



**VYSOKÁ ŠKOLA  
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
V PRAZE**

**Fakulta potravinářské a biochemické technologie  
Ústav analýzy potravin a výživy**

# **UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

**Leoš Uttl, Kamila Hůrková, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová**

**Metodika necílové hmotnostně spektrometrické  
analýzy (fingerprintingu) a metabolického profilování  
pro posouzení autenticity vína**

**Praha, listopad 2017**

## Dedikace:

*Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky v rámci řešení projektu NAZV 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 .....                                                      | 8  |
| 3.2.1 | U-HPLC–QTOF-MS .....                                                      | 8  |
| 3.3   | Chemikálie, analytické standardy a spotřební materiál.....                | 8  |
| 3.4   | Přístroje a zařízení.....                                                 | 9  |
| 3.5   | Použitý software.....                                                     | 9  |
| 3.6   | Pracovní postup.....                                                      | 9  |
| 3.6.1 | Příprava vzorku.....                                                      | 9  |
| 3.6.2 | Kontrola kvality .....                                                    | 10 |
| 3.7   | Podmínky pořízení metabolomických „fingerprintů“ pomocí U-HPLC-HRMS ..... | 10 |
| 3.8   | Detekce a konfirmace specifických markerů .....                           | 12 |
| 3.8.1 | U-HPLC-HRMS analýza .....                                                 | 12 |
| 3.8.2 | Multivariační statistická analýza metabolomických dat .....               | 12 |
| 3.8.3 | Identifikace charakteristických markerů.....                              | 16 |
| 3.9   | Pracovní charakteristiky metody.....                                      | 18 |
| 3.9.1 | Opakovatelnost metody .....                                               | 18 |
| 3.9.2 | Selektivita metody .....                                                  | 18 |
| 3.9.3 | Robustnost metody .....                                                   | 18 |
| 4     | Srovnání novosti postupů .....                                            | 19 |
| 5     | Popis uplatnění certifikované metodiky .....                              | 20 |
| 6     | Ekonomické aspekty.....                                                   | 21 |
| 7     | Seznam související použité literatury .....                               | 22 |
| 8     | Seznam publikací, které předcházely metodice.....                         | 23 |
|       | AUTOŘI A OPONENTI.....                                                    | 24 |

## 1 Cíl metodiky

Jedním z dílčích cílů projektu QJ1530272 podporovaného Ministerstvem zemědělství České republiky bylo vyvinout metodu umožňující autentikaci vín podel odrůdy, ze které byla vyrobena. Vycházelo se z předpokladu, že pro jednotlivé odrůdy jsou charakteristické profily fenolických látek a dalších středně polárních metabolitů, a proto byly tyto izolovány ze vzorku ethylacetátem. Zakoncentrované extrakty vzorků vína různých odrůd (tři odrůdy bílého a tři odrůdy červeného) z rozdílných lokalit a odlišných let sklizně byly následně analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí (U-HPLC-HRMS). Generovaná primární data, tj. detekované sloučeniny charakterizované retenčním časem, přesnou hmotou, izotopovým vzorem a intenzitou, byla poté využita k vytvoření chemometrických modelů, jejíž kvalita je dána rozpoznávací a predikční schopností. Chemometrické modely byly zároveň využity pro identifikaci charakteristických markerů pro jednotlivé odrůdy.

Vypracovaná metodika je určena k využívání v kontrolních laboratořích dozorových orgánů při laboratorní kontrole odrůdové autenticity vína.

## 2 Teoretický úvod

V dnešní době představuje víno běžnou součástí spotřebitelského koše. Poptávka po něm dlouhodobě stoupá, čemuž odpovídá i nárůst jeho celosvětové produkce za posledních deset let o 8,6 %. Doložena je však řada případů, kdy je víno falšováno, s cílem dosáhnout ekonomického profitu. Jako příklad falšování lze uvést ředění vína vodou, aromatizaci, barvení, nesprávné uvádění geografického původu a v neposlední řadě existují případy, kdy je deklarována jiná odrůda. Proto je důležitá kontrola autenticity těchto produktů, ke které se (mimo řady dalších „zavedených“ analytických metod) stále častěji využívá dvou nových metabolomických přístupů, necílového metabolomického „fingerprintingu“ a metabolomického profilování.<sup>1,2</sup>

Víno představuje komplexní směs látek. Jeho hlavními složkami jsou voda, ethanol a cukry, nicméně obsahuje i řadu dalších minoritně zastoupených organických a anorganických složek. Klíčovou roli mezi těmito látkami hrají polyfenoly. Jedná se o širokou skupinu sekundárních metabolitů běžně přítomných v rostlinách. Hrozny a víno obsahují velké množství těchto látek; lze je dělit do čtyř hlavních skupin: fenolické kyseliny a jejich deriváty, flavonoidy, anthokyany a taniny. Polyfenoly mají významný vliv na výsledné sensorické vlastnosti vína (např. barvu, chuť, hořkost a trpkost). Jejich koncentrace je značně ovlivněna mnoha různými faktory, např. odrůdou hroznů, zralostí, klimatickými podmínkami, geografickým původem hroznů, rokem sklizně či technologickým procesem výroby vína.<sup>2-5</sup>

Při detekci falšování vína je obvykle aplikován jeden ze dvou přístupů: buď je prokázána přítomnost cizorodé látky (markeru), která v autentickém vzorku vína není běžně přítomna, nebo je analýza zaměřena na nalezení významných odchylek koncentrací ve víně se vyskytujících látek (oproti očekávaným hodnotám). Druhý uvedený způsob je často realizován v kombinaci se statistickým zpracováním dat, kde při významné odchylce v koncentraci (nebo častěji kombinaci několika odchylek) jsou takovéto vzorky odlehle od souboru vzorků autentických. V praxi jsou oba tyto přístupy běžně využívány.<sup>6,7</sup>

Výše zmíněná metabolomická analýza se zabývá jak cílovou, tak necílovou analýzou. Zaměřuje se na komplexní a rychlou detekci malých molekul (< 1500 Da) – metabolitů přítomných v biologických systémech. Metabolomická analýza je realizovaná pomocí vysokorozlišovací tandemové hmotnostní spektrometrie (HRMS/MS) ve spojení s ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (U-HPLC). Hmotnostní detektory vybavené analyzátozem typu orbitrap nebo analyzátozem doby letu (TOF) umožňují identifikaci látek na základě přesné hmoty mateřského iontu a izotopového vzoru, ze kterých je možno určit elementární složení dané látky. 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 a je použit i v této metodice.<sup>1,2,8-11</sup>

### 3 Vlastní popis metodiky

#### 3.1 Použitelnost metody

Aplikace metabolomického „fingerprintingu“ pro autentikaci vín na základě odrůdy révy vinné se v této oblasti analýzy potravin jeví jako velmi perspektivní metoda, kdy se pro vzájemné odlišení využívá komplexní analýzy metabolitů vyextrahovaných do ethylacetátu. Získaný záznam/„fingerprint“ slouží k možné diferenciaci vzorků a zároveň je možné s jeho pomocí stanovit autenticitu (odrůdovou pravost) daného vzorku. Na základě dat získaných metodou metabolomického „fingerprintingu“ byly prostřednictvím chemometrického zpracování sestaveny modely, které je možno použít právě k ověření deklarované odrůdy vzorků vína. Analyzovány byly vzorky červeného vína (41) odrůd Rulandské modré, Svatovavřínecké a Modrý Portugal a vzorky bílého vína (44) odrůd Ryzlink rýnský, Rulandské šedé a Tramín červený. Jednalo se o ročníky 2009-2016. Nejhojněji byl zastoupen ročník 2015. Výsledkem tak byly velmi robustní modely s dostatečnou vypovídající hodnotou, použitelné pro rychlou a spolehlivou autentikaci vína na základě rozpoznání použité odrůdy révy vinné. Samozřejmě, že v praxi, při rozšíření strategie na další odrůdy a další typy vzorků by se postupovalo genericky.

## 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 módu a detekovatelných technikou ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem typu kvadrupól - analyzátor doby letu (U-HPLC–QTOF-MS), v ethylacetátových extraktech vzorků vína. Vzhledem k selektivnímu postupu extrakce se jedná především o fenolické látky. S využitím multivariační statistické analýzy slouží získaný „fingerprint“ k možné diferenciaci vzorku a stanovení jeho autenticity resp. ověření pravosti deklarované odrůdy. Na základě měření přesné hmoty, znalosti sumárního vzorce a informací dostupných z odborné literatury je možná předběžná identifikace vybraných iontů.

### 3.2.1 U-HPLC–QTOF-MS

- Kapalný vzorek je nejprve pomocí autosampleru přenesen do nástřikového ventilu a následně LC systémem unášen na chromatografickou kolonu, kde probíhá separace analytů. Následně jsou analyty podrobeny ionizaci (elektrosprej, ESI) a vzniklé ionty transportovány do hmotnostního spektrometru. Výstupem měření je chromatogram obsahující hmotnostní spektra vzorku. Zpracování naměřených dat je realizováno ve specializovaných softwarech PeakView, MarkeView, MasterView (SCIEX, Německo) a SIMCA (UMETRICS, Švédsko).

## 3.3 Chemikálie, analytické standardy a spotřební materiál

- methanol, gradient grade for LC (Merck KGaA, Německo)
- deionizovaná voda (zařízení Milli-Q, Millipore, Německo)
- ethylacetát, gradient grade for LC (Fluka Analytical, Švýcarsko)
- mravenčan amonný, čistota 99,9 %, (Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina mravenčí, for mass spectrometry - 98 %, (Sigma-Aldrich, Německo)
- kalibrační roztok APCI Calibration Solution (SCIEX, Kanada)
- technický plyn: dusík (99,994 %), Technoplyn (ČR)
- 15 ml plastové centrifugační zkumavky PP, (Merci, Česká republika)
- vialky, septa, víčka a další příslušenství, (Labicom s.r.o., Česká republika)
- běžné laboratorní sklo a vybavení

- špičky Finntip, (Analytika, Česká republika)
- indikátorové papírky (Erba Lachema s.r.o., Česká republika)

### 3.4 Přístroje a zařízení

#### *Příprava vzorku:*

- automatické pipety (TraffLab-Transferpette®, Švýcarsko)
- centrifuga Rotina 35R (HettichZentrifugen, Německo)
- přístroj na přípravu deionizované vody Milli-Q (Merck Millipore, Německo)
- suchý termostat pro odpařování rozpouštědel ze vzorků Digital Dry Bath (Benchmark Scientific, USA)

#### *Instrumentální stanovení systémem U-HPLC-HRMS:*

- kapalinový chromatograf U-HPLC DionexUltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- hmotnostní spektrometr TripleTOFTM 6600 (SCIEX, Kanada)
- analytická kolona HSS T3 (2,1x100 mm, 1,8 µm), (Waters, USA)

### 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
- SIMCA verze 13.0, UMETRICS, Švédsko
- Chromeleon™ verze 7.1, ThermoFischer SCIENTIFIC, USA

*Poznámka: přístroje a zařízení uvedených dodavatelů, které byly použity pro tuto metodu, lze použít i od alternativních dodavatelů, pokud jsou pro daný účel vhodné. Vhodnost musí být dokumentována při implementaci metody v konkrétních podmínkách.*

### 3.6 Pracovní postup

#### *3.6.1 Příprava vzorku*

Použitý extrakční postup, zaměřený především na fenolické látky, představuje modifikovanou variantu extračního postupu dříve vyvinutého na Ústavu analýzy potravin a výživy.<sup>8</sup> 4 ml vzorku jsou odebrány do 15 ml plastové centrifugační kyvety. Následně se přidají 4 ml okyselené vody (deionizovaná voda s kys. mravenčí, pH = 2) a 4 ml ethylacetátu. Obsah každé kyvety je po dobu 3 minut třepán a následně odstředěn centrifugou (5 °C, 5 min,

10 000 min<sup>-1</sup>). Po odstředění jsou odebrány 3 ml organické fáze, převedeny do 4ml tmavých vialek a vysušeny mírným proudem dusíku. Odparek je dále rozpuštěn v 500 µl rozpouštědla (směs methanolu a vody v poměru 50:50 (v/v)). Výsledný extrakt je převeden do 2 ml tmavé vialky a tím připraven k analýze. Celý proces přípravy vzorků se odehrává ve tmě (vzorky jsou v každém kroku extrakce zakryty hliníkovou fólií).

### 3.6.2 Kontrola kvality

Kromě vzorků vína je nutné připravit vzorky pro kontrolu kvality měřených dat (*quality control*, QC), které slouží k ověření, že měření v průběhu celé sekvence proběhla za stejných podmínek a zda jsou tedy získaná data konzistentní. V případě metabolomických studií se jedná o směs analyzovaných vzorků, ve které by měly být obsaženy ionty přítomné ve všech analyzovaných vzorcích. V případě vzorků vína je z každého vzorku odebráno 20 µl extraktu a převedeno do jedné 2 ml tmavé vialky (zvlášť pro červená a bílá vína). Takto připravené vialky slouží jako QC vzorky a jsou analyzovány spolu se vzorky vína v průběhu sekvence.

## 3.7 Podmínky pořízení metabolomických „fingerprintů“ pomocí U-HPLC-HRMS

Pro pořízení metabolomického „fingerprintu“ je využita ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií s hybridním analyzátozem kvadrupól – analyzátor doby letu částic (HR-QTOFMS).

Podmínky měření extraktů vína jsou uvedeny v **tabulkách I a II** pro kapalinovou chromatografii a v **tabulce III** pro hmotnostní spektrometrii.

**Tab. I:** Podmínky LC separace

| LC                          |                                                             |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>Teplota kolony</b>       | 45 °C                                                       |
| <b>Objem nástřiku</b>       | 4 µl                                                        |
| <b>Teplota autosampleru</b> | 5 °C                                                        |
| <b>Kolona</b>               | HSS T3 (2,1x100 mm, 1,8 µm)                                 |
| <b>Mobilní fáze</b>         | A - 5 mM mravenčan amonný ve vodě + 0,1 % kys. mravenčí     |
|                             | B - 5 mM mravenčan amonný v methanolu + 0,1 % kys. mravenčí |

**Tab. II:** Gradient mobilní fáze (ESI+)

| Čas   | Průtok   | A   | B   |
|-------|----------|-----|-----|
| [min] | [ml/min] | [%] | [%] |
| 0     | 0,4      | 95  | 5   |
| 1     | 0,4      | 95  | 5   |
| 11    | 0,55     | 0   | 100 |
| 12    | 0,6      | 0   | 100 |
| 12,1  | 0,4      | 95  | 5   |
| 14    | 0,4      | 95  | 5   |

**Tab. III:** Podmínky MS detekce

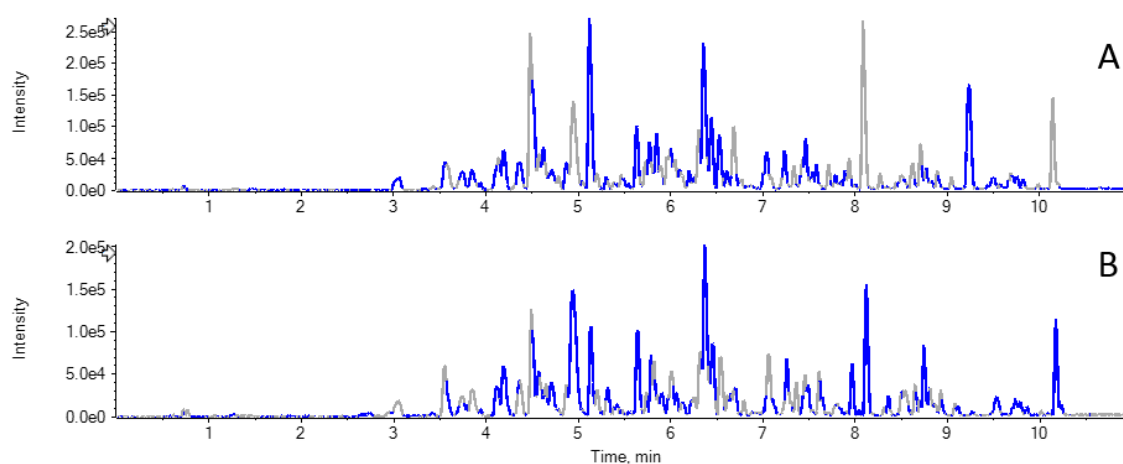
| MS                                        |                                                                  |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>Iontový zdroj</b>                      | Duo Spray <sup>TM</sup> s oddělenými ESI a APCI iontovými zdroji |
| <b>Ionizační technika</b>                 | ESI +                                                            |
| <b>Teplota iontového zdroje</b>           | 480 °C                                                           |
| <b>Napětí na kapiláře</b>                 | +5000 V                                                          |
| <b>Rozsah snímaných hmot (<i>m/z</i>)</b> | 100 – 1200                                                       |
| <b>Kolizní energie</b>                    | 35 ± 15 eV                                                       |
| <b>Tlak nebulizačního plynu</b>           | 50 psi (345 kPa)                                                 |
| <b>Tlak sušícího plynu</b>                | 50 psi (345 kPa)                                                 |
| <b>Dosažené rozlišení</b>                 | FWHM > 31000 ( <i>m/z</i> 321,0192)                              |

Pro kontrolu stability podmínek systému (intenzita píků, retenční časy a přesnost hmoty) je nutné vždy na začátku každého setu měření zanalyzován vzorek pro kontrolu kvality (QC) v 15 opakováních, a dále pak v 1 opakování po každých deseti vzorcích. Automatická kalibrace *m/z* je prováděna kalibračními roztoky vždy po změření 10 vzorků pomocí kalibračního dávkovacího systému (CDS).

### 3.8 Detekce a konfirmace specifických markerů

#### 3.8.1 U-HPLC-HRMS analýza

Extrakty vzorků jsou za výše uvedených podmínek vyšetřeny v pozitivním módu ionizace. Získané „fingerprinty“ ethylacetátových extraktů různých odrůd vína jsou bohaté, avšak na první pohled se od sebe příliš neliší (viz **Obrázek 1**), proto je nutno vzít do úvahy poměry normalizovaných relativních intenzit jednotlivých iontů/látek, které vykazují známky odlišnosti, a jsou tak klíčové pro odlišení vzorků. Získaná data jsou zpracována pomocí statistických chemometrických analýz, jejichž výsledky jsou ukázány níže (**Obrázek 2-5**). Identifikace a rozbor důležitých látek je rovněž popsán níže (kapitola 3.8.3).



**Obr. 1:** Ukázka U-HPLC–ESI-HRMS „base peak“ chromatogramu (BPC) dvou vzorků vína (A – oblast Čechy, podoblast Litoměřická, ročník 2013; B - oblast Morava, podoblast Slovácká, ročník 2014) odrůdy Rulandské modré, měřeného v pozitivním módu ionizace

#### 3.8.2 Multivariační statistická analýza metabolomických dat

Data získaná U-HPLC-HRMS analýzou je dále nutné zpracovat. Ke zpracování a interpretaci vícerozměrných dat získaných během metabolomických analýz se využije metody multivariační chemometrické analýzy, nejčastěji analýzy hlavních komponent (*principal component analysis*, PCA). Tato statistická metoda umožňuje prozkoumat strukturu komplexních dat. Při tvorbě statistických modelů pro klasifikaci neznámých vzorků lze pak uplatnit například diskriminační analýzu nejmenších čtverců (*partial least squares discriminant analysis*, PLS-DA).

V případě této metodiky bylo zpracování dat prováděno automaticky pomocí dostupného softwaru MarkerView, který obsahuje podprogramy (komponenty) pro zpracování

dat i statistické zpracování. Proces zpracování dat sestával z několika dílčích kroků: vyhledání píků pomocí automatického algoritmu; „alignment“ resp. mezivzorkové sjednocení retenčních časů a přesných hmot detekovaných látek; odstranění izotopických hmot a odečtení látek přítomných ve slepých vzorcích. Takto je získána matice dat, obsahující seznam naměřených iontů, charakterizovaných retenčním časem, přesnou hmotou, intenzitou a „nábojovým stavem“ (monoizotopický či izotopický). V případě bílých vín bylo detekováno 657 iontů a v případě červených vín 1023 iontů. Následně bylo použito Paretovo odstupňování (Pareto scaling) a provedena analýza hlavních komponent (PCA). Po zprocesování byla data normalizována na celkovou sumu ploch. Takto byly získány grafy komponentních vah a grafy komponentního skóre.

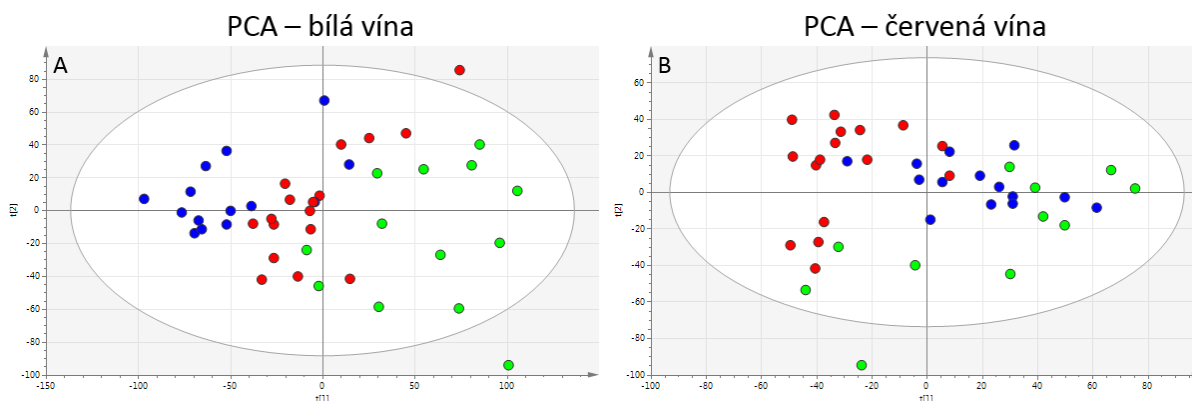
Data byla dále podrobena t-testu, prostřednictvím kterého bylo zjištěno, jak významně se každá proměnná (resp. iont) podílí na rozlišení zkoumaných skupin (resp. odrůd vína). Tento parametr je vyjádřen jako hodnota  $p$  (p-value). Čím nižší tato hodnota je, tím významněji se daná proměnná podílí na diferenciaci zkoumaných skupin. Pro další práci s výsledky byly vybrány ionty s hodnotou  $p \leq 0,05$ . Zbylé ionty, které pro rozdělení jednotlivých skupin nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ), byly odstraněny. Množství statisticky významných iontů se v případě bílých vín pohybovalo v rozmezí 45-58 iontů a v případě červených vín v rozmezí 55-108 iontů (v závislosti na porovnávané dvojici odrůd).

Statisticky významné ionty byly dále exportovány do softwaru SIMCA, který umožňuje lepší zpracování dat a vizualizaci výsledků. Zde byla provedena diskriminační analýza nejmenších čtverců (PLS-DA). Vytvořeno bylo celkem šest PLS-DA modelů, tři pro bílá (**obrázek 3**) a tři pro červená vína (**obrázek 4**). Kvalita modelů byla hodnocena na základě hodnot komponentních vektorů  $R^2X$  (podíl variability proměnných  $X$  vysvětlených v modelu),  $R^2Y$  (podíl variability proměnných  $Y$  vysvětlených v modelu) a  $Q^2$  (parametr prediktivní schopnosti). Obecně platí, že hodnota  $QY^2$  vyšší než 0,5 naznačuje dobrou kvalitu modelu a hodnota  $QY^2$  vyšší než 0,9 pak excelentní model. Hodnota  $RY^2$  by měla být vždy vyšší, než hodnota  $QY^2$ . Hodnoty parametrů  $R^2X$ ,  $R^2Y$  a  $Q^2$  vytvořených PLS-DA modelů jsou uvedeny v **tabulce IV**.

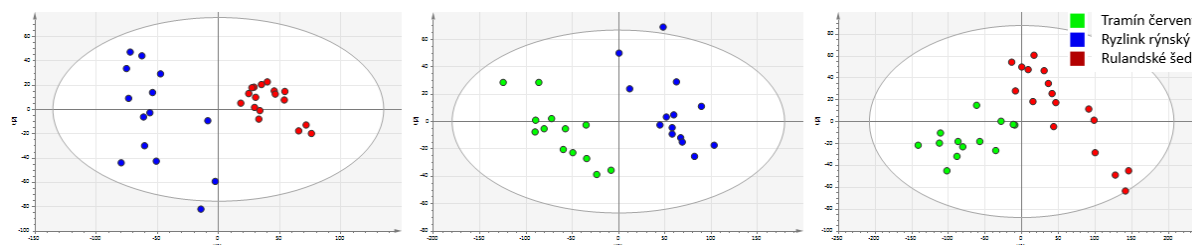
Po získání uvedených PLS-DA modelů byla provedena jejich validace. Po získání uvedených PLS-DA modelů byla provedena jejich validace. Jednalo se o interní validaci, tzv. cross-validaci, která byla provedena v pěti cyklech. Validací modelů byly zjištěny rozpoznávací a predikční schopnosti. Rozpoznávací schopnost znázorňuje procentuální úspěšnost správně zařazených vzorků analyzovaného souboru do příslušné skupiny. Predikční schopnost udává procentuální úspěšnost správného zařazení nově testovaného vzorku. V optimálním případě by

obě tyto hodnoty měly dosahovat 100%. Obě zmíněné schopnosti by tedy měly být co nejvyšší. Hodnoty rozpoznávacích a predikčních schopností vytvořených PLS-DA modelů jsou uvedeny v **tabulce V**.

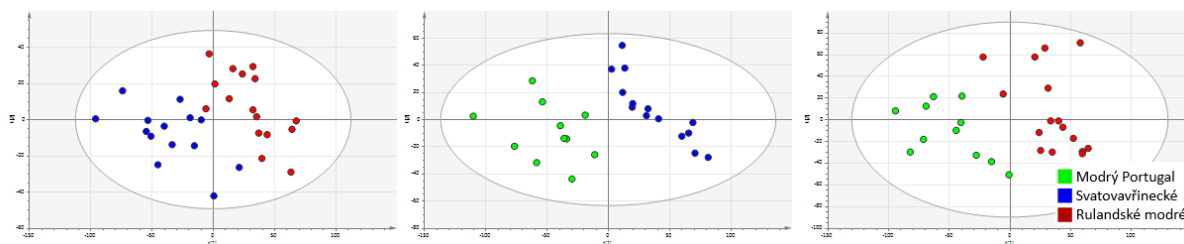
Na **Obrázku 5** je ukázán příklad grafu komponentních vah. Tento graf ukazuje, které látky jsou odpovědné za pozorované rozdělení vzorků. Obecně platí, že čím je marker odlehlejší od středu, tím je významnější a má větší podíl na oddělení vzorků. Všechny tyto nejdůležitější ionty tzv. markery jsou shrnuty v **tabulce VI** a **VII** (kapitola 3.8.3).



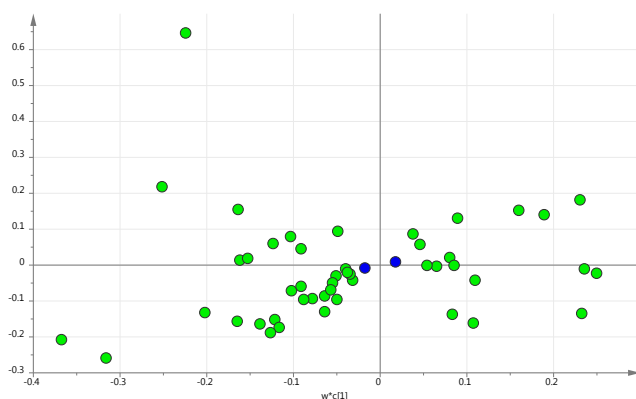
**Obrázek 2:** PCA analýza dat z metabolomického „fingerprintingu“ ethylacetátových extraktů: (A) bílého vína odrůd Ryzlink rýnský (modrá barva), Rulandské šedé (červená barva) a Tramín červený (zelená barva), (B) červeného vína odrůd Svatovavřínecké (modrá barva), Rulandské modré (červená barva) a Modrý Portugal (zelená barva), pozitivní mód ionizace (ESI+).



**Obrázek 3:** PLS-DA analýza dat z metabolomického „fingerprintingu“ ethylacetátových extraktů bílého vína odrůd Ryzlink rýnský (modrá barva), Rulandské šedé (červená barva) a Tramín červený (zelená barva), pozitivní mód ionizace (ESI+).



**Obrázek 4:** PLS-DA analýza dat z metabolického „fingerprintingu“ ethylacetátových extraktů červeného vína odrůd Svatovavřínecké (modrá barva), Rulandské modré (červená barva) a Modrý Portugal (zelená barva), pozitivní mód ionizace (ESI+).



**Obrázek 5:** Příklad loading scatter plot prezentující výsledky ze statistické analýzy PLS-DA (bílé víno, Ryzlink rýnský a Rulandské šedé), graf rozložení váhy jednotlivých iontů/láték tzv. markerů.

**Tab. IV:** Hodnoty parametrů  $R^2X$ ,  $R^2Y$  a  $Q^2$  vytvořených PLS-DA modelů

| Odrůdy vína                       | $R^2X$ | $R^2Y$ | $Q^2$ |
|-----------------------------------|--------|--------|-------|
| Ryzlink rýnský x Rulandské šedé   | 0,45   | 0,89   | 0,81  |
| Tramín červený x Ryzlink rýnský   | 0,48   | 0,91   | 0,79  |
| Tramín červený x Rulandské šedé   | 0,68   | 0,88   | 0,78  |
| Modrý Portugal x Rulandské modré  | 0,49   | 0,81   | 0,67  |
| Svatovavřínecké x Modrý Portugal  | 0,48   | 0,86   | 0,65  |
| Svatovavřínecké x Rulandské modré | 0,40   | 0,79   | 0,51  |

**Tab. V:** Hodnoty rozpoznávacích a predikčních schopností vytvořených PLS-DA modelů

| Odrůdy vína                       | Rozpoznávací schopnost [%] | Predikční schopnost [%] |
|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Ryzlink rýnský x Rulandské šedé   | 100                        | 96,7                    |
| Tramín červený x Ryzlink rýnský   | 100                        | 93,3                    |
| Tramín červený x Rulandské šedé   | 95,2                       | 93,3                    |
| Modrý Portugal x Rulandské modré  | 100                        | 93,3                    |
| Svatovavřínecké x Modrý Portugal  | 100                        | 92,0                    |
| Svatovavřínecké x Rulandské modré | 100                        | 76,7                    |

### 3.8.3 Identifikace charakteristických markerů

Body v grafu komponentních vah, které byly vyhodnoceny jako potenciální markery vinných odrůd, byly dále zkoumány. Byl sledován profil jejich odezvy v jednotlivých vzorcích. Látky, jejichž odezva byla závislá na zařazení vzorku do skupiny, byly dále identifikovány. Identifikace látek byla realizována pomocí pokročilých softwarů, jimiž je vybaven měřicí systém. Na základě přesné hmoty a izotopového vzoru jsou schopny navrhnout pravděpodobný sumární vzorec hledané látky. Spolu s přesnou hmotou je tato informace použita při vyhledávání v chemických databázích jako jsou, např. *ChemSpider* nebo *Metlin*. Jako maximální možná odchylka naměřené hmoty od teoretické hmoty je akceptována hodnota  $\pm 5$  ppm (parts per million). Při nízké intenzitě zkoumané látky lze ve vyjíměčných případech pracovat s hodnotou do  $\pm 10$  ppm. 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. Důležité markery pro odlišení zkoumaných odrůd vína a jejich sumární vzorce jsou vypsány v **tabulkách VI a VII**. Zároveň je u některých látek uvedena navržená identifikace.

**Tab. VI:** Identifikované markery jednotlivých odrůd vinné révy (bílá vína)

| RT [min] | <i>m/z</i> | sumární vzorec                                  | odchylka od přesné hmoty [ppm] | adukt               | identifikace                 | odrůda                          |
|----------|------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 3,60     | 313,0547   | C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>  | -2,3                           | [M+H] <sup>+</sup>  | kyselina kaftarová           | Ryzlink rýnský a Rulandské šedé |
| 4,46     | 349,0520   | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>  | -2,9                           | [M+Na] <sup>+</sup> | kyselina fertarová           | Ryzlink rýnský                  |
| 4,81     | 349,0898   | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>  | 1,2                            | [M+Na] <sup>+</sup> | glukosid kyseliny p-kumarové | Ryzlink rýnský                  |
| 5,93     | 363,0670   | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>  | -3,2                           | [M+Na] <sup>+</sup> | NI                           | Ryzlink rýnský                  |
| 6,26     | 451,1210   | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | -5,5*                          | [M+H] <sup>+</sup>  | dihydroquercetin 3-rhamnosid | Rulandské šedé a Tramín červený |
| 6,59     | 229,0868   | C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>  | 3,8                            | [M+H] <sup>+</sup>  | resveratrol                  | Ryzlink rýnský                  |
| 7,52     | 455,2235   | C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>  | -3,6                           | [M+Na] <sup>+</sup> | NI                           | Tramín červený                  |
| 7,80     | 485,1973   | C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>  | 7,9*                           | [M+Na] <sup>+</sup> | NI                           | Tramín červený                  |
| 8,02     | 353,1554   | C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>  | -4,7                           | [M+Na] <sup>+</sup> | NI                           | Tramín červený                  |
| 8,37     | 339,1761   | C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>  | -5,0                           | [M+Na] <sup>+</sup> | NI                           | Tramín červený                  |

\* látky s chybou hmoty vyšší než 5 ppm, způsobeno nízkou intenzitou iontů; NI - neidentifikováno

**Tab. VII:** Identifikované markery jednotlivých odrůd vinné révy (červená vína)

| RT [min] | <i>m/z</i> | sumární vzorec                                  | odchylka od přesné hmoty [ppm] | adukt               | identifikace                 | odrůda                            |
|----------|------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| 5,01     | 349,0884   | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>  | -2,8                           | [M+Na] <sup>+</sup> | glukosid kyseliny p-kumarové | Modrý Portugal                    |
| 5,59     | 453,2069   | C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>  | -5,7*                          | [M+Na] <sup>+</sup> | NI                           | Modrý Portugal                    |
| 6,01     | 213,0730   | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>   | -1,6                           | [M+Na] <sup>+</sup> | NI                           | Svatovavřínecké                   |
| 6,27     | 479,0807   | C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>13</sub> | -2,8                           | [M+H] <sup>+</sup>  | quercetin 3-O-glukuronid     | Modrý Portugal                    |
| 6,27     | 451,1225   | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> | -2,2                           | [M+H] <sup>+</sup>  | dihydroquercetin 3-rhamnosid | Rulandské modré a Svatovavřínecké |
| 6,80     | 319,0440   | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>  | -2,6                           | [M+H] <sup>+</sup>  | myricetin                    | Modrý Portugal                    |
| 6,90     | 727,2201   | C <sub>36</sub> H <sub>38</sub> O <sub>16</sub> | -4,3                           | [M+H] <sup>+</sup>  | NI                           | Modrý Portugal                    |

\* látky s chybou hmoty vyšší než 5 ppm, způsobeno nízkou intenzitou iontů; NI - neidentifikováno

### 3.9 Pracovní charakteristiky metody

#### 3.9.1 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody byla stanovena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) odezev detekovaných iontů charakteristických markerů, získaných z opakovaných analýz ( $n=5$ ). Hodnoty RSD se pro všechny ionty pohybovaly v rozmezí 2-10 %

#### 3.9.2 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.

#### 3.9.3 Robustnost metody

Během zavádění metody byly identifikovány takové fáze pracovního postupu, které mohou výrazně ovlivnit výsledek stanovení. Jedná se 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

Většinu způsobů falšování vína je dnes možno jednoznačně odhalit vhodnými analytickými postupy, mnohdy i rutinními. V případě autentikace odrůdy vína však zatím spolehlivý postup není k dispozici.

Předkládaná metodika optimalizuje postup dříve vyvinutý na Ústavu analýzy potravin a výživy.<sup>8</sup> Tento postup umožňuje provést rychlou a citlivou analýzu vhodnou k autentikaci vína na základě použité odrůdy hroznů. Využívá selektivní extrakce zaměřené především na fenolické látky ve spojení s U-HPLC-HRMS analýzou.

U-HPLC-HRMS technika je z hlediska dostupnosti běžně používanou instrumentací v laboratořích. Je velmi perspektivní pro metabolomické analýzy s cílem potvrzení autenticity vzorku. Současně je možno využít separace a pokročilé MS instrumentace k identifikaci specifických látek/markerů.

Výhoda vyvinuté metodiky spočívá především v množství informací obsažených v hmotnostních spektrech (veškeré ionizovatelné sloučeniny v oblasti molekulových hmot od 100 do 1200 Da). Metodika poskytuje spolehlivou kvalitativní i kvantitativní informaci a je robustní. Také umožňuje zpětné prohledávání dat a dodatečnou identifikaci původně necílené sloučeniny.

## 5 Popis uplatnění certifikované metodiky

Parametry a pracovní charakteristiky uvedené analytické metody, která je založená na principu U-HPLC-HRMS, jsou vhodné pro získání rychlé kvalitativní informace o autenticitě vína resp. jeho autentikaci na základě odrůdy révy vinné.

Metodika byla primárně vyvinuta pro účely projektu **QI1530272 - 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 potvrzení pravosti produktu, což bývá často nelehký úkol.

Smluvním uživatelem metodiky je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). Certifikovanou metodiku bude využívat při autentikaci vína na základě odrůdy révy vinné. 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

Výhodou výše popsané metodiky analýzy vína je využití ultra-vysokoúčinné 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 provozní náklady na jednu analýzu by byly 1400 Kč, celkové náklady na implementaci by se rovnaly 28 tis. Kč.

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. Ekonomické přínosy očekávané v této oblasti nelze však přesně kvantifikovat.

## 7 Seznam související použité literatury

- (1) Alanon, M. E.; Perez-Coello, M. S.; Marina, M. L. Wine science in the metabolomics era. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2015**, 74, 1-20.
- (2) Villano, C.; Lisanti, M. T.; Gambuti, A.; Vecchio, R.; Moio, L.; Frusciante, L.; Aversano, R.; Carputo, D. Wine varietal authentication based on phenolics, volatiles and DNA markers: State of the art, perspectives and drawbacks. *Food Control* **2017**, 80, 1-10.
- (3) Vaclavik, L.; Lacina, O.; Hajslova, J.; Zweigenbaum, J. The use of high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 685, 45-51.
- (4) Martelo-Vidal, M. J.; Vazquez, M. Polyphenolic Profile of Red Wines for the Discrimination of Controlled Designation of Origin. *Food Anal. Method* **2016**, 9, 332-341.
- (5) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D.: Phenolic Compounds. In *Handbook of Enology*; John Wiley & Sons, Ltd, **2006**; pp 141-203.
- (6) Čížková, H.; Ševčík, R.; Rajchl, A.; Pivoňka, J.; Voldřich, M. Trendy v autenticitě potravin a v přístupech k detekci falšování. *Chem. Listy* **2012**, 106, 903–910.
- (7) Alanon, M. E.; Perez-Coello, M. S.; Marina, M. L. Wine science in the metabolomics era. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2015**, 74, 1-20.
- (8) Rubert, J.; Lacina, O.; Fauhl-Hassek, C.; Hajslova, J. Metabolic fingerprinting based on high-resolution tandem mass spectrometry: a reliable tool for wine authentication? *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 6791-6803.
- (9) Rubert, J.; Zachariasova, M.; Hajslova, J. Advances in high-resolution mass spectrometry based on metabolomics studies for food - a review. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **2015**, 32, 1685-1708.
- (10) Lee, T. S.; Ho, Y. S.; Yeo, H. C.; Lin, J. P. Y.; Lee, D. Y. Precursor mass prediction by clustering ionization products in LC-MS-based metabolomics. *Metabolomics* **2013**, 9, 1301-1310.
- (11) Zhang, A. H.; Sun, H.; Wang, P.; Han, Y.; Wang, X. J. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst* **2012**, 137, 293-300.

## 8 Seznam publikací, které předcházely metodice

(1) Vaclavik, L.; Lacina, O.; Hajslova, J.; Zweigenbaum, J. The use of high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 685, 45-51.

(2) Rubert, J.; Lacina, O.; Faulstich, C.; Hajslova, J. Metabolic fingerprinting based on high-resolution tandem mass spectrometry: a reliable tool for wine authentication? *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 6791-6803.

## AUTOŘI A OPONENTI

### Metodu zpracovali:

**Ing. Leoš Uttl, Ing. Kamila Hůrková, 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 6, 150 00 Praha 5
- 2) **Ing. Jiří Urban**, ÚKZÚZ v Brně  
Hroznová 63/2, Brno, 65606

Autoři metodiky (procentuální podíl na vypracování metodiky):

**Leoš Uttl (30%), Kamila Hůrková (30%), Vladimír Kocourek (15%) Jana Hajšlová (25%)**

## **UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

**Metodika necílové hmotnostně spektrometrické analýzy (fingerprintingu) a metabolického profilování pro posouzení autenticity vína**

---

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

**Rok vydání:** 2017

**Počet stran:** 25