



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

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

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Monika Jírů, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová

**Stanovení profilu alkaloidů charakteristických pro
různé odrůdy máku setého**

Praha, prosinec 2018

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky v rámci řešení projektu QK1720263 (Diagnostické metody pro laboratorní kontrolu pravosti máku setého). Technické zázemí pro realizaci této studie bylo zajištěno 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	7
3.3	Chemikálie, analytické standardy a spotřební materiál.....	8
3.4	Přístroje a zařízení.....	9
3.5	Pracovní postup.....	9
3.5.1	Extrakce vzorků.....	9
3.5.2	Příprava směsných kalibračních roztoků opiových alkaloidů	9
3.5.3	LC-MS analýza.....	11
3.5.4	Identifikace a kvantifikace	12
3.6	Pracovní charakteristiky.....	13
3.6.1	Opakovatelnost.....	13
3.6.2	Pravdivost metody	13
3.6.3	Selektivita metody	14
3.6.4	Linearita.....	15
3.6.5	Mez stanovitelnosti.....	15
4	Srovnání novosti postupů	16
5	Popis uplatnění certifikované metodiky	17
6	Ekonomické aspekty.....	18
7	Seznam související použité literatury	20
8	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	21

1 Cíl metodiky

Jedním z dílčích cílů projektu QK1720263 „Diagnosticke metody pro laboratorní kontrolu pravosti máku setého“ podporovaného Ministerstvem zemědělství České republiky bylo vyvinout a optimalizovat metodu umožňující stanovení opiových alkaloidů v máku setém. Cílová analýza komplexu opiových alkaloidů se provádí metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií.

Vypracovaná metodika je určena k využívání v kontrolních laboratořích dozorových orgánů při laboratorní kontrole kvality a autenticity makových semen.

2 Teoretický úvod

Pěstování máku na území České republiky má již dlouholetou tradici. Mák setý (*Papaver somniferum L.*) je jednoletá rostlina, jejíž semena nacházejí široké uplatnění především v potravinářském průmyslu, zvláště pro nezaměnitelnou chuť jsou oblíbenou surovinou pro řadu pekařských výrobků, jako jsou makové náplně do koláčů a jiných moučníků, nebo pro výrobu jedlých makových olejů.

Makové tobolky (makovice) jsou naopak cenným materiálem pro zpracování ve farmaceutickém průmyslu.^{1,2,3} Některé odrůdy totiž obsahují vysoké množství různých alkaloidů, které našly uplatnění hlavně v lékařství pro utišení bolesti. Bohužel ale tento materiál může sloužit jako surovina pro výrobu nelegálních omamných prostředků. Mezi hlavní opiové alkaloidy patří morfin, narkotin, tebain, kodein, narcein a papaverin. Opiové alkaloidy jsou přítomny v suché, ale i nezralé makovině.^{1,4}

Potravinářské odrůdy máku se od technických odrůd pro farmaceutické účely liší kromě koncentrací a zastoupením opiových alkaloidů ale i výrazně odlišnými organoleptickými vlastnostmi. Metabolom máku včetně opiových alkaloidů ovlivňují i klimatické podmínky při pěstování, vegetační doba, složení půdy nebo i stresové faktory jako je například napadení plísní. Samotná maková semena opiové alkaloidy prakticky neobsahují nebo jen stopová množství, ale jsou jimi často kontaminována z jiných částí rostliny. Často dochází k přímé kontaminaci během napadení makovice škůdci, kdy mléčný latex ulpí na makových semenech a zaschne. Přesto k největšímu nárůstu obsahu alkaloidů v semenech dochází během nevhodného procesu sklizně (s problémem se lze setkat u nedesikovaných porostů - pokud rostliny nestejněmálně dozrávají) a nekvalitně provedeným čistícím procesem (jednostupňové čištění na sítích bez použití pneumatických stolů).

Maková semena jsou velmi náchylná na mechanické poškození. Semena máku pro potravinářské účely obsahují 45-50% oleje, proto poškozené semeno je na povrchu znečištěno olejem, na který se usazují prachové částice z rozdrčené makoviny. Vedle nežádoucí kontaminace semen se, zároveň se sníží jejich senzorické vlastnosti i trvanlivost, protože makový olej je velmi náchylný k oxidativnímu žluknutí.^{2, 3, 5, 6}

Snížení obsahu opiových alkaloidů v semenech máku lze v praxi dosáhnout pomocí důkladného čištění, praní, mletí a následného tepelného procesu. Až téměř úplnou eliminaci lze docílit kombinací více ošetření s tepelnou úpravou pokud možno nad 200 °C. Na druhou stranu tepelné ošetření indukuje oxidaci lipidů, což se projeví žluklou chutí a vůní a celkově

ztrátou typické chuti máku. Také proces namáčení nebo praní máku může vést ke snížení kvality a skladovatelnosti této komodity.⁵

Navzdory rozsáhlým diskuzím mezi členskými státy dosud nebyl stanoven ve společné legislativě Evropské unie (EU) maximální limit opiových alkaloidů v máku. Přesto existuje několik omezení a doporučení souvisejících s příjmem alkaloidů v máku. Od 1. ledna 2014 platí v České republice ustanovení, že pro potravinářské účely lze využít pouze ten mák, jehož obsah morfinových alkaloidů nepřekročí limit 25 mg/kg (vyhláška č. 399/2013 Sb. v platném znění) Tato hodnota je považována jako kritérium kvality a vztahuje se na mák, který byl vyprodukován nebo zabalen na území České republiky.⁷

V roce 2011 vydal Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) vědecké stanovisko k rizikům pro veřejné zdraví související s přítomností opiových alkaloidů v máku. Podle odborníků hrozí určité zdravotní riziko u dětí (jsou obecně citlivější na morfin), které pocházejí ze zemí s vyšší spotřebou máku.⁴

Za poslední tři roky Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) upozornila na řadu případů míchání kvalitního potravinářského máku s levným technickým, který je odpadem z farmaceutického průmyslu. Takto prodáváný mák pod označením pro potravinářské účely obsahuje opiové alkaloidy o vyšších koncentracích a zároveň vykazuje už nevyhovující senzorické vlastnosti. A právě vysoký obsah opiových alkaloidů ve vzorku potravinářského máku může být důsledkem falšování ohrožujícího ve výsledku i bezpečnost potravin.^{8,9}

3 Vlastní popis metodiky

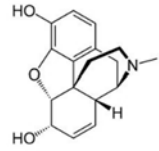
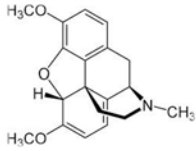
3.1 Použitelnost metody

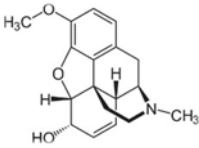
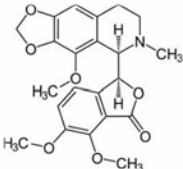
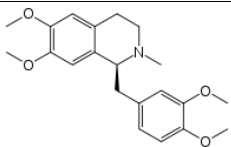
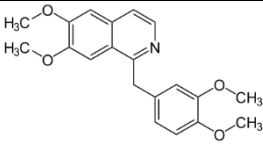
Metoda je obecně vhodná pro analýzu komplexu opiových alkaloidů v semenech i makovině máku setého, včetně vzorků máku mletého nebo ošetřeného termostabilizací. Optimalizována a validována byla především pro kontrolu makových semen. Opiové alkaloidy tvoří povrchovou kontaminaci makových semen. Hlavní opiový alkaloid v máku je morfin, který vykazuje psychoaktivní účinky. Dalšími majoritními alkaloidy v máku jsou kodein a tebain. Dále mohou být přítomny noskapin, papaverin nebo laudanisin.

3.2 Princip metody

Opiové alkaloidy jsou ze vzorku máku extrahovány methanolem s 0,1% kyselinou mravenčí a následně podle potřeby naředěny. Identifikace a kvantifikace jednotlivých cílových analytů se provádí pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie ve spojení vysokorozlišovací hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC–HRMS). Jednotlivé analyty jsou kvantifikovány pomocí metody externí kalibrace (kalibrační křivka). Sledované analyty včetně jejich přesných hodnot m/z jsou shrnuty v **Tabulce I**. Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie umožňuje také zpětného prohledávání chromatografických záznamů a identifikaci neznámých látek.

Tabulka I: Sledované opiové alkaloidy máku, jejich sumární vzorce a přesné hmoty iontů pro LC-HRMS analýzu.

Alkaloid	Sumární vzorec	Přesná hmota aduktu $[M+H]^+$	Struktura
Morfin	$C_{17}H_{19}NO_3$	286,1443	
Tebain	$C_{19}H_{21}NO_3$	312,1600	

Alkaloid	Sumární vzorec	Přesná hmota aduktu $[M+H]^+$	Struktura
Kodein	$C_{18}H_{21}NO_3$	300,1600	
Noskapin	$C_{22}H_{23}NO_7$	414,1553	
Laudanosin	$C_{21}H_{27}NO_4$	358,2018	
Papaverin	$C_{20}H_{21}NO_4$	340,1549	

3.3 Chemikálie, analytické standardy a spotřební materiál

- Morfin (koncentrace $1,000 \pm 0,050$ mg volné báze v methanolu; Lipomed, Švýcarsko)
- Kodein (koncentrace 1 mg volné báze v methanolu; Lipomed, Švýcarsko)
- Tebain (koncentrace 1 mg volné báze v methanolu; Lipomed, Švýcarsko)
- Papaverin (100 mg, Sigma-Aldrich, USA)
- Noskapin (100 mg, Sigma-Aldrich, USA)
- Laudanosin (15 mg, Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol, pro LC-MS LiChrosolv® (Merck, Německo)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich, USA)
- Mravenčan amonný 99,999 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina mravenčí, p.a. 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina octová, glacial, 99.99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Vialky, septa, víčka a další příslušenství, (Labicom s.r.o., Česká republika)
- Filtrační papíry Munktell Filtrak č. 390 (Vitrum, Česká republika)
- Běžné laboratorní sklo, pomůcky a laboratorní vybavení

Poznámka: chemikálie a materiály uvedených specifikací a dodavatelů byly použity při vývoji a validaci této metody, lze ale použít položky od alternativních dodavatelů, pokud vykazují stejné nebo lepší specifikace čistoty.

3.4 Přístroje a zařízení

- Přístroj na přípravu deionizované vody Milli-Q (Merck Millipore, Německo)
- Automatické pipety (TraffLab-Transferpette®, Švýcarsko)
- Mutipipeta Multipette Stream, Eppendorf (Německo)
- Analytické váhy (e=1 mg, d=0,01/0,1 mg)
- Nerezový mlýnek KM-2270, Tristar
- Třepačka HS 250 basic (IKA Labortechnik, IKA Werk, Německo)
- **LC-MS systém:**
 - Kapalinový chromatograf Acquity UPLC (Waters, USA)
 - Analytická kolona Atlantis HILIC 100 x 2,1 mm, 3 µm (Waters, USA)
 - Hmotnostní spektrometr Exactive (Thermo Scientific, USA), iontový zdroj ESI (Thermo Scientific, USA)

3.5 Pracovní postup

3.5.1 Extrakce vzorků

Do 100 ml Erlenmeyerovy baňky se naváží 5 g homogenizovaných semen nebo 0,5 g mleté makoviny, ke kterým se přidá 50 ml extrakčního činidla, kterým je methanol s 0,1 % (v/v) kyseliny octové. Vzorek se následně intenzivně třepe po dobu 30 minut a obsah se poté přefiltruje do 100 ml odměrné baňky a doplní extrakčním činidlem. Čirý extrakt převedený do vialky je připravený pro chromatografické stanovení. V případě vzorků máků a makoviny, v nichž obsah jednotlivých analytů bývá oproti potravinářským semenům značně vyšší, se extrakt naředí podle potřeby 10x, 50x nebo i 100x methanolem.

3.5.2 Příprava směsných kalibračních roztoků opiových alkaloidů

Z roztoku standardu morfinu, kodeinu a tebainu o koncentraci 1 mg/ml se odebere 100 µl do 10ml odměrné baňky a doplní se methanolem, čímž vzniknou zásobní roztoky alkaloidů o koncentraci 10 µg/ml. Pevné standardy (noskapin, laudanosin a papaverin) se naváží do 10 ml odměrné baňky cca 20 mg a doplní methanolem, v případě laudanosinu se

pro rozpuštění použije ethanol. Jejich ředění až na směsné kalibrační standardy je popsáno v **Tabulce II** až v **Tabulce VI**. Zásobní roztoky standardů jsou uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

Tabulka II: Příprava roztoků jednotlivých analytů

Analyt	Navážka (g)	Čistota (%)	Objem ml	Koncentrace mg/ml	Rozpouštědlo
Laudanosin (Lau)	0,0200	100	10	2,00	Ethanol
Papaverin (Pap)	0,0200	100	10	2,00	Methanol
Noskapin (Nos)	0,0200	100	10	2,00	Methanol

Tabulka III: Příprava 10 ml směsného roztoku (laudanosinu, papaverinu a noskapinu) o koncentraci 50 000 ng/ml v methanolu

Analyt	Koncentrace (mg/ml)	Objem standardu (ml)
Laudanosin (Lau)	2,00	0,250
Papaverin (Pap)	2,00	0,250
Noskapin (Nos)	2,00	0,250

Tabulka IV: Příprava 10 ml směsného roztoku (laudanosinu, papaverinu a noskapinu) o koncentraci 10 000 ng/ml v methanolu

Konečná koncentrace (ng/ml)	Objem (ml)	Výchozí koncentrace (ng/ml)	Objem standardu (ml)
10 000	10	50 000	2

Tabulka V: Příprava 10 ml směsného roztoku všech analytů o koncentraci 1 000 ng/ml v methanolu

Standard	Koncentrace (ng/ml)	Objem standardu (ml)
Směsný standard (Lau, Nos, Pap)	10 000	1

Morfin	10 000	1
Tebain	10 000	1
Kodein	10 000	1

Tabulka VI: Příprava rozpouštědlových standardů opiových alkaloidů pro kalibraci

Kalibrační standard (ng/ml)	Konečný objem (ml)	Výchozí koncentrace (ng/ml)	Objem roztoku standardů (μl)	Objem přidaného methanolu (μl)
1000	1,5	1 000	1500	0
500	1,5	1 000	750	750
200	1,5	1 000	300	1 200
100	1,6	1 000	160	1 440
50	1,5	1 000	75	1 425
10	1,5	100	150	1 350
2	1,5	100	30	1 470

3.5.3 LC-MS analýza

Pro analýzu vzorků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se použije vhodný chromatografický systém ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokorozlišovacím hmotnostním analyzátozem a ionizací elektrosprejem. Základní parametry HPLC–HRMS metody použité při stanovení opiových alkaloidů jsou uvedeny v **Tabulkách VII až IX**.

Tabulka VII: Nastavení U-HPLC systému pro analýzu opiových alkaloidů

Kolona	Atlantis HILIC 100 x 2,1 mm, 3 μm (Waters, USA)
Teplota kolony	40 °C
Objem nástřiku	3 μl
Mobilní fáze	A: 50 mM mravenčan amonný, pH 3,0 B: acetonitril

Tabulka VIII: Gradient mobilní fáze

Čas (min)	A (%)	B (%)	Průtok (ml/min)	Křivka
počáteční	25	75	0,5	počáteční

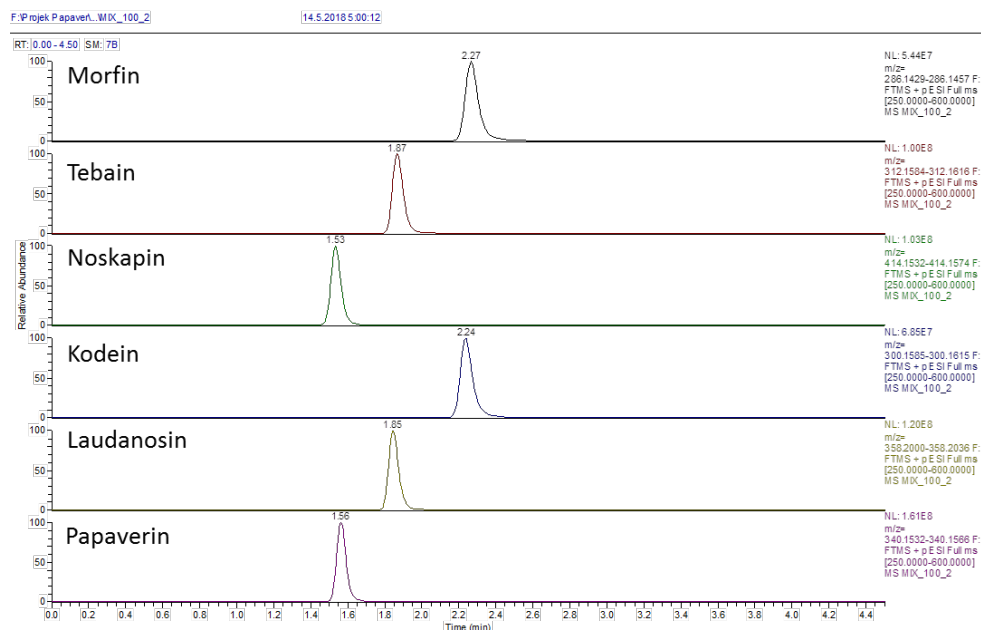
2	25	75	0,5	6
5	35	65	0,5	6
5,2	25	75	0,5	6
8	25	75	0,5	1

Tabulka IX: Hmotnostně-spektrometrické podmínky analýzy

Ionizace	ESI +
Nosný/pomocný plyn (N₂)	45/10 arb.j.
Teplota kapiláry	275 °C
Vypařovací teplota	250 °C
Napětí na elektrospreji	3,5 kV
Napětí na kapiláře	32,5 V
Napětí na čočkách	100 V
Napětí na sběrači	24 V
Rozlišení	50 000 FWHM
Akviziční rychlost	2 spektrum/s
Hmotnostní rozsah	50 – 1000 m/z

3.5.4 Identifikace a kvantifikace

Morfin, stejně jako ostatní opiové alkaloidy, snadno ionizují v pozitivním módu ionizace, kdy tvoří protonizovaný pseudomolekulární iont $[M+H]^+$. Identifikovány mohou být na základě přesné hodnoty m/z, shody isotopového profilu a retenčního času porovnáním s příslušným standardem. Hmotnostní detektor typu Orbitrap poskytuje přesnost hodnot m/z s odchylkou do 3 ppm od teoretické hodnoty. Seznam alkaloidů vyskytujících se v máku, spolu s jejich strukturami a přesnou hodnotou m/z, je uveden úvodu v **Tabulce I** a na **Obrázku 1** je zobrazen chromatografický záznam směsného standardu o koncentraci 100 ng/ml. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na technice externí kalibrace metodou kalibrační křivky.



Obrázek 1: Příklad chromatografických záznamů směsného standardu vybraných opiových alkaloidů o koncentraci 100 ng/ml.

3.6 Pracovní charakteristiky

3.6.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody je charakterizována jako relativní směrodatná odchylka (RSD_r), vypočítaná z minimálně šesti opakovaných analýz vzorků. Protože jsou semena máku kontaminována opiovými alkaloidy na povrchu (morfin a ostatní alkaloidy nejsou přítomny v semenech, ale dochází ke kontaminaci z makoviny), může být v důsledku nehomogenity reálných vzorků dosahovaná opakovatelnost metody poněkud horší (vyšší hodnota RSD_r). Výsledky finální validace shrnuje **Tabulka X**.

3.6.2 Pravdivost metody

Pravdivost metody byla charakterizována jako zpětná výtěžnost a zároveň přidavkem známého množství standardů (0,5 mg/kg opiových alkaloidů) ke vzorku makových semen a samostatné reextrakce již vyextrahovaného vzorku pro matici makoviny. Výsledky z minimálně šesti opakovaných analýz jsou shrnuty v **Tabulce X**.

Tabulka X: Opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka (RSD_r) a výtěžnost stanovení opiových alkaloidů pro maková semena a makovinu

MAKOVÁ SEMENA				
Analyt	Stanovená koncentrace ve vzorku (mg/kg)	RSD_r (%; n=6)	Výtěžnost přídavkem (%; n=6)	Výtěžnost zpětné reextrakce (%; n=3)
Morfin	12,0	18	103	95
Kodein	3,0	13	121	92
Tebain	339	5	-	89
Noskapin	5,2	4	110	100
Papaverin	3,9	7	87	100
Laudanosin	3,6	16	91	91
MAKOVINA				
Analyt	Stanovená koncentrace ve vzorku (mg/kg)	RSD_r (%; n=6)	Výtěžnost zpětné reextrakce (%; n=3)	
Morfin	811	6	82	
Kodein	17	4	73	
Tebain	6,8	7	92	
Noskapin	85	3	88	
Papaverin	104	3	85	
Laudanosin	6,2	3	85	

3.6.3 Selektivita metody

Používaná technika ultra-účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí je technikou umožňující detekci a identifikaci širokého spektra látek, jejichž selektivní stanovení umožňuje vysokorozlišovací hmotnostní detektor, kde odchylky od teoretické hmoty m/z se pohybují do 5 ppm.

3.6.4 Linearita

Odezvy detektoru pro kodein, tebain a laudanosin jsou lineární v rozsahu koncentrací 2-500 ng/ml, pro alkaloidy morfin, noskapin a papaverin je lineární rozsah 2-1000 ng/ml.

3.6.5 Mez stanovitelnosti

Odhadovaná mez stanovitelnosti pro všechny analyzované opiové alkaloidy je nejvýše 0,04 mg/kg (při rozšířené nejistotě $U \leq 50 \%$).

4 Srovnání novosti postupů

Vzhledem k problematice míchání kvalitních potravinářských semen se semeny máku z makoviny, určené pro farmaceutické účely a obsahující řádově vyšší obsahy opiových alkaloidů, je vhodné sledovat v rámci rutinních analýz celé spektrum opiových alkaloidů, především morfinu, tebainu a kodeinu. V případě rutinních analýz se doposud stanovuje jen alkaloid morfin, nicméně v rámci studie na Ústavu analýzy potravin a výživy bylo zjištěno, že morfin není vždy nejhojněji zastoupený alkaloid a celá řada vzorků s nízkým obsahem morfinu má vysoké obsahy zejména tebainu. Tato metoda proto poskytuje daleko rozsáhlejší informaci o celém komplexu opiových alkaloidů, příp. umožňuje zpětnou identifikaci dalších biologicky aktivních látek běžně nestanovovaných. Výsledkem pak není pouze informace o obsahu jednotlivých složek ale celková charakteristika vzorku umožňující jeho autentikaci.

Z hlediska dostupnosti je technika U-HPLC-HRMS v kontrolních laboratořích již běžně používanou instrumentací, která umožňuje zpětné prohledávání dat a dodatečnou identifikaci původně necílené sloučeniny na základě přesné hmoty a izotopového vzoru, což konvenční rutinní metoda neumožňuje.

5 Popis uplatnění certifikované metodiky

Parametry a pracovní charakteristiky uvedené cílové analytické metody, která je založená na principu HPLC-HRMS, jsou vhodné pro získání rychlých kvantitativních, ale i kvalitativní informací o zastoupení jednotlivých majoritních i minoritních opiových alkaloidů v makových semenech či makovině.

Metodika byla vyvinuta jako výsledek projektu QK1720263 – „Diagnostické metody pro laboratorní kontrolu pravosti máku setého“, který reaguje především na aktuální potřeby orgánů státního dozoru.

Smluvním uživatelem metodiky je Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). Uvedenou metodiku je vzhledem k jednoduchosti a rychlosti postupu možné aplikovat ve smluvních státních i soukromých laboratořích ale též pro další výzkumné a vývojové účely.

6 Ekonomické aspekty

Zhodnocení z hlediska ekonomických aspektů bylo provedeno za předpokladu, že laboratoř, která chce uvedenou metodu zavést, již má zkušenosti s LC-MS analýzou a vlastní tak kapalinový chromatograf a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr.

Oproti konvenčním rutinním metodám pro stanovení pouze samotného alkaloidu morfinu je uvedená metoda zdánlivě ekonomicky náročnější, nicméně poskytuje daleko rozsáhlejší a komplexní informaci o ostatních opiových alkaloidech, příp. umožňuje zpětnou identifikaci dalších biologicky aktivních látek. Výstupem pak není pouze informace o obsahu jednotlivých složek ale celková charakteristika vzorku.

Implementace metody zahrnuje pořízení analytických standardů alkaloidů a dále pak verifikaci pracovních charakteristik, zejména limitů kvantifikace, linearity, ale také zjištění výtěžnosti a opakovatelnosti metody (min. $n=6$). Seznam standardů včetně jejich pořizovací ceny je uveden v Tabulce IX. Za předpokladu, že by bylo provedeno 20 verifikačních a kontrolních analýz, přičemž provozní náklady na jednu analýzu by byly 1 400 Kč, celkové náklady na implementaci by se rovnaly 28 tis. Kč. Pokud laboratoř HPLC-HRMS/MS zařízení nevlastní pohybují se celkové náklady na zavedení výše uvedené metody ve výši 10,9 mil Kč.

Ekonomickou výhodou je využití ultra-účinné kapalinové chromatografie, která má oproti konvenční HPLC vyšší separační potenciál, umožňuje významné zkrácení doby analýzy, ale i snížení spotřeby velmi čistých a drahých rozpouštědel (cena za 1 litr methanolu se pohybuje kolem 2 500 Kč). Z ekologického hlediska je významné snížením množství odpadů. Při bilanci ekonomických aspektů bylo předpokládáno, že laboratoř, která chce uvedenou metodu zavést, již má zkušenosti s analýzou v systémech HPLC-HRMS a vlastní již také kapalinový chromatograf s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem. Při použití vysokorozlišovacího hmotnostního spektrometru typu Orbitrap lze získat plnou spektrální informaci a můžeme tak realizovat retrospektivní hledání dříve necílených sloučenin z již naměřených dat bez nutnosti opakovaného přeměření. Rovněž toto znamená významné snížení nákladů při analýze vzorků, kdy cena analýzy jednoho vzorku byla vykalkulována na 1 400 Kč.

Ekonomicky významným přínosem je též zvýšení účinnosti kontroly dodržování nařízení (ES) č. 1169/2011 a nařízení (ES) č.178/2002. Ekonomické přínosy očekávané v této oblasti nelze však přesně kvantifikovat.

Tabulka IX: Cena jednotlivých standardů opiových alkaloidů

Alkaloid	Výrobce	Kód produktu	Množství standardu	Cena (Kč)
Morfin	Lipomed	M-005	1 mg	1 067
Tebain	Lipomed	T2019	1 g	5 445
Kodein	Lipomed	C-006	1 mg	1 067
Noskapin	Sigma Aldrich	N1300000	100 mg	3 960
Laudanosin	Sigma Aldrich	Y0001765	15 mg	3 960
Papaverin	Sigma Aldrich	CDS021481	100 mg	948,75

7 Seznam použité související literatury

1. Mák setý (Papaver somniferum). <http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/database/Mak.htm>; ze dne 20. 2. 2018
2. Kocián, P. mák setý - Papaver somniferum. <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=228>; ze dne 20. 2. 2018
3. Sproll, C.; Perz, R. C.; Lachenmeier, D. W. Optimized LC/MS/MS Analysis of Morphine and Codeine in Poppy Seed and Evaluation of Their Fate during Food Processing as a Basis for Risk Analysis. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 5292–5298.
4. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of opium alkaloids in poppy seeds. EFSA Journal [Online] 2011, 9(11):2405.
<http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/2405.htm>; ze dne 20. 2. 2018
5. Doporučení Komise (EU) č. 662/2014 ze dne 10. září 2014 o správné praxi pro předcházení a snižování výskytu opiových alkaloidů v máku a makových produktech. Úřední věstník Evropské unie, L 271/96.
6. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. Faramakologie a Toxikologie [online]; Grada Publishing a.s., 2004. <http://books.google.cz/books?id=YugXIU4WB4EC&hl=cs>; ze dne 20. 2. 2018
7. Vyhláška č. 329/1997 Sb. Ministerstva zemědělství, kterou se provádí §18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro škrob a výrobky ze škrobu, luštěniny a olejnatá semena v platném znění.
8. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. <http://www.szpi.gov.cz/clanek/inspekce-zjistila-dalsi-sarze-maku-s-nadlimitnim-obsahem-morfinu.aspx>; ze dne 20. 2. 2018
9. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. <http://www.szpi.gov.cz/clanek/szpi-intenzivne-kontro-luje-dovoz-a-zpracovani-maku-v-cr.aspx?q=JmNobnVtPTemaGw9bcOhaw%3d%3d>; ze dne 20. 2. 2018

8 Seznam publikací, které předcházely metodice

Metodika dosud nebyla publikována, jedná se o originální práci. Publikace v odborném periodiku je v přípravě.

AUTOŘI A OPONENTI

Metodu zpracovali:

Ing. Monika Jíru, 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. Markéta Pospíchalová** – Ústřední kontrolní a zkušební úřad zemědělský, ředitelka odboru NRL
- 2) **Ing. Martin Kubík** – Státní zemědělská a potravinářská inspekce, vedoucí odboru zkušební laboratoře

Monika Jírů, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Metodika stanovení profilu alkaloidů charakteristických pro různé odrůdy máku setého

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

Oponenti: Ing. Markéta Pospíchalová, Ing. Martin Kubík

Rok vydání: 2018

Počet stran: 21