažených bakterií klesá ihned. V současné době se v laboratoři půdní mikrobiologie a ekotoxikologie NRL-OMB používá metoda pro stanovení inhibice luminiscence bakterie *Vibrio fischeri*, kdy se měří inhibice v 5., 15. a 30. minutě. Zavedení metody inhibice luminiscence mořské bakterie *Vibrio fischeri* v režimu kinetiky umožňuje měření zhášení ihned po kontaktu bakterie s výluhem. Tímto postupem lze měřit i vzorky silně zakalené i barevné bez nutnosti filtrace nebo centrifugace (možnost poklesu toxicity vzorku).

2 Cíl

Cílem práce bylo zavedení a optimalizace metody pro měření kinetiky *Vibrio fischeri* podle ČSN ISO 21338:2010 pomocí následujících kroků:

- (i) optimalizace nastavení měřicího přístroje CHAMELEON s připojeným injektorem pro přímý nástřik suspenze *Vibrio fischeri*

- (ii) optimalizace testu za použití standardní chemikálie 3,5 – dichlorophenol
- (iii) aplikace metody na 3 vzorcích půdních extraktů

3 Princip

Zkouška se provádí na mořské bakterii *Vibrio fischeri*. Bakterie přirozeně emitují světlo, které vzniká v organismu při chemické reakci katalyzované enzymem luciferázou. Tato reakce probíhá pouze za optimálních podmínek pro bakterie. Pokud těchto podmínek není dosaženo (působení toxické látky), velice rychle vyhasíná i bioluminiscence. Tohoto jevu se využívá jako ukazatele toxicity testované látky. Inhibice luminiscence se stanovuje u bakterií vystavených vhodně zvoleným koncentracím toxické látky. Emise světla se měří a zaznamenává od okamžiku přidání bakteriální suspenze až do dosažení maximální hodnoty (obvykle dochází do 5 s od smíchání) a po době kontaktu 5 min, 15 min a 30 min. Metoda měřící kinetiku reakce obchází problémy spojené s intenzivním zbarvením a zákalem vzorků. Test je optimalizován pro provedení v 96 jamkových mikrotitračních destičkách.

4 Materiál a metody

4.1 Přístroje a pomůcky

- 4.1.1 Mikrodestičkový luminometr umístěný v termostatu s nastavenou teplotou na 15 °C. Dilutor s nastavitelným objemem 1 µl a celkovým objemem 2 ml.
- 4.1.2 Termostat nastavený na 15 °C.
- 4.1.3 pH metr.
- 4.1.4 Horizontální třepačka.
- 4.1.5 8-kanálová pipeta (30 – 300) µl.
- 4.1.6 Automatické pipety (20 – 200) µl, (200 – 1000) µl.
- 4.1.7 Váhy, přesnost 0,01 g, váživost do 200 g.
- 4.1.8 Mikrodestičky pro měření luminiscence (bílé).
- 4.1.9 Stopky.
- 4.1.10 Testovací skleněné nádoby 200 ml.
- 4.1.11 Pipetovací vaničky.
- 4.1.12 Lyofilizovaná kultura *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 (Dr. Bruno Lange GmbH & Co KG), která se uchovává při teplotě –20 °C. Za uvedených podmínek může být skladována nejméně rok.

4.2 Chemikálie

- 4.2.1 Chlorid sodný, $c(\text{NaCl}) = 20 \text{ g/l}$. 20 g NaCl se rozpustí ve vodě, po převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku.
- 4.2.2 Chlorid sodný, $c(\text{NaCl}) = 40 \text{ g/l}$ (pro ředění 2 při analýze půd). 40 g NaCl se rozpustí ve vodě, po převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku.
- 4.2.3 Médium pro lyofilizované bakterie (dále jen „VF medium“).
Ve vodě se rozpustí:
20 g chloridu sodného, NaCl
2,035 g hexahydrátu chloridu hořečnatého, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,30 g chloridu draselného KCl a po rozpuštění doplní vodou na 1000 ml.
Roztok se uchovává při -20°C , před analýzou se vytemperuje na 3°C , část se vytemperuje na 15°C pro případ ředění suspenze s příliš vysokou aktivitou.
- 4.2.4 Hydroxid sodný, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$. 4,0 g NaOH se rozpustí ve vodě, po převedení do 1000ml odměrné baňky se doplní po značku.
- 4.2.5 Kyselina chlorovodíková, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$. 8,77 ml 35% HCl se přidá do vody a doplní na celkový objem 1000 ml.
- 4.2.6 3,5-dichlorofenol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$), DCF.
Zásobní roztok, $c(\text{DCF}) = 136 \text{ mg/l}$. V roztoku NaCl (20 g/l) se rozpustí 27,2 mg DCF a tím že roztokem doplní do 200 ml.

5 Pracovní postup

Postup je založen na standardizované metodě ISO 21338.

5.1 Příprava suspenze *Vibrio fischeri*

Příprava zásobní suspenze

Do ampule s lyofilizovanou kulturou *V. fischeri* se přidá obsah ampule ochlazený asi na 3°C , který je součástí kitu dodaný společností Dr. Bruno Lange GmbH & Co KG. Suspenze se ponechá minimálně 30 min v ledničce. Hodnoty luminiscence s dobou skladování klesají.

Příprava pracovní suspenze

Pracovní suspenze se připraví ředěním zásobní suspenze *V. fischeri* VF médiem (4.2.3) o teplotě 3°C tak, aby výsledná hodnota luminiscence byla v rozmezí 300 000 až 800 000. Pracovní suspenze se důkladně protřepe a umístí na 15°C . Po 15 min se provede orientační

měření a v případě, že hodnota luminiscence je větší než 1 000 000, pracovní suspenze se dále zředí VF médiem vytemperovaným na 15 °C. Jako vhodné se proto jeví připravit si pro orientační měření ředící řadu suspenze *V. fischeri*. Při kalkulaci je třeba vzít v úvahu, že při testu se pracovní suspenze *V. fischeri* ředí zkušebním roztokem v poměru (1 : 1). Suspenze se důkladně protřepe, nalije do pipetovací vaničky a opět umístí do termostatu, který je nastaven na 15 °C. Po celkové době temperování 15 min může být pracovní suspenze použita pro další práci. Tato doba by neměla být zbytečně prodlužována, luminiscenční aktivita bakterií s časem klesá.

5.2 Příprava testovaných roztoků

Pro přípravu vzorků se použijí tři destičky: destička pro přípravu ředící řady (ředicí), destička pro vytemperování zkušebních roztoků (přípravná) a destička, ve které probíhá měření (zkušební). Roztoky ředící řady se přepipetují z ředicí do přípravné destičky z důvodu znáhodnění pozic jednotlivých ředění v rámci ředící řady. Jedna sada tří destiček umožní analýzu tří vzorků; každý vzorek se analyzuje ve dvou opakováních, krajní jamky se pro analýzu nevyužívají.

Příprava půdních extraktů

V případě testování toxicity půdy nebo půdních materiálů se do 200ml testovacích skleněných nádob naváží vzorek odpovídající 10 g sušiny ve dvou opakováních. Přidá se tolik vody, aby celkový objem extraktantu včetně vody obsažené v půdě činil 20 ml. Suspenze se nechá třepat 24 h na orbitální třepačce při frekvenci 170 min⁻¹, při laboratorní teplotě. Po skončení extrakce se změří pH suspenze. V případě, že se pH nachází mimo rozsah 6,5 až 8,0, upraví se pH na hodnotu 7,0 ± 0,2 roztokem NaOH nebo HCl. Původní hodnoty pH, případně upravené hodnoty se zaznamenají do tabulky.

Ředění extraktu se definuje jako poměr objemu roztoku k objemu extraktu. Pro přípravu roztoku o ředění 2 se použije roztok NaCl o koncentraci 40 g/l, pro roztoky o vyšším ředění roztok NaCl o koncentraci 20 g/l. Ředící řada se napipetuje v ředicí mikrodestičce, pro každé opakování v jedné řadě jamek. Nejprve se do první jamky napipetuje 320 µl extraktu a do následujících jamek roztoky NaCl podle tabulky 1. Pokud vzorek obsahuje velké částice, může se pipetování usnadnit odříznutím hrotu špičky. Poté se pomocí multikanálové pipety připraví ředící řada podle tabulky 2. Výsledná ředící řada je uvedena v tabulce 3.

Tabulka 1. Pipetování extraktu a roztoků NaCl (4.2.1 resp. 4.2.2) pro přípravu ředicí řady.

Sloupec	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Roztok	Extrakt	4.2.1	4.2.2	4.2.1	4.2.1	4.2.1	4.2.1	4.2.1	4.2.1	4.2.2
V [μl]	320	150	150	150	150	150	150	250	150	150

Tabulka 2. Postup přípravy ředicí řady.

Krok	Zdrojová jamka	V [μl]	Cílová jamka
1	S1	150	S3
2	S3	150	S4
3	S4	150	S5
4	S5	150	S6
5	S6	150	S7
6	S7	150	odpad
7	S1	150	S10
8	S10	50	S8
9	S8	150	S9
10	S9	150	odpad

Tabulka 3. Pipetování extraktu a roztoků NaCl pro přípravu ředicí řady.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Ředění		0	2	4	8	16	32	12	24	2

Příprava koncentrační řady pro testování chemikálií

V případě testování toxicity chemikálií nebo směsí chemikálií se připraví řada roztoků s geometrickou posloupností hodnot koncentrací. Násobek mezi dvěma sousedními hodnotami nemá být větší než 2. Pro přípravu koncentrační řady se použije roztok NaCl (20 g/l). Stanovení se provádí ve dvou opakováních.

Příprava koncentrační řady referenční látky

Koncentrační řada se připraví ředěním zásobního roztoku DCF (136 mg/l) roztokem NaCl (20 g/l) podle tabulky 4. Uvedené koncentrace odpovídají finální koncentraci v jamce mikrodestičky. Protože k roztoku referenční látky se během testu přidává suspenze *Vibrio fischeri* v poměru (1 : 1), koncentrace uvedené v tabulce jsou poloviční než koncentrace pracovních roztoků.

Tabulka 4. Příprava roztoků DCF pro stanovení EC₅₀. Uvedené koncentrace DCF se vztahují na finální koncentraci v jamce mikrodestičky.

Výsledná koncentrace (mg DCF/l)	Zásobní roztok DCF (μl)	Roztok NaCl (μl)
1,80	53	1947
2,37	70	1930
3,13	92	1908
4,13	121	1879
5,45	160	1840
7,19	211	1789
9,50	279	1721

5.3 Příprava mikrodestiček před měřením

Do krajních jamek zkušební destičky se napipetuje 200 μl vody, aby se zamezilo krajovým efektům, destička se přikryje víčkem a umístí do termostatu, který je nastaven na 15°C. Do přípravné destičky se z ředící destičky napipetuje 200 μl testovaných roztoků do jamek v pozicích odpovídajících jamkám, ve kterých se během měření budou nacházet ve zkušební destičce. V případě půdních výluhů se testují ředění 2; 4; 8; 12; 16; 24; 32, každá řada obsahuje i kontrolu (roztok NaCl, 20 g/l). Pořadí jednotlivých ředění v případě testování půdních extraktů nebo jednotlivých koncentrací v případě stanovení vlivu chemikálií každého paralelního stanovení v rámci vzorku je znáhodněné (tabulka 5; 6). Poté se destičky nechají vytemperovat na 15 °C.

Tabulka 5. Příklad znáhodněného pořadí série ředění vzorku ve dvou opakováních v přípravné destičce.

Sloupec	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Ředění	16	2	32	8	12	4	0	24
Ředění	2	24	16	0	32	4	12	8

Tabulka 6. Příklad znáhodnění koncentrační řady DCF ve dvou opakováních v přípravné destičce.

Sloupec	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
cDCF (mg/l)	9,50	4,13	0,00	3,13	2,37	1,80	7,19	5,45
cDCF (mg/l)	9,50	3,13	7,19	1,80	2,37	5,45	0,00	4,13

5.4 Měření luminiscence

Do mikrodestičkového luminometru s připojeným injektorem se vloží prázdná mikrodestička. Injektor se propláchne připraveným inokulem *Vibrio fischeri*, dokud si měřené hodnoty luminiscence nejsou podobné. Vymění se mikrodestička za vytemperovanou zkušební destičku (15 °C) s napipetovanými testovanými vzorky. Nastaví se parametry nástřiku inokula *Vibrio fischeri* (100 µl), třepání destičky před každým nástřikem inokula, délka měření kinetiky jedné jamky (20 ms) a definují se jamky měření v mikrodestičce. Nastaví se měření a pipetování po řadách (B, C, D...). Měří se přímá luminiscence, teplota uvnitř přístroje je nastavena na 15 °C. Měří se po řadách (B, C...). Nejprve se změří kinetika (počet měření jedné jamky 20 ms po dobu 30 s) a následně po 5 min, 15 min a 30 min již bez modu kinetiky znovu změří luminiscence jednotlivých jamek mikrodestičky.

5.5 Vyhodnocení testu

Korekce počátečních hodnot

Korekční faktor slouží ke korekci počátečních hodnot.

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_p} (t = 5, 15, 30 \text{ min}) \quad (1)$$

f_{kt} - korekční faktor

I_{kt} - luminiscence kontrolního vzorku po 5, 15 nebo 30 min

I_p – maximální intenzita luminescence (vrcholová hodnota) kontrolní zkušební suspence ihned po přidání bakterií ke vzorku

Vypočte se průměr hodnot f_{kt} kontrolních vzorků f_{kt_av} .

Výpočet závislosti účinku na koncentraci

Pro hodnoty luminiscence v jamkách před přidavkem testovaných vzorků se vypočte korigovaná hodnota:

$$I_{ct} = I_p \cdot f_{kt_av} \quad (2)$$

I_p - maximální intenzita luminescence (vrcholová hodnota) kontrolní zkušební suspence ihned po přidání bakterií ke vzorku

I_{ct} - korigovaná hodnota luminiscence v jamkách před přidáním testovaného vzorku

f_{kt_av} - průměr hodnot f_{kt}

Vypočte se inhibiční účinek testovaného vzorku:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_t}{I_{ct}} \times 100 \quad (3)$$

H_t - inhibiční účinek testovaného vzorku po expoziční době t

I_{ct} - viz (2)

I_t - luminiscence testovaného vzorku v čase t

Pro vyhodnocení závislosti inhibice na koncentraci zkoušené látky se vypočte hodnota gama

$$\Gamma_t = \frac{H_t}{100 - H_t} \quad (4)$$

Γ_t - hodnota gama testovaného vzorku v čase t

H_t - průměr hodnot H_t uvedený v (3).

Pozn. hodnotu gama nelze spočítat pro hodnotu inhibice 0 % nebo 100 %. Proto se pro výpočet gama obvykle používají hodnoty H_t v rozmezí 10 % až 90 %.

Vztah mezi koncentrací a účinkem může být popsán rovnicí:

$$\log c_t = b \cdot \log \Gamma_t + a \quad (5)$$

log - dekadický logaritmus

c_t - koncentrace roztoku

b - směrnice regresní přímky

a - úsek regresní přímky

Výpočet hodnot EC_x

Hodnotou účinné koncentrace EC_x se rozumí koncentrace, která způsobí $x\%$ pokles hodnoty luminiscence. Hodnoty EC_x se vypočtou pomocí rovnice (5). Pro danou hodnotu EC_x se spočte hodnota Γ_t , dosadí do rovnice a vypočte hodnota c_t .

$$EC_{20} = 10^{(b \cdot \log 0.25 + a)} \quad \Gamma_t = 0.25$$

$$EC_{50} = 10^a \quad \Gamma_t = 1.00$$

$$EC_{80} = 10^{(b \cdot \log 4 + a)} \quad \Gamma_t = 4.00$$

Výpočet hodnot EC_x je rovněž možno provést logit nebo probit regresí.

5.6 Kritéria validity

Test je platný, jestliže:

- 1 Hodnota fkt_av pro 30min inkubaci je v rozmezí 0,6 až 1,8,
- 2 Inhibice luminiscence způsobená referenční látkou 3,5-dichlorofenolem při koncentraci 3,4 mg/l se pohybuje v rozmezí 20 % až 80 %.

Data se vyhodnotí podle Statistické hodnocení ekotoxikologických testů programem ToxRat.

6 Výsledky a diskuze

6.1 Optimalizace nastavení měřicího přístroje CHAMELEON

Přístroj CHAMELEON se ovládá prostřednictvím programu MikroWin. Pro správné fungování a ovládání přístroje je nutno jako první spustit program MikroWin a potom zapnout přístroj CHAMELEON. Před samotným započítím měření je nutno správně nadefinovat oblast jamek pro napipetování inokula bakterie, měření a zvolit mód měření fluorescence. Následně je nutno propláchnout injektor přichystanou suspenzí *Vibrio fischeri*. Suspenze *Vibrio fischeri* se pipetuje levým injektorem (ozn. LEFT). Dále se nastaví parametry měření kinetiky.

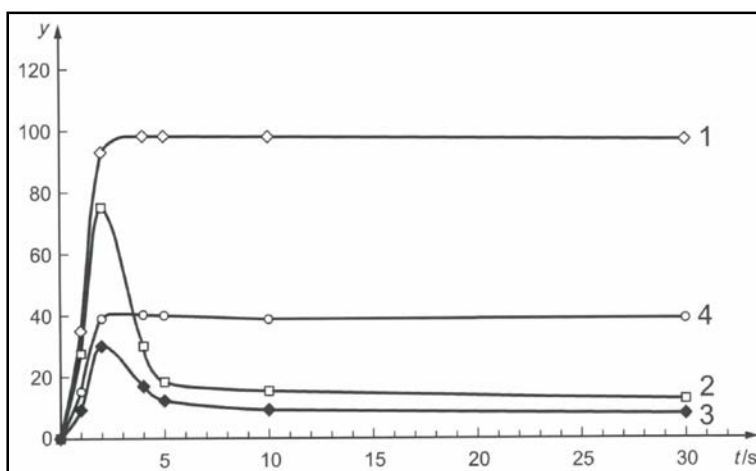
Parametry proplachování a měření jsou shrnuty v tabulce 7. Po skončení měření se propláchně injektor. K tomu se použije celá mikrodestička.

Tabulka 7. Parametry měření a pipetování pro stanovení inhibice luminiscence *Vibrio fischeri*, promývání a kinetické měření.

Analýza	Promývání injektoru	Pipetování, měření
Technology	Luminiscence	Luminiscence
Meas. Cycle	Lumino1, Direct	Lumino1, Direct
Oper.mode	Single measurement	Repeat by Well
Temp.Cont.	Ne	Ne
Plate size	96w, 8x12	96w, 8x12
Movement	Quadrangle by row	Quadrangle by row
Shake Cont.	Ne	Yes (4s, amplituda 2, před nástřikem inokula)
Meas.mode	Direct	Direct
Count.Time	20 ms	20 ms
Disp.Left	Ano	Ano
Volume (µl)	100	100
Speed	1	1
Delay	0	0
Tube vol.(µl)	500	500
Syringe (µl)	500	500
Repeat trig.	1	1

6.2 Optimalizace testu za použití standardní chemikálie 3,5–dichlorophenol a test tří extraktů půdy

Pro ověření funkčnosti zvoleného postupu byl proveden test se standardní chemikálií 3,5 - dichlorophenol. Inhibice luminiscence způsobená referenční látkou 3,5-dichlorofenolem při koncentraci 3,4 mg/l se pohybuje v rozmezí 20 % až 80 %. Test byl proveden třikrát.

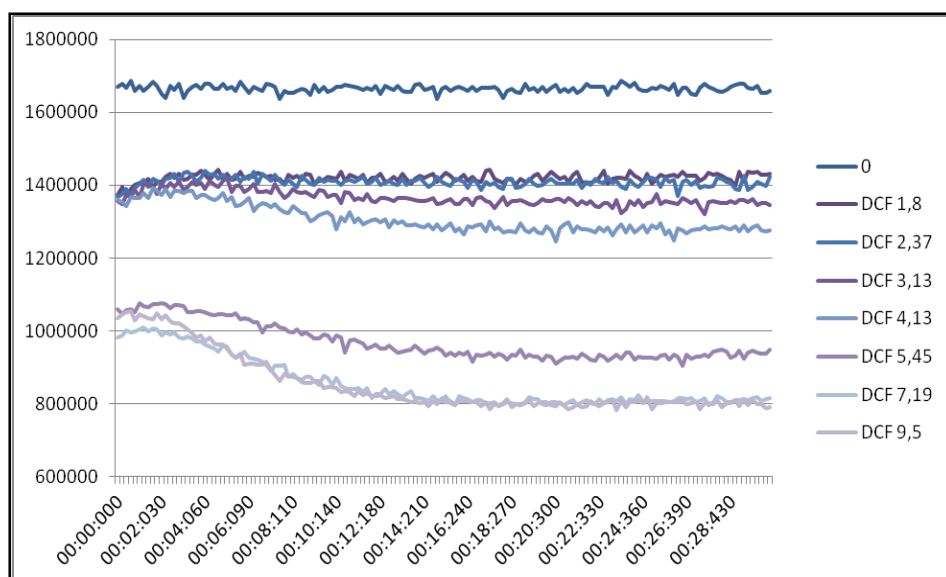


Obrázek 1. Typické kinetické chování toxických a netoxických pevných vzorků v kinetické zkoušce s luminiscenčními bakteriemi během 30 s expozice (ISO 21338).

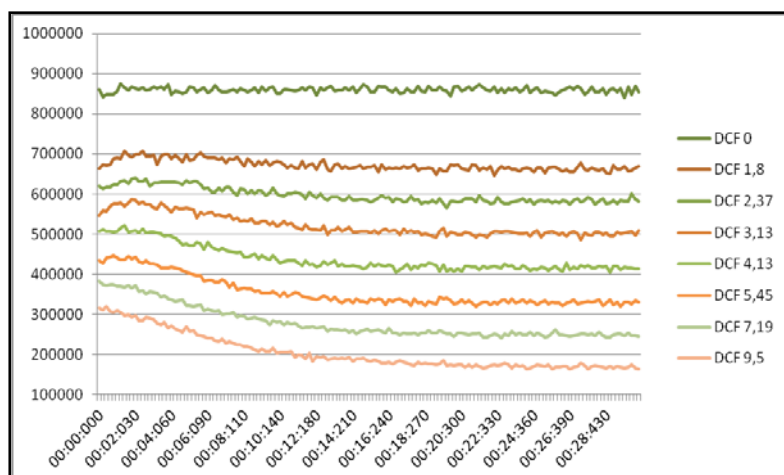
- 1- odezva kontroly;
- 2- odezva DCF;
- 3- odezva půdy kontaminované ropnými látkami;
- 4- odezva nekontaminované půdy;
- y- relativní jednotka světla.



Obrázek 2. Záznam kinetiky luminiscence *V. fischeri* při působení DCF.



Obrázek 3. Záznam kinetiky luminiscence *V. fischeri* při působení DCF.

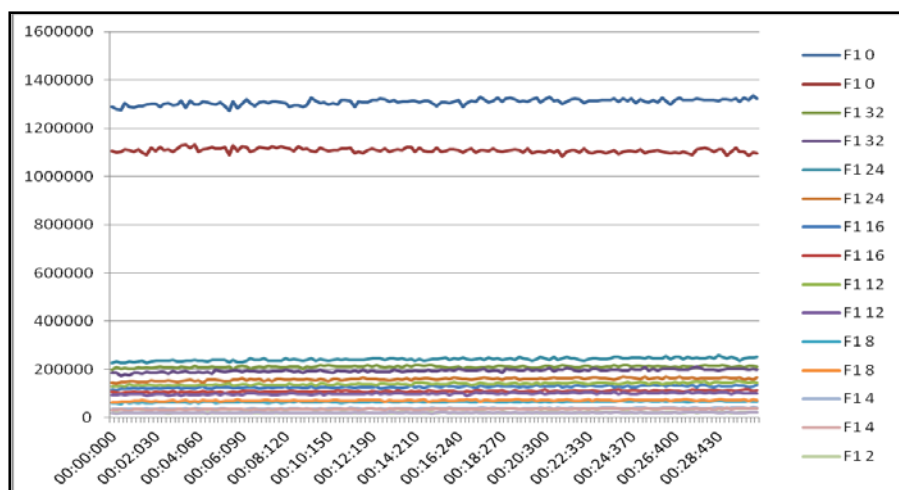


Obrázek 4. Záznam kinetiky luminiscence *V. fischeri* při působení DCF.

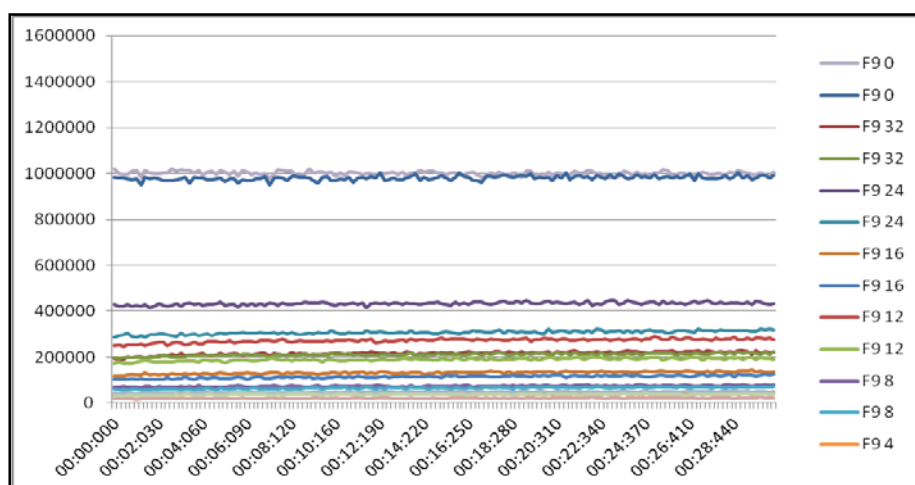
Referenční látka 3,5-dichlorofenol byl testován v koncentracích (1,80; 2,37; 3,13; 4,13; 5,45; 7,19; 9,50) mg/l. Ve srovnání s ideálním případem zaznamenání luminiscence uvedeným v normě ISO 21338 luminometr CHAMELEON II nezaznamenal maximální vrcholovou hodnotu pro vysoké koncentrace DCF (7,19 a 9,5 mg/l), obr. 2 až 4. Je to způsobeno nástřikem inokula kultury *V. fischeri* mimo prostor detektoru a následně posun mikrodestičky zpět na pozici pod detektor a změření luminiscence.

V případě testování výluhů půd F1 (nekontaminovaná půda), F9 (půda s maximálním přídavkem kompostu RABIO vzhledem k potřebám využití dusíku rostlinami), P20 (jílovitá půda s maximálním přídavkem kompostu RABIO vzhledem k potřebám využití dusíku rostlinami) a P20 extrakt (jílovitá půda s maximálním přídavkem kompostu RABIO vzhledem

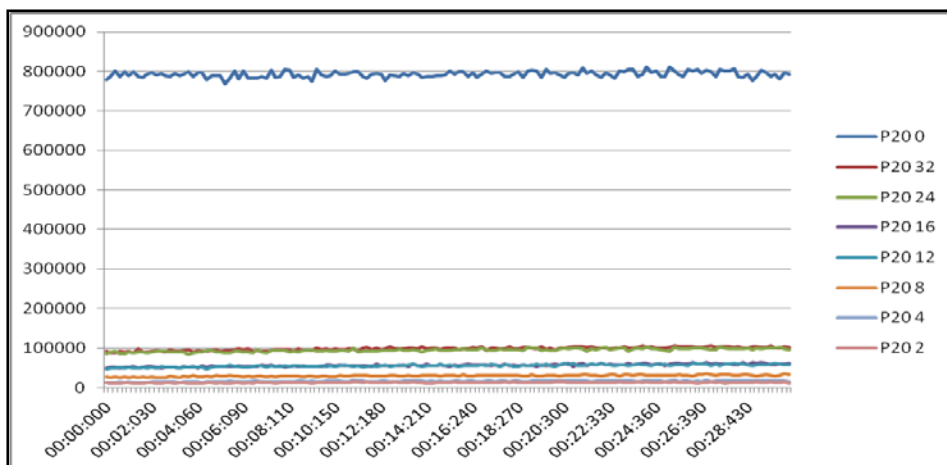
k potřebám využití dusíku rostlinami- odstředěná půda) se testovala ředění 2; 4; 8; 12; 16; 24; 32, včetně kontrolní varianty bez přídavku výluhu (pouze NaCl 20 g/l). Vyskytl se zde problém s pipetováním vzorku neodstředěných půd. Docházelo k zacpávání ústí špičky částčkami půdy. Problém vyřešilo seříznutí špičky. Výsledky jsou graficky zpracovány na obrázcích 5 až 8.



Obrázek 5. Záznam kinetiky luminiscence *V. fischeri* při působení půdního extraktu F1.



Obrázek 6. Záznam kinetiky luminiscence *V. fischeri* při působení půdního extraktu F9.



Obrázek 7. Záznam kinetiky luminiscence *V. fischeri* při působení půdního extraktu P20.



Obrázek 8. Záznam kinetiky luminiscence *V. fischeri* při působení centrifugovaného půdního extraktu P20.

Z výsledků je patrný silný vliv suspenze napipetované v jamkách mikrodestičky. V porovnání s odstředěným extraktem (Obr. 8), kdy se luminiscence jednotlivých ředění nelišily od kontrolní varianty, se neodstředěné vzorky výrazně odlišovaly (Obr. 7). V neodstředěných vzorcích došlo k výrazné inhibici luminiscence. Tento jev je pravděpodobně způsoben zákalem půdní suspenze, která zabránila průchodu světla na detektor. Luminometr nebyl schopen změřit počáteční nárůst luminiscence do vrcholové hodnoty (Obr. 5 až 7). Zkoušený postup se v laboratoři ekotoxikologie NRL pro testování půdních suspenzí neosvědčil.

Dalším negativním aspektem je odhadovaná cena a náročnost analýzy v porovnání s již zavedenou metodou využití *V. fischeri*, ale bez měření kinetiky. Cena za kulturu *V. fischeri* je vyšší díky nutnosti zakoupení většího množství kultury. Podle postupu je nutno propláchnout

dilutor a určitá část kultury je takto znehodnocena a nevyžita. Připravené naředěné inokulum časem ztrácí na intenzitě a nelze jej dále používat, tím dochází k možnosti stanovení menšího počtu vzorků.

7 Závěr

V rámci práce byla otestována flash metoda pro měření inhibice luminiscence bakterie *Vibrio fischeri*. Při aplikaci metody na půdní extrakty byl prokázán značný negativní vliv zákalu půdního extraktu na luminiscenci bakterie. Tato metoda není vhodná pro účely laboratoře NRL, OMB.

8 Literatura

1. ČSN EN ISO 21338, Kvalita vod – Kinetické stanovení inhibičního účinku sedimentů, dalších pevných látek a zabarvených vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (kinetická zkouška s luminiscenčními bakteriemi) Český normalizační institut. 2013.
2. Lappalainen J., Juvonen R., Vajasaari K., Karp M. A new flash method for measuring the toxicity of solid and colored samples. Chemosphere, 1999, 38, 1069–1083.
3. Lappalainen J., Juvonen R., Nurmi J., Karp M. Automated color correction method for *Vibrio fischeri* toxicity test: comparison of standard and kinetic assays. Chemosphere, 2001, 45, 635–641.

Zavedení detekce vnitřního genu bavlny a modifikace 281-24-236 x 3006-210-23 pro syntézu proteinů Cry1F a Cry1Ac

Kateřina Staňková

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

1 Úvod

Geneticky modifikované plodiny jsou takové rostliny, u kterých byl změněn dědičný materiál (DNA) pomocí genových technologií. Geneticky modifikované rostliny se vyznačují různými specifickými vlastnostmi, zejména odolností vůči škodlivým činitelům – škůdcům, chorobám, chladu, suchu, apod. anebo tolerancí vůči postřiku neselektivním herbicidům.

Geneticky modifikované olejniny – sója, řepka a bavlna – hrají významnou roli ve světovém zemědělském sektoru. Přesto není v EU povoleno pěstovat žádnou geneticky modifikovanou olejinu. Geneticky modifikované olejniny 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. Na trhu EU je nyní povoleno 18 typů geneticky modifikovaných olejnin (sója - 7, řepka - 3, bavlník - 8 typů).

Geneticky modifikovaný bavlník patří k nejčastěji pěstovaným geneticky modifikovaným plodinám ve světě. Jedná se především o odrůdy odolné vůči škůdcům. Rostlina je schopná se sama bránit škodlivému hmyzu a má vyšší výnosy.

2 Cíl

Cílem práce bylo rozšířit spektrum dosud stanovovaných plodin a genetických modifikací. Nově zaváděnými jsou „vnitřní gen“ bavlny a její transgen 281-24-236 x 3006-210-23.

Bavlna 281-24-236 x 3006-210-23

Geneticky modifikovaná bavlna 281-24-236 x 3006-210-23 byla vytvořena křížením dvou linií bavlny, a to 281-24-236 a 3006-210-23. Každá z těchto linií produkuje insekticidní proteiny Cry1F a Cry1Ac. Jedná se o delta-endotoxiny způsobující odolnost rostliny vůči škůdcům z řádu Lepidoptera. Produkce insekticidního proteinu Cry1F je způsobena díky vloženému genu *cry1f* do linie bavlny 281-24-236. Za produkci proteinu Cry1Ac je odpovědný gen *cry1Ac* vložený do linie bavlny 3006-210-23. Dalším genem, který tato genetická modifikace obsahuje je gen *pat* odpovědný za odolnost vůči herbicidu s účinnou složkou glufosinátem. Gen *pat* je element, který lze stanovit v rámci screeningu.

Geneticky modifikovaná bavlna 281-24-236 x 3006-210-23 je v EU povolena v potravinách nebo složkách potravin, které ji obsahují nebo se z ní sestávají a v krmivech, které ji obsahují, sestávají se z ní nebo jsou z ní vyrobeny.

3 Princip

Základem metod pro stanovení vnitřního genu bavlny a detekce genetické modifikace 281-24-236 x 3006-210-23 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.

4 Materiál a metody

4.1 Přístroje a pomůcky

- 4.1.1 Analytické váhy.
- 4.1.2 Váhy s přesností 0,01 g.
- 4.1.3 Vortex.
- 4.1.4 Centrifuga.
- 4.1.5 Vodní lázeň.
- 4.1.6 Nízkoobjemový spektrofotometr (vlnové délky 230, 260, 280 nm).
- 4.1.7 Minitřepačka.
- 4.1.8 Laminární box.
- 4.1.9 Termální cykler.
- 4.1.10 Elektromagnetické míchadlo s ohřevem.
- 4.1.11 Elektroforetická vana a zdroj napětí.
- 4.1.12 Transiluminátor.
- 4.1.13 Fotodokumentační zařízení se softwarem.
- 4.1.14 pH metr.
- 4.1.15 Automatické pipety s nastavitelnými objemy (0,1 – 1000) µl a sterilní špičky s filtrem.
- 4.1.16 Sterilní plastové zkumavky o objemu 0,20 ml, 0,5 ml, 2 ml.
- 4.1.17 Výrobník ledu.
- 4.1.18 Přenosná UV lampa.
- 4.1.1 Latexové rukavice bezpudrové, laboratorní sklo, stojánky na zkumavky, nádoba na uchování ledu, odpadní nádoby.

Sterilizace a dekontaminace se provádí dle charakteru materiálu buď tepelně, tj. v sušárně 1 h při (115 – 120) °C, nebo chemicky, např. 70% etanolem, (0,5 – 1) % chlornanem sodným apod.

4.2 Chemikálie

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

- 4.2.1 Lysis Buffer CF.
- 4.2.2 Buffer C2.
- 4.2.3 Buffer C3.
- 4.2.4 Wash buffer CQW.
- 4.2.5 Wash buffer C5 (koncentrát).
- 4.2.6 Elution buffer CE.
- 4.2.7 NucleoSpin® Food Columns (plus Collection Tubes).
- 4.2.8 Proteinase K (lyofilizát).
- 4.2.9 Proteinase buffer PB.

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

- 4.2.10 REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂ (dále REDTaq).
- 4.2.11 PCR voda.

Amplifikační primery

- 4.2.12 KVM157: CAC ATG ACT TAG CCC ATC TTT GC
- 4.2.13 KVM 158: CCC ACC CTT TTT TGG TTT AGC
- 4.2.14 281-f1: CTC ATT GCT GAT CCA TGT AGA TTT C
- 4.2.15 281-r1: GGA CAA TGC TGG GCT TTG TG

Příprava amplifikačních primerů

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

Zásobní roztok o koncentraci 100 µM:

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 µl do sterilních zkumavek o objemu 0,5

ml. Pokud se rozdělí zásobní roztok v jiných množstvích, uveďte se objem na zkumavku. Zkumavky s primery se zamrazí a uchovávají při teplotě $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Pracovní roztok o koncentraci 20 μM :

Do jedné zkumavky zásobního roztoku se přidá čtyřnásobný objem vody vhodné pro PCR. Tím se získá pracovní roztok. Rozdělí se po $(20 - 25) \mu\text{l}$ 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

4.2.16 Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové, Na_2EDTA .

4.2.17 Trizma base.

4.2.18 Ledová kyselina octová.

4.2.19 Hydroxid sodný, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol.l}^{-1}$, 10 g NaOH se rozpustí ve vodě a doplní na výsledný objem 250 ml v odměrné baňce.

Příprava TAE pufru:

Příprava zásobního roztoku $50 \times \text{TAE}$

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 $(115 - 120) ^\circ\text{C}$ 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 $1 \times \text{TAE}$ pro elektroforézu

Odměří se 20 ml zásobního roztoku $50 \times \text{TAE}$ 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 naváže dané množství práškové agarózy a přidá se 80 ml pracovního 1 × TAE pufru. Vaří se při teplotě (150 – 200) °C na elektromagnetickém míchadle po dobu (15 – 20) minut 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 minutu. Poté se vyjme míchadélko 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 × TAE pufru.

Ostatní

4.2.20 Voda vhodná pro PCR.

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

4.2.22 (re)destilovaná voda.

4.2.23 Agaróza.

4.2.24 Zásobní roztok ethidium bromidu. Pracovní roztok se získá zředěním zásobního roztoku 10 × (re) destilovanou vodou.

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

4.2.26 6 × Loading Dye Solution.

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

4.2.28 (0,5 – 1)% roztok chlornanu sodného.

4.2.29 70% etanol.

Testovaný materiál

Pozitivní kontroly se používají pro potvrzení přítomnosti amplifikovaného úseku. V případě nově zaváděných vnitřních genů nebo transgenů se pro prokázání specifity reakce používají také kontroly negativní.

Vnitřní gen bavlny

ERM[®]BF422a blank (naše označení CRM 7/2012) obsahující 0 % modifikované bavlny 281-24-236 x 3006-210-23 a ERM[®]BF422c (naše označení CRM 8/2012) obsahující 1 % modifikované bavlny 281-24-236 x 3006-210-23 z IRMM Institute for reference Material and Measurements.

281-24-236 x 3006-210-23

ERM[®]BF422c (naše označení CRM 8/2012) obsahující 1 % modifikované bavlny 281-24-236 x 3006-210-23 z IRMM Institute for reference Material and Measurements.

Výše uvedený certifikovaný referenční materiál je ve formě prášku, proto se z něj musí nejprve vyizolovat DNA.

5 Pracovní postup

5.1 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 po dobu 1 roku.

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 provést příprava pracovní plochy. Pracovní nástroje, pomůcky i prostor se dekontaminují od jakýchkoli molekul DNA otřením otřením povrchů 70% etanolem a působením UV záření po dobu 30 min.

Vodní lázeň se předehřeje na teplotu 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 při teplotě 65 °C po dobu 30 min. Poté se směs centrifuguje po dobu 10 min (>10000 g) až se buněčné zbytky usadí. Připraví se podmínky pro vázání DNA na silikagel, a to 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 centrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml. 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.

5.2 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; 260; 280) nm umožní kromě 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.

5.3 Vlastní měření

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 minut).

5.4 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 bavlny

Stanovení genu pro alkohol dehydrogenázu C (AdhC).

Primery: KVM157, KVM 158

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: 73 bp

Transgenní bavlna 281-24-236 x 3006-210-23

Primery: 281-f1, 281-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: 111 bp

Provedení vlastní PCR reakce

Laminární box se vysvítí UV zářením po dobu (20 – 30) min. 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 tabulky reakčních směsí (Tabulka 1) 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 zcentrifugují na minicentrifuze. PCR směs se připravuje na ledu. 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 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

Elektroforéza v agarózovém gelu

2% gel se vloží do elektroforetické vany a převrství pracovním 1 × TAE pufrém 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, (5 – 15) μl. Amplifikáty získané pomocí kitu REDTaq[®] Ready Mix[™] PCR Reaction Mix 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.

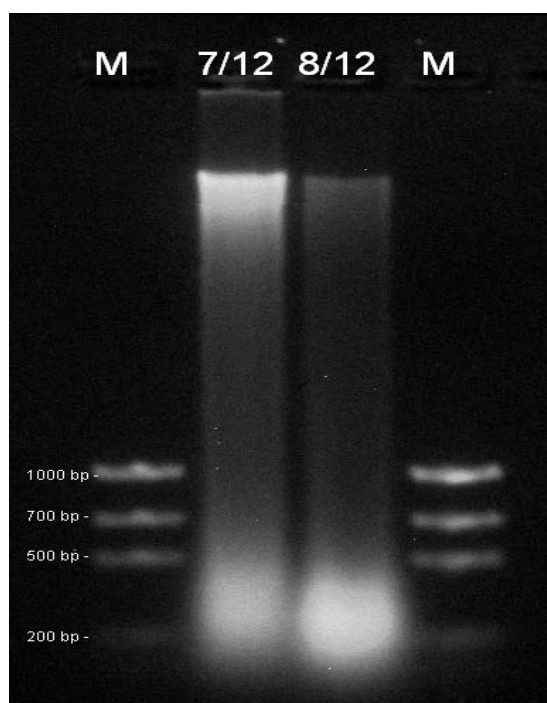
Výsledky a diskuze

Spektrofotometrické měření koncentrace získané DNA:

Tabulka 2. Naměřené koncentrace a hodnoty určujících čistotu vyextrahované DNA

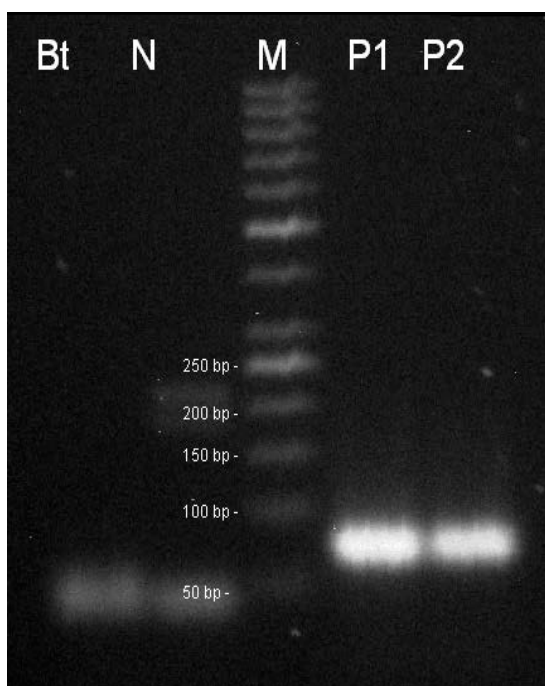
vzorky	koncentrace (ng/μl)	A 260 / A 280	A 260 / A 230
CRM 7/2012	151,0	2,01	2,02
CRM 7/2012	150,8	2,02	2,05
CRM 8/2012	200,6	1,87	2,14
CRM 8/2012	199,7	1,88	2,13

Určení kvality vyizolované DNA

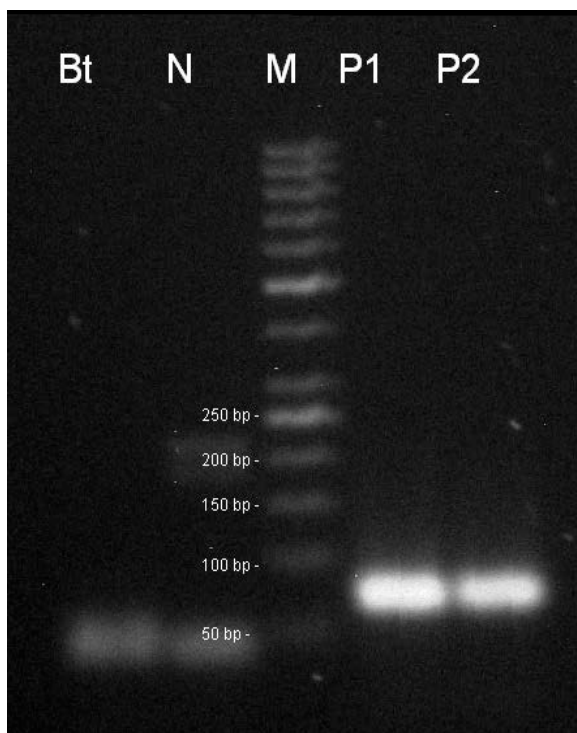


Obrázek 1. Určení kvality vyizolované DNA pozitivních kontrol CRM 7/2012 (7/12) a CRM 8/2012 (8/12), K – kontrola izolace, M – hmotnostní standard.

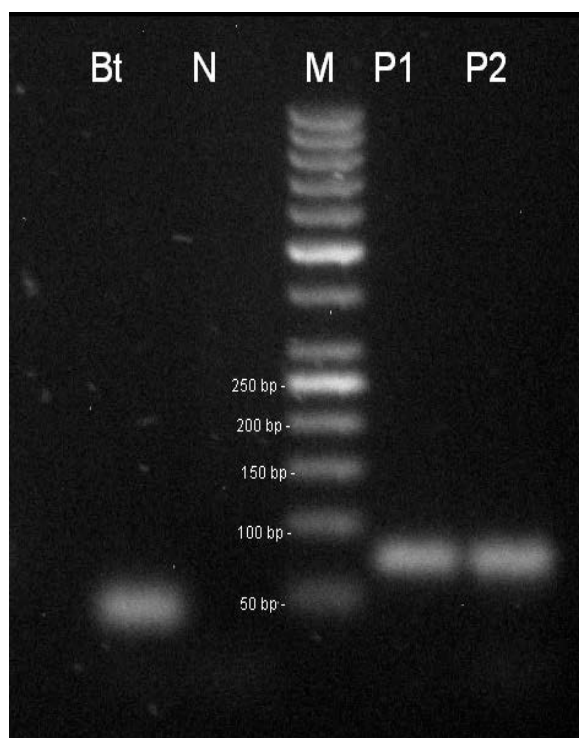
Vnitřní gen bavlny:



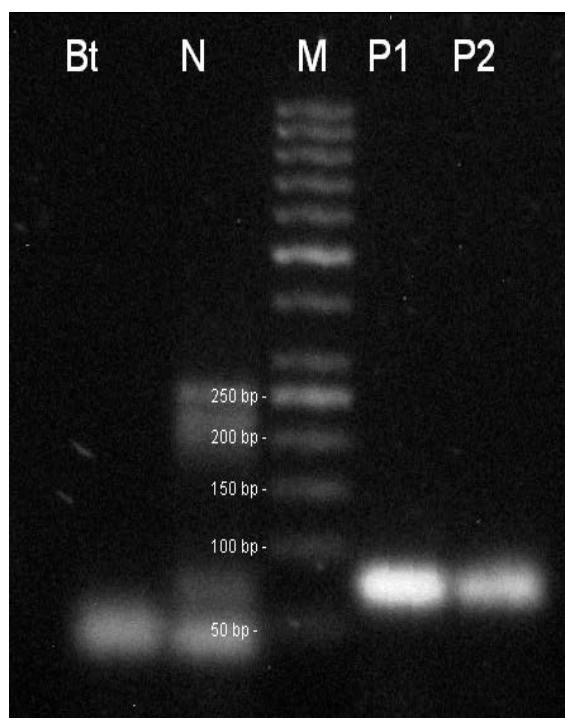
Obrázek 2. Stanovení vnitřního genu bavlny 73bp u pozitivních kontrol CRM 7/2012 a CRM 8/2012, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 1/2001 (negativní sója) , M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 7/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 8/2012.



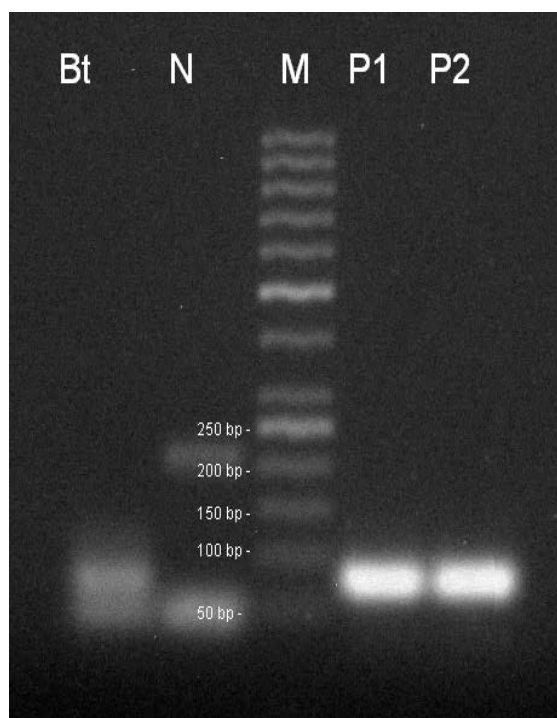
Obrázek 3. Stanovení vnitřního genu bavlny 73bp u pozitivních kontrol CRM 7/2012 a CRM 8/2012, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2009 (negativní kukuřice), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 7/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 8/2012.



Obrázek 4. Stanovení vnitřního genu bavlny 73bp u pozitivních kontrol CRM 7/2012 a CRM 8/2012, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 5/2006 (negativní řepka), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 7/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 8/2012.

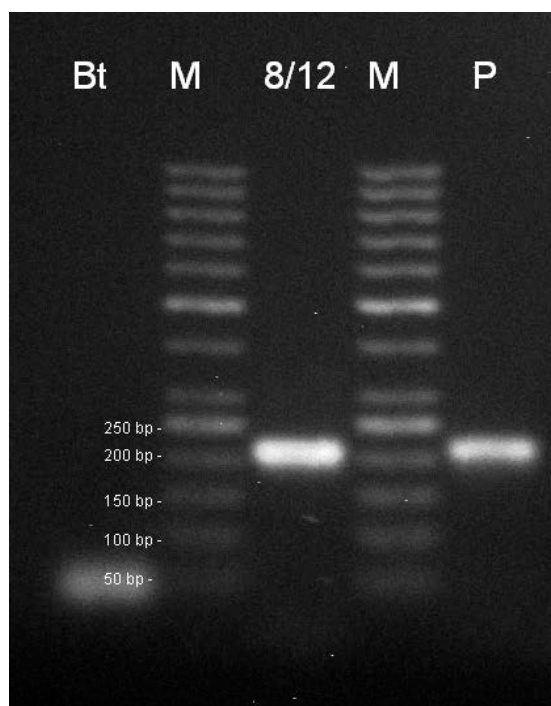


Obrázek 5. Stanovení vnitřního genu bavlny 73bp u pozitivních kontrol CRM 7/2012 a CRM 8/2012, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola IRM 1/2010 (negativní rýže), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 7/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 8/2012.



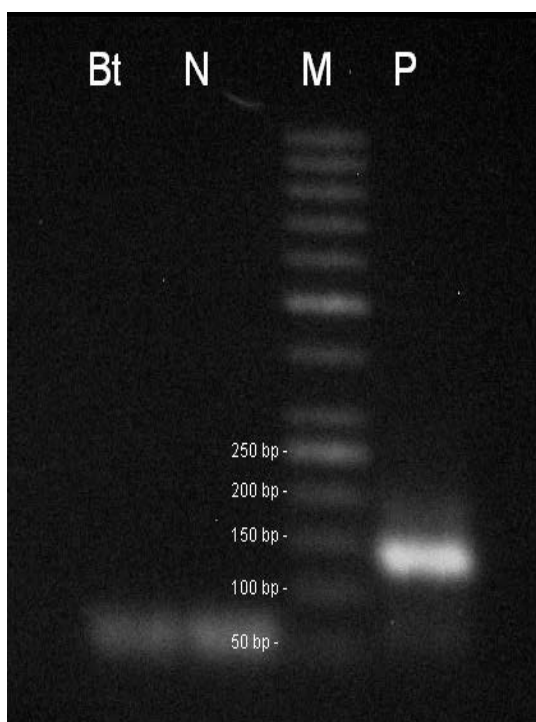
Obrázek 6. Stanovení vnitřního genu bavlny 73bp u pozitivních kontrol CRM 7/2012 a CRM 8/2012, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 2/2011 (negativní brambory), M - marker 50 bp, P1 – pozitivní kontrola CRM 7/2012, P2 – pozitivní kontrola CRM 8/2012.

Screeningový element pat pozitivní kontroly CRM 8/2012:

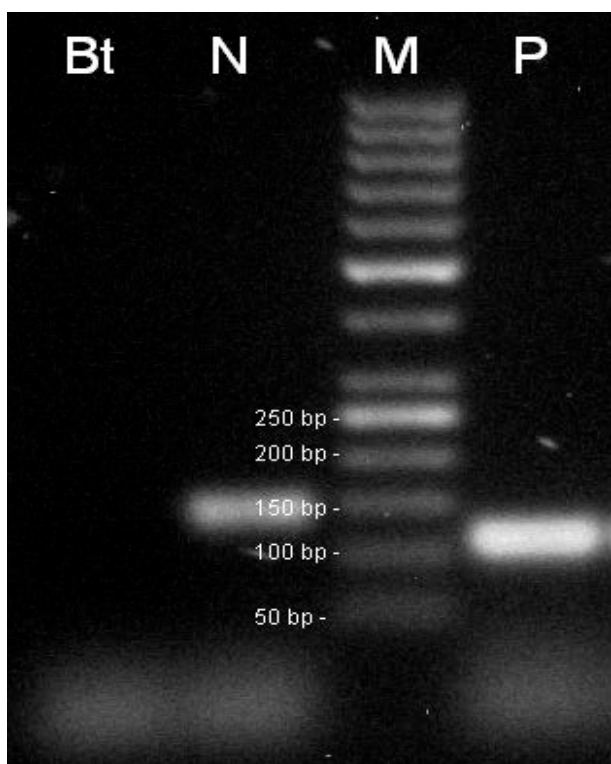


Obrázek 7. Stanovení screeningového elementu pat 186bp u pozitivní kontroly CRM 8/2012 (8/12), Bt – beztemplátová kontrola, , M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 4/2009.

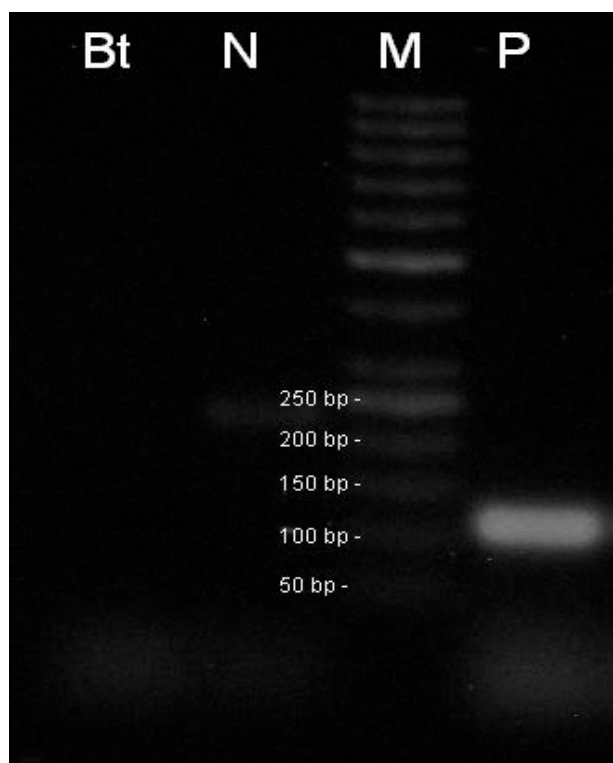
Genetická modifikace bavlny 281-24-236 x 3006-210-23:



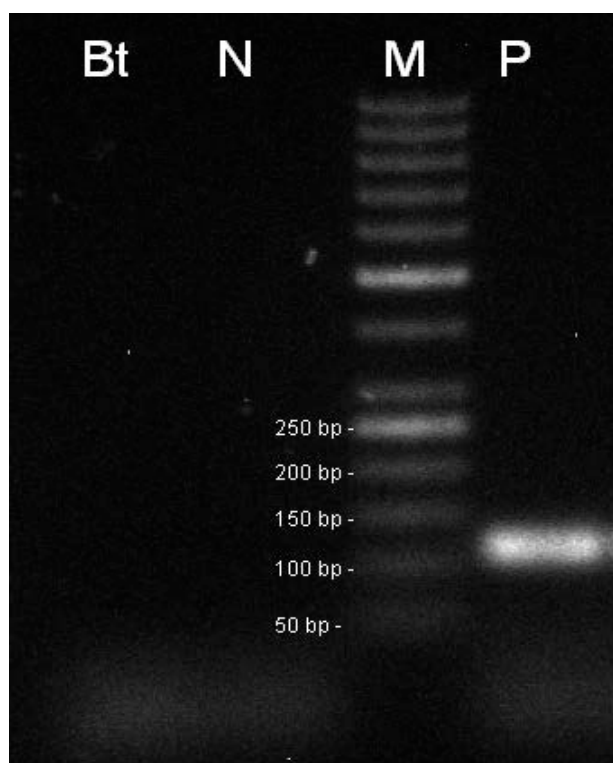
Obrázek 8. Stanovení transgenu 281-24-236 x 3006-210-23 bavlny 111bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 7/2012 (negativní bavlna), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 8/2012.



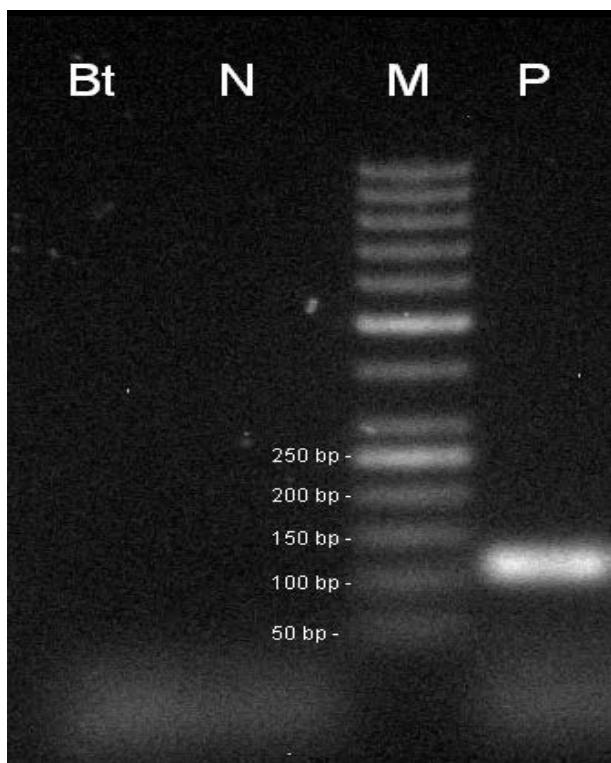
Obrázek 9. Stanovení transgenu 281-24-236 x 3006-210-23 bavlny 111bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 7/2012 (negativní bavlna), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 8/2012.



Obrázek 10. Stanovení transgenu 281-24-236 x 3006-210-23 bavlny 111bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 7/2012 (negativní bavlna), M – marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 8/2012.



Obrázek 11. Stanovení transgenu 281-24-236 x 3006-210-23 bavlny 111bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 7/2012 (negativní bavlna), M – marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 8/2012.



Obrázek 12. Stanovení transgenu 281-24-236 x 3006-210-23 bavlny 111bp, Bt – beztemplátová kontrola, N – negativní kontrola CRM 7/2012 (negativní bavlna), M - marker 50 bp, P – pozitivní kontrola CRM 8/2012.

Během verifikace se postupovalo dle 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 (hlavně u nižší koncentrace DNA) mohou být na hranici viditelnosti (zejména 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 závislá na opakovaném rozmrazování a zmrazování.
- Kvalitě gelu a provedení elektroforézy.

6 Závěr

Cílem práce bylo zavést novou plodinu, a to bavlnu (vnitřní gen bavlny) a genetickou modifikaci bavlny 281-24-236 x 3006-210-23 a rozšířit tak spektrum dosud stanovovaných plodin a transgenů v laboratoři OMB.

Úkol se podařilo splnit a laboratoř je schopna v současné době stanovit vnitřní gen bavlny a její modifikaci 281-24-236 x 3006-210-23.

Tyto metody se zařadí do postupu zkoušení přítomnosti genetických modifikací u vzorků krmiv.

7 Literatura

1. Stanovení přítomnosti GMO metodou PCR, ÚKZÚZ, JPP ZK, postup 250 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.
2. Genetické modifikace v České republice a opatření k zajištění biologické bezpečnosti, Roudná M. (Ed.) et al., **2011**, Ministerstvo životního prostředí, Praha.

Stanovení obsahu karvonu v kmínové silici

Naděžda Kabátová, Radvana Šulová

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Odbor NRL Brno,
Hroznová 2, 656 06 Brno
nada.kabatova@ukzuz.cz

1 Úvod

Kmín kořený (*Carum carvi* L.) si stále drží postavení významné plodiny českého zemědělství i důležité exportní komodity. Jeho pěstování, šlechtění a výzkum má v českých zemích dlouholetou tradici. Potvrzením toho je i skutečnost, že v roce 2008 bylo označení „ČESKÝ KMÍN“ zapsáno Evropskou Unií do Rejstříku chráněných označení původu a chráněných zeměpisných označení (nařízení Komise (ES) č. 433/2008). Vhodné klimatické a půdní podmínky v ČR, použití registrovaných odrůd kmínu dvouleté formy a zároveň i zkušenosti a propracovaná metodika pěstování ovlivňují specifické vlastnosti Českého kmínu, zejména pak jeho vynikající výnosnost a vysoký obsah silic v semeni na úrovni 3 % – 5 %. Zcela výjimečný je i obsah jednotlivých složek aroma kmínové silice. U Českého kmínu je její hlavní součástí karvon. Jeho obsah je vyšší než 50 %, obvykle kolem 60 %, čímž se liší od ostatních, v jejichž silicích převažuje D-limonen (1).

Registraci nových odrůd kmínu kořeného a ověřování výkonnosti již uznaných odrůd provádí Národní odrůdový úřad (NOÚ). Jedním z hodnoticích kritérií je i obsah karvonu v kmínové silici. Doposud se v laboratoři testování odrůd ke stanovení karvonu používala titrační metoda podle Bournota. Cílem této práce bylo připravit postup, který by vedl ke zpřesnění analýz a jako analytickou koncovku by využíval metodu plynové chromatografie s detektorem FID. Ověření metody a následná validace byla po konzultaci s referentem NOÚ pro tuto plodinu provedena nejen pro karvon, ale i pro druhou významnou složku kmínové silice, a to limonen.

2 Teoretická část

Kmín kořený (*Carum carvi* L.)

Kmín kořený je jednou z nejstarších léčivých rostlin pěstovaných u nás. Pěstuje se pro své aromatické plody, nažky. V České republice se pro jeho pěstování nejčastěji využívají níže položené bramborářské oblasti, případně okrajové řepářské oblasti (2). Roste však i planě na loukách, mezích a pastvinách.

Kmín kořený se nejčastěji vyskytuje ve dvouleté formě. Šlechtěním byla získána forma se zkrácenou délkou vegetační doby tzv. kmín ozimý. První ozimá odrůda, u které proběhlo úspěšně zkoušení pro registraci, byla v ČR zaregistrována v roce 2014 pod názvem Aprim (3). V teplejších lokalitách (jižní Evropa) roste jednoletý kmín (2).

Popis rostliny

Kmín kořený je fakultativně dvouletá bylina z čeledi miříkovitých (Apiaceae). V prvním roce vytváří přizemní listovou růžici dvakrát až třikrát jemně zpeřených listů a silný zašpičatělý kořen. Druhým rokem poskytuje ploché květenství, které tvoří okolíky složené z 8 až 11 okolíčků, s 15 – 18 květy. Květenství je většinou bílé, zřídka růžové.

Plodem kmínu jsou dvounažky elipsovitého až vejčitého tvaru, které se v době zralosti poltí na jednotlivé, silně aromatické, šedohnědé až hnědé, lysé nažky. Jsou obvykle srpovitého tvaru, na obou koncích zašpičatělé, každá s pěti vyniklými úzkými žebry. Na příčném řezu mají tvar téměř pravidelného pětiúhelníku, na hřbetní straně se čtyřmi, na poutcové straně se dvěma siličnými kanálky (4).

Využití kmínu a jeho účinky

Kmín se využívá především v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Jako koření je pro svou typickou vůni, výraznou chuť a příznivé dietetické vlastnosti nepostradatelný při výrobě pečiva, kořených směsí, masitých pokrmů, uzenin a sýrů. Používá se také při výrobě likérů (kmínka).

Kmín se uplatňuje ve farmacii i v lidovém lékařství, neboť zklidňuje nežádoucí mobilitu trávicího traktu, působí proti nadýmání a povzbuzuje činnost žláz s vnitřní sekrecí. Zvyšuje vylučování mléka a podporuje vykašlávání hlenu při onemocnění dýchacích cest. Ve farmacii se z něj připravují aromatické oleje, sirupy a léčivé čaje s protikřečovým, baktericidním a fungicidním účinkem. Zároveň se využívá i k úpravě nepříjemných chuťových a pachových vlastností léků.

Kmín jako součást lučních porostů zvyšuje dietetickou hodnotu krmiva. Semena, pokrutiny i sláma patří mezi vysoce ceněné doplňky krmiv. Zvyšují stravitelnost živin, omezují nadýmavost jiných krmiv, zlepšují jejich chuť a příznivě působí na celkovou látkovou výměnu a zdravotní stav. Nejsou však vhodné pro dojnice, neboť se po jejich konzumaci mohou v mléce objevovat odchylky od typické vůně mléka.

Kořeny kmínu i listová růžice se používají zejména v severní části Evropy jako zelenina, obsahující (60 – 200) mg vitamínu C (2).

V poslední době se otevírají nové možnosti pro využití kmínové silice i v chemickém průmyslu, díky jejím schopnostem inhibovat klíčení. Lze ji využít jako retardant klíčení brambor, jež na rozdíl od syntetických přípravků nevykazuje toxicitu (5).

Obsahové látky

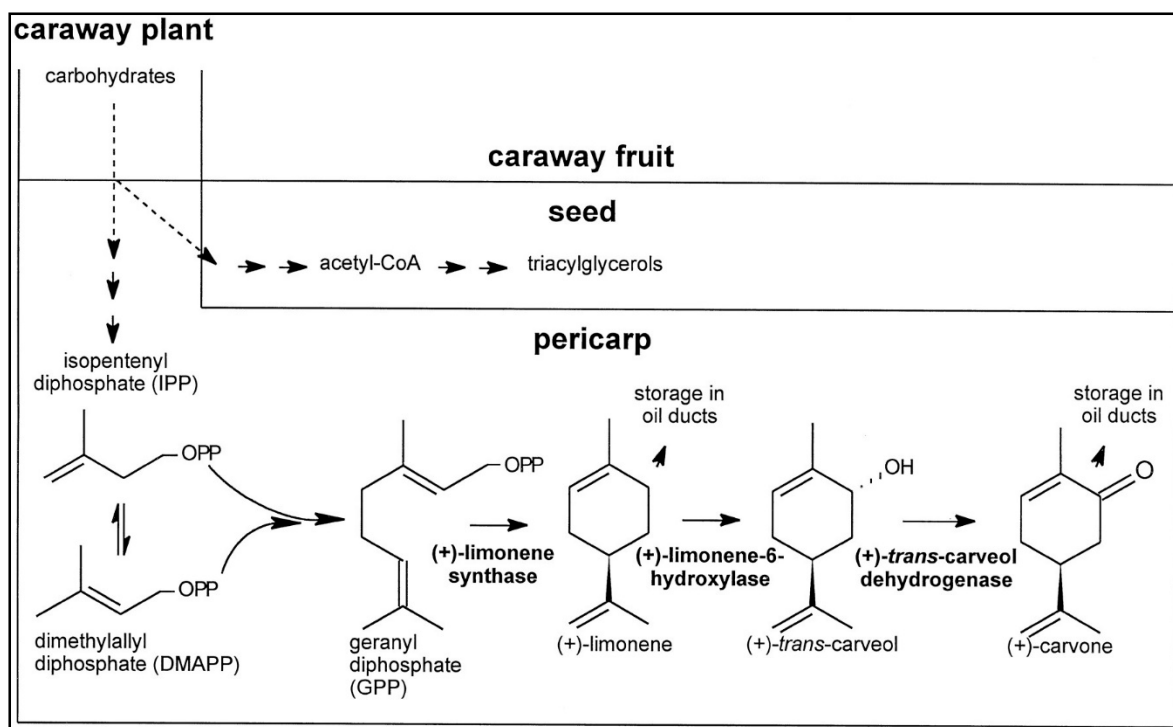
Kmín kořený (*Carum carvi* L.) je pěstován zejména pro vysoký obsah silice, jež mu dodává charakteristické aroma. Nejvyšší koncentrace silice se nachází ve zralých nažkách. Obsah silice se zde pohybuje od 1 % do 6 %.

Semena dále obsahují (13 – 21) % tuku, (25 – 36) % dusíkatých látek, (5 – 18) % bezdusíkatých extraktivních látek, (13 – 19) % vlákniny, (5 – 7) % popele, (9 – 13) % vody, 1,5 % vosku, malé množství tříslovin a pryskyřice (6).

Kmínová silice

Kmínová silice je bezbarvá až slabě nažloutlá čirá kapalina, charakteristické chutě a pachu. Hlavní složkou silice je (S)-(+)-karvon (50 – 70) % a (R)-(+)-limonen (30 – 50) %. Během dozrávání stoupá podíl obsahu karvonu a podíl limonenu klesá. Obsah hlavních složek v kmínové silici se pohybuje v rozmezí 95 % až 99 %. Silice v malém množství obsahuje i další terpenické látky jako např. β -myrcen, trans-dihydrokarvon, trans-karveol, pinen, thujen, fenchon, kamfen, fellandren (4, 6). Schéma biosyntézy (+)-limonenu a (+)-karvonu v kmínu kořeném lze vidět na obrázku 1 (7).

Množství a složení silice je geneticky podmíněné a závislé na klimatických podmínkách během pěstování a dozrávání.



Obrázek 1. Schéma biosyntézy (+)-limonenu a (+)-karvonu v kmínu kořenném (7).

3 Experimentální část

Při přípravě postupu na stanovení obsahu karvonu v kmínové silici metodou plynové chromatografie s využitím plamenově-ionizačního detektoru (GC-FID) se vycházelo ze zkoušek pro hodnocení kmínové silice, které byly popsány v Českém lékopisu 2002 a Českém lékopisu 2009 (8, 9). Pro ověření a provedení částečné validace metody byly použity vzorky kmínové silice, připravené z kmínu kořenného, který dodal Národní odrůdový úřad a pocházel ze sklizní 2012 a 2013. Vzorky byly současně analyzovány i podle platného postupu 50270.1, který popisuje stanovení obsahu karvonu titrační metodou (10). Výsledky obou metod byly porovnány a statisticky vyhodnoceny. K optimalizaci podmínek měření na GC byla využita směs standardů základních látek obsažených v kmínové silici (karvon, limonen, myrcen, karveol, dihydrokarvon), tak aby v případě potřeby mohl být připravený postup využit i pro jejich stanovení. Původní požadavek, tzn. připravit metodu na stanovení obsahu karvonu v kmínové silici, byl po konzultaci s referentem NOÚ pro tuto plodinu rozšířen o stanovení obsahu limonenu, neboť vzájemný poměr karvonu a limonenu je považován za měřítko kvality kmínové silice.

3.1 Metoda na stanovení obsahu karvonu a limonenu v kmínové silici

3.1.1 Princip metody

Kmínová silice se vhodným způsobem naředí a k přesně definovanému podílu takto připraveného vzorku se přidá roztok vnitřního standardu. Následně se hledané látky stanoví metodou plynové chromatografie s využitím plamenově-ionizačního detektoru.

3.1.2 Chemikálie

Chemikálie jsou analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Heptan, pro GC.
- 2 Kafr, roztok, $c(\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}) = 6 \text{ mg/ml}$, vnitřní standard (IS).
Příprava: Naváží se 0,6000 g kafru, rozpustí se a doplní heptanem (1) ve 100ml odměrné baňce po značku.
- 3 Karvon, (+)-karvon, analytický standard.
- 4 Limonen, (*R*)-(+)-limonen, analytický standard.

3.1.3 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.
- 2 Plynový chromatograf s detektorem FID.
- 3 Automatické pipety s nastavitelným objemem, špičky.
- 4 Injekční stříkačka, 50 μl , 100 μl .
- 5 Lékovky, tmavé, 3 ml.
- 6 Vialky se šroubovacím uzávěrem, tmavé, 2 ml.

3.1.4 Příprava zkušební vzorku

Příprava kmínové silice je popsána v JPP Testování odrůd, postup 50260.1 – Stanovení obsahu silic (10).

3.1.5 Úprava vzorku před chromatografickým stanovením

Do 10ml odměrné baňky se pomocí automatické pipety naváží asi 100 mg silice s přesností 0,01 mg, doplní se po značku heptanem (1), baňka se uzavře a roztok se důkladně promíchá. Do 3ml lékovky se napipetuje 1 ml takto připraveného roztoku, přidá se 1 ml vnitřního

standardu – kafru (2), lékovka se uzavře a obsah se promíchá. Takto připravený vzorek se převede do vialky a uzavře se víčkem s teflonovým septem.

3.1.6 Chromatografické stanovení

Vlastní analýza se provádí na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem. Pro separaci jednotlivých složek kmínové silice se použije kapilární kolona s nepolární stacionární fází na bázi dimethylpolysiloxanu s 5 % fenylu. Nastavení chromatografických podmínek je uvedeno v tabulce 1. Chromatogram získaný při analýze vzorku kmínové silice je na obrázku 2.

Tabulka 1. Příklad nastavení chromatografických podmínek.

Plynový chromatograf	GC Varian CP-3800
Kapilární kolona	DB-5 (30 m × 0,25 mm, film 0,25 µm)
Nosný plyn	Dusík
Průtok nosného plynu	0,6 ml/min
Teplota injektoru	250 °C
Teplota detektoru	260 °C
Teplotní program	60 °C → 10 °C/min → 220 °C (4 min)
Objem nástřiku, dávkování	1 µl, split 1 : 100

3.1.7 Kvalitativní a kvantitativní analýza

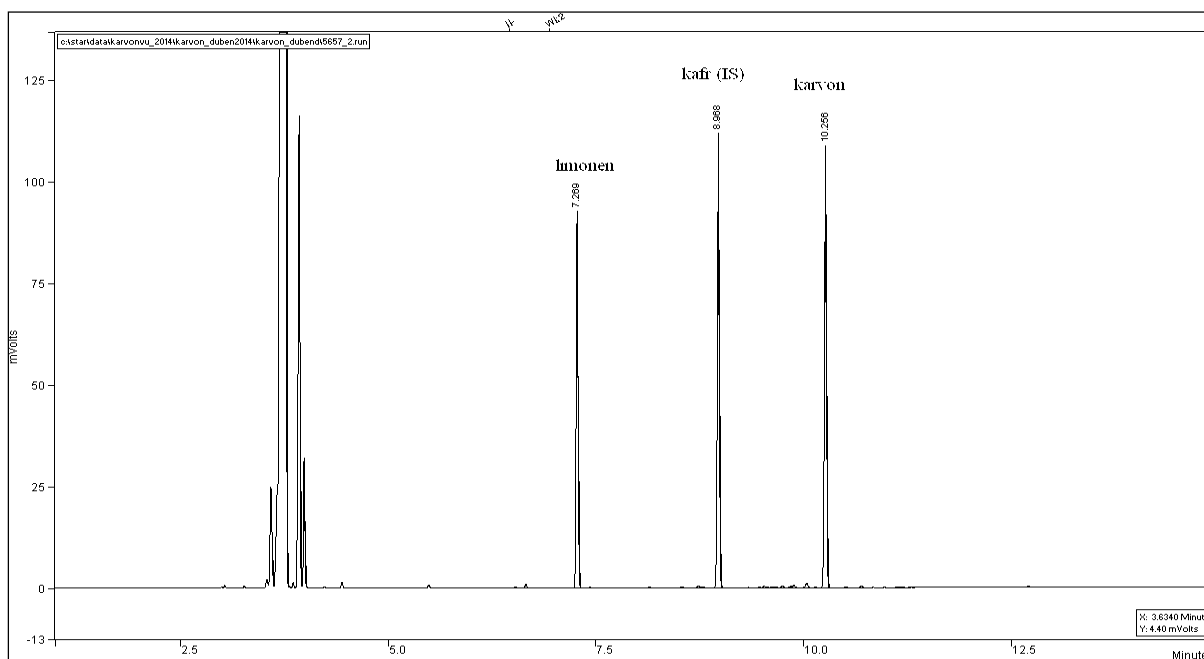
Píky karvonu, limonenu, případně dalších látek obsažených v kmínové silici (β-myrcen, karveol, dihydrokarvon atd.), se identifikují na základě jejich retenčních časů, porovnáním s retenčními časy píků v připravené referenční směsi o známém složení.

Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnitřního standardu. Připraví se pětibodová kalibrační přímka v rozsahu 1,5 mg/ml až 7,5 mg/ml karvonu (resp. limonenu) v heptanu, což odpovídá 15% až 75 % karvonu, resp. limonenu ve vzorku. Kontroluje se linearita kalibračního grafu.

Příprava kalibračních roztoků

Do sady 10ml odměrných baněk se napipetuje 5 ml heptanu (1) a pomocí injekční stříkačky se postupně naváží asi (15; 30; 45; 60; 75) mg karvonu (3) a přibližně stejné množství limonenu (4) s přesností 0,01 mg. Po každé navážce se odměrná banka ihned uzavře zátkou. Po navážení obou látek se odměrná banka doplní heptanem (1) po značku a zamíchá. Pomocí automatické

pipety se převede 1 ml takto připraveného roztoku do 3ml lékovky a přidá se 1 ml kafru (2), jako vnitřní standard. Lékovka se uzavře, obsah se dobře promíchá a převede do vialky.



Obrázek 2. Chromatogram reálného vzorku kmínové silice.

3.1.8 Výpočet

Z poměru ploch píků karvonu a kafru (IS) se vypočítá relativní odezva (RR) karvonu vztažená na přidavek vnitřního standardu a sestrojí se závislost RR karvonu na koncentraci v požadovaném rozsahu. Ze směrnice kalibrační přímky se zjistí koncentrace karvonu ve vzorku a jeho obsah vyjádřený v procentech se vypočítá podle vztahu

$$x = \frac{100 \times c \times V \times 10^{-3}}{m \times 10^{-3}} = \frac{100 \times c \times V}{m} \quad (\%)$$

- kde
- x je obsah karvonu ve vzorku v %,
 - c koncentrace karvonu zjištěná z kalibrační závislosti v mg/ml,
 - V celkový objem vzorku po naředění v ml,
 - m navážka vzorku v mg,
 - 10^{-3} konverzní faktor pro přepočet z mg/ml na g/ml.
 - 10^{-3} konverzní faktor pro přepočet z mg na g.

Stejným způsobem se vypočítá obsah limonenu ve vzorku.

3.2 Výsledky a diskuse

3.2.1 Optimalizace postupu

V současné době neexistuje v České republice závazná norma pro stanovení obsahu karvonu v kmínové silici. Při vypracování postupu na jeho stanovení se proto vycházelo ze zkoušek na hodnocení kmínové silice, které jsou uvedeny v Českém lékopisu 2002 a v Českém lékopisu 2009. V nejnovějším vydání ČL 2009 je popsáno stanovení chromatografického profilu kmínové silice s vyhodnocením pomocí vnitřní normalizace. Pro účel laboratoře, tzn. co nejpřesnější kvantifikaci karvonu, je tato metoda méně výhodná. Proto byl jako základ pro vypracování metody vybrán postup z ČL 2002, kde je popsáno stanovení obsahu karvonu v kmínové silici metodou GC-FID, využívající pro kvantitativní vyhodnocení metodu vnitřního standardu.

Postup byl optimalizován a ověřen na vzorcích kmínové silice. Tato silice byla připravena ze zkušebních vzorků kmínu kořeného, které dodal Národní odrůdový úřad (NOÚ) a pocházely ze sklizně 2012 a 2013. Byl posuzován vliv jednotlivých kroků od velikosti navážky, množství přidaného vnitřního standardu, až po chromatografické podmínky vlastního stanovení. K optimalizaci podmínek měření na GC byla využita i směs standardů základních látek obsažených v kmínové silici (karvon, limonen, myrcen, karveol, dihydrokarvon) tak, aby v případě potřeby mohly být tyto látky kvantifikovány. Původní požadavek, tzn. připravit a ověřit postup na stanovení obsahu karvonu v kmínové silici metodou GC, byl po konzultaci s referentem NOÚ pro tuto plodinu rozšířen i o stanovení obsahu limonenu, neboť vzájemný poměr karvonu a limonenu se považuje za měřítko kvality kmínové silice.

U připravených vzorků silice byl současně stanoven obsah karvonu také titrační metodou, podle platného postupu 50270.1 (10). Výsledky obou metod byly porovnány a statisticky vyhodnoceny.

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

Součástí vývojového úkolu bylo i ověření stability karvonu a limonenu v připravené kmínové silici.

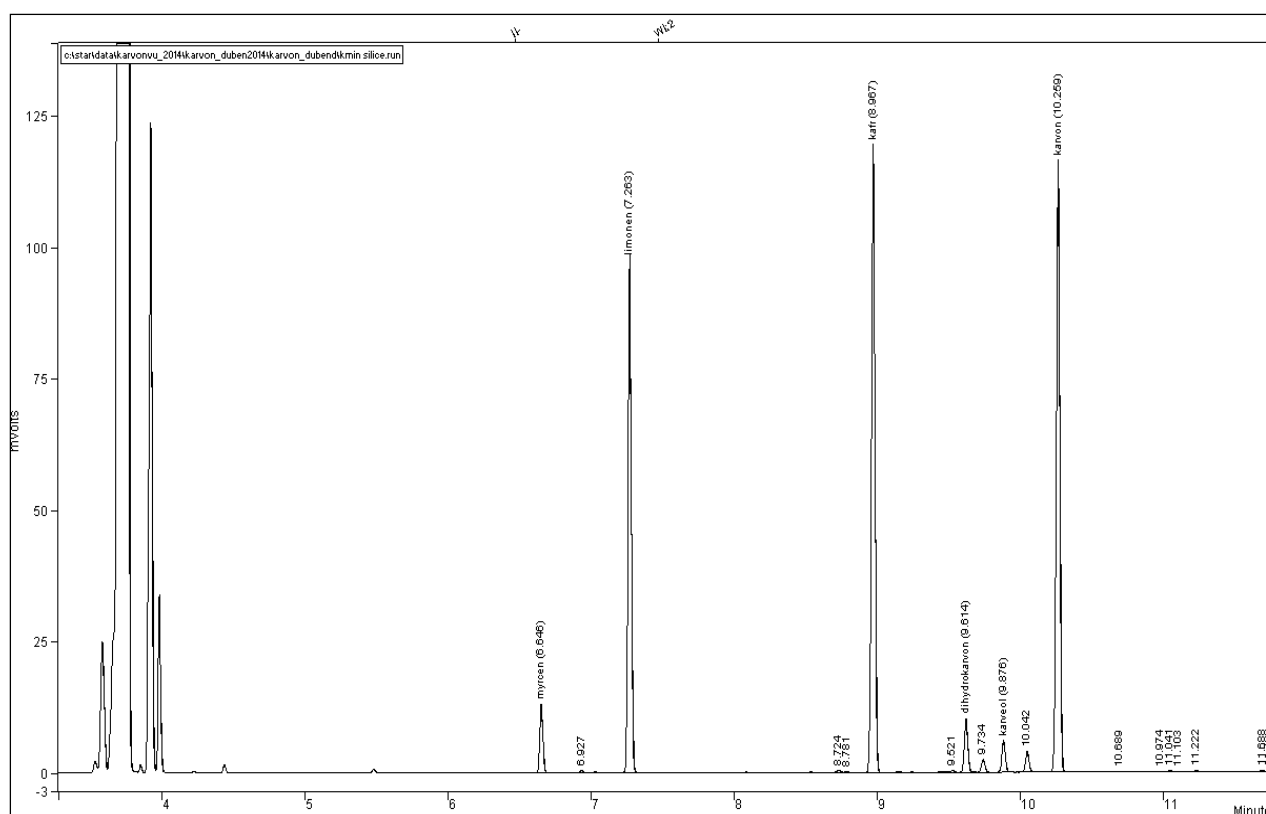
Chromatografické podmínky

Cílem práce bylo připravit metodu na stanovení obsahu karvonu a limonenu metodou GC-FID. Při výběru vhodné kolony se vycházelo z postupu popsaného v ČL 2002. Pro separaci jednotlivých složek kmínové silice byla doporučena kapilární kolona s chemicky vázanou nepolární fází na bázi dimethylpolysiloxanu s 5 % fenylu o délce 60 m, s vnitřním průměrem

0,53 mm a tloušťkou vrstvy 1,5 μm . Pro prvotní odzkoušení byla nainstalována kolona, která se v laboratoři standardně používá. Jednalo se o kolonu DB-5 (30 m $\times$ 0,25 mm, film 0,25 μm) s doporučenou fází, ale jinými rozměry. Potvrdilo se, že tato kolona je pro zamýšlené účely vhodná. Díky poloviční délce a menšímu průměru kolony došlo ke zkrácení doby analýzy, píky jsou užší a vyšší, což vede k lepšímu rozlišení. Parametrům kolony byla přizpůsobena velikost navážky vzorku a následné ředění.

Chromatografické podmínky (kap. 3.1.6, tabulka 1) byly nastaveny tak, aby karvon a limonen, tvořící společně (95 – 99) % obsahu kmínové silice, i vnitřní standard kafr poskytovaly symetrické píky dostatečně rozdělené od ostatních látek reálného vzorku. Na připravené směsi standardů nejvýznamnějších složek kmínové silice (karvon, limonen, myrcen, karveol, dihydrokarvon) pak bylo ověřeno, že nastavené podmínky jsou vhodné i pro případné stanovení dalších látek, viz obrázek 3. V tabulce 2 jsou uvedeny retenční časy t_R jednotlivých složek kmínové silice a jejich relativní retenční časy R_{tR} vzhledem k vnitřnímu standardu pro výše uvedený teplotní program a kolonu.

V průběhu ověřování metody byla u karvonu a limonenu pozorována vysoká hodnota jak opakovatelnosti stanovení, tak i opakovatelnosti nástřiku. Následně bylo zjištěno, že tyto vysoké hodnoty jsou velkou měrou způsobeny teplotou nástřikového prostoru. Od počátku měření byla teplota injektoru nastavena dle ČL 2002 na 220 °C. Po úpravě teploty na 250 °C (tato teplota doporučena i v ČL 2009) došlo k výraznému zlepšení opakovatelnosti nástřiku. U karvonu se snížila tato hodnota na polovinu (tzn. při $t_{inj} = 220$ °C byla hodnota $s = 0,052$ a při $t_{inj} = 250$ °C byla hodnota $s = 0,025$) a zároveň se snížila opakovatelnost stanovení z původní hodnoty $s = 0,65$ na hodnotu 0,28. Další snížení hodnoty opakovatelnosti bylo docíleno úpravou navážky vzorku z 50 mg na 100 mg a zvýšením přídatku vnitřního standardu z 200 μl na 1 ml.



Obrázek 3. Chromatogram směsi standardů nejvýznamnějších složek kmínové silice.

Tabulka 2. Retenční časy a relativní retenční časy hlavních složek kmínové silice.

Analyt	tr (min)	Rtr
Myrcen	6,644	0,74
Limonen	7,262	0,81
Kafr, vnitřní standard	8,964	1,00
Dihydrokarvon	9,612	1,07
Karveol	9,874	1,10
Karvon	10,256	1,14

3.2.2 Ověření stability

Během ověřování metody byla sledována stabilita karvonu a limonenu v připravené kmínové silici. Tato silice byla skladována při teplotě přibližně 4 °C. Opakované analýzy byly provedeny po dvou, pěti, sedmi, dvanácti a patnácti dnech. Po celou dobu byly dodržovány popsání podmínky skladování. Ke sledování stability byly vybrány dva vzorky silice a ty byly stanovený den připraveny k analýze vždy ve třech opakováních. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3. Stabilita karvonu a limonenu v kmínové silici.

Interval mezi přípravou vzorků	Obsah limonenu ve vzorku (%)		Obsah karvonu ve vzorku (%)	
	vzorek č. 5658	vzorek č. 5755	vzorek č. 5658	vzorek č. 5755
	42,81	43,64	54,90	54,74
po 2 dnech	42,66	43,49	54,85	54,71
po 5 dnech	42,76	42,93	55,39	54,67
po 7 dnech	41,47	42,25	55,00	55,09
po 12 dnech	41,08	42,01	55,09	55,62
po 15 dnech	40,91	41,96	55,62	55,80

Z uvedených výsledků vyplývá, že obsah karvonu se začal nepatrně zvyšovat ke konci druhého týdne skladování. Kolísání obsahu karvonu v prvních dvanácti dnech je způsobeno chybou stanovení. V případě limonenu docházelo k viditelnému snížení stanoveného obsahu již po sedmi dnech a pravděpodobně souvisí s dozrívajícími pochody, které zde probíhají, viz obrázek 1 (Schéma biosyntézy (+)-limonenu a (+)-karvonu v kmínu kořenném). Kmínovou silici lze v případě nutnosti uchovávat maximálně po dobu pěti dnů při teplotě přibližně 4 °C.

3.2.3 Validační parametry

Opakovatelnost

Výpočet opakovatelnosti byl proveden pomocí software EffiValidation 3.0 - Opakovatelnost - po úrovních z vícenásobného měření. Opakovatelnost byla stanovena pouze na jedné koncentrační hladině, což odráží skutečnost, že obsahy karvonu i limonenu se v reálných vzorcích kmínu kořenného pohybují pouze v úzkém koncentračním rozsahu.

Ve vybraném vzorku kmínové silice byl v deseti opakováních stanoven výše popsanou metodou obsah karvonu a limonenu. Byla vypočítána směrodatná odchylka (s) a relativní směrodatná odchylka (s_R), které jsou statistickou mírou přesnosti (opakovatelnosti). Ze směrodatné odchylky měření, byla vypočítána povolená difference paralelních stanovení $R_{\max}$, tj. maximální rozpětí, které lze ještě vysvětlit přítomností náhodných chyb (11).

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

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

s směrodatná odchylka z vícenásobných měření jednoho vzorku.

Tabulka 4. Opakovatelnost měření a maximální difference dvou paralelních stanovení; počet opakování = 10.

Analyt	Popis vzorku	Průměr (%)	Opakovatelnost (% abs.)	Rel. opakovatel. (%)	R _{max} (% abs.)
Limonen	vz. č. 5658	44,074	0,1817	0,41	0,503
Karvon	vz. č. 5658	53,927	0,2084	0,39	0,577

Z tabulky 4 vyplývá, že opakovatelnost stanovení pro karvon a limonen je akceptovatelná a odpovídá koncentrační hladině v níž se dané látky v kmínové silici vyskytují.

Pro zápis výsledků do LIMSu byla vložena pro povolenou diferenci dvou paralelních stanovení hodnota 0,6 % abs., jak pro stanovení karvonu, tak i pro stanovení limonenu.

Střední přesnost

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí software EffiValidation 3.0 - Opakovatelnost - z paralelních měření. K výpočtu byly použity hodnoty získané z analýz vzorků kmínové silice ze sklizně 2012 a 2013. Obsahy karvonu i limonenu se ve vzorcích pohybovaly v koncentračním rozsahu typickém pro silice kmínu kořeného.

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

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

kde b_R je t

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

s směrodatná odchylka získaná z paralelních stanovení.

Vyhodnocení je shrnuto v tabulce 5.

Tabulka 5. Střední přesnost a maximální difference dvou paralelních stanovení.

Analyt	Počet vzorků (n)	Průměr měření (%)	Střední přesnost (% abs.)	Rel. střední přesnost s _r (%)	R _{max} (% abs.)
Limonen	36	43,73	0,2281	0,52	0,561
Karvon	36	54,37	0,2357	0,43	0,580

Z tabulky 5 vyplývá, že zjištěná střední přesnost je pro koncentrační hladinu, v níž se obě látky vyskytují, akceptovatelná. Zároveň lze říci, že výsledky korespondují s hodnotami přesnosti získanými za podmínek opakovatelnosti.

Správnost

V současné době nejsou pořádány žádné mezilaboratorní porovnávací zkoušky na stanovení karvonu, případně limonenu a není dostupný žádný CRM kmínové silice. Správnost metody na stanovení obsahu karvonu a limonenu v této silici byla proto ověřena metodou standardního přídávku s použitím testu výtěžnosti. V rámci ověření správnosti byly rovněž porovnány výsledky analýz vzorků ze sklizně 2012 a 2013 získané metodou GC s výsledky, které poskytuje titrační metoda na stanovení karvonu. Vyhodnocení bylo provedeno v EffiValidation 3.0 - Porovnání 2 metod/laboratoří: t-testem na rozdíl výsledků.

Při ověřování správnosti metodou standardního přídávku bylo postupováno následovně. K přesné navážce vzorku bylo vždy přidáno definované množství standardu karvonu a limonenu tak, aby byla připravena řada vzorků na třech koncentračních hladinách, pokrývajících požadovaný rozsah. Na každé z hladin byly připraveny vzorky ve 3 opakováních. Získané výsledky stanovení byly vyhodnoceny v programu EffiValidation 3.0 - Správnost - Velký koncentrační rozsah - slepý pokus není k dispozici. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 6 a 7.

Tabulka 6. Ověření správnosti metody stanovení karvonu v kmínové silici.

Popis	Přídavek	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Výchozí vz.	0	0	0	0,15948	-0,36147 – 0,36147	Přijata
Přídavek 1	5,064	5,3733	106,11	0,16503	5,00552 – 5,74115	Přijata
Přídavek 2	10,128	10,2967	101,67	0,64444	9,23265 – 11,36068	Přijata
Přídavek 3	19,994	19,5133	97,60	0,39119	18,83626 – 20,19041	Přijata
Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.						

Tabulka 7. Ověření správnosti metody stanovení limonenu v kmínové silici.

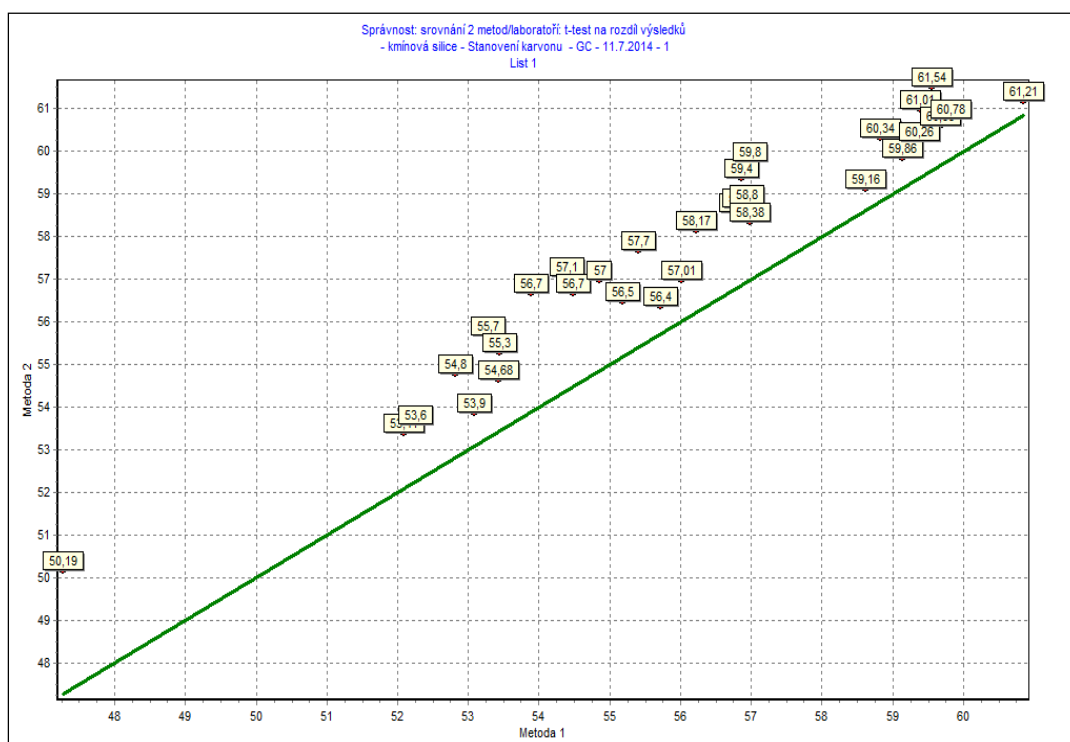
Popis	Přídavek	Naměřeno	Výtěžnost	Přesnost	Interval spolehlivosti	Hypotéza
Výchozí vz.	0	0	0	0,25423	-0,57624 – 0,57624	Přijata
Přídavek 1	4,9925	4,6800	93,74	0,13204	4,22086 – 5,13914	Přijata
Přídavek 2	9,9850	9,9667	99,82	0,20881	9,43939 – 10,49394	Přijata
Přídavek 3	19,849	20,1367	101,45	0,51449	19,2169 – 21,05643	Přijata
Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.						

Z výsledků v tabulce 6 a 7 vyplývá, že popsaná analytická metoda poskytuje správné výsledky.

Pokud se pomocí t-testu na rozdíl výsledků porovnaly obsahy karvonu získané metodou GC s výsledky titračního stanovení, bylo zjištěno, že metody neposkytují statisticky shodné výsledky, viz tabulka 8. Obsahy karvonu zjištěné titrační metodou byly ve všech případech vyšší, což dokládá i obrázek 4. Tyto zvýšené hodnoty souvisí pravděpodobně s principem titračního stanovení, kdy se na kmínovou silici působí přebytkem ethanolického roztoku hydroxylaminu hydrochloridu. Reakcí s karvonem dojde k uvolnění kyseliny chlorovodíkové, která se stanoví alkalimetrickou titrací. Lze předpokládat, že tak jako karvon mohou v kmínové silici reagovat i další látky podobné chemické povahy a způsobovat tak navýšení této hodnoty.

Tabulka 8. Srovnání výsledků získaných metodou GC-FID a stávající titrační metodou.

Průměrný rozdíl	Přesnost rozdílu	Interval spolehlivosti	Hypotéza
-1,65031	0,72281	-1,91085– -1,38978	Zamítnuta
Závěr: Srovnávané analytické metody neposkytují statisticky stejné výsledky.			



Obrázek 4. Srovnání výsledků stanovení obsahu karvonu metodou GC-FID a titrační metodou – grafické vyhodnocení.

Legenda: Metoda 1 – titrační metoda, Metoda 2 – metoda s využitím GC-FID.

Meze detekce a stanovitelnosti

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

Připravená řada kalibračních roztoků (koncentrace v rozmezí 0,001 mg/ml až 7 mg/ml karvonu, resp. limonenu v heptanu) byla změřena na GC za podmínek metody, byly vyhodnoceny výšky píků karvonu a limonenu a z naměřených hodnot byly vypočítány směrnice kalibračních přímk pro oba analyty (EffiValidation 3.0 - Kalibrace). Hodnota maximálního kolísání základní linie (velikost šumu) byla po změření 5 slepých pokusů automaticky stanovena řídicím softwarem Star 5.5.

Ze směrnice kalibrační přímky a hodnot maximálního kolísání základní linie byly vypočítány meze detekce a stanovitelnosti, které jsou shrnuty v tabulce 9.

Tabulka 9. Meze detekce a stanovitelnosti.

Parametr		Limonen	Karvon
Směrnice kalibrační přímky	b_1	24447,5	18983,23
Korelační koeficient	R^2	0,99996	0,99991
Max. kolísání zákl.linie	$h_{\max}$ (μV)	9,8	9,4
Koncentrace na mezi detekce	x_D (mg/ml)	0,0012	0,00149
	x_D (%)	0,012	0,015
Koncentrace na mezi stanovitelnosti	x_Q (mg/ml)	0,00401	0,00495
	x_Q (%)	0,040	0,050

Za výše popsanych podmínek metody je mez detekce, resp. stanovitelnosti 0,015 %, resp. 0,050 % karvonu a 0,012 %, resp. 0,040 % limonenu ve vzorku.

Nejistota stanovení

Relativní standardní nejistota a relativní rozšířená nejistota byly stanoveny z hodnot paralelních stanovení 33 vzorků kmínové silice. Obsah karvonu a limonenu se v daných vzorcích pohyboval v koncentračním rozsahu typickém pro odrůdy kmínu kořenného. Výpočet byl proveden v programu EffiValidation 3.0 - Nejistoty z přesnosti - paralelní měření k dispozici. Pro výpočet rozšířené nejistoty byl použit faktor pokrytí 2. Vypočítané nejistoty pro stanovení obsahu karvonu a limonenu jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Tabulka 10. Nejistoty pro stanovení obsahu karvonu a limonenu v kmínové silici.

Analyt	Konc. rozsah (%)	Standardní nejistota		Rozšířená nejistota (k = 2)	
		(% abs.)	relativní (%)	(% abs.)	relativní (%)
Limonen	36 – 56	0,2167	0,494	0,4334	0,988
Karvon	43 – 62	0,2290	0,419	0,4581	0,838

Relativní rozšířená nejistota stanovení byla pro oba parametry, tzn. karvon i limonen zaokrouhlena na hodnotu 1 %.

4 Závěr

Byla připravena a validována metoda na stanovení obsahu karvonu a limonenu v kmínové silici s využitím GC-FID. Rozšíření vývojového úkolu o stanovení limonenu bylo provedeno na základě konzultací s NOÚ. Limonen spolu s karvonem tvoří přibližně (95 – 99) % obsahu kmínové silice a jejich vzájemný poměr je měřítkem její kvality.

Byla provedena optimalizace podmínek pro měření na GC, tak aby v případě požadavku bylo možné stanovit i další složky silice. Pro měření byla použita kapilární kolona DB-5 s nepolární stacionární fází na bázi dimethylpolysiloxanu s 5 % fenylu.

Bylo prokázáno, že kmínovou silici lze uchovávat po dobu 5 dnů při teplotě okolo 4 °C, aniž by došlo ke změnám v obsahu karvonu a limonenu ve vzorku.

Po ukončení optimalizace metody byla provedena její validace. Byla stanovena opakovatelnost, střední opakovatelnost, linearita, meze detekce a stanovitelnosti a nejistota stanovení. Do laboratorního informačního a řídicího systému LIMS byly po zaokrouhlení vloženy následující parametry. Povolený rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními byl pro karvon i limonen nastaven na hodnotu 0,6 % abs., pro mez stanovitelnosti byla zadána hodnota 0,04 % u limonenu a 0,05 % u karvonu a relativní rozšířená nejistota stanovení pro oba parametry má hodnotu 1 % relativní.

5 Literatura

1. Úřední věstník Evropské Unie, 7.8.2007, C 184/15 – C 184/18.
2. Růžicková, G. a kolektiv: Léčivé a kořeninové rostliny z čeledi miříkovité. *Kmín kořený*, Vydavatelství Ing. Petr Baštan – Olomouc, 1. vydání, 2013, s. 58 – 73.
3. Zehnálek, P., Holubář, J., Mezlík, T.: Olejniny 2014. *Přehledy odrůd hořčice bílé, máku setého, lnu olejného a kmínu kořeného 2014*, ÚKZÚZ – NOÚ Brno, 1. vydání, 2014, s. 114 – 115.
4. Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2009. *Carvi fructus – Kmínový plod*, Grada Praha, 1. vydání, 2009, s. 1603 – 1604.
5. Kaláčková, P.: Diplomová práce: Mikrobiologická čistota kmínu kořeného (*carum carvi* L.) během skladování, MZLU Brno – Agronomická fakulta, 2008.
6. Sedláková, J., Kocourková, B., Lojková, L., Kubáň, V.: The essential oil content in caraway species (*Carum carvi* L.), *Horticultural Science (Prague)*, 2003, 30, s.73 – 79.
7. Bouwmeester, H. J., Gershenzon, J., Konings, M. C. J. M., Croteau, R.: Biosynthesis of the Monoterpenes Limonene and Carvone in the Fruit of Caraway. *Plant Physiology*, 1998, 117 (3), s. 901 – 912.
8. Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2009. *Carvi etheroleum – Kmínová silice*, Grada Praha, 1. vydání, 2009, s. 1602 – 1603.
9. Ministerstvo zdravotnictví ČR: Český lékopis 2002, 5. díl, Národní část. *Carvi etheroleum – Kmínová silice*, Grada Publishing, 1. vydání, 2002, s. 5460 – 5462.
10. Kabátová, N., Šulová, R., Ryšavý, P. a kol.: JPP Testování odrůd. ÚKZÚZ – NRL Brno, 2012.
11. Eckschlager, K., Horsák, I.: Dovolena difference výsledků paralelních stanovení. Vyhodnocování analytických výsledků a metod, 1. vydání, SNTL Praha, 1980
12. Centner, V.: Uživatelská příručka EffiValidation 3.0.

Bulletin Národní referenční laboratoře XX 2016/2

Ročník: XX, č. 2

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2016

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 51

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196