



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Ústav analýzy potravin a výživy



UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Metodika necílové hmotnostně spektrometrické analýzy
(fingerprinting) a metabolického profilování pro odhalení
jednotlivých druhů a poddruhů ovoce v ovocných výrobcích**

Kamila Hůrková, Milena Stránská, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová

Praha, 2017

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QJ1530272 (Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba-spotřebitel) a dále byla tato práce realizována v rámci "Operačního programu Praha - Konkurenceschopnost" (CZ.2.16/3.1.00/21537 a CZ.2.16/3.1.00/24503) za podpory "Národního programu udržitelnosti I" - NPU I (LO1601 - č.: MSMT-43760/2015).

OBSAH

1	CÍL METODIKY	4
2	TEORETICKÝ ÚVOD	5
3	VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
3.1	Použitelnost metody	7
3.2	Princip metody	9
3.2.1	Princip metody U-HPLC–QTOF-MS	10
3.3	Bezpečnost práce.....	10
3.3.1	Chemikálie a spotřební materiál	10
3.4	Přístroje a zařízení.....	11
3.5	Použitý software.....	11
3.6	Pracovní postup	11
3.6.1	Příprava extraktů ovoce	11
3.6.2	U-HPLC–QTOF-MS analýza	12
3.7	Detekce a potvrzení specifických markerů	13
3.7.1	U-HPLC-MS analýza	13
3.7.2	Multivariační statistická analýza metabolických dat	14
3.7.3	Identifikace charakteristických markerů.....	16
3.8	Pracovní charakteristiky metody	17
3.8.1	Opakovatelnost metody	17
3.8.2	Selektivita metody	17
3.8.3	Robustnost metody	17
4	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....	18
5	POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	19
6	EKONOMICKÉ ASPEKTY	20
7	SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY.....	21
8	SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE	22
	AUTOŘI A OPONENTI	23

1 CÍL METODIKY

Jedním z dílčích cílů projektu QJ1530272 podporovaného Ministerstvem zemědělství České republiky bylo vyvinout a následně validovat metodu pro necílovou analýzu (fingerprinting) a metabolické profilování sloužící pro odhalení přítomnosti klikvy velkoplodé a brusnice brusinky ve výrobcích. Extrakty různých odrůd brusnice brusinky a klikvy velkoplodé z rozdílných lokalit a odlišných let byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí (U-HPLC-HRMS/MS). Cílem bylo nalézt vhodné diagnostické markery, které jsou selektivní pro daný druh ovoce. Dále byla vytvořena databáze hmotnostně-spektrometrických záznamů vzorků, která posloužila pro tvorbu chemometrických modelů s vysokou predikční a rozpoznávací schopností. Vyvinutá metodika byla kriticky porovnána s metodikou PCR.

Vypracovaná metodika bude dále předána k využívání pracovníkům kontrolních laboratoří, pro možné využití při laboratorní kontrole přítomnosti brusnice brusinky a klikvy velkoplodé v potravinářských výrobcích a v doplňcích stravy.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

Plody rostlin brusnice brusinky (*Vaccinium vitis-idaea* L.) a tzv. americké brusinky, klikvy velkoplodé (*Vaccinium macrocarpon* L.) jsou známy a využívány zejména k prevenci infekce močových cest (UTI). Antibakteriální a antioxidační aktivitu těchto plodů zajišťují především fenolické látky a to konkrétně proanthokyanidiny, tedy oligomery (dimery a trimery) katechinu a epikatechinu. Aktivita těchto látek spočívá v zabránění adheze bakterií *Escherichia coli* na buňky epitelu močových cest. Právě díky tomuto pozitivnímu působení přítomných proanthokyanidinů jsou brusinky využívány k výrobě doplňků stravy určených k prevenci a léčbě infekce močových cest [1, 2].

Brusnice brusinka a klikva velkoplodá se obecně liší v obsahu anthokyanů, proanthokyanidinů a dalších fenolických látek, jež tvoří významnou část rozsáhlého metabolomu. Brusnice brusinka obsahuje zhruba 2,5krát více celkových anthokyanů než klikva velkoplodá. Záleží však na lokalitě pěstování. Zatímco divoce rostoucí brusinky jsou oproti klikvám bohatší na obsah anthokyanů, tak u brusinek vypěstovaných ve Skandinávii je tomu naopak. Klikva obsahuje šest typů anthokyanů, a to galaktosidy, glukosidy a arabinosidy kyanidinů a peonidinů. Brusinka obsahuje pouze glykosidy kyanidinů [3].

I když jsou brusinka a klikva morfologicky odlišné rostliny, často dochází k jejich záměně. Nejen v České republice, kde je často výraz „cranberry“ chybně překládán jako brusinka, ale také v anglicky mluvících zemích, ve kterých jsou často např. doplňky stravy s extraktem klikvy velkoplodé, jakožto účinné složky, prodávány v obalech s ilustrací brusnice brusinky. Velmi snadné zaměnit klikvu velkoplodou za deklarovanou brusnici brusinku je speciálně ve výrobcích, ve kterých jsou plody brusinky rozmělněny, rozvařeny nebo mají podobu ovocné šťávy [3, 4].

Autentikace potravin v posledních letech zaznamenala nebývalý rozvoj. Donedávna byly k autentikaci potravin využívány klasické techniky, jako jsou chromatografické metody s konvenčními způsoby detekce analytů, které monitorovaly konkrétní složky potravin, tzv. markery, ale neposkytovaly dostatečně komplexní informace o složení vzorku. Nyní jsou k dispozici pokročilé analytické strategie, techniky, které tuto schopnost mají a navíc ji kombinují s chemometrickými metodami zpracování dat, čímž poskytují maximální množství informací o analyzované potravine. Mezi tyto moderní techniky patří metabolomika, která napomáhá komplexně hodnotit kvalitu, bezpečnost a především autenticitu potravin.

Metabolomika se zaměřuje na komplexní a rychlou detekci malých molekul (obvykle do 1 500 Da) - metabolitů přítomných v biologických systémech [5].

Dnes je v dané oblasti dominantní metabolomická analýza umožňující získání fingerprintů, která je realizovaná pomocí vysokorozlišovací tandemové hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií. Hmotnostní detektory vybavené analyzátozem typu orbitrap nebo analyzátozem doby letu (TOF) umožňují identifikaci látek na základě přesné hmoty mateřského iontu, ze které je možno určit elementární složení dané látky, resp. komponenty. Tandemové uspořádání (MS/MS) potom nabízí možnost získat další strukturní informace o detekovaných látkách díky fragmentaci mateřského iontu, což umožňuje v řadě případů identifikaci látek bez použití analytických standardů, za předpokladu, že jsou k dispozici vhodné softwarové databáze. Vysoký diagnostický potenciál této analytické platformy pro hodnocení autenticity a odhalování falšování potravin byl demonstrován v řadě vědeckých publikací [6, 7].

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1 POUŽITELNOST METODY

Aplikace metabolomického fingerprintingu pro odlišení klikvy velkoplodé a brusnice brusinky se v této oblasti analýzy potravin jeví jako velmi perspektivní metoda, kdy se pro vzájemné odlišení využívá necílové analýzy zaměřené na detekci maximálního množství nízkomolekulárních složek („fingerprint“) dané potraviny. Na základě získaných primárních dat z analýzy fingerprintů souboru autentických vzorků je sestaven model, vytvořený pomocí chemometrického zpracování dat, který je poté možno použít k identifikaci charakteristických markerů jednotlivých druhů ovoce. Aby model odrážel co největší variabilitu vzorků, byly analyzovány různé odrůdy klikvy velkoplodé a brusnice brusinky, pocházející z různých lokalit a ze tří různých sklizní (rok 2015, 2016, 2017). Model by tak měl zahrnovat jak variabilitu mezidruhovou, tak i meziroční variabilitu v metabolomu vzorků. Vznikl tak velmi robustní statistický model s dostatečnou vypovídající hodnotou potřebnou pro spolehlivou kontrolu původu vzorků. Získaný fingerprint slouží k možné diferenciaci vzorků a zároveň je možné pomocí těchto charakteristických fingerprintů zhodnotit autenticitu (pravost) daného vzorku. Důležité markery pro odlišení klikvy velkoplodé a brusnice brusinky jsou shrnuty v **Tab. I**. U jednotlivých iontů je navržena jejich identifikace na základě přesné hmoty, izotopového profilu a charakteristických MS/MS fragmentů.

Tabulka I: Charakteristické markery získané U-HPLC-HRMS/MS technikou (ESI+)

Druh ovoce	RT (min)	Detekovaný ion (m/z)	Sumární vzorec [M+H] ⁺	Δppm	Identifikace
Brusnice brusinka	9,6	780,5530	C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P	-1	PC 36:5
Brusnice brusinka	9,8	782,5698	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	0,5	PC 36:4
Brusnice brusinka	10,1	784,5840	C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P	-1,4	PC 36:3
Brusnice brusinka	9,8	756,554	C ₄₂ H ₇₈ NO ₈ P	0,3	PC 34:3
Brusnice brusinka	10,0	758,5713	C ₄₂ H ₇₆ NO ₈ P	2,5	PC 34:2
Klikva velkoplodá	9,0	439,3546	-	-	-
Klikva velkoplodá	4,9	433,1121	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-1,9	Peonidin 3-arabinosid
Klikva velkoplodá	4,7	463,1219	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	-3,4	Peonidin 3-glukosid
Klikva velkoplodá	10,3	522,4518	-	-	-
Klikva velkoplodá	10,3	736,6066	-	-	-

PC (x:y): Fosfatidylcholin (počet uhlíků v navázaných řetězcích:počet dvojných vazeb v navázaných řetězcích)

Tabulka II: Charakteristické markery získané U-HPLC-HRMS/MS technikou (ESI-)

Druh ovoce	RT (min)	Detekovaný ion (m/z)	Sumární vzorec [M-H] ⁻	Δppm	Identifikace
Klikva velkoplodá	9,5	447,3490	-	-	-
Klikva velkoplodá	10,4	503,4115	-	-	-
Brusnice brusinka	4,1	289,0729	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	3,9	Katechin
Klikva velkoplodá	5,3	449,0733	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	1,7	Myricetin-3-arabinosid
Klikva velkoplodá	5,9	447,0953	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	4,5	Petunidin-3-arabinosid
Klikva velkoplodá	4,9	461,1106	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	3,6	Peonidin 3-glukosid
Klikva velkoplodá	3,1	325,0931	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	0,6	derivát kyseliny kumarové
Klikva velkoplodá	9,9	475,3798	-	-	-
Klikva velkoplodá	5,7	477,1052	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	2,8	Petunidin 3-glukosid
Klikva velkoplodá	5,1	479,0849	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	3,7	Myricetin 3-glukosid
Brusnice brusinka	5,6	193,0520	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	4,6	Ferulová kyselina

3.2 PRINCIP METODY

Metoda je určena pro stanovení profilu nízkomolekulárních organických látek s molekulovou hmotností menší než 1200 Da, ionizovatelných v elektrospreji v pozitivním či negativním módu a detekovatelných technikou ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem typu kvadrupol- analyzátor doby letu (U-HPLC–QTOF-MS), ve vodně-methanolických extraktech ovoce a výrobků z ovoce. Výstupem měření je chromatogram obsahující hmotnostní spektra vzorku. Jedná se o soubor odezev detekovaných iontů ve zvoleném rozmezí retenčních časů (RT) nebo hodnot *m/z* (tzv. fingerprintová knihovna metabolomu). Použitá instrumentace umožňuje přiřadit vybraným iontům pravděpodobné prvkové (elementární) složení, sloužící jako podklad pro potvrzení jejich identity.

3.2.1 *Princip metody U-HPLC–QTOF-MS*

Kapalný vzorek je pomocí autosampleru přenesen do nástřikového ventilu a LC systémem unášen do iontového zdroje (elektrosprej, ESI), kde jsou analyty ionizovány a transportovány do hmotnostního spektrometru. Ionizace, analýza a detekce probíhají postupně po předchozí separaci na chromatografické koloně. Specializované softwary PeakView, MasterView a MarkerView (SCIEX, Německo) umožňují zpracování naměřených. Pomocí těchto programů lze, na základě měření přesné hodnoty m/z , provést určení pravděpodobného prvkového složení vybraných iontů (po zadání typu a množství prvků uvažovaných pro kalkulaci). Potvrzení identifikace látky probíhá na základě porovnání naměřených MS/MS fragmentů s dostupnými MS/MS spektry v online databázích či odborné literatuře.

3.3 BEZPEČNOST PRÁCE

Během manipulace s rozpouštědly a s extrakty plodů ovoce a ovocných výrobků je třeba dodržovat základní pravidla bezpečnosti práce v laboratoři. V případě kontaktu s pokožkou či očima mohou organická rozpouštědla a kyselina mravenčí způsobovat podráždění. Proto je nezbytné pracovat v laboratorních rukavicích během celé přípravy vzorků.

3.3.1 *Chemikálie a spotřební materiál*

- Deionizovaná voda (přečištěná z destilované vody pomocí zařízení Milli-Q, Millipore, Německo)
- Methanol, Merck (Německo)
- Kyselina mravenčí >95%, Sigma-Aldrich (Německo)
- Mravenčan amonný 99 %, Sigma Aldrich (USA)
- Technický plyn: dusík (99,994 %), Technoplyn (ČR)
- Plastové (PTFE) kyvety o objemu 15 ml, Merci (ČR)
- Skleněné vialky (2 ml), víčka a septa, Labicom (ČR)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.4 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

- Stolní centrifuga Rotina 35R, HettichZentrifugen (Německo)
- Laboratorní homogenizátor Ultra-Turrax® T 10 B (ČR)
- Vortex, Chromservis (ČR)
- Přístroj na přípravu deionizované vody, Milli-Q, Millipore (Německo)
- Automatické pipety, TraffLab-Transferpette® (Švýcarsko)
- Multipipeta, Eppendorf (Německo)
- U-HPLC–Q-TOF-MS systém:
 - vysokoúčinný kapalinový chromatograf Dionex UltiMate® 3000 RSLC, Thermo Fisher Scientific (USA)
 - analytická kolona HSS T3 (2,1 mm × 100 mm; 1,8 µm), Waters (USA)
 - hmotnostní spektrometr Q-TOF, TripleTOF 6600, SCIEX (Kanada)

3.5 POUŽITÝ SOFTWARE

- Sada Microsoft Office – programy MS Word a MS Excel, Microsoft Corporation, USA
- Analyst® verze 1.6 TF, SCIEX, Kanada
- PeakView™ verze 2.2, SCIEX, Kanada
- MarkerView™ verze 1.2.1, SCIEX, Kanada
- LipidView™ verze 1.2, SCIEX, Kanada
- SIMCA verze 13.0, UMETRICS, Švédsko
- Chromeleon™ verze 7.1, ThermoFischer SCIENTIFIC, USA

Poznámka: přístroje a zařízení uvedených dodavatelů, které jsou zde uvedeny, lze použít i od alternativních dodavatelů, pokud je to pro daný účel vhodné. Vhodnost musí být dokumentována při implementaci metody v konkrétních podmínkách.

3.6 PRACOVNÍ POSTUP

3.6.1 Příprava extraktů ovoce

1 g homogenizovaného vzorku se naváží do 15ml plastové centrifugační kyvety. K mraženým plodům se přidá 5 ml methanolu. Obsah každé kyvety je po dobu 1 minuty homogenizován pomocí ultraturraxu. Vzorky jsou následně odstředěny v centrifuze při 10 000 min⁻¹ a teplotě 5 °C po dobu 5 minut. Po odstředění je extrakt odebrán do vialek a tím

připraven k analýze. Dále byly připraveny vzorky pro kontrolu kvality (QC) měřených dat, které slouží k ověření, že měření v průběhu celé měřicí sekvence proběhla za stejných podmínek a získaná data jsou konzistentní (retenční čas, intenzita signálu). V tomto případě se jednalo o směsný vzorek všech analyzovaných vzorků, z jejichž extraktů bylo odebráno do vialky 50 µl. Tento vzorek je nastříkovan minimálně desetkrát na začátku sekvence a dále každých 5-10 vzorků v průběhu celé sekvence.

3.6.2 U-HPLC–QTOF-MS analýza

Metoda pro stanovení profilu látek ve vzorku je realizována technikou U-HPLC–QTOF-MS. Iontový zdroj elektrosprej (ESI) umožňuje pracovat v pozitivním a negativním módu, přičemž každý z nich je v mnoha případech vhodný pro ionizaci jiných skupin látek, resp. získání odlišných (navzájem komplementárních) látkových profilů. Z tohoto důvodu je vzorek analyzován vždy jak v pozitivním, tak i negativním módu ionizace. Důležitým parametrem, který může ovlivňovat látkový profil získaný technikou LC-MS, je výběr stacionární fáze chromatografické kolony. Ta je rozhodující pro efektivní detekci látek s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, především polaritou. Pro separaci středně polárních látek obsažených ve vodně-methanolickém extraktu je použita chromatografická separace v systému s reverzní fází. Detaily popisující podmínky U-HPLC separace a QTOF-MS detekce jsou uvedeny níže.

3.6.2.1 Chromatografie v reverzní fázi

Kolona: HSS T3 (2,1 x 100 mm, 1,8 µm) Waters (USA), teplota kolony: 45 °C, mobilní fáze: 5 mM mravenčan amonný ve vodě (A) a 5 mM mravenčan amonný v methanolu (B), gradient: počátek s 5 % (B), lineární vzrůst ke 100 % (B) v 8 min, 100 % (B) až do 14 min, v 14,1 min změna k 5 % (B), ekvilibrace kolony 3 min před dalším nástřikem. Nástřikový objem: 4 µl, průtok 0.400 ml/min.

Tabulka III: Parametry hmotnostního spektrometru a podmínky detekce

Iontový zdroj	Duo Spray TM s odděleným ESI iontovým zdrojem a APCI iontovým zdrojem
Ionizační technika	ESI+/ESI-
Napětí na kapiláře	+5000 V/-4500 V
Teplota iontového zdroje	480 °C

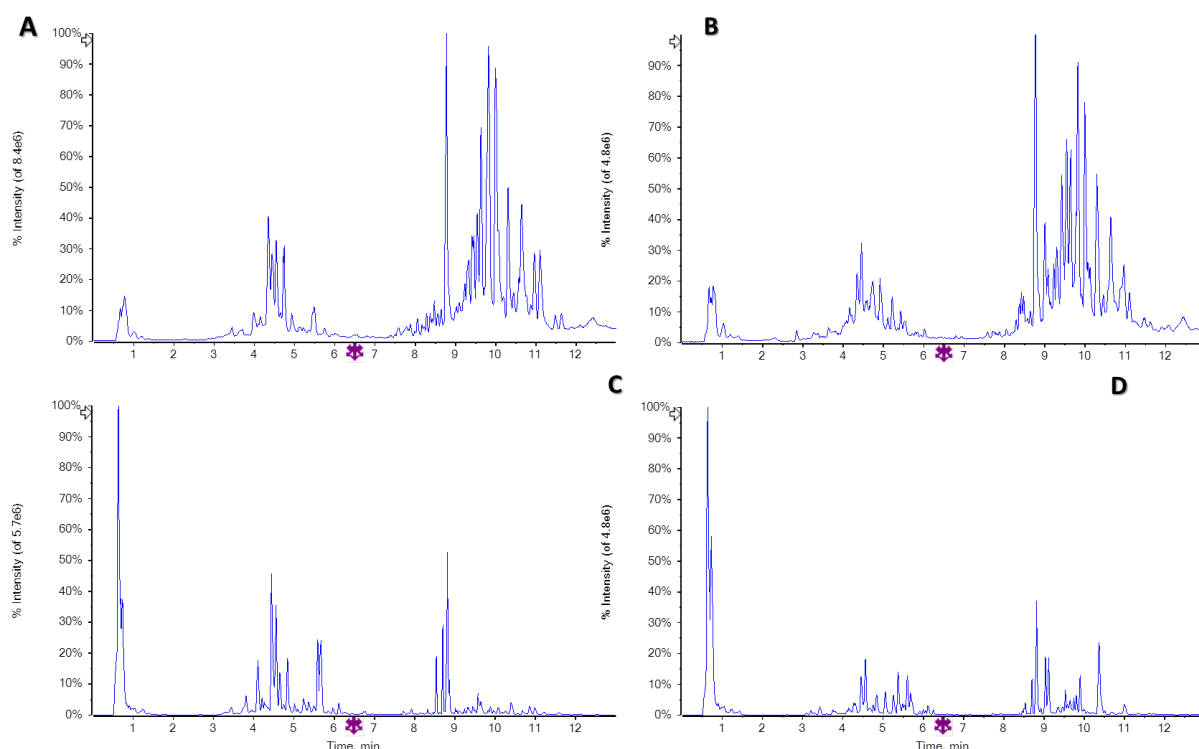
Rozsah hodnot m/z	100 – 1200
Kolizní energie	35±15 eV
Tlak nebulizačního plynu	55 psi (344,74 kPa)
Tlak sušícího plynu	55 psi (344,74 kPa)
Deklasterační potenciál	80 V
Dosažené rozlišení	FWHM > 31000 (m/z 321,0192) v obou polaritách

Automatická kalibrace m/z byla realizována kalibračním dávkovacím systémem (CDS) po každých 10 změřených vzorcích pomocí kalibračního roztoku. Ke kontrole přesnosti hmoty a posunu retenčního času během celé sekvence měření byl použit kontrolní vzorek (QC) obsahující směs všech extraktů vzorků.

3.7 DETEKCE A KONFIRMACE SPECIFICKÝCH MARKERŮ

3.7.1 U-HPLC-HRMS analýza

Připravené vzorky jsou za výše zmiňovaných podmínek vyšetřeny jak v pozitivním, tak i v negativním módu ionizace. Na **Obrázku 1** jsou znázorněny příklady chromatografických záznamů (fingerprintů) vzorků klikvy velkoplodé a brusnice brusinky získané pomocí techniky U-HPLC-HRMS v pozitivním i negativním ionizačním módu. Chromatografické záznamy získané touto technikou za výše popsanych podmínek v pozitivním i negativním módu jsou poměrně bohaté (až tisíce látek). Získaná data jsou dále zpracována pomocí statistických chemometrických analýz, jejichž výsledky jsou shrnuty níže (**Obrázek 2-3**).



Obrázek č. 1: Příklady chromatografických záznamů získaných technikou U-HPLC-HRMS. A: Brusnice brusinka (ESI+); B: Klikva velkoplodá (ESI+); C: Brusnice brusinka (ESI-); D: Klikva velkoplodá (ESI-)

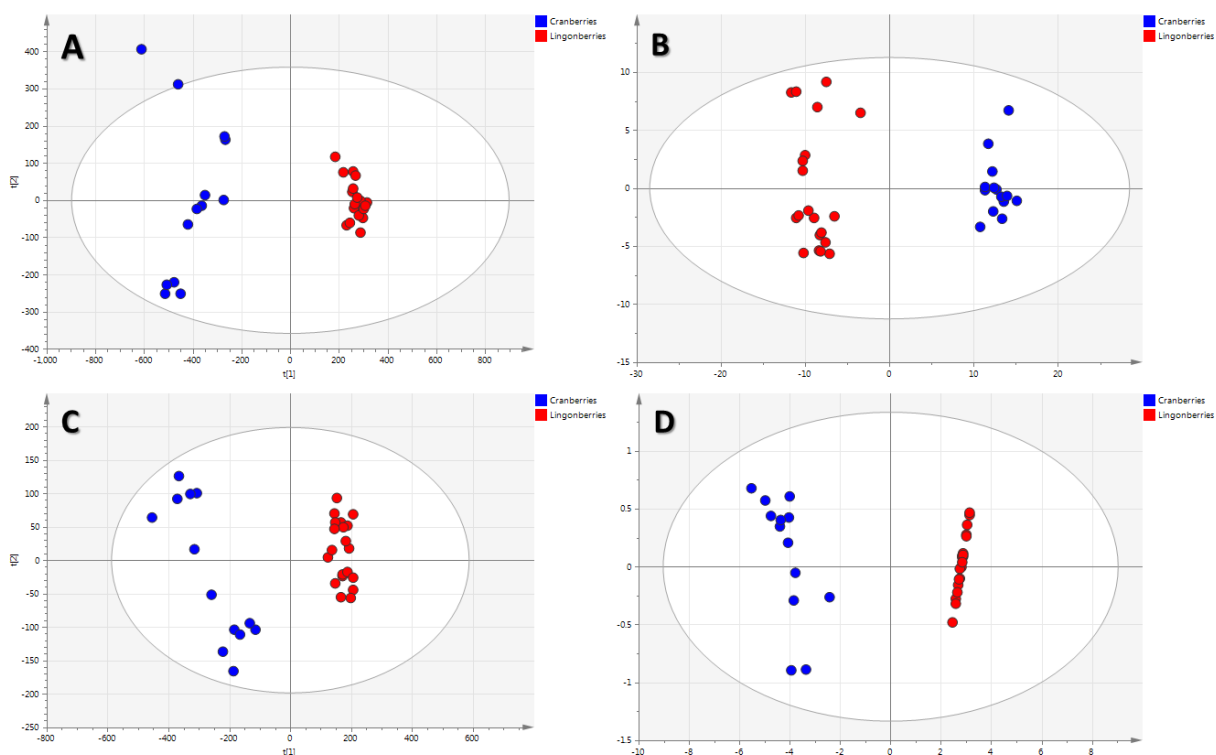
3.7.2 Multivariační statistická analýza metabolomických dat

Data získaná z analýzy vzorků obou druhů ovoce pomocí U-HPLC-HRMS je dále nutné statisticky zpracovat. Ke zpracování a interpretaci vícerozměrných dat získaných během metabolomických analýz se využije metody multivariační statistické analýzy, v prvním kroku nejčastěji neřízená analýza hlavních komponent (*principal component analysis*, PCA). Tato statistická metoda umožňuje první pohled na strukturu komplexních dat. V dalším kroku se při tvorbě matematických modelů pro klasifikaci neznámých vzorků uplatňují především řízené analýzy: lineární diskriminační analýza (*linear discriminant analysis*, LDA) nebo diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (*partial least squares discriminant analysis*, PLS-DA).

Data z jednotlivých měření pomocí výše zmiňovaných technik jsou zpracována pomocí multivariačních chemometrických analýz PCA a PLS-DA. **Obrázek 2** ukazuje získané výsledky provedených statistických analýz z naměřených dat pro oba ionizační módy. Na **Obrázku 3** je dále ukázán příklad VIP plotu, který zobrazuje markery nejvíce zodpovědné za

rozdělení vzorků do skupin. Všechny tyto nejdůležitější ionty, tzv. markery, jsou shrnuty v **tabulce I a II**, kap. 3.1.

V případě techniky U-HPLC-HRMS je zpracování dat prováděno automaticky pomocí dostupného softwaru MarkerView (Sciex, Kanada), který obsahuje podprogramy (komponenty) pro zpracování dat i pokročilé statistické zpracování. Výběr vhodných iontů, dle zvolených parametrů (rozsah retenčních časů, rozsah naměřených hodnot m/z a další), normalizace intenzit včetně následného statistického předzpracování je provedeno pomocí programu MarkerView. Data jsou posléze přenesena do softwaru SIMCA (UMETRICS, Švédsko), který pak umožňuje rozsáhlejší zpracování velkých souborů dat a přehlednou vizualizaci finálních výsledků.



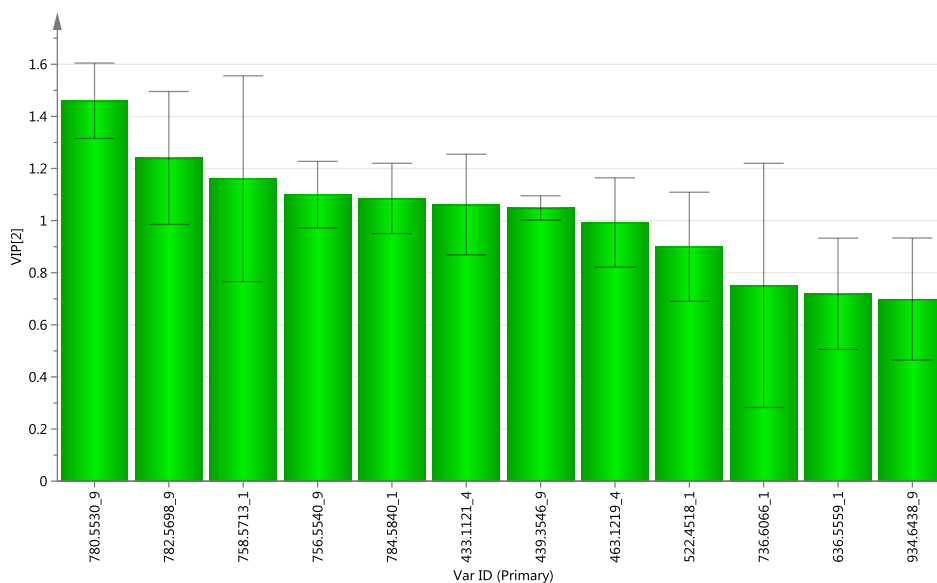
Obrázek č. 2: Grafy komponentního skóre vzorků brusnice brusinky (červená barva) a klikvy velkoplodé (modrá barva). A: PCA (ESI+); B: PCA (ESI-); C: PLS-DA (ESI+); D: PLS-DA (ESI-)

Po získání uvedených PLS-DA modelů byla provedena jejich validace. Validací modelů byly zjištěny rozpoznávací a predikční schopnosti. Rozpoznávací schopnost znázorňuje procentuální úspěšnost správně zařazených vzorků analyzovaného souboru do příslušné skupiny. Predikční schopnost udává procentuální úspěšnost správného zařazení nově testovaného vzorku. Tedy snaha je, aby obě schopnosti vykazovaly co nejvyšší procento

úspěšnosti. Rozpoznávací schopnost pro PLS-DA model sestavený z dat měřených v pozitivním módu ionizace dosahovala 100 % a predikční schopnost také 100 %. V případě PLS-DA modelu pro data z negativního módu ionizace vyšla rozpoznávací schopnost 100 % a predikční schopnost opět 100 %. Sestrojené modely tedy vykazovaly maximální rozpoznávací i predikční schopnost.

3.7.3 Identifikace charakteristických markerů

Dále byly pomocí VIP plotu nalezeny markery, které nejvíce ovlivňují rozdělení vzorků do skupin dle druhu ovoce (viz **Obrázek č. 3**) a jsou buď výlučně, nebo ve statisticky významně vyšší míře přítomny v jedné ze skupin ovoce. Identifikace markerů se provádí na základě inspekce hmotnostních spekter v chromatogramu. Vytipované analyty jsou identifikovány na základě hmotnostních spekter pomocí výpočtu elementárního složení. Pokročilý software, jímž je vybaven měřicí systém, je na základě přesné hmoty a izotopového profilu schopen navrhnout pravděpodobný sumární vzorec hledané látky. Podle navrženého sumárního vzorce či naměřené hmoty m/z jsou látky vyhledávány v chemických databázích, jako jsou např. ChemSpider nebo Metlin. Jako maximální možná odchylka naměřené od teoretické hmoty je akceptována hodnota 5 ppm (parts per million). Konfirmace identity nalezených látek probíhá na základě přítomnosti specifických molekulových fragmentů, tedy míry shody naměřených MS/MS fragmentů s teoretickými nebo v databázi nalezenými MS/MS fragmenty konkrétních molekul.



Obrázek č. 3: VIP plot prezentující výsledky PLS-DA analýzy souboru vzorků v pozitivním módu ionizace.

3.8 PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY METODY

3.8.1 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody byla stanovena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) odezev detekovaných iontů charakteristických markerů, získaných z opakovaných analýz ($n=6$). Hodnoty RSD se pro všechny ionty pohybovaly v rozmezí 2-10 %.

3.8.2 Selektivita metody

Technika U-HPLC–HRMS umožňuje účinnou separaci, ionizaci a detekci širokého spektra látek. Výjimku tvoří sloučeniny s molekulární hmotností vyšší než přibližně 1200 Da a některé vysoce polární nebo naopak nepolární látky. Selektivita metody je určena rozlišovací schopností (RP) hmotnostního spektrometru, která se u hmotnostních analyzátorů umožňujících měření při vysoké rozlišovací schopnosti mění s hodnotou m/z iontů. V případě hmotnostního analyzátoru typu kvadrupól-analyzátor doby letu (Q-TOF), se RP snižuje s rostoucí hodnotou m/z . Pro m/z 321 RP odpovídá FWHM > 31000 v obou polaritách.

3.8.3 Robustnost metody

Během zavádění metody byly identifikovány takové fáze pracovního postupu, které mohou výrazně ovlivnit výsledek stanovení. Jedná se především o operace související s instrumentální koncovkou.

- Před vlastní analýzou vzorků nechat promýt analytickou kolonu a vyčkat na dosažení požadovaných parametrů (teplota, tlak, průtok, složení mobilní fáze) systému, cca 30 min.
- Analýzu zahájit opakovaným nástřikem téhož vzorku (min. třikrát), první nástřik slouží k provozní verifikaci systému.
- V případě měření metodou U-HPLC–Q-TOF-MS je vhodné používat tzv. kontrolní vzorek (směsný vzorek extraktů všech analyzovaných vzorků) a jeho analýzu provádět opakovaně na začátku sekvence, během sekvence (v pravidelných intervalech) a na konci sekvence = kontrola stability podmínek během měření vzorků (retenční čas, intenzita jednotlivých látek, přesnost hmoty).
- Pro zajištění přesného měření hmotnostním detektorem typu Q-TOF v průběhu celé sekvence je nutné detektor před začátkem analýzy kalibrovat a kalibraci automaticky opakovat podle potřeby každých 5-10 vzorků.

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika umožňuje provést rychlou a citlivou analýzu vhodnou k autentikaci brusnice brusinky a výrobků z ní připravených. Unikátnost vyvinutého postupu analýzy metabolického fingerprintu tkví ve způsobu detekce pomocí vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie. Dosavadní publikované metody pro extrakci a analýzu biologicky aktivních látek v rostlinných matricích jsou většinou zaměřeny na kvantitativní extrakci a analýzu jednotlivých skupin látek (sacharidy / polyfenoly / karotenoidy / steroly / mastné kyseliny / atd.), kdy je využíván specifický způsob přípravy vzorku (extrakce, derivatizace, přečištění, atd.). Pro detekci jsou často využívány konvenční typy detektorů (UV, DAD, FID, aj.) [3, 4, 8].

Výhoda metodiky komplexního necílového fingerprintingu frakcí extraktů metodou U-HPLC–HRMS a následná identifikace zájmových látek spočívá především v množství informací obsažených v hmotnostních spektrech (veškeré ionizovatelné sloučeniny v oblasti molekulových hmot od 50 do 1200 Da). Vyvinutá metodika přináší nový způsob analýzy pomocí „fingerprintingu“ celkového metabolomu s využitím ultra-účinné kapalinové chromatografie spojené s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (U-HPLC–HRMS) s ionizací elektrosprejem. Tato inovativní metodika analýzy metabolomu ovoce poskytuje také možnost zpětného prohledávání dat a dodatečné identifikace původně necílené sloučeniny, což žádná z výše zmíněných konvenčních metod neumožňuje.

5 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Uvedená metodika umožňuje rychlé vyšetření komplexního metabolomu brusnice brusinky a klikvy velkoplodé, ale je aplikovatelná i na jiné matrice, např. ostatní bobulovité ovoce a výrobky z něj. Metoda byla primárně vyvinuta pro účely projektu **QJ1530272 – Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba – spotřebitel (2015-2018, MZE/QJ)**. Aplikace metody v rámci tohoto projektu významně přispěje k odlišení brusnice brusinky od klikvy velkoplodé, což bývá, především ve šťávách a jiných výrobcích, kde se plody nezanechávají v celku, často nelehký úkol.

Smluvním uživatelem metodiky je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). Certifikovanou metodiku bude využívat při screeningu výrobků s deklarovaným obsahem klikvy velkoplodé a brusnice brusinky. S ohledem na to, že provozní laboratoře (SZPI) nedisponují potřebným analytickým vybavením, předpokládá se pro analytickou část metodiky spolupráce s VŠCHT či instrumentálně odpovídajícím způsobem vybavenými komerčními laboratořemi formou služby. Uvedenou metodiku je vzhledem k jednoduchosti a rychlosti postupu také možné aplikovat v dalších státních i soukromých laboratořích a výzkumných centrech.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Výhoda výše popsané metodiky přímé analýzy extraktu červeného bobulového ovoce metodou U-HPLC–HRMS spočívá především v jednoduché přípravě vzorku bez nutnosti použití zdlouhavých postupů. Další nespornou výhodou je využití ultra-účinné kapalinové chromatografie, která má oproti konvenční HPLC vyšší separační potenciál, umožňuje významné zkrácení doby analýzy, ale i snížení spotřeby rozpouštědel (methanol). To je výhodné jak z ekonomického (cena za 1 litr methanolu se pohybuje kolem 2 500 Kč), tak i z ekologického hlediska snížením množství odpadů. Při bilanci ekonomických aspektů bylo předpokládáno, že laboratoř, která chce uvedenou metodu zavést, již má zkušenosti s analýzou v systémech U-HPLC-HRMS a vlastní již také kapalinový chromatograf s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem. Implementace metody zahrnuje zjištění aktuálních pracovních charakteristik, zejména zjištění citlivosti a opakovatelnosti metody. Za předpokladu, že by bylo provedeno 20 verifikačních a kontrolních analýz, přičemž režijní provozní náklady na jednu analýzu by byly 1 400 Kč, celkové náklady na implementaci by se rovnaly 28 tis. Kč.

Biochemická metoda PCR je oproti technice U-HPLC–HRMS časově náročnější (v první fázi stanovení je zapotřebí izolace a čištění DNA), jsou nezbytná speciální rozpouštědla, jejichž spotřeba je vyšší. Zároveň je třeba speciálního sterilního materiálu. Podle ceníku zkušební laboratoře pro identifikaci GMO a DNA fingerprinting (VÚRV Praha v.v.i.) se ceny analýzy pohybují mezi 5 000 – 15 000 Kč (bez DPH). Celkové náklady na zde navrženou metodu by neměly překročit 2 500 Kč, což znamená úsporu nejméně 2 500 Kč na analýzu. Při zpracování 100 vzorků ročně je úspora 250 tis. Kč. Jak ale již bylo uvedeno, informační (diagnostická) hodnota výsledků je v případě U-HPLC-HRMS vyšší.

Ekonomicky významným přínosem je podstatné zvýšení účinnosti kontroly dodržování nařízení (ES) č. 1169/2011 a nařízení (ES) č.178/2002. Dalším přínosem je zvýšení důvěry veřejnosti k potravinám a doplňkům stravy, které obsahují biologicky účinné látky pocházející z jednoznačně deklarovaných bobulovin. Ekonomické přínosy očekávané v této oblasti nelze však přesně kvantifikovat.

7 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

1. Howell, A.B., *Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(6): p. 732-737.
2. Singh, I., et al., *Effect of oral cranberry extract (standardized proanthocyanidin-A) in patients with recurrent UTI by pathogenic E. coli: a randomized placebo-controlled clinical research study*. Int Urol Nephrol, 2016. **48**(9): p. 1379-1386.
3. Grace, M.H., et al., *Comparative Analysis of Phenolic Content and Profile, Antioxidant Capacity, and Anti-inflammatory Bioactivity in Wild Alaskan and Commercial Vaccinium Berries*. J Agric Food Chem, 2014. **62**(18): p. 4007-4017.
4. Kylli, P., et al., *Lingonberry (Vaccinium vitis-idaea) and European Cranberry (Vaccinium microcarpon) Proanthocyanidins: Isolation, Identification, and Bioactivities*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(7): p. 3373-3384.
5. Wishart, D.S., *Metabolomics: applications to food science and nutrition research*. Trends Food Sci Technol, 2008. **19**(9): p. 482-493.
6. Rubert, J., et al., *Advances in high-resolution mass spectrometry based on metabolomics studies for food – a review*. Food Addit Contam A, 2015. **32**(10): p. 1685-1708.
7. Lee, T.S., et al., *Precursor mass prediction by clustering ionization products in LC-MS-based metabolomics*. Metabolomics, 2013. **9**(6): p. 1301-1310.
8. Rui, L., et al., *Anthocyanin composition and content of the Vaccinium uliginosum berry*. Food Chem, 2011. **125**(1): p.116-120.

8 SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH METODICE

Vzhledem k novosti postupu využitého v této metodice nebyly zatím řešitelským pracovištěm Ústavu analýzy potravin a výživy publikovány na dané téma zde popsané postupy ani výsledky. Původní publikace výsledků v odborném časopise je v přípravě.

AUTOŘI A OPONENTI

Metodu zpracovali:

Ing. Kamila Hůrková, Doc. Ing. Milena Stránská, Ph.D., prof. Ing. Vladimír Kocourek, CSc., prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,

Ústav analýzy potravin a výživy, FPBT

Technická 3, 166 28 Praha 6 - Dejvice

Oponenti:

1) **Ing. Martin Kubík**, Inspektorát SZPI v Praze, NRL

Za Opravnou 300/6, 150 00 Praha – Motol

2) **Doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.**, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

Autoři metodiky (procentuální podíl na vypracování metodiky):

Kamila Hůrková (25 %), Milena Stránská (25 %), Vladimír Kocourek (25 %), Jana Hajšlová (25 %)

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika necílové hmotnostně spektrometrické analýzy (fingerprinting) a metabolického profilování pro odhalení jednotlivých druhů a poddruhů ovoce v ovocných výrobcích

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Rok vydání: 2017

Počet stran: 24

Vydání: první



OVĚŘOVACÍ DOLOŽKA KONVERZE DOKUMENTU

Ověřuji pod pořadovým číslem 2017-9-1412-70784, že tento dokument označený v rámci organizace identifikátorem SZPI7102A7057, který vznikl převedením vstupu v elektronické podobě do podoby elektronické, skládající se z 24 listu(ů), se doslovně shoduje s obsahem vstupu.

Zajišťovací prvek:

Ověřující osoba:

Vystaveno dne:

Vystavil:

Původní dat. formát:

Mgr. Švomová Pavla
2017-12-18 12:48:58
SZPI, Podatelna ÚI
Květná 15, 603 00 Brno
pdf