



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

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

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Monika Jírů, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová

**Metodika pro charakterizaci semen máku setého
pomocí metabolomických fingerprintů / profilů**

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	Současný stav problematiky	5
3	Charakterizace metodiky	8
3.1	Použitelnost zvolené analytické strategie.....	8
3.2	Princip analytické metody.....	8
3.3	Chemikálie a spotřební materiál	9
3.4	Přístroje a zařízení.....	9
3.5	Použitý software	9
3.6	Pracovní postup	10
3.6.1	Příprava vzorku.....	10
3.7	Podmínky pořízení metabolomických „fingerprintů“ pomocí U-HPLC-HRMS	10
3.8	Detekce a konfirmace specifických markerů	11
3.8.1	U-HPLC-HRMS analýza	11
3.8.2	Vícerozměrná statistická analýza metabolomických dat	14
3.8.3	Identifikace charakteristických markerů.....	19
3.9	Pracovní charakteristiky metody	23
3.9.1	Selektivita metody	23
3.9.2	Robustnost metody	23
4	Srovnání novosti postupů.....	24
5	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	25
6	Ekonomické aspekty	26
7	Seznam související použité literatury	27
8	Seznam publikací, které předcházely metodice	28

1 Cíl metodiky

Jedním z dílčích cílů projektu QK1720263 (PAPAVÉR - Diagnostické metody pro laboratorní kontrolu pravosti máku setého) podporovaného Ministerstvem zemědělství České republiky, bylo vyvinout a následně validovat analytickou metodu, která by kontrolním laboratorním dozorovým orgánům umožnila současné ověření deklarovaného geografického původu makových semen a také zjištění, zda tato semena byla tepelně ošetřena. Tento zákrok se využívá pro účely tzv. 'termostabilizace' (deaktivace nativních lipolytických enzymů), v některých případech ale může být cílem tepelné operace i snížení obsahu opiových alkaloidů (výčet k tomuto účelu využitelných postupů uvádí Doporučení Komise 2014/662/EU).

2 Současný stav problematiky

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je jednoletá rostlina, jejíž pěstování má na našem území dlouholetou tradici. Česká republika je již řadu let předním světovým producentem makových semen používaných hlavně v potravinářském průmyslu. Pro jejich typickou chuť jsou maková semena oblíbenou surovinou pro řadu pekařských výrobků, jako jsou makové náplně do závinů a koláčů či jiných moučníků, oblibu si získal i za studena lisovaný olej využívaný nejen pro potravinářské, ale i kosmetické účely. Naopak, makové tobolky neboli makovice, jsou důležitým zdrojem opiových alkaloidů, které se využívají pro zpracování ve farmaceutickém průmyslu.^{1, 2, 3} Zatímco v ČR registrované odrůdy pěstované pro potravinářské účely obsahují jen nízké hladiny opiových alkaloidů (obsah morfinu by neměl překročit 25 mg/kg - Vyhláška č. 399/2013 Sb. § 12, odstavec 4), nepotravinářské technické odrůdy obsahují obvykle významně vyšší množství těchto bioaktivních látek. Zralá maková semena však alkaloidy téměř neobsahují, nebo pouze na stopových hladinách; zvýšené koncentrace jsou důsledkem kontaminace, ať již mléčnou šťávou ('latexem') vytékající z nezralých makovic, anebo úlomky makovic, které se do semen dostávají při nesprávně vedené sklizni a následně nedokonalém přečistění. Potravinářské odrůdy máku se od technických odrůd pěstovaných pro farmaceutické účely liší nejen množstvím a zastoupením jednotlivých opiových alkaloidů, ale i odlišnými organoleptickými vlastnostmi.^{1, 4}

Již v roce 2012 začala Státní zemědělská a potravinářská inspekce varovat před případy falšování kvalitního potravinářského máku vyšlechtěného v České republice výrazně levnějším, technickým mákem, který je de facto odpadem farmaceutického průmyslu.^{5, 6, 7} Bohužel tento mák, který může být distribuován na trhu pod označením 'pro potravinářské účely', často obsahuje vyšší hladiny alkaloidů (pokud neprošel dekontaminací) a zároveň vykazuje nežádoucí organoleptické vlastnosti. Pracovní skupina EK pro zemědělské kontaminanty.

Zejména vyšší koncentrace opiových alkaloidů ve vzorcích máků deklarovaných jako 'potravinářské' a jejich odlišné (pro odrůdy pěstované v ČR netypické) relativní zastoupení by mohly představovat vodítko pro průkaz jejich falšování, jako je např. 'ředění' potravinářského máku farmaceutickým. Problematika byla posléze řešena i Evropskou Komisí, která na základě toxikologických rizik hrozících z konzumace opiových alkaloidů, vydala 'Doporučení Komise' o správné praxi pro předcházení a snižování výskytu opiových alkaloidů v máku a makových produktech 2014/662/EU. Dokument uvádí, že snížení obsahu

alkaloidů v semenech máku lze, mimo jiné, dosáhnout pomocí důkladného čištění, praní, mletí a následným tepelným ošetřením (termostabilizací). Předpokládá se, že téměř úplnou eliminaci morfinu z kontaminovaných semen lze docílit kombinací více ošetření s tepelnou úpravou, pokud možno nad 200 °C. Na druhou stranu ale tepelné ošetření může indukovat oxidaci lipidů, která se projeví žluklou chutí a vůní a ztrátou typických senzorických vlastností máku. Také proces namáčení nebo praní máku může vést ke snížení kvality a skladovatelnosti této komodity.⁸

V České republice se máky s vysokým obsahem morfinu pro potravinářský průmysl nepěstují, lokální producenti na trh dodávají výhradně semena odrůd máku o nízkých hladinách morfinu, ale i dalších opiových alkaloidů.⁹ Naopak v zemích Jižní Evropy, a především v tropickém a subtropickém pásu jiných kontinentů se mák pěstuje hlavně pro produkci technického máku pro farmaceutické účely. Kolem 60 % celkové světové produkce technického máku pochází z jihovýchodní Asie. Mezi další přední pěstitele máku pro farmaceutické účely patří Turecko, Indie, Čína, Austrálie a Pákistán.^{4, 10}

Při detekci falšování máku resp. náhradě potravinářského máku technickým se obvykle využívá cílové stanovení obsahu opiových alkaloidů. V případě tepelného ošetření těchto makových semen ale již (vysoké) hodnoty obsahu opiových alkaloidů využity jako důkaz být nemohou. Z tohoto důvodu se jeví jako vhodný nástroj pro určení falšování přesněji určení autenticity původu semen necílová analýza, metabolomický fingerprinting. Tento způsob je často realizován v kombinaci se statistickým zpracováním dat, kde při významné odchylce v koncentraci (signálech) některých metabolitů (nebo častěji kombinaci odchylek několika metabolitů) jsou takovéto vzorky odlehle od souboru vzorků autentických.¹¹

Obecně je cílem metabolomické analýzy detekce co nejširšího spektra malých molekul (<1500 Da), metabolitů, přítomných v daném biologickém systému. Metabolomická analýza je dnes nejčastěji realizovaná pomocí tandemové vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS/MS) ve spojení s ultra-účinnou 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 (knihovny). 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.¹²⁻¹⁵

3 Charakterizace metodiky

3.1 Použitelnost zvolené analytické strategie

Necílový screening, resp. metabolomický „fingerprinting“, zde aplikovaný pro klasifikaci semen máku, je v oblasti autentikace potravin a přírodních produktů vysoce perspektivní, genericky aplikovatelná strategie, reprezentující světový trend. Data generovaná metodou metabolomického „fingerprintingu“ jsou zpracována s využitím multivariační analýzy, získané modely je poté možno použít k ověření (i) deklarovaného geografického původu semen máku a (ii) k průkazu tepelného ošetření (‘termostabilizace’) máku.

Pro vytvoření klasifikačního modelu, umožňujícího zjištění země původu (geograficitu), byly analyzovány vzorky semen máku (n=70) z řady lokalit - z Číny, Austrálie, Turecka, Španělska, Německa, Slovenska, Rakouska a České republiky, tak aby byla podchycena variabilita metabolomu.

Pro vytvoření klasifikačního modelu, který bude sloužit k průkazu tepelného ošetření máku, byly analyzovány vzorky autentických semen, tepelně neošetřených (n=16) a v laboratorních podmínkách termostabilizovaných (n=16). Jednalo se o komplementární sady vzorků, kdy semena daného máku byla analyzována vždy před a po termostabilizaci. Získány tak byly velmi robustní modely s dostatečnou vypovídající hodnotou.

3.2 Princip analytické metody

Ethanolové extrakty čerstvě pomletých makových semen byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí (U-HPLC-HRMS/MS, analyzátor doby letu s kvadrupólem, QTOF). Cílem bylo zaznamenat charakteristické ‘fingerprinty’ metabolitů (sloučeniny s molekulovou hmotností ≤ 1200 Da) makových semen různého původu a termostabilizovaných semen. V případě průkazu termostabilizace makových semen bylo dalším (doplňujícím) cílem popsat vliv tepelného ošetření na průběh změny chemického složení po rozemletí makových semen. Na základě naměřených dat byla vytvořena databáze hmotnostně-spektrometrických záznamů vzorků, která posloužila pro tvorbu chemometrických modelů (multivariační analýza) s vysokou rozpoznávací a predikční schopností.

Na základě měření přesné hmoty, znalosti sumárního vzorce (elementárního složení) a informací dostupných z odborné literatury je možná předběžná identifikace vybraných iontů – markerů pro profilování.

3.3 Chemikálie a spotřební materiál

- methanol, Merck (Německo)
- deionizovaná voda (zařízení Milli-Q, Millipore, Německo)
- propan-2-ol (Sigma-Aldrich, Německo)
- ethanol (Merck, Německo)
- 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)
- plastové (PTFE) kyvety o objemu 15 ml, Merci (ČR)
- vialky, septa, víčka a další příslušenství, (Labicom s.r.o., Česká republika)
- běžné laboratorní sklo a vybavení

3.4 Přístroje a zařízení

Příprava vzorku:

- centrifuga Rotina 35R (Hettich Zentrifugen, Německo)
- přístroj na přípravu deionizované vody Milli-Q (Merck Millipore, Německo)
- automatické pipety (TraffLab-Transferpette®, Švýcarsko)
- nerezový mlýnek KM-2270, Tristar
- analytické váhy (e=1 mg, d=0,01/0,1 mg)
- třepačka HS 250 basic (IKA Labortechnik, IKA Werk, Německo)

Instrumentální systém U-HPLC-HRMS:

- kapalinový chromatograf U-HPLC DionexUltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- hmotnostní spektrometr TripleTOFTM 6600 (SCIEX, Kanada)
- analytická kolona BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm) (Waters, USA)

3.5 Použitý software

- 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: Kromě přístroje a zařízení uvedených dodavatelů, které byly použity pro tuto metodiku, lze použít instrumentaci 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

0,5 g homogenizovaného reprezentativního vzorku makových semen se naváží do 15 ml plastové centrifugační kyvety. Do kyvety se přidá 15 ml ethanolu. Obsah každé kyvety je intenzivně třepán po dobu 30 minut (210 min^{-1}). Vzorky jsou následně odstředěny v centrifuze při $10\,000 \text{ min}^{-1}$ a teplotě 5°C po dobu 5 minut. Po odstředění je extrakt odebrán do vialek a tím připraven k analýze. Dále se připraví vzorky pro kontrolu kvality (QC) měřených dat, které slouží k ověření, že měření v průběhu celé sekvence proběhla za stejných podmínek, a tak získaná data jsou konzistentní. V případě metabolomických studií se jedná o směs analyzovaných vzorků ('pool'), ve které by měly být obsaženy ionty přítomné ve všech analyzovaných vzorcích. QC vzorek je nastřikován minimálně desetkrát na začátku sekvence a dále je zařazen po každých 5-10 vzorků v průběhu celé sekvence. V případě správné funkce zařízení, PCA analýza naměřených dat ukáže jejich těsné seskupení.

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

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

Podmínky měření extraktů semen máku jsou uvedeny v **Tabulkách 1 a 2** pro kapalinovou chromatografii a v **Tabulce 3** pro hmotnostní spektrometrii.

Tabulka 1: Podmínky UHPLC separace

LC	
Teplota kolony	60 °C

Objem nástřiku	1 µl
Teplota autosampleru	5 °C
Kolona	BEH C18 (2,1x100 mm, 1,7 µm)
Mobilní fáze	A - 5 mM mravenčan amonný ve směsi vody a methanolu (95/5, v/v) + 0,1 % kyselina mravenčí
	B - 5 mM mravenčan amonný ve směsi vody, methanolu a propan-2-olu (5/30/65, v/v/v) + 0,1 % kyselina mravenčí

Tabulka 2: Gradient mobilní fáze (při ionizaci ESI+)

Čas	Průtok	A	B
[min]	[ml/min]	[%]	[%]
0	0,4	90	10
1	0,4	50	50
5	0,4	20	80
11	0,4	0	100
19	0,5	0	100
20	0,5	90	10
22	0,4	90	10

Tabulka 3: Podmínky MS detekce

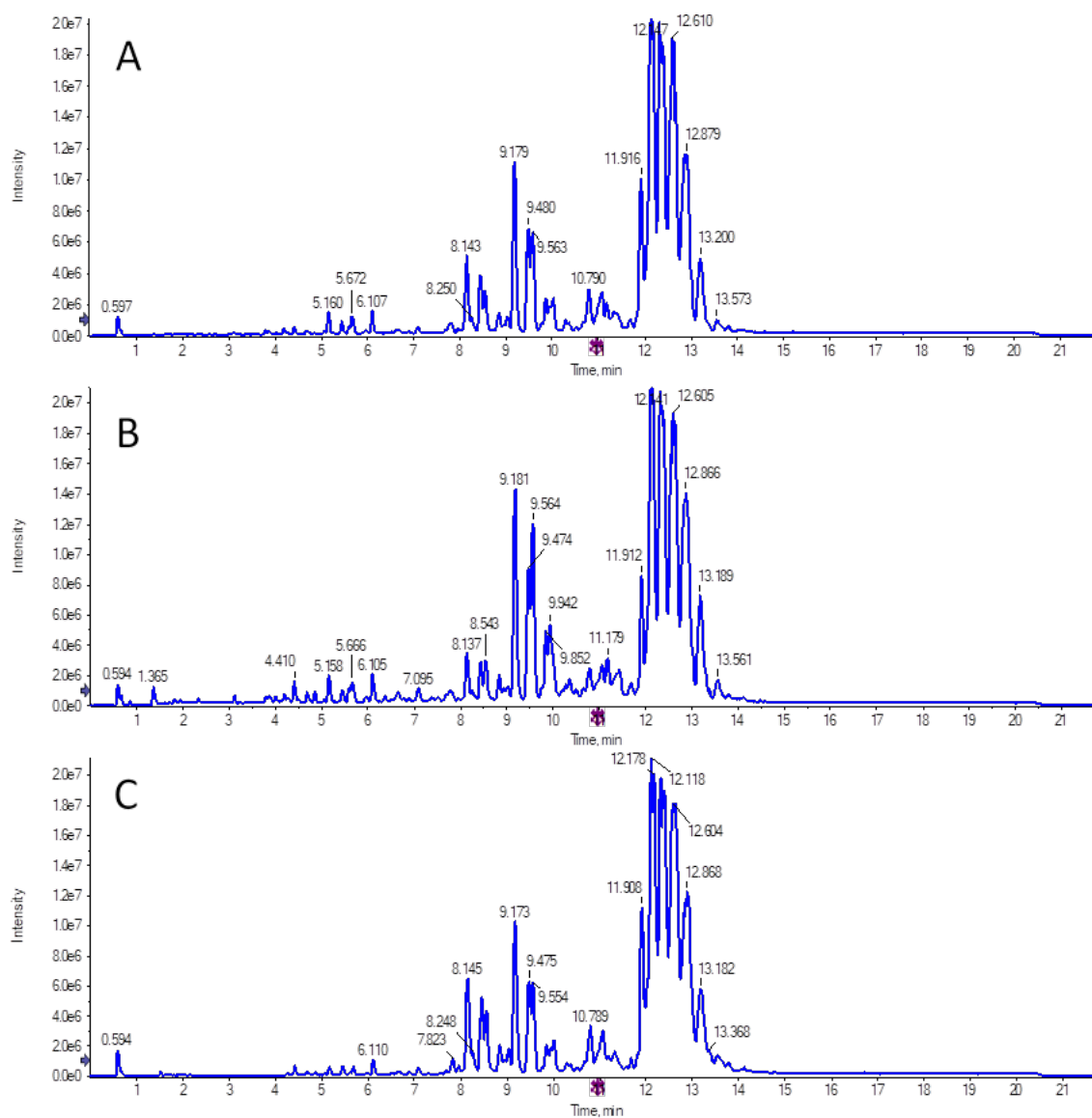
MS	
Iontový zdroj	Duo Spray™ s oddělenými ESI a APCI iontovými zdroji
Ionizační technika	ESI +
Teplota iontového zdroje	480 °C
Napětí na kapiláře	+5000 V
Rozsah snímaných hmot (<i>m/z</i>)	100–1200
Kolizní energie	35 ± 15 eV
Tlak nepulzačního plynu	50 psi (345 kPa)
Tlak sušícího plynu	50 psi (345 kPa)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

3.8 Detekce a potvrzení specifických markerů

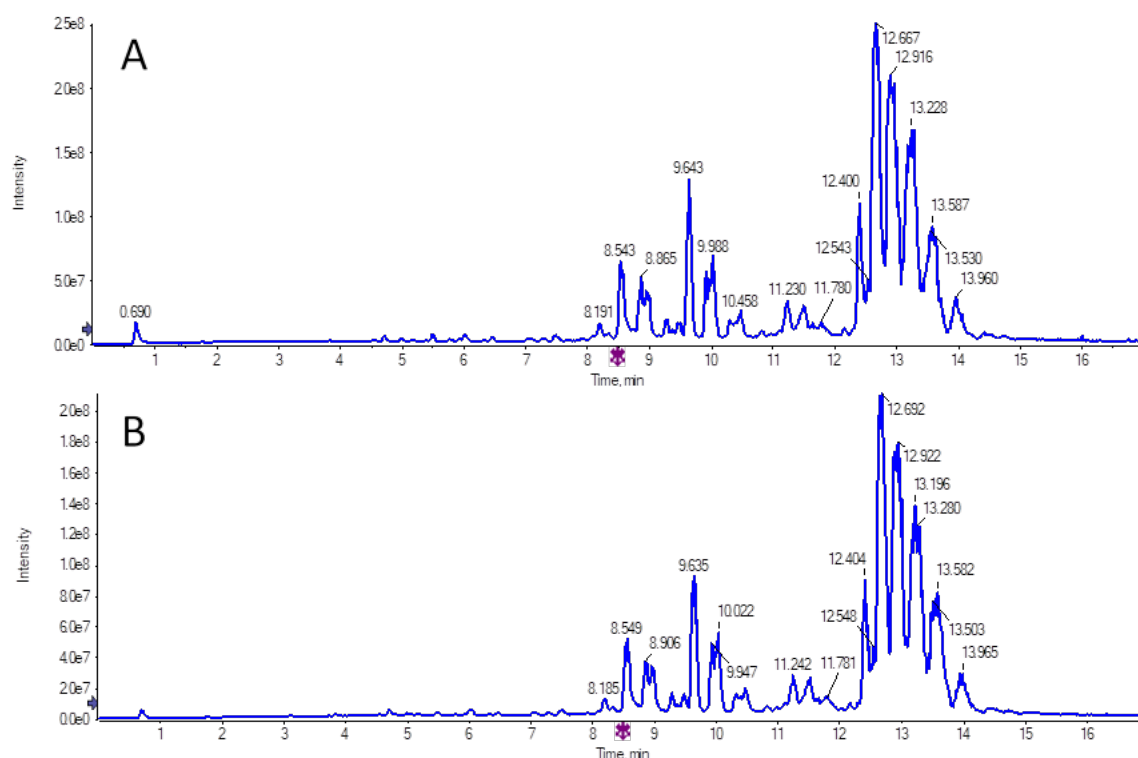
3.8.1 U-HPLC-HRMS analýza

Extrakty vzorků jsou za výše uvedených podmínek vyšetřeny v pozitivním módu ionizace (ESI+). Získané „fingerprinty“ ethanolových extraktů makových semen různého původu jsou bohaté, vizuálně však nelze rozdíly hodnotit (**Obrázek 1**). Řada složek metabolomu není totiž chromatograficky separována, separovány jsou až spektrálně,

dekonvolucí. Při klasifikaci exportovaných dat chemometrickými metodami jsou potom zohledněny poměry normalizovaných relativních intenzit jednotlivých iontů/látek (viz níže). Stejný případ je i v případě termostabilizovaných a tepelně neošetřených máků (**Obrázek 2**). Získaná data jsou zpracována pomocí statistických chemometrických analýz v programu SIMCA, jejichž výsledky jsou ukázány níže (**Obrázky 3-8**).



Obrázek 1: Ukázka U-HPLC-ESI-HRMS „base peak“ chromatogramu (BPC) vzorků makových semen různého původu (A – Čína; B – Španělsko; C – Česká republika), měřených v pozitivním módu ionizace



Obrázek 2: Ukázka U-HPLC-ESI-HRMS „base peak“ chromatogramu (BPC) vzorků makových semen (A – termostabilizovaná; B – neošetřená), měřených v pozitivním módu ionizace

3.8.2 Vícerozměrná statistická analýza metabolomických dat

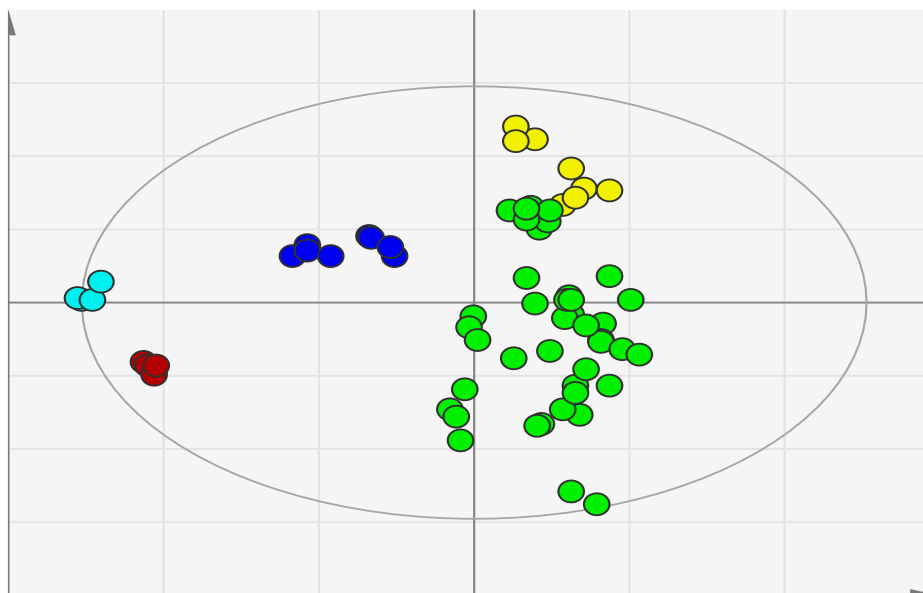
Data získaná U-HPLC-HRMS analýzou je dále nutné zpracovat. Ke zpracování a interpretaci vícerozměrných dat získaných během metabolomických analýz se využije metody multivariační chemometrické analýzy, nejčastěji analýzy hlavních komponent (*Principal Component Analysis*, PCA). Tato statistická metoda 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 softwarů MarkerView a SIMCA, které obsahují 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 zpracování dat pro rozlišení země původu

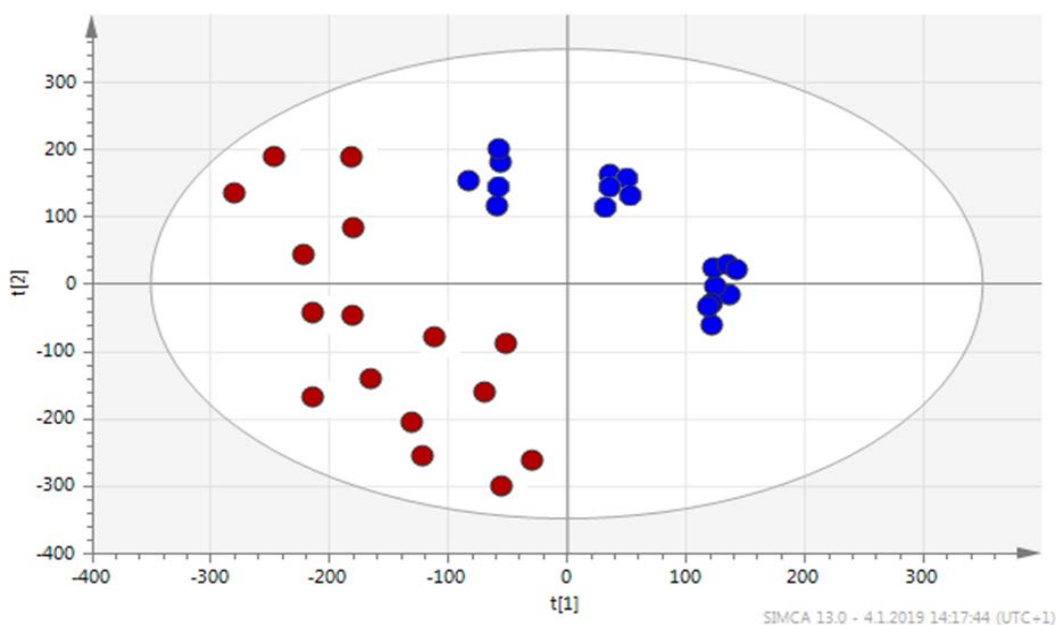
bylo detekováno 1218 iontů a v případě dat pro průkaz termostabilizace máku 1023 iontů. Pro procesování byla data normalizována na celkovou sumu ploch. Následně bylo použito Paretovo odstupňování (Pareto scaling) a provedena analýza hlavních komponent (**Obrázek 3 a 4**). Takto byly získány grafy komponentních vah a grafy komponentního skóre.

V dalším kroku byla data podrobena diskriminační analýze nejmenších čtverců (PLS-DA). Vytvořeny byly tři PLS-DA modely (**obrázek 5-8**). 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 Q^2 vyšší než 0,5 naznačuje dobrou kvalitu modelu a hodnota Q^2 vyšší než 0,9 pak excelentní model. Hodnoty parametrů R^2X , R^2Y a Q^2 vytvořených PLS-DA modelů jsou shrnuty v **Tabulce 4**.

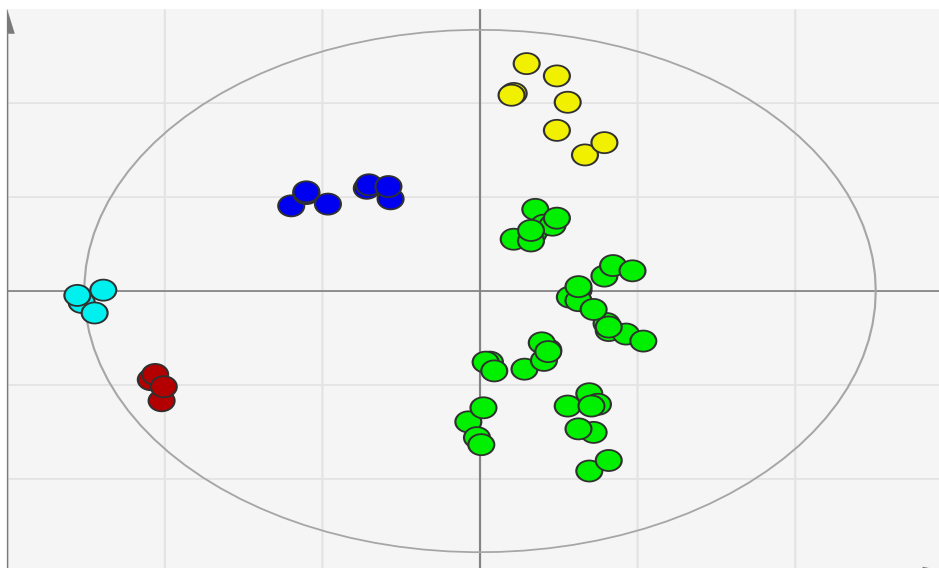
Po získání uvedených PLS-DA modelů byla provedena jejich validace. Jednalo se o interní validaci, tzv. cross-validaci, která byla provedena v sedmi cyklech. Validací modelů byly zjištěny rozpoznávací a predikční schopnosti. Rozpoznávací schopnost znázorňuje procentuální úspěšnost správně zařazených vzorků 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 tří vytvořených PLS-DA modelů jsou uvedeny v **Tabulce 5**.



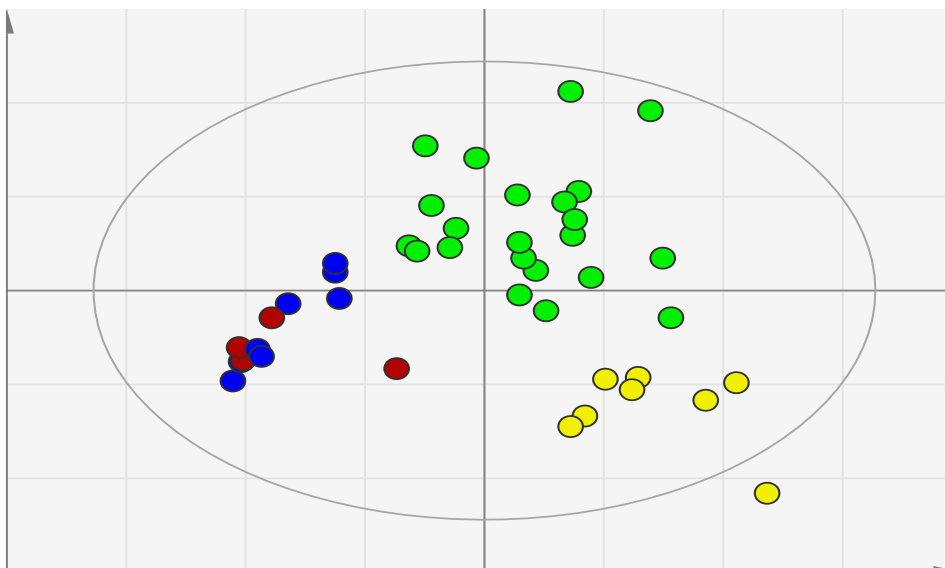
Obrázek 3: PCA analýza dat z metabolického „fingerprintingu“ ethanolových extraktů semen máku původem z Austrálie (tmavě modrá barva), Číny (červená barva), Turecka (žlutá barva), Španělska (světle modrá barva) a původem souhrnně ze zemí Střední Evropy – Slovensko, Německo, Rakousko a Česká republika (zelená barva), pozitivní mód ionizace (ESI+).



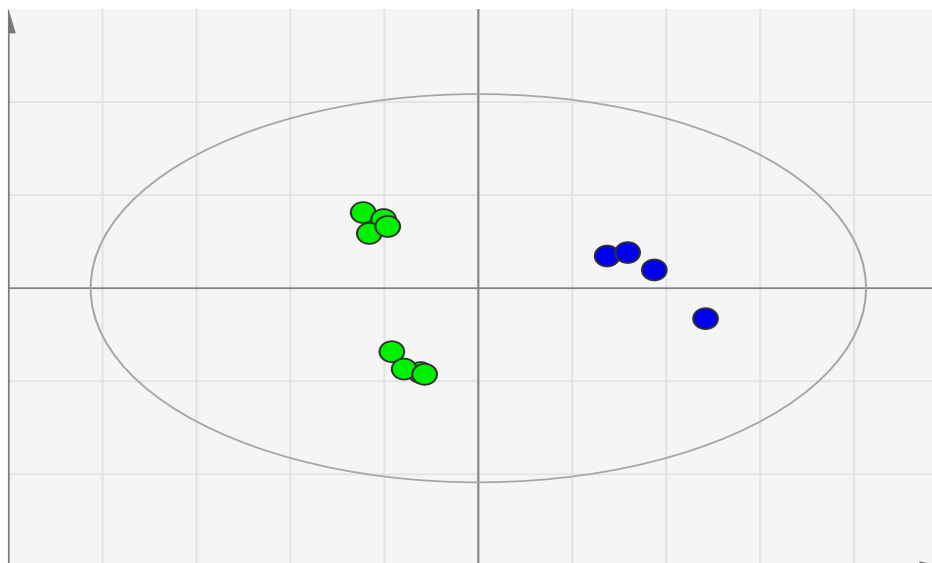
Obrázek 4: PCA analýza dat z metabolického „fingerprintingu“ ethanolových extraktů termostabilizovaných tmavě modrá barva a neošetřených (červená barva) semen máku, pozitivní mód ionizace (ESI+).



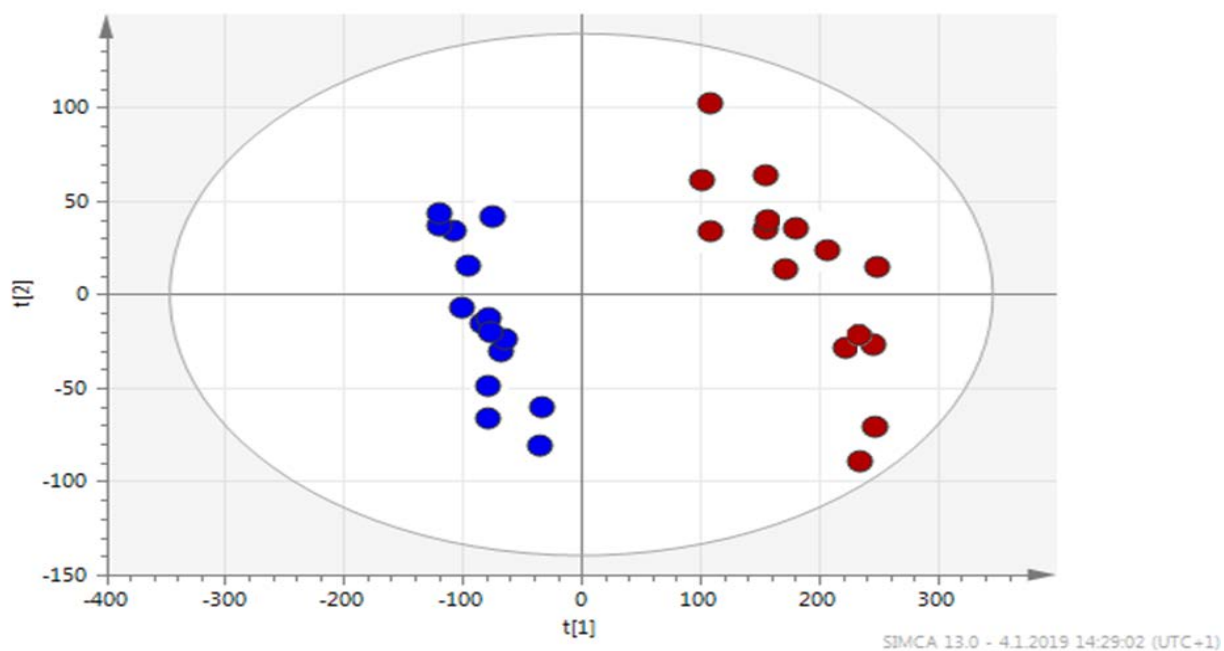
Obrázek 5: PLS-DA analýza dat z metabolomického „fingerprintingu“ ethanolových extraktů semen máku původem z Austrálie (tmavě modrá barva), Číny (červená barva), Turecka (žlutá barva), Španělska (světle modrá barva) a původem souhrnně ze zemí Střední Evropy – Slovensko, Německo, Rakousko a Česká republika (zelená barva) – model A, pozitivní mód ionizace (ESI+).



Obrázek 6: PLS-DA analýzy dat z metabolomického „fingerprintingu“ ethanolových extraktů semen máku původem z Rakouska (modrá barva), Německa (červená barva), Slovenska (žlutá barva) a České republiky (zelená barva) – model B, pozitivní mód ionizace (ESI+).



Obrázek 7: PLS-DA analýzy dat z metabolomického „fingerprintingu“ ethanolových extraktů semen máku původem z Německa (modrá barva) a Rakouska (zelená barva) – model C, pozitivní mód ionizace (ESI+).



Obrázek 8: PLS-DA analýza dat z metabolomického „fingerprintingu“ ethanolových extraktů termostabilizovaných tmavě modrá barva a neošetřených (červená barva) semen máku – model D, pozitivní mód ionizace (ESI+).

Tabulka 4: Hodnoty parametrů R^2X , R^2Y a Q^2 vytvořených PLS-DA modelů

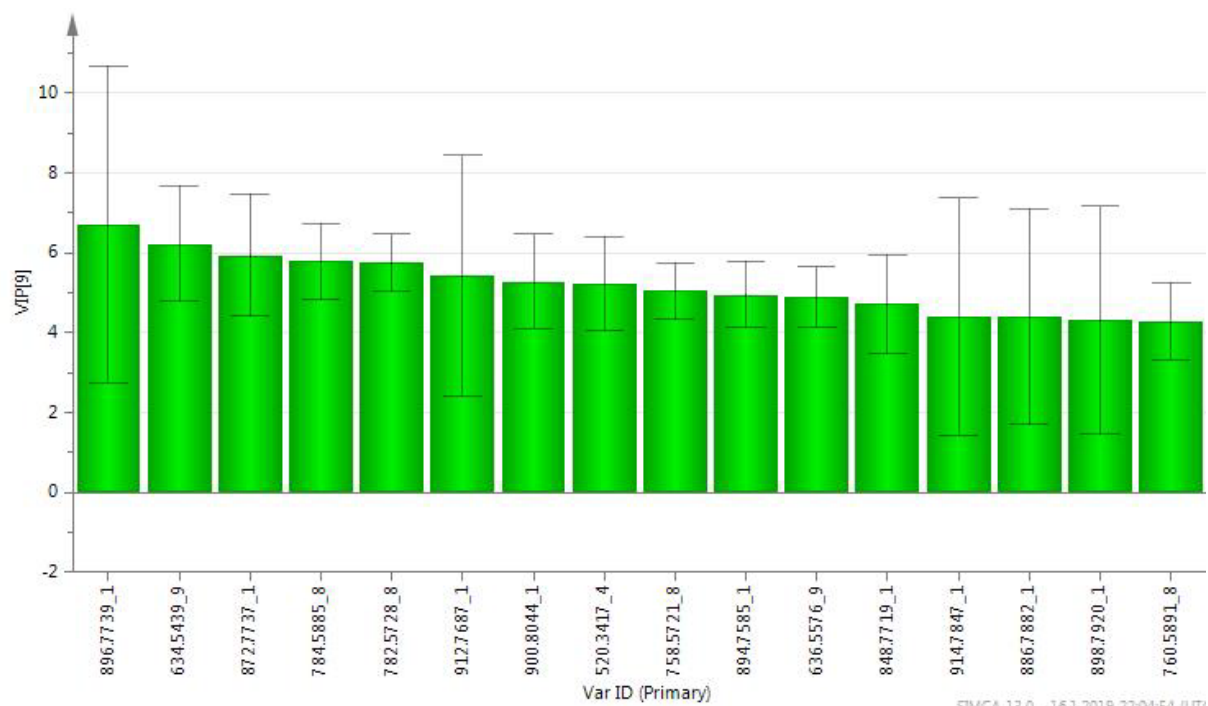
Model	R^2X	R^2Y	Q^2
Model A	0,892	0,978	0,915
Model B	0,751	0,933	0,577
Model C	0,869	0,997	0,974
Model D	0,652	0,882	0,870

Tabulka 5: Hodnoty rozpoznávacích a predikčních schopností vytvořených PLS-DA modelů

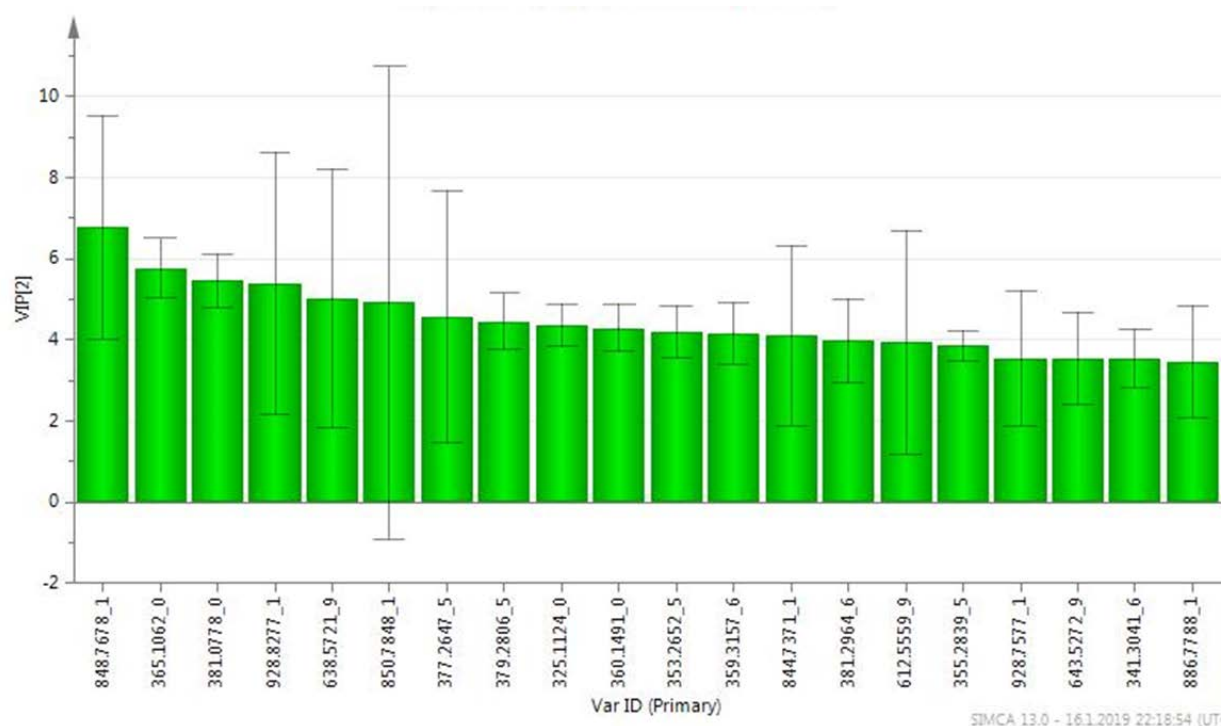
Model	Rozpoznávací schopnost [%]	Predikční schopnost [%]
Model A	97	80
Model B	100	96
Model C	100	100
Model D	100	100

3.8.3 Identifikace charakteristických markerů

Markery, t.j. metabolity které nejvíce ovlivňují rozdělení vzorků do skupin, byly určeny pomocí tzv. VIP (variable importance plot) plotů, které jsou pro klasifikaci dle geografického původu znázorněny na **Obrázku 9** a dle tepelného ošetření na **Obrázku 10**. Jde o látky, které jsou ve statisticky významně vyšší míře přítomny v jedné ze skupin. Identifikace markerů byla realizována pomocí pokročilých softwarů, jimiž je vybaven měřicí systém. Na základě přesné hmoty a izotopového vzoru jsou schopny navrhnout pravděpodobný sumární (elementární) 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 ± 5 ppm (parts per million). Při nízké intenzitě zkoumané látky lze ve výjimečných případech pracovat s hodnotou do ± 10 ppm. Konfirmace identity nalezených látek probíhá na základě přítomnosti specifických molekulových fragmentačních iontů, tedy míry shody naměřených MS/MS fragmentů s teoretickými (in silico) nebo v databázi nalezenými MS/MS fragmenty konkrétních molekul. Důležité markery pro odlišení geografického původu jsou uvedeny v **Tabulce 6**. V **Tabulce 7** jsou uvedeny markery pro odlišení termostabilizovaného a neošetřeného máku. Zároveň je u některých látek uvedena navržená identifikace. Je nutné zdůraznit, že pro účely autentikace /klasifikace je dostačující znalost hodnot m/z příslušného diagnostického iontu.



Obrázek 9: VIP plot prezentující výsledky PLS-DA analýzy souboru vzorků máků různého geografického původu v pozitivním modu ionizace.



Obrázek 10: VIP plot prezentující výsledky PLS-DA analýzy souboru termostabilizovaných s neošetřených vzorků máku v pozitivním modu ionizace.

Tabulka 6: Identifikované markery geografického původu máku

RT (min)	m/z	Sumární vzorec	Odchylka od přesné hmoty (ppm)	adukt	Identifikace	Původ máku
1,60	526,3394	C ₂₉ H ₄₇ N ₂ NaO ₅	0,54	[M+H] ⁺	-	Turecko
4,41	520,3417	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	-1,92	[M+H] ⁺	LPC 18:2	Austrálie, Čína
4,68	496,3417	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	3,83	[M+H] ⁺	LPC 16:0	Německo
4,85	522,3478	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	4,60	[M+H] ⁺	LPC 18:1	Austrálie, Čína
7,94	714,5096	C ₃₉ H ₆₉ O ₈ P	3,92	[M+NH ₄] ⁺	PA 36:4	Slovensko
8,11	365,3423	C ₂₄ H ₄₄ O ₂	2,46	[M+H] ⁺	-	Španělsko
8,31	716,5242	C ₃₉ H ₇₄ NO ₈ P	2,37	[M+H] ⁺	1-Palmitoyl-2-linoleoyl PE	Slovensko
9,58	601,5210	-	-	-	-	Rakousko, Německo
11,17	912,7687	C ₅₇ H ₉₈ O ₇	3,94	[M+NH ₄] ⁺	22:1-Glc-Stigmasterol	Rakousko
11,39	888,7693	C ₅₅ H ₉₈ O ₇	4,73	[M+NH ₄] ⁺	20:0-Glc-Sitosterol	Česká republika
11,72	916,8003	C ₅₇ H ₁₀₂ O ₇	4,25	[M+NH ₄] ⁺	22:0-Glc-Sitosterol	Čína
12,73	896,7716	C ₅₇ H ₉₈ O ₆	1,56	[M+NH ₄] ⁺	TG 54:6	Slovensko

LPC – lysofosfatidylcholin, PA – fosfatidová kyselina, TG – triacylglycerol, x:y = počet uhlíků v navázaných řetězcích : počet dvojných vazeb v navázaných řetězcích)

Tabulka 7: Identifikované markery termostabilizovaného a tepelně neošetřeného máku

RT (min)	m/z	Sumární vzorec	Odchylka od přesné hmoty (ppm)	adukt	Identifikace	Původ máku
0,59	381,0778	-	-	-	-	Neošetřený mák
0,60	365,1062	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	2,2	[M+Na] ⁺	Disacharid	Neošetřený mák
0,61	325,1124	C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀	-1,5	[M+H] ⁺	-	Neošetřený mák
5,12	355,2839	C ₂₁ H ₃₈ O ₄	-1,1	[M+H] ⁺	MG 18:2	Neošetřený mák
5,40	353,2562	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	0,0	[M+Na] ⁺	MG 16:0	Neošetřený mák
6,10	381,2964	C ₂₁ H ₄₂ O ₄	-3,2	[M+Na] ⁺	MG 18:0	Neošetřený mák
10,55	949,6868	C ₅₁ H ₉₆ O ₁₅	-4,8	[M+H] ⁺	DGDG 36:0	Termostabilizovaný mák
10,57	933,7102	-	-	-	-	Termostabilizovaný mák
10,81	904,7577	C ₅₅ H ₉₈ O ₈	-1,5	[M+NH ₄] ⁺	TG 52:4;2	Termostabilizovaný mák

MG- monoacylglycerol, TG – triacylglycerol, DGDG - digalactosyldiacylglycerol x:y;z = počet uhlíků v navázaných řetězcích : počet dvojných vazeb v navázaných řetězcích; stupeň oxidace

3.9 Pracovní charakteristiky metody

3.9.1 Selektivita metody

Technika U-HPLC-HRMS umožňuje, díky chromatografické a spektrální separaci, účinnou detekci širokého spektra složek metabolomu (uvažovány sloučeniny do 1200 D). Selektivita metody je určena rozlišovací schopností (resolution power, 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 .

3.9.2 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. Pro omezení nežádoucích vlivů je doporučeno respektovat následující opatření:

- 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 máku, tj. míchání (ředění) kvalitní suroviny – potravinářského máku mákem technickým či její úplné nahrazení, je možné odhalit vhodnými rutinními analytickými postupy, kdy se stanovuje profil opiových alkaloidů. Pokud jsou však tato semena technického máku tepelně ošetřena, hodnoty obsahu opiových alkaloidů již nejsou ukazateli falšovaného máku. Za těchto podmínek se autentikace původu makových semen stává obtížnou, neboť dosud spolehlivá laboratorní metodika nebyla k dispozici, zřejmě i proto, že problém resp. požadavek na odhalení tohoto typu falšování je specifický pouze pro několik středoevropských zemí, které pěstují potravinářský mák. Dosud publikované studie zaměřené na mák řešily především kvantitativní extrakci a analýzu jednotlivých skupin látek jako jsou opiové alkaloidy / steroly / mastné kyseliny.

Předkládaná metodika vychází z tzv. metabolomiky resp. strategie metabolomického fingerprintingu, tedy využití necílové analýzy, která umožňuje provést rychlou analýzu vhodnou k autentikaci geografického původu a k průkazu termostabilizace máku. Vyvinutá metodika přináší nový způsob analýzy pomocí „fingerprintingu“ celkového metabolomu s využitím ultra-účinné kapalinové chromatografie spojené s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (U-HPLC–HRMS) s ionizací elektrosprejem. Tento přístup je zcela unikátní a nebyl doposud publikován. Je ale třeba zdůraznit potřebu dalšího zvyšování robustnosti chemometrických modelů pomocí rozšiřování počtu analyzovaných autentických vzorků máku používaných k jejich konstrukci.

Předností komplexního necílového fingerprintingu frakcí extraktů metodou UHPLC–HRMS je především množství informací obsažených v hmotnostních spektrech detekovaných metabolitů (veškeré ionizovatelné sloučeniny v oblasti molekulových hmot od 100 do 1200 Da). Metodika poskytuje spolehlivou kvalitativní i kvantitativní informaci a je robustní. Tato inovativní metodika analýzy metabolomu máku umožňuje také retrospektivní prohledávání dat a dodatečnou identifikaci původně necílené sloučeniny, což konvenční rutinní metody cílové analýzy neumožňují.

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 makových semen (ověření geografického původu makových semen, průkaz tepelného ošetření).

Metodika byla vyvinuta pro účely projektu **QK1720263I1530272 – „Diagnostické metody pro laboratorní kontrolu pravosti máku setého“**. Aplikace metody v rámci tohoto projektu významně přispěje k potvrzení původu makových semen a zároveň k popsání chemických změn, které probíhají během termostabilizace máku.

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 a výzkumných centrech.

6 Ekonomické aspekty

Výhodou výše popsané metodiky analýzy máku 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. Vašák, J. a kol. *Mák*, první vydání. Praha: Powerprint, (2010).
2. Kocián, P. mák setý - Papaver somniferum. <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=228>; ze dne 21. 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 21. 2. 2018
5. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. <http://www.szpi.gov.cz/clanek/inspekce-zjistila-dalsi-sarze-maku-s-nadlimitnim-obsahem-morfinu.aspx>; ze dne 21. 2. 2018
6. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. <http://www.szpi.gov.cz/clanek/inspekce-nevpustila-na-trh-24-tun-maku-s-nepovolenym-obsahem-morfinu.aspx>; ze dne 21. 2. 2018
7. Státní zemědělská a potravinářská inspekce <http://www.szpi.gov.cz/clanek/szpi-intenzivne-kontroluje-dovoz-a-zpracovani-maku-v-cr.aspx?q=JmNobnVtPTemaGw9bcOhaw%3d%3d>; ze dne 21. 2. 2018
8. DOPORUČENÍ KOMISE ze dne 10. září 2014 o správné praxi pro předcházení a snižování výskytu opiových alkaloidů v máku a makových produktech. Úřední věstník Evropské unie, 2014/662/EU.
9. Chýlková, M. (Potravinářská komora ČR). Přijde (někdy ta správná) doba maková. <http://ceskymodrymak.cz/prijde-nekdy-ta-spravna-doba-makova/>; ze dne 21. 2. 2018
10. The vaults Erowid, Opium Poppy. <https://www.erowid.org/plants/poppy/>; ze dne 21. 2. 2018
11. 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.
12. Rubert, J.; Lacina, O.; Fauth-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.
13. 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.
14. 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.
15. 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

V průběhu vývoje a optimalizace metody byly publikovány předběžné pilotní výsledky na mezinárodní konferenci RAFA 2017 (*8th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis*, 7.-10. 11. 2017, Prague, Czech republic).

- Likarova M, Svobodova V, Kocourek V, Hajslova J: THE AUTHENTICATION OF POPPY SEEDS BY U-HPLC–HRMS/MS. 8th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis. Prague, CZ, 7.-10.11.2017.

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 pro charakterizaci semen máku setého pomocí metabolomických fingerprintů / profilů

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: 28