



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

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



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Vojtěch Hrbek, Klára Navrátilová, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová

**Ověření geografického původu zeleného čaje
pomocí metabolického fingerprintingu metodou
kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací
hmotnostní spektrometrií**

Praha, říjen 2017

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QJ1530272 (Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba-spotřebitel). Tato práce byla realizována také v “Operačním 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).

©Vojtěch Hrbek, Klára Navrátilová, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová, 2017

ISBN 978-80-7592-006-5

OBSAH

1	Cíl metodiky.....	4
2	Teoretický úvod	5
3	Vlastní popis metodiky	7
3.1	Použitelnost metody.....	7
3.2	Princip metody	9
3.3	Chemikálie, analytické standardy a spotřební materiál.....	10
3.4	Přístroje a zařízení.....	10
3.5	Pracovní postup.....	11
3.5.1	Příprava vzorku.....	11
3.5.2	Kontrola kvality	11
3.6	Podmínky pořízení fingerprintů pomocí U-HPLC-HRMS	11
3.7	Detekce a konfirmace specifických markerů	13
3.7.1	U-HPLC-HRMS analýza	13
3.7.2	Multivariační statistická analýza metabolomických dat	14
3.7.3	Selektivita metody	18
3.7.4	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 předcházejících metodice	23
	AUTOŘI A OPONENTI.....	24

1 Cíl metodiky

Dílčím cílem projektu QJ1530272 podporovaného Ministerstvem zemědělství České republiky bylo vyvinout metodu umožňující kontrolu autenticity zelených čajů resp. ověření geografického původu zelených čajů. Pro tento účel byla zvolena strategie metabolomického fingerprintingu využívající moderní analytickou techniku ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií.

Vypracovaná metodika bude dále předána pracovníkům kontrolních laboratoří pro možné využití při laboratorní kontrole geografického původu vzorků zelených čajů.

2 Teoretický úvod

Zelené čaje jsou velmi populární nápoje konzumované po celém světě nejen kvůli jejich senzorickým vlastnostem, ale také kvůli jejich farmakologickým účinkům. Doložena je však řada případů, kdy jsou tyto produkty falšovány s cílem dosáhnout ekonomického profitu. Proto je důležitá kontrola autenticity těchto produktů, ke které se stále častěji využívá necílová analýza, tzv. metabolomický fingerprinting.

Čaj je v dnešní době hned po vodě druhým nejčastěji požívaným nápojem na světě. Jeho nutriční hodnoty jsou minimální, avšak v lidské dietě tvoří důležitý zdroj antioxidantů, jelikož obsahuje vysoké množství fenolových sloučenin, zvláště flavonoidů¹.

Botanicky se pravý čaj, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, dále dělí na dvě variety: čínskou (var. *sinensis*) a indickou (var. *assamica*). Čínská varieta je rostlina s malými lístky původem z Číny, která je pěstovaná na severovýchodě Asie, kde panuje chladnější klima. Varieta indická má naopak větší listy, byla objevena v Indii v Assamu a roste spíše v subtropických podmínkách. Zatímco *assamica* se využívá spíše pro produkci černého čaje, většina variety *sinensis* se zpracovává na čaj zelený².

Zelený čaj je konzumován celosvětově, jakkoli největší oblibě se těší tradičně ve východní Asii, zvláště v Číně a Japonsku, kde často převyšuje spotřebu čaje černého. V zelených čajích neprobíhá fermentace, což znamená, že sesbírané listy čajovníku jsou ihned po sklizni zahřáty a srolovány tak, aby byly inaktivovány enzymy (polyfenol oxidázy) oxidující katechiny na theaflaviny a thearubiginy. Proto je zelený čaj zdrojem nejvyšších katechinů, tedy flavan-3-olů, zatímco oxidační produkty katechinů pak dávají charakteristické aroma a zbarvení černým čajům³.

Kromě katechinů obsahují zelené čaje mnoho dalších fytochemických látek (přes 2000). Mezi tyto látky patří další fenolové sloučeniny, methylxantiny, uhlovodíky, proteiny, volné aminokyseliny, L-askorbová kyselina a další organické kyseliny, lipidy, karotenoidy, chlorofyly, minerální látky a stopové prvky⁴.

Nejvíce zastoupenými katechiny v zelených čajích jsou epigalokatechingalát, epikatechingalát, epigalokatechin atd., z čehož epigalokatechingalát je nejvíce bioaktivní složkou. Nejdůležitějším účinkem katechinů je ten antioxidační, díky němuž vykazují čaje spoustu pozitivních účinků na lidské zdraví, jako například: protirakovinný, protizánětlivý, antibakteriální, antidiabetický, proti kardiovaskulárním onemocněním, proti stárnutí, proti obezitě apod.^{5,6}.

Antioxidační účinek je definován jako zabránění oxidace lipidů, proteinů, DNA a dalších molekul tak, že zablokuje krok propagace v oxidačních řetězových reakcích. Primární antioxidanty jsou schopné přímo odstraňovat volné radikály, zatímco sekundární antioxidanty nepřímo zabráňují vzniku volných radikálů tím, že zhasí singletový kyslík, rozkládají peroxidy na neradikálové částice, inhibují oxidativní enzymy, absorbují UV záření apod. Čaje poskytují oba zmíněné druhy antioxidantů – například polyfenoly, flavonoidy, vitaminy E a C či pigmenty jako karotenoidy a anthokyaniny^{7,8}.

Pro stanovení autenticity resp. ověření geografického původu je možné využít několik různých analytických přístupů. Nejběžnější je pravděpodobně využití kapalinové chromatografie (LC) s hmotnostně spektrometrickou (MS) detekcí⁹. Dále je však možné také využít plynovou chromatografii s MS detekcí¹⁰, nukleární magnetickou rezonanci, vibrační a fluorescenční spektroskopii, prvkové složení, izotopové techniky či senzorickou analýzu¹¹⁻¹³. V posledních dvou dekáдах se stále více pro účely autentikace vzorků využívá metabolický fingerprinting, což je v zásadě rychlá analytická metoda, která vychází z jednoduché a co nejméně diskriminativní přípravy vzorku následované necílovou analýzou co nejširšího spektra látek obsažených v extraktu vzorku. Naměřená data jsou pak statisticky zpracovávána a vyhodnocena.

3 Vlastní popis metodiky

3.1 Použitelnost metody

Aplikace metabolického fingerprintingu pro ověření geografického původu vzorků zelených čajů se v této oblasti analýzy potravin jeví jako velmi perspektivní metoda, kdy se pro vzájemné odlišení využívá komplexní analýzy nízkomolekulárních složek („fingerprint“) dané komodity (suchého zeleného čaje). Získaný fingerprint slouží k možné diferenciaci vzorků a zároveň je možné pomocí těchto charakteristických fingerprintů zhodnotit autenticitu daného vzorku. Na základě získaných primárních dat z analýzy fingerprintů souboru autentických vzorků je sestaven model, vytvořený pomocí chemometrického zpracování dat, který je možno použít právě k ověření geografického původu. Aby model odrážel co největší variabilitu vzorků pocházejících z určitých lokalit, byly analyzovány různé odrůdy zelených čajů pocházejících z Číny, Japonska a Koreje a zároveň se jednalo o vzorky čajů ze dvou sklizní, jedna z roku 2016 a druhá z roku 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 geografického původu vzorků zelených čajů. Zároveň bylo nalezeno několik látek charakteristických pro čaje z různé země (markery). V případě čajů se jedná spíše o látky, které jsou ve vzorcích z jednotlivých zemí přítomny na rozdílných koncentračních hladinách, než že by v jedné skupině vzorků dominovaly a v další skupině nebyly vůbec přítomny.

Identifikace diagnostických sloučenin hmotnostní spektrometrií probíhala na základě určení přesné hmotnosti iontu, odchylky od přesné hmoty (Δ ppm), izotopového zastoupení a fragmentačních spekter. Tato hmotnostní spektra byla získána za použití kolizní rampy, která v kolizní cele navyšuje energii k rozštěpení iontů a výsledné spektrum je průměrem takto naměřených dat. V tomto případě byla aplikována energie 10-30 V. Zaznamenané markery, jejich fragmenty a sumární vzorce jsou uvedeny v **tabulkách I a II**. Zároveň je u některých látek navržena pravděpodobná identifikace, přičemž je zřejmé, že nejvíce k rozdělení do skupin přispívají fosfolipidy, diacylglyceroly či glykosidy kvercetinu.

Tabulka I: Seznam markerů v extraktu dichlormethan – methanol, pozitivní ionizace

Země původu	RT (min)	Detekovaný ion <i>m/z</i>	Sumární vzorec [M+H] ⁺	Δppm	Hlavní fragmenty <i>m/z</i>	Identifikace
Čína	1,12	195,0888	C8H11N4O2	3,1	138,0675; 110,0726	Kofein
	4,26	518,3247	C26H49NO7P	0,0	184,0744; 500,3141	Fosfatidylcholin (18:3)
	5,34	1185,541	C51H85N4O27	0,7	593,2763	-
	8,13	816,6546	C46H90NO10	0,1	383,3690; 401,2895	-
	8,17	885,5532	C55H73N4O6	0,2	607,2550; 547,2335	-
Korea	7,84	784,5850	C44H83NO8P	0,8	184,0746	Fosfatidylcholin (36:3)
	8,30	501,4306	C33H57O3	0,4	147,0452; 165,0559	-
	8,54	529,4622	C35H61O3	0,2	147,0454; 165,0558	-
	8,74	557,4937	C37H65O3	0,5	147,0453; 165,0556	-
Japonsko	6,80	856,5228	C36H78N3O19	0,2	335,2592; 613,4833	-
	7,17	834,5387	C47H72N5O8	0,7	313,2745; 335,2589; 573,4880	-
	7,19	954,6143	C64H80N3O4	0,6	613,4830; 335,2593	-
	7,43	792,5613	C39H79N5O9P	0,5	613,4831; 335,2594	-
	7,56	932,6307	C62H82N3O4	0,2	591,4989; 313,2749; 335,2592	-
	7,96	760,5858	C42H83NO8P	0,3	184,0745	Fosfatidylcholin (34:1)

Tabulka II: Seznam markerů v extraktu dichlormethan - negativní ionizace

Země původu	RT (min)	Detekovaný iont <i>m/z</i>	Sumární vzorec [M-H] ⁻	Δppm	Hlavní fragmenty <i>m/z</i>	Identifikace
Čína	1,01	289,0713	C15H13O6	0,3	245,0806; 203,0708	-
	1,08	915,1632	C45H31N4O18	0,1	457,0753; 169,0135	-
	1,20	883,1735	C45H31N4O16	0,0	441,0795; 289,0692; 169,0127	-
	4,52	559,312	C28H47O11	0,4	277,2159; 513,3051; 253,0913	-
Korea	7,81	828,576	C45H83NO10P	1,0	768,5524; 281,2474	Fosfatidylserin (39:2)
	8,29	499,4151	C33H55O3	0,0	-	-
	8,52	527,447	C35H59O3	1,1	-	-
	8,73	555,4786	C37H63O3	1,6	-	-
Japonsko	0,92	611,1407	C22H33N2O14P 2	0,0	305,0658	-
	1,13	337,0919	C16H17O8	1,2	173,0453; 163,0399	-
	7,14	815,4987	C52H67N2O6	1,5	-	-
	7,68	951,5146	C71H67O2	0,5	-	Kumaroylchinová kyselina

3.2 Princip metody

Analýzou extraktu vzorku (dichlormethan-methanol, 1:1, v/v) pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (U-HPLC-HRMS) je získán charakteristický metabolomický fingerprint. Takto získaný fingerprint, spolu s využitím multifunkční statistické analýzy, slouží k možné diferenciaci vzorků a zároveň je možné pomocí těchto charakteristických fingerprintů posoudit autenticitu daného vzorku resp. ověřit správnost deklarovaného geografického původu. Na základě měření přesné hmoty, znalosti sumárního vzorce a informací dostupných z odborné literatury je možná identifikace vybraných iontů.

3.3 Chemikálie, analytické standardy a spotřební materiál

- Methanol, MS-grade (Merck, Německo)
- Propan-2-ol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dichlormethan (Sigma-Aldrich, Německo)
- Deionizovaná voda (přečištěná z destilované vody pomocí zařízení Milli-Q, Millipore, Německo)
- Kyselina mravenčí 95% (Sigma-Aldrich, Německo)
- Mravenčan amonný (Sigma-Aldrich, Německo)
- Leucin-Eukefalin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Krimpovací vialky 2 ml (Gilson, USA)
- Injekční stříkačky 5 ml (Braun, Německo)
- Stříkačkové PTFE filtry 0,22 µm (Labicom, ČR)
- Plastové (PTFE) kyvety (50 ml; 15 ml)

3.4 Přístroje a zařízení

- Homogenizátor Grindomix GM 200 (Retsch, Německo)
- Váhy AND GF-1200 (AND, Japonsko)
- Odstředivka Rotina 35R (Hettich, Německo)
- Zařízení na výrobu deionizované vody Milli Q (Millipore, USA)
- Automatická pipeta 1 a 10 ml (Thermo Fischer Scientific, Finsko)

Zařízení pro metabolomický fingerprinting vzorků

- Kapalinový chromatograf Acquity UPLC (Waters, USA)
- ESI iontový zdroj (Waters, USA)
- Hmotnostní spektrometr typu QTOF SYNAPT[®] G2 MS (Waters, USA)
- Kolona: Acquity UPLC[®] BEH C18 (2.1x100 mm, 1,7 µm) (Waters, 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.

3.5 Pracovní postup

3.5.1 Příprava vzorku

U všech vzorků byla nejprve provedena homogenizace celého vzorku. Pokud byly vzorky zelených čajů porcovány v nálevových sáčkích, byly všechny sáčky rozstříženy a jejich obsah následně homogenizován.

Do 15-ml kyvety se naváží 0,5 g vzorku a přidá 4 ml směsi dichlormethan-methanol (1:1, v/v). Kyveta se intenzivně třepe 2 minuty a poté odstředí při 10000 otáčkách za minutu, při 20 °C po dobu 5 minut. Z horní vrstvy se stříkačkou odebere část supernatantu, která se přefiltruje přes mikrofiltr (0,22 µm) a převede do 2-ml vialky k analýze.

3.5.2 Kontrola kvality

Kromě vzorků zelených čajů se připraví kontrolní vzorky pro řízení kvality měřených dat, které slouží k ověření, že měření v průběhu celé měřicí sekvence proběhla za stejných podmínek a získaná data jsou 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 zelených čajů bylo pro kontrolu náhodně vybráno 5 různých zástupců všech tří skupin (čaje z Číny, Japonska a Koreje), z jejichž extraktů bylo odebráno 100 µl a rovněž smícháno do jedné vialky (QC vzorek). Takto připravené vialky sloužily jako QC vzorky a byly analyzovány spolu se vzorky v průběhu sekvence.

3.6 Podmínky pořízení fingerprintů pomocí U-HPLC-HRMS

Pro pořízení fingerprintu se využívá ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií s hybridním analyzátozem kvadrupól – analyzátor doby letu částic (HR-QTOFMS).

Podmínky měření extraktů zelených čajů jsou uvedeny v **tabulce III** pro kapalinovou chromatografii a v **tabulce IV** pro hmotnostní spektrometrii.

Tabulka III: Podmínky UHPLC analýzy pro extrakty (dichlormethan-methanol) zelených čajů.

Přístroj	ACQUITY UPLC™, Waters				
Kolona	ACQUITY, BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm), Waters				
Mobilní fáze	A: voda-methanol (95:5, v/v) + 0,1% mravenčí kyseliny + 5 mM mravenčan amonný				
	B: propan-2-ol-methanol-voda (65:30:5, v/v/v) + 0,1 % mravenčí kyseliny + 5 mM mravenčan amonný				
Gradientová eluce	Čas (min.)	Průtok (ml/min.)	A (%)	B (%)	Křivka*
	počáteční	0,4	95	5	počáteční
	0,5	0,4	95	5	6
	8	0,4	0	100	6
	10,3	0,4	0	100	1
	13	0,4	95	5	1
Objem nástřiku	2 µl (ESI +) resp. 5 µl (ESI -)				
Teplota kolony	65 °C				
Teplota autosampleru	20 °C				

* 6=lineární změna; 1=skoková změna

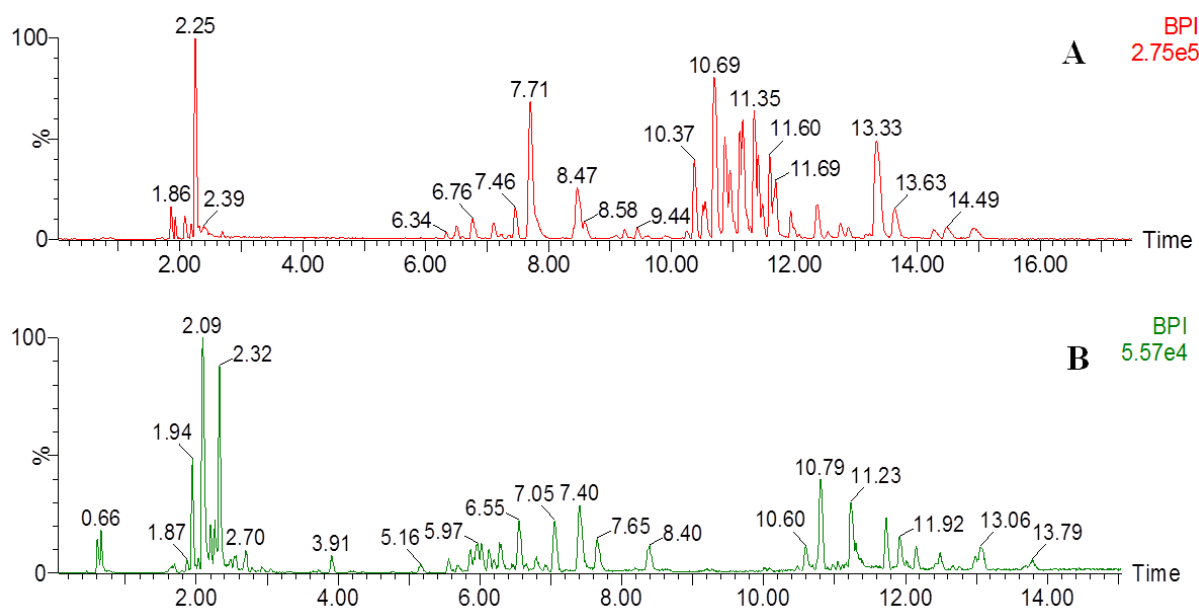
Tabulka IV: Parametry iontového zdroje, MS systému.

Přístroj	QTOF SYNAPT® G2 MS, Waters
Ionizační mód	ESI +/-
Napětí na kapiláře	+/- 1 kV
Teplota iontového zdroje	120 °C
Desolvatační teplota	350 °C
Průtok desolvatačního plynu	800 l/h
Rozlišení	20000 FWHM
Rozsah m/z	50-1200

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. Získané fingerprinty extraktů zelených čajů, z různých zemí původu měřené v jednom ionizačním módu, se na první pohled od sebe příliš neliší, proto je nutno vzít do úvahy poměry normalizovaných relativních intenzit jednotlivých iontů/látek, které vykazují známky odlišnosti, a jsou tak klíčové pro odlišení vzorků. Na **Obrázku 1** je ukázán chromatografický záznam (fingerprint) vzorku zeleného čaje získaný 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. Oba získané chromatografické záznamy kompletují informace o vzorcích zeleného čaje a je možno tato data kombinovat a získat tak komplexní údaj o složení vzorku. Identifikace a rozbor důležitých látek je popsán níže. Získaná data jsou zpracována pomocí statistických chemometrických analýz, jejichž výsledky jsou ukázány níže (**Obrázek 2-5**).



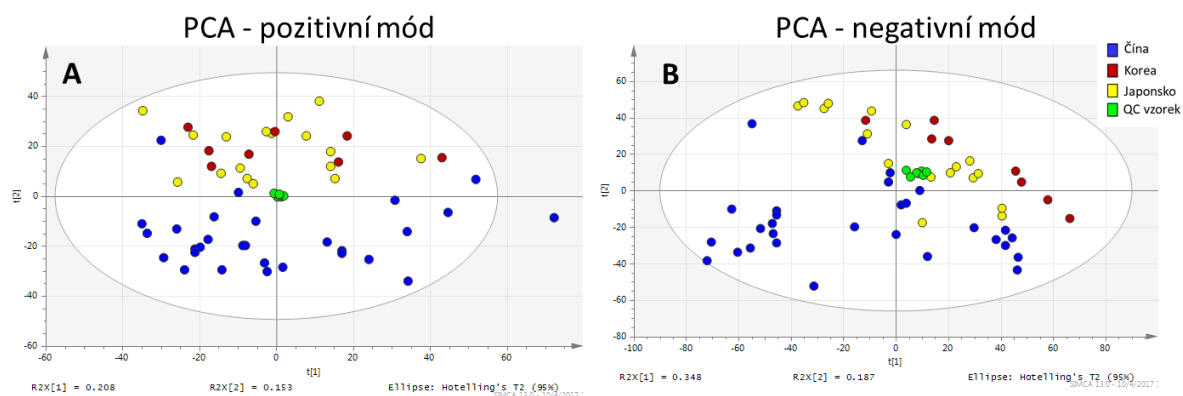
Obrázek 1. Ukázka U-HPLC–ESI-HRMS TIC chromatogramu vzorku zeleného čaje měřeného v pozitivním módu ionizace (A), v negativním módu ionizace (B).

3.7.2 Multivariační statistická analýza metabolomických dat

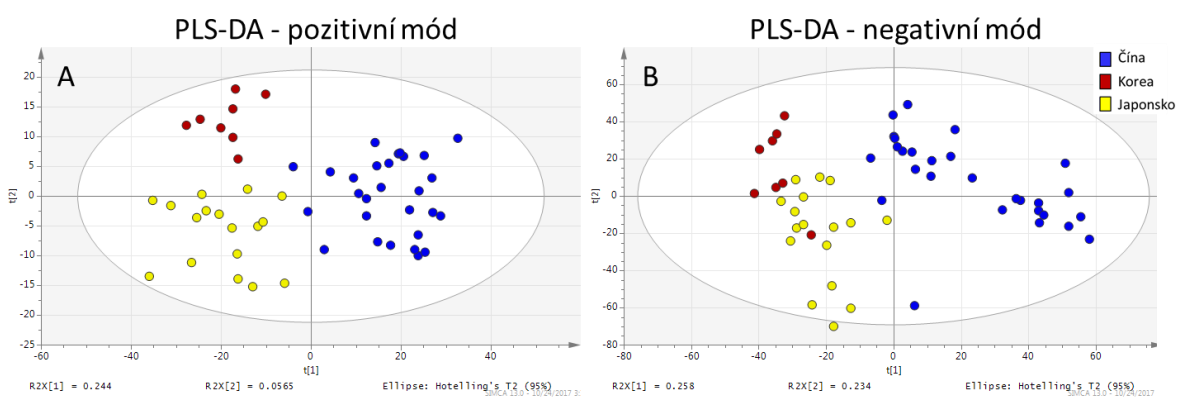
Data získaná z analýzy vzorků zelených čajů pomocí U-HPLC-HRMS je dále nutné statisticky zpracovat. Ke zpracování a interpretaci vícerozměrných dat získaných během metabolomických analýz se využije metody multivariační statistické analýzy, nejčastěji analýza hlavních komponent (*principal component analysis*, PCA). Tato statistická metoda umožňuje prozkoumat strukturu komplexních dat. Při tvorbě matematických modelů pro klasifikaci neznámých vzorků se uplatňuje především lineární diskriminační analýza (*linear discriminant analysis*, LDA) nebo diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců (*partial least squares discriminant analysis*, PLS-DA) případně nejvhodnější chemometrickou analýzu pro odlišení dvou skupin vzorků tj. ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců (*orthogonal partial least squares discriminant analysis*, OPLS-DA).

Data z jednotlivých měření pomocí výše zmiňovaných technik jsou zpracována pomocí multivariačních chemometrických analýz PCA a (O)PLS-DA. **Obrázky 2-4** ukazují získané výsledky provedených statistických analýz z naměřených dat pro oba ionizační módy. Na **Obrázku 5** je ukázán příklad S-plotu, který ukazuje rozložení jednotlivých iontů, které jsou použity pro statistické hodnocení. Na opačných koncích, nejvzdálenější ionty, jsou ionty s největší vahou na oddělení vzorků. 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 MassLynx, 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 a následné statistického předzpracování je provedeno pomocí programu MarkerLynx. Data jsou posléze přenesena do softwaru SIMCA, který pak umožňuje rozsáhlejší zpracování velkých souborů dat a přehlednou vizualizaci finálních výsledků.



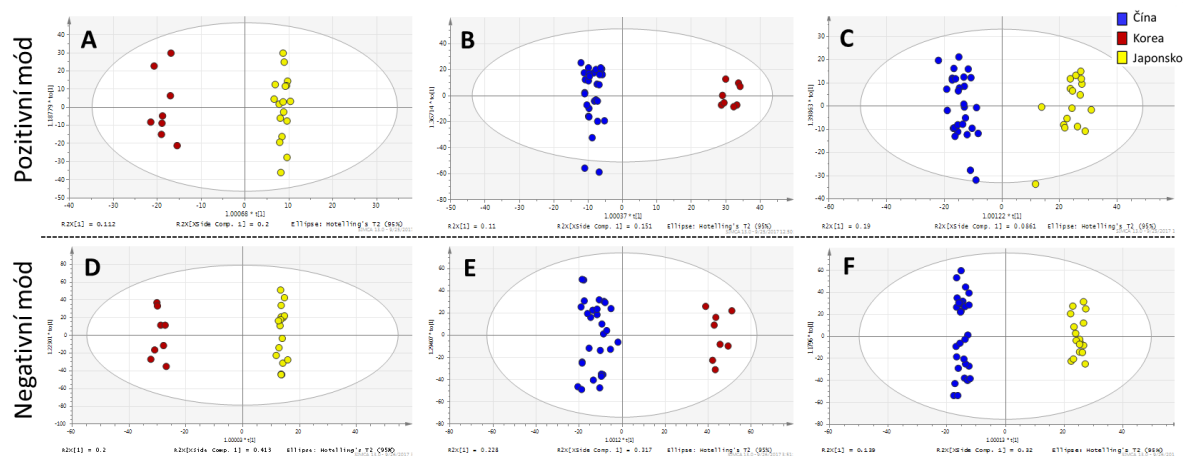
Obrázek 2: PCA analýza dat z fingerprintů extraktů zelených čajů (z roku 2016 a 2017) z Číny (modrá barva), Koreje (červená barva) a Japonska (žlutá barva), (A) pozitivní ionizace, (B) negativní ionizace, zelená barva – kontrolní vzorky (QC).



Obrázek 3. PLS-DA analýza dat z fingerprintů extraktů zelených čajů (z roku 2016 a 2017) z Číny (modrá barva), Koreje (červená barva) a Japonska (žlutá barva), (A) pozitivní ionizace, (B) negativní ionizace.

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 93,2 % a predikční schopnost 61,4 %. V případě PLS-DA modelu pro data z negativního módu ionizace vyšla rozpoznávací schopnost 93,7 % a predikční schopnost 71,5 %. Modely sestavené ze tří různých skupin mají obecně horší obě dvě schopnosti, proto byly v následném kroku modely sestaveny vždy pouze pro kombinaci dvou skupin vzorků, tedy vzorky zelených čajů pocházejících ze dvou různých zemí původu. Oba parametry by se tak měly zlepšit a modely by měly lépe vzorky klasifikovat a to i

v případě analýzy následně vyšetřovaného vzorku pro účel potvrzení deklarace geografického původu vzorku.

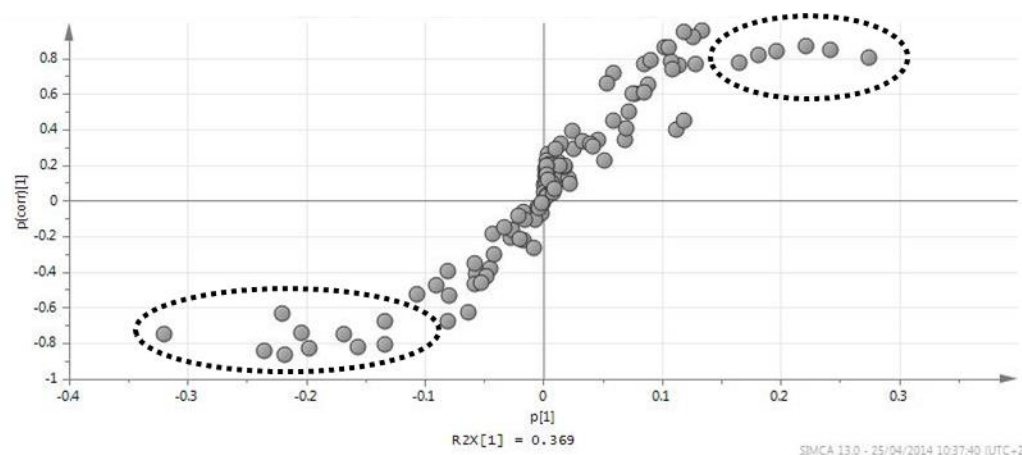


Obrázek 4. OPLS-DA analýza dat z fingerprintů extraktů zelených čajů (z roku 2016 a 2017) z Číny (modrá barva), Koreje (červená barva) a Japonska (žlutá barva), (A,B,C) pozitivní ionizace, (D,E,F) negativní ionizace.

Uvedené statistické modely byly podrobeny opět validaci. Ze zjištěných hodnot vyplývá, že mírně horší obě schopnosti poskytují modely sestavené z dat měřených v pozitivním módu ionizace, tudíž jako obecně lepší modely s lepšími validačními parametry vychází ty, které jsou založeny na datech měřených v negativním módu ionizace. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v následující **Tabulce V**. Predikční schopnosti jsou v tomto případě velmi uspokojivé a dostačující pro daný účel.

Tabulka V: Rozpoznávací a predikční schopnosti uvedených OPLS-DA modelů.

model	ionizační mód	rozpznávací schopnost (%)	predikční schopnost (%)
A	pozitivní	98,9	85,2
B	pozitivní	98,7	86,6
C	pozitivní	95,7	86,6
D	negativní	99,6	87,7
E	negativní	96,2	91,4
F	negativní	99,3	93,2



Obrázek 5: Příklad S-plotu prezentující výsledky se statistické analýzy OPLS-DA, graf rozložení váhy jednotlivých iontů/látek tzv. markerů (zakroužkovány).

Dále byly ze statistické analýzy nalezeny markery, které nejvíce ovlivňují rozdělení vzorků do skupin dle země původu, přičemž některé z nich byly identifikovány. Mezi tyto markery nejvíce přispívající k oddělení skupin patří různé typy fosfolipidů, diacylglyceroly či glykosidy kvercetinu.

Validita analytického a matematicko-statistického postupu je prokázána pro vzorky pocházející z Číny, Koreje a Japonska, avšak metodu je možno genericky využít i pro ověření autenticity vzorku pocházejícího z jiné země, pokud by byl k dispozici dostatečný soubor autentických vzorků, z něhož by bylo možné sestavit statistický model.

Pracovní charakteristiky metody

3.7.3 *Selektivita metody*

Technika U-HPLC-HRMS umožňuje účinnou ionizaci, separaci a detekci širokého spektra látek. 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.

3.7.4 *Robustnost metody*

Během optimalizace metody byly identifikovány takové fáze pracovního postupu, které mohou významně ovlivnit výsledek stanovení. Jedná se o operace související s instrumentální koncovkou. Pro omezení nežádoucích vlivů je doporučeno respektovat následující opatření:

U-HPLC-HRMS:

- 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.
- Provádět opakované analýzy QC vzorku v průběhu celé sekvence – kontrola kvality, stability získávaných dat
- Provádět opakované analýzy blanku pro kontrolu případného (ne)přenosu látek z jednoho nástřiku do druhého

4 Srovnání novosti postupů

Jak již bylo řečeno, pro stanovení autenticity vzorku je možno využít několik různých přístupů a analytických technik, které jsou většinou zaměřeny na cílenou analýzu vybraných látek. Modernější způsob v poslední době vychází z tzv. metabolomiky resp. strategie metabolomického fingerprintingu, tedy využití necílové analýzy. Tento přístup je využit také v této metodice. Pro účel získání metabolomického fingerprintu byla vyvinuta poměrně rychlá a efektivní metoda U-HPLC–HRMS, která nevyžaduje nákladnou a zdlouhavou úpravu vzorku, poskytuje v jediné analýze komplexní a spolehlivou kvalitativní i kvantitativní informaci a je přitom poměrně robustní. V porovnání s polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), která je v současné době velmi často využívána pro hodnocení autenticity vzorku na základě hodnocení DNA fingerprintu, je tato metoda rychlejší (velký počet vzorků za jednotku času), méně pracná a umožňuje komplexnější charakterizaci vzorků i z hlediska spotřebitelské kvality čaje. Jakkoli metoda PCR poskytuje rovněž spolehlivé výsledky, U-HPLC-HRMS technika je pro analýzu potravin daleko univerzálněji využitelná. Z hlediska dostupnosti je v kontrolních laboratořích již běžně používanou instrumentací a do budoucna se pro metabolomické analýzy s cílem potvrzení autenticity vzorku jeví jako velmi perspektivní. Současně je možno využít separace a pokročilé MS instrumentace nejen k identifikaci specifických látek/markerů, ale i některých biologicky účinných látek.

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 zeleného čaje resp. ověření geografického původu zeleného čaje.

Metodika byla vyvinuta pro účely projektu **QI1530272 „Komplexní strategie pro efektivní odhalování falšování potravin v řetězci (prvo)výroba-spotřebitel“**. Aplikace metody v rámci tohoto projektu významně přispěje k objektivnímu posouzení pravosti produktů, což bývá dosud většinou obtížný úkol. V některých případech se jedná o velmi užitečný nástroj pro nezávislé potvrzení výsledků získaných PCR anebo podezření založené na různých analytických parametrech.

Smluvní uživatel metodiky (SZPI) bude moci certifikovanou metodiku využívat při kontrolních činnostech a rozhodování.

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 zeleného čaje metodou U-HPLC–HRMS spočívá především v jednoduché přípravě vzorku bez nutnosti použití zdoluhavých 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.

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.

7 Seznam související použité literatury

1. Schulzki, G., B. Nusslein, and H. Sievers, Transition rates of selected metals determined in various types of teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and herbal/fruit infusions. *Food Chemistry*, **2017**. 215: p. 22-30.
2. Kaundun, S.S. and S. Matsumoto, Identification of processed Japanese green tea based on polymorphisms generated by STS-RFLP analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(7): p. 1765-1770.
3. Koo, M.W.L. and C.H. Cho, Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *European Journal of Pharmacology*, **2004**. 500(1-3 SPEC. ISS.): p. 177-185.
4. Carvalho, M., et al., Green tea: A promising anticancer agent for renal cell carcinoma. *Food Chemistry*, **2010**. 122(1): p. 49-54.
5. El-Shahawi, M.S., et al., Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, **2012**. 134(4): p. 2268-2275.
6. Braicu, C., et al., The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chemistry*, **2013**. 141(3): p. 3282-3289.
7. Pisoschi, A.M. and A. Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2015**. 97: p. 55-74.
8. Jimenez-Zamora, A., C. Delgado-Andrade, and J.A. Rufian-Henares, Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chemistry*, **2016**. 199: p. 339-346.
9. Jing, J., et al., Prediction of Chinese green tea ranking by metabolite profiling using ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC–Q-TOF/MS). *Food Chemistry*, **2017**. 221: p. 311-316.
10. Pongsuwan, W., et al., Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**. 55(2): p. 231-236.
11. Zhang, L., J.-r. Pan, and C. Zhu, Determination of the geographical origin of Chinese teas based on stable carbon and nitrogen isotope ratios. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, **2012**. 13(10): p. 824-830.
12. Ma, G., et al., Determining the geographical origin of Chinese green tea by linear discriminant analysis of trace metals and rare earth elements: Taking Dongting Biluochun as an example. *Food Control*, **2016**. 59: p. 714-720.
13. Qin, Z., et al., Evaluation of Chinese tea by the electronic nose and gas chromatography–mass spectrometry: Correlation with sensory properties and classification according to grade level. *Food Research International*, **2013**. 53(2): p. 864-874.

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. Vojtěch Hrbek, Ph.D., Ing. Klára Navrátilová, 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):

Vojtěch Hrbek (35%), Klára Navrátilová (35%), Vladimír Kocourek (15%) Jana Hajšlová (15%)

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Ověření geografického původu zeleného čaje pomocí metabolomického fingerprintingu metodou kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií.

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

Rok vydání: 2017

Počet stran: 25

Vydání: první



OVĚŘOVACÍ DOLOŽKA KONVERZE DOKUMENTU

Ověřuji pod pořadovým číslem 2017-9-1412-70795, že tento dokument označený v rámci organizace identifikátorem SZPI7102A7059, který vznikl převedením vstupu v elektronické podobě do podoby elektronické, skládající se z 25 listu(ů), se doslovně shoduje s obsahem vstupu.

Zajišťovací prvek:

Ověřující osoba:

Vystaveno dne:

Vystavil:

Původní dat. formát:

Mgr. Švomová Pavla
2017-12-18 13:12:25
SZPI, Podatelna ÚI
Květná 15, 603 00 Brno
pdf