



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

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

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Petra Jonátová, Zbyněk Džuman, Milena Stránská, Jana Hajšlová

Multi-detekční metoda pro analýzu toxických pyrrolizidinových alkaloidů a jejich N-oxidů v potravinách

Praha, 2020

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za finanční podpory Technologické agentury České republiky (TAČR) v rámci řešení projektu TJ02000238 (Vývoj inovativních analytických strategií využitelných pro kontrolu bezpečnosti a autenticity potravin a potravinářských surovin). 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 řešené problematiky	5
3	Vlastní popis metodiky	8
3.1	Použitelnost zvolené analytické strategie	8
3.2	Princip analytické metody	8
3.3	Chemikálie, spotřební materiál, referenční materiály	9
3.4	Přístroje a zařízení	10
3.5	Použitý software	10
3.6	Pracovní postup	10
3.7	LC–MS analýza pyrrolizidinových alkaloidů	12
3.8	Pracovní charakteristiky metody	15
4	Srovnání novosti postupů	19
5	Popis uplatnění certifikované metodiky	20
6	Ekonomické aspekty	21
7	Seznam související použité literatury	22
8	Seznam publikací, které předcházely metodice	23
AUTOŘI A OPONENTI		24

1 Cíl metodiky

Jedním z dílčích cílů projektu TJ02000238 (INOVAMET – Vývoj inovativních analytických strategií využitelných pro kontrolu bezpečnosti a autenticity potravin a potravinářských surovin) zahájeného v březnu 2019 pod záštitou Technologické agentury České republiky, bylo vyvinout a následně validovat spolehlivou analytickou metodu, která by kontrolním laboratořím dozorových orgánů umožnila analýzu pyrrolizidinových alkaloidů (PA) a jejich N-oxidů, jež by se měly výhledově monitorovat v rámci Evropské Unie (EU) v potravinách.

Vyhotovená metodika je určena pro kontrolu potravin a doplňků stravy s obsahem léčivých bylin, zejména pak herbálních čajů především v laboratořích dozorových orgánů.

2 Současný stav řešené problematiky

Potraviny rostlinného původu představují přibližně 60 % standardního spotřebního koše člověka. Největší podíl reprezentují obiloviny a pekárenské výrobky následovány zeleninou, luštěninami a ovocem. Oproti těmto komoditám je spotřeba potravin a pochutin typu bylinných čajů, jednodruhových či vícedruhových koření nebo různých druhů doplňků stravy na herbální základě relativně zanedbatelná,¹ i když u dnešní společnosti je vlivem preferencí „zdravého“ životního stylu neustále s rostoucí tendencí. Kromě více či méně „ověřených“ zdravotních benefitů však s sebou tato skupina potravin může nést také toxikologická rizika v podobě různých druhů kontaminujících látek. Jednou z takových skupin mohou být i rostlinné alkaloidy. Jedná se velmi často o „toxické“ látky, které jsou biosyntetizovány přímo rostlinami (plevelnatými rostlinami i zemědělskými plodinami) jako součást jejich sekundárního metabolismu. Funkčně tyto látky pak slouží většinou jako ochranný prvek před škůdci. V současné době je známo, že tyto látky produkuje více než 4 000 různých rostlinných druhů. Z fyziologického hlediska se ovšem může jednat jak o sloučeniny s pozitivním (využití v lékařství – antimalarika, antihemoragika, antiarytmika, analgetika, atd.), tak i negativním charakterem účinku (toxický účinek, halucinogenní účinek, drogy).^{2,3}

Alkaloidy (více než 6 000 různých sloučenin) jsou obecně klasifikovány do tří skupin, které se liší chemickou strukturou, prekurzory vzniku i vlastní toxicitou⁴:

- i) pravé alkaloidy
- ii) pseudoalkaloidy
- iii) protoalkaloidy

Toxikologicky nejvýznamnějšími skupinami alkaloidů jsou kromě pyrrolizidinových alkaloidů (PA), které jsou předmětem této certifikované metodiky, také tropanové alkaloidy (TA), chinolizidinové alkaloidy (QA) či piperidin-pyridonové alkaloidy a mnohé další. Chemicky se jedná o přírodní bazické sloučeniny, které mají ve své molekule zabudovaný 1 či 2 atomy dusíku a bývají odvozeny především od aminokyselin. Charakteristický je pro tyto látky jejich lipofilní charakter a obecně dobrá rozpustnost v nepolárních organických rozpouštědlech a alkoholech.⁵

Pyrrolizidinové alkaloidy jsou prakticky celosvětově nejrozšířenější skupinou toxinů v rostlinách. V současné době je známo kolem 600 různých PA, které jsou primárně

biosyntetizovány botanickými rodinami *Boraginaceae* (čeleď brutnákovité), *Asteraceae* (čeleď hvězdnicovité) a *Fabaceae* (čeleď bobovité). Zpravidla se vyskytují ve formě terciárních bází či N-oxidů pyrrolizidinových alkaloidů (PANO). Strukturně se jedná o estery kyseliny necinové a hydroxylovaných methylpyrrolizidinů (necinových bází). Rozmanitost využitelných necinových bází pak může vést k tvorbě tří různých typů PA^{2,5}:

- i) 1,2-nenasycené PA – dvojná vazba v poloze 1,2
- ii) otevřené nebo cyklické diestery – další hydroxylová skupina v poloze 7
- iii) PA bez konverze na N-oxid deriváty díky vystavení N-methylaci pyrrolizidinového kruhu

Cílovým orgánem toxického účinku PA u konzumentů jsou játra a plíce. Hlavními příznaky intoxikace PA bývají zvracení, zvětšení jater nebo krvácivé průjmy. Tyto symptomy ovšem provázejí spíše akutní či subakutní otravu PA, nikoliv její chronickou formu, která může vést především k veno-okluzivní chorobě jater (HVD) s vysokým procentem následných úmrtí nebo k cirhóze jater. Jako toxikologicky pro člověka nejrizikovější je hodnocena skupina 1,2-nenasycených PA. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařadila několik testovaných zástupců této skupiny (lasiocarpine – 1987, monocrotaline – 1987, riddelliine – 2002) do kategorie 2B, tj. potencionální karcinogeny pro člověka. Toto zařazení bylo provedeno na základě zjištění, že tyto látky se podílejí na tvorbě reaktivních pyrrolů, které reagují s proteiny a vytvářejí adukty s DNA. Naopak je tomu u 1,2-nasycených PA, které nevytvářejí reaktivní metabolity a jejich celková toxicita je pro člověka tedy relativně nízká. U některých z ostatních typů PA (senkirkine, retrorsine, seneciphylline, atd.) je zatím deklarována IARC kategorie 3, tj. neklasifikovatelné, pokud jde o karcinogenitu pro člověka.^{5,6}

Na legislativních opatřeních ze strany Evropské Komise se v současné době vytrvale pracuje s předpokládaným termínem schválení finální verze maximálních limitů pro sumu 21 PA^a v roce 2020. Tato opatření by se měla vztahovat právě na výše zmíněné rizikové komodity: herbální čaje a jejich nálevy, byliny a jejich nálevy a doplňky stravy s rostlinným či pylovým základem. Definitivní podoba maximálních limitů zatím není známa a prozatímní navrhované

^a Suma 21 PA - echimidine, echimidine-N-oxide, europine, europine-N-oxide, heliotrine, heliotrine-N-oxide, intermedine, intermedine-N-oxide, lasiocarpine, lasiocarpine-N-oxide, lycopsamine, lycopsamine-N-oxide, retrorsine, retrorsine-N-oxide, senecionine, senecionine-N-oxide, seneciphylline, seneciphylline-N-oxide, senecivernine, senecivernine-N-oxide, senkirkine

hodnoty jsou aktuálně připomínkovány členskými státy. EFSA vědecký panel pro kontaminanty v potravinovém řetězci (CONTAM panel) dospěl k závěru, že zavedení hodnoty tolerovatelné denní dávky (TDI) pro genotoxické a karcinogenní 1,2-nenasycené PA by nebylo vhodné, a proto stanovil v roce 2011 expoziční limit MOE (= margin of exposure), který slouží jako referenční bod pro srovnání s odhadovanou expozicí v potravě, na úroveň 7 ng/kg živé váhy.^{3,7}

Nejčastěji využívanou analytickou metodou pro stanovování PA je v současné době vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC–MS/MS). Je ovšem všeobecně známo, že řada zástupců PA má vůči sobě izomerní charakter, tzn. že mají tyto látky stejnou molekulovou hmotnost a při využití MS/MS generují stejná fragmentační spektra, tudíž je není možné takto detekovat. Zbývajícím řešením je chromatografická separace, ale i ta bývá často u řady LC metod velmi problematická a dochází ke koeluci daných látek. Příkladem jsou skupiny i) echinatine / indicine / intermedine / lycopsamine / rinderine, stejně jako jejich PANO formy, nebo ii) integerrimine / senecionine / senecivernine, atd. Tato skutečnost by samozřejmě mohla vnášet řadu problémů do správné identifikace a následné kvantifikace PA a PANO a to včetně skutečnosti, že pro řadu z těchto analytů neexistují komerčně dostupné analytické standardy.^{3,8}

3 Vlastní popis metodiky

3.1 Použitelnost zvolené analytické strategie

Předložená analytická metoda je vhodná pro stanovení 32 pyrrolizidinových alkaloidů ve vzorcích potravin a doplňků stravy s obsahem léčivých bylin a obecně herbálním základem, tj. herbální čaje, jedno-druhové či více-druhové směsi koření, doplňky stravy ve formě koncentrovaného rostlinného materiálu ve formě tablet, atd. Optimalizována a validována byla pro matrice (i) směsný herbální čaj a (ii) koření (oregano).

3.2 Princip analytické metody

Pyrrolizidinové alkaloidy jsou ze vzorku extrahovány směsí methanolu a deionizované vody (60:40, v/v) okyselené 0,4% kyselinou mravenčí. Identifikace a kvantifikace cílových analytů se provádí pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie (U-HPLC) na reverzní fázi (RP) ve spojení s tandemovou (MS/MS) či vysokorozlišovací (HRMS) hmotnostní spektrometrií. Analyty jsou kvantifikovány pomocí metody externí kalibrace (kalibrační křivky). Sledované analyty včetně jejich přesných hodnot m/z jsou uvedeny v **Tabulce I**.

Tabulka I: Přehled stanovovaných pyrrolizidinových alkaloidů (PA), jejich sumárních vzorců a přesných hmot iontů pro LC-MS analýzu

Analyt	Označení	CAS	Sumární vzorec	Přesná m/z iontu $[M+H]^+$
Echimidine*	PA1	520-68-3	$C_{20}H_{31}NO_7$	398,2173
Echimidine-N-oxide*	PA2	41093-89-4	$C_{20}H_{31}NO_8$	414,2122
Europine*	PA3	570-19-4	$C_{16}H_{27}NO_6$	330,1911
Europine-N-oxide*	PA4	65582-53-8	$C_{16}H_{27}NO_7$	346,1860
Heliotrine*	PA5	303-33-3	$C_{16}H_{27}NO_5$	314,1962
Heliotrine-N-oxide*	PA6	6209-65-0	$C_{16}H_{27}NO_6$	330,1911
Intermedine*	PA7	10285-06-0	$C_{15}H_{25}NO_5$	300,1805
Intermedine-N-oxide*	PA8	95462-14-9	$C_{15}H_{25}NO_6$	316,1755
Lasiocarpine*	PA9	303-34-4	$C_{21}H_{33}NO_7$	412,2330
Lasiocarpine-N-oxide*	PA10	127-30-0	$C_{21}H_{33}NO_8$	428,2279
Lycopsamine*	PA11	10285-07-1	$C_{15}H_{25}NO_5$	300,1805
Lycopsamine-N-oxide*	PA12	95462-15-0	$C_{15}H_{25}NO_6$	316,1755
Retrorsine*	PA13	480-54-6	$C_{18}H_{25}NO_6$	352,1755
Retrorsine-N-oxide*	PA14	15503-86-3	$C_{18}H_{25}NO_7$	368,1704
Senecionine*	PA15	130-01-8	$C_{18}H_{25}NO_5$	336,1805
Senecionine N-oxide*	PA16	13268-67-2	$C_{18}H_{25}NO_6$	352,1755
Seneciphylline*	PA17	480-81-9	$C_{18}H_{23}NO_5$	334,1649
Seneciphylline-N-oxide*	PA18	38710-26-8	$C_{18}H_{23}NO_6$	350,1598
Senecivernine*	PA19	72755-25-0	$C_{18}H_{25}NO_5$	336,1805
Senecivernine-N-oxide*	PA20	101687-28-9	$C_{18}H_{25}NO_6$	352,1755

Analyt	Označení	CAS	Sumární vzorec	Přesná m/z iontu [M+H] ⁺
Senkirkine*	PA21	2318-18-5	C ₁₉ H ₂₇ NO ₆	366,1911
Echinatine	PA22	34221-41-5	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	300,1806
Echinatine-N-oxide	PA23	20267-93-0	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	316,1755
Erucifoline	PA24	40158-95-0	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆	350,1598
Erucifoline-N-oxide	PA25	123864-94-8	C ₁₈ H ₂₃ NO ₇	366,1548
Indicine	PA26	480-82-0	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	300,1806
Indicine-N-oxide	PA27	41708-76-3	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	316,1755
Jacobine	PA28	6870-67-3	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	352,1755
Jacobine-N-oxide	PA29	38710-25-7	C ₁₈ H ₂₅ NO ₇	368,1704
Monocrotaline	PA30	315-22-0	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	326,1598
Monocrotaline-N-oxide	PA31	35337-98-5	C ₁₆ H ₂₃ NO ₇	342,1548
Trichodesmine	PA32	548-90-3	C ₁₈ H ₂₇ NO ₆	354,1911

* Analyty očekávané v sumě PA ošetřených v budoucí legislativě (předpokládaný termín přijetí: rok 2020)

3.3 Chemikálie, spotřební materiál, referenční materiály

Chemikálie:

- Methanol (p. a., čistota 99,8 %, Penta, ČR)
- Kyselina mravenčí (čistota 98 %, Sigma-Aldrich, USA)
- Mravenčan amonný, (čistota 99 %, Sigma Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda (přečištěná z destilované vody pomocí zařízení Milli-Q, Millipore, Německo)

Spotřební materiál:

- Mikrofiltry, 0,2 µm, (Ciro, USA)
- Plastové (PTFE) odměrné baňky
- Plastové vialky (PTFE) s konickým dnem, víčka, septa
- Plastové (PTFE) kyvety
- Automatická mikropipeta, 0,5-5 ml, (TreffLab, Švýcarsko)
- Automatické mikropipety, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml, 1-10 ml, (TreffLab, Švýcarsko)
- Mikro-stříkačky o objemu 10, 100, 250 a 500 µl, (Hamilton, USA)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

Referenční materiály:

- Certifikované analytické standardy pyrrolizidinových alkaloidů uvedených v **Tabulce I** (doporučený výrobce: Phytolab GmbH & Co. KG)

3.4 Přístroje a zařízení

Příprava vzorku:

- Homogenizátor, střížný mlýnek Grindomix GM200, (Retsch, Německo)
- Laboratorní třepačka, model HS 250 basic, (IKA Labortechnik, Německo)
- Elektronické váhy, model HF-1200G, (A&D Instruments LTD, Japonsko)
- Analytické váhy, model GR-202, (A&D Instruments LTD, Japonsko)
- Centrifuga Rotina 35R, (Hettich, Německo)
- Přístroj pro přípravu deionizované vody Milli-Q, (Millipore, Německo)

Instrumentální systém U-HPLC-MS/MS:^b

- Ultra-účinný kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1290 Infinity II (USA)
- Analytická kolona Luna Omega C18 (150 x 2,1 mm, 1,6 µm), (Phenomenex, USA)
- Tandemový hmotnostní spektrometr QTRAP® 6500+, (SCIEX, Kanada)

3.5 Použitý software

- Analyst, verze 1.7, (SCIEX, Kanada)
- SCIEX OS, verze 1.5, (SCIEX, Kanada)

3.6 Pracovní postup

3.6.1 Příprava vzorků

Úprava vzorků před extrakcí:

Laboratorní vzorek je homogenizován pomocí laboratorního mlýnku a před odběrem navážky důkladně promíchán.

Extrakce:

1 g homogenního vzorku je navážen do 50 ml PTFE kyvety. Ke vzorku je přidáno 10 ml extrakčního rozpouštědla (0,4% HCOOH v MeOH/H₂O (60:40, v/v)) a směs je intenzivně třepána 30 min na laboratorní třepačce při 240 ot/min. Poté následuje centrifugace po dobu 5 min při 10 000 ot/min. Následně je extrakt zfiltrován přes mikrofiltr (0,22 µm) a převeden do

^b 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.

skleněné vialky. 1 ml vzorku připraveného tímto způsobem obsahuje ekvivalent 0,1 g původní matrice. Před analýzou PA je extrakt vzorku skladován v mrazícím zařízení při teplotě -18 °C.

3.6.2 Příprava směsného kalibračního roztoku PA

Analytické standardy jsou od výrobců dodávány jako pevné látky. Pevné standardy jsou před použitím naváženy s přesností na 4 desetinná místa pomocí analytických vah a následně rozpuštěny v methanolu v odměrných baňkách. Nařazené zásobní standardy individuálních PA i zbylé pevné standardy jsou skladovány při teplotě -18 °C.

Pokud jsou pevné analytické standardy od výrobců dodány ve formě vázané na anorganickou sůl (hydrobromid/hydrochlorid), je v důsledku toho nutné, aby při tvorbě směsného pracovního roztoku standardu PA, bylo kalkulováno nejen s čistotou analytického standardu, ale také s přepočítávacími faktory na jejich volné formy.

Směsný pracovní roztok PA o koncentraci 10 000 ng/ml je připraven odebráním vypočítaného objemu z každého zásobního roztoku individuálních PA obsažených v dané pracovní směsi a doplněn methanolem do finálního objemu 10 ml. Následně je roztok skladován při teplotě -18 °C v mrazícím zařízení.

3.6.3 Příprava pracovních směsí kalibračního roztoku PA využívaných pro tvorbu kalibračních řad

Ze směsného pracovního roztoku PA jsou postupným ředěním (vždy 1 ml pracovního roztoku PA doplněn do objemu 10 ml methanolem) připraveny ředěné pracovní směsi kalibračního roztoku PA o koncentracích 1 000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml a 0,1 ng/ml. Tyto roztoky jsou dále použity k přípravě kalibračních řad matričních a rozpouštědlových standardů a pro cílenou kontaminaci vzorků za účelem zjištění validačních charakteristik využitých metod, konkrétně výtěžnosti a opakovatelnosti. Všechny pracovní roztoky standardů jsou skladovány při teplotě -18 °C.

3.6.4 Příprava kalibračních roztoků rozpouštědlových a matričních standardů PA – externích kalibračních řad

Jednotlivé kalibrační standardy (body externí rozpouštědlové kalibrační řady) o požadovaných koncentracích (0,01 až 50 ng/ml) jsou připraveny odebráním vypočítaných objemů z ředěných pracovních směsí kalibračního roztoku PA do vialek, od foukáním methanolu jemným proudem dusíku a rozpuštěním v 1 ml finálního rozpouštědla.

Matriční kalibrační standardy (body externí matriční kalibrační řady) o požadovaných koncentracích (0,01 až 50 ng/ml) jsou připraveny odebráním vypočítaných objemů z ředěných pracovních směsí kalibračního roztoku PA do vialek, odfoukáním methanolu jemným proudem dusíku a rozpuštěním v 1 ml extraktu vzorku prostého kontaminace PA připraveného dle postupu uvedeného v kapitole 3.6.1.

Externí rozpouštědlové i matriční kalibrační řady jsou uchovány v mrazničce při teplotě -18 °C.

3.6.5 Příprava cíleně kontaminované matrice za účelem zjišťování a ověřování validačních charakteristik využitých metod, konkrétně výtěžnosti a opakovatelnosti

Do vhodně zvoleného rostlinného materiálu prostého kontaminace PA se před extrakcí přidá směsný roztok pracovního standardu (objem dle zvolené koncentrační hladiny). Po přidavku roztoku standardu do matrice se vzorek promíchá a nechá minimálně 30 min stát při laboratorní teplotě za účelem inkorporace cílových analytů do matrice. Následně je vzorek extrahován příslušným extrakčním postupem jako ostatní analyzované vzorky (viz. kapitola 3.6.1.).^c

3.7 LC–MS analýza pyrrolizidinových alkaloidů

Separace PA je prováděna za podmínek dále popsané ultra-účinné kapalinové chromatografie na koloně s reverzní fází Luna Omega C18 (150 x 2,1 mm, 1,6 µm), Phenomenex (USA) v **Tabulkách II a III**. K detekci PA je využito spojení U-HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Parametry MS/MS detekce jsou uvedeny v **Tabulce IV**. Sledované analyty jsou identifikovány na základě charakteristických fragmentačních přechodů prekurzorových iontů na ionty produktové (jednotlivé SRM přechody byly při vývoji metody optimalizovány pomocí individuálních standardů PA). Jednotlivé SRM přechody jsou uvedeny spolu s optimálními kolizními energiemi v **Tabulce V**. Měření se pak rutinně provádí v režimu MRM (*multiple reaction monitoring*). Pro každou sloučeninu je sledován jeden kvantifikační a dva konfirmační ionty.

^c Úroveň kontaminace stanovenými rostlinnými alkaloidy v matrici, která je v případě „prostého stavu“ využita k přípravě cíleně kontaminované matrice, je zjištěna prostřednictvím předběžného prověření („screening“) s využitím rozpouštědlových kalibračních roztoků standardů.

Tabulka II: Podmínky U-HPLC separace

LC	
Kolona	Luna Omega C18 (150 x 2,1 mm, 1,6 µm)
Teplota kolony	50 °C
Teplota autosampleru	10 °C
Objem nástřiku	1 µl
Mobilní fáze	2 mM mravenčan amonný v 0,2% HCOOH v H ₂ O
	2 mM mravenčan amonný v 0,2% HCOOH v MeOH
Doba analýzy	22 min

Tabulka III: Gradient mobilní fáze U-HPLC-(ESI+)–MS/MS

Čas	Průtok	A	B
[min]	[ml/min]	[%]	[%]
0	0,25	90	10
8	0,25	70	30
16	0,25	40	60
18	0,25	0	100
20	0,25	0	100
20,5	0,25	90	10
22	0,25	90	10

Tabulka IV: Podmínky MS detekce

MS	
Ionizační technika	Elektrosprej v pozitivním módu ionizace (ESI +)
Teplota iontového zdroje	500 °C
Ionizační potenciál	+ 5 500 V
Tlak zmlžovacího plynu (GAS 1)	50 psi
Tlak sušícího plynu (GAS 2)	60 psi
Tlak clonícího plynu (CURTAIN GAS)	35 psi
Tlak kolizního plynu (CAD)	medium

Tabulka V: Sledované fragmentační přechody iontů (SRM, *selected reaction monitoring*) a optimální hodnoty kolizní energie při tandemové hmotnostní spektrometrii

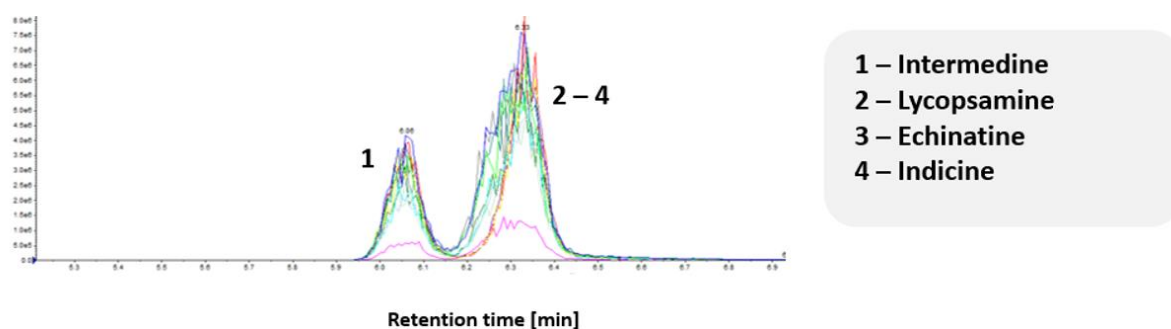
Analyt	Prekurzorový iont [M+H] ⁺ (m/z)	Produktový kvantifikační iont (m/z)	Kolizní energie [eV]	Produktový konfirmační iont 1 (m/z)	Kolizní energie [eV]	Produktový konfirmační iont 2 (m/z)	Kolizní energie [eV]	Deklusterací potenciál [eV]
Echimidine*	398,2	120	31	220	23	77	93	76
Echimidine-N-oxide*	414,2	254,1	41	396,1	33	352,1	33	71
Europine*	330,2	172,1	37	79,9	83	110,9	51	106
Europine-N-oxide*	346,2	172,1	41	328,1	31	80	91	71
Heliotrine*	314,2	138,1	27	156,1	37	120	41	81
Heliotrine-N-oxide*	330,2	138	31	254,1	25	156	39	66
Intermedine*	300,2	138	27	94	33	156	39	111
Intermedine N-oxide*	316,2	172	37	137,9	37	94	59	121
Lasiocarpine*	412,2	120	35	336	25	220,1	25	126
Lasiocarpine-N-oxide*	428,2	410,1	31	254,1	39	93,9	71	126
Lycopsamine*	300,2	94	33	156,1	37	138,1	27	126
Lycopsamine-N-oxide*	316,2	172,1	37	138	37	93,9	59	126
Retrorsine*	352	120	39	324,1	37	93,9	41	126
Retrorsine-N-oxide*	368,2	119,1	43	118	39	94	71	141
Senecionine*	336	308,1	37	120	39	138	39	141
Senecionine N-oxide*	352	119,1	43	118	39	94	73	136
Seneciphylline*	334	306,1	35	120	37	94	39	141
Seneciphylline-N-oxide*	350,2	120	37	138	37	77	81	126
Senecivernine*	336,2	120	37	308,1	37	138	37	146
Senecivernine-N-oxide*	352,2	119,1	43	118	41	94	69	96
Senkirkine*	366	168,1	39	150	37	122	41	111
Echinatine	300,2	138	29	156	37	120	39	1
Echinatine-N-oxide	316,2	172,1	39	138	37	155	35	61
Erucifoline	350	119,1	39	118	39	94	67	106
Erucifoline-N-oxide	365,8	118	39	118,9	37	119,9	39	91
Indicine	300,2	138	27	94	33	156	39	91
Indicine N-oxide	316,2	172	37	138	37	93,9	61	91
Jacobine	351,8	280,1	31	155,2	39	120	37	31
Jacobine-N-oxide	367,9	296	33	120	43	118	41	71
Monocrotaline	326	120	45	121	39	94	73	141
Monocrotaline-N-oxide	341,7	137	39	119	41	120	43	156
Trichodesmine	353,9	222,1	39	120	45	308,1	33	151

* Analyty očekávané v sumě PA ošetřených v budoucí legislativě (předpokládaný termín přijetí: rok 2020)

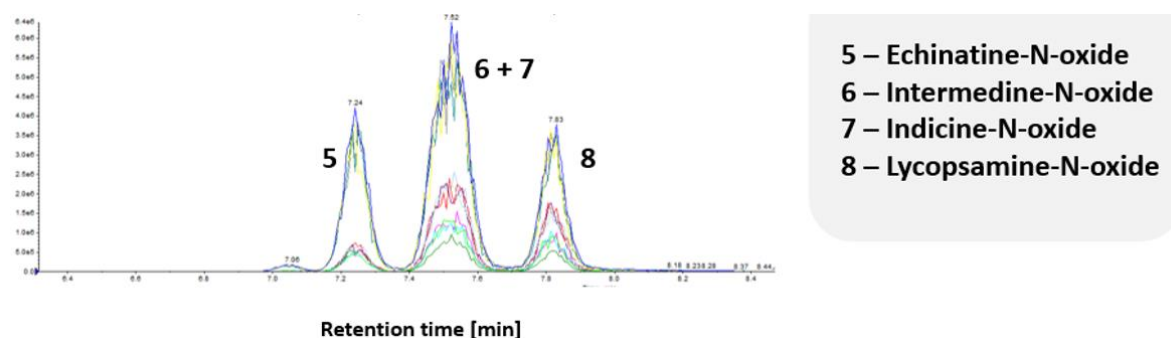
Červeně zvýrazněné analyty vykazují vůči sobě R/S izomerii a zároveň u nich nebylo dosaženo chromatografické separace s využitím LC-MS podmínek uvedených v kapitole 3.7. Problematika jejich LC-MS analýzy je zevrubně popsána v kapitole 3.7.1.

3.7.1 LC-MS analýza izomerních zástupců pyrrolizidinových alkaloidů

Při využití LC-MS podmínek uvedených výše v kapitole 2.7 byly zaznamenány komplikace s chromatografickou separací některých zástupců pyrrolizidinových alkaloidů, které vůči sobě mají R/S izomerní charakter, tzn. jedná se o vzájemné stereoisomery, které mají stejnou molekulovou hmotnost a generují stejné kvantifikační a konfirmační ionty. Tito zástupci jsou v **Tabulce V** vyznačeni červeně. Chromatografická separace těchto látek i po důkladné optimalizaci analytické metody (testy využití různých mobilních fází, důkladná optimalizace gradientové eluce, atd.) nebyla úspěšná a je tedy nutné tyto analyty kvantifikovat jako sumu daných látek. Konkrétně se jedná o sumu i) echinatine + indicine + lycopsamine (1 chromatografický pík) a ii) indicine-N-oxide + intermedine-N-oxide (1 chromatografický pík). Ukázky chromatografických záznamů problematických skupin PA jsou uvedeny na **Obrázcích 1 a 2**.



Obrázek 1: Extrahovaný iontový chromatogram izomerní skupiny PA: echinatine + indicine + intermedine + lycopsamine (pracovní směs, 100 ng/ml); *surová (nevyhlazená) data*.



Obrázek 2: Extrahovaný iontový chromatogram izomerní skupiny PA: echinatine-N-oxide + indicine-N-oxide + intermedine-N-oxide + lycopsamine-N-oxide (pracovní směs PA, 100 ng/ml); *surová (nevyhlazená) data*.

3.8 Pracovní charakteristiky metody

3.8.1 *Správnost metody (charakterizována výtěžností)*

Vzhledem ke komerční nedostupnosti certifikovaných referenčních materiálů (CRM) pro pyrrolizidinové alkaloidy v rostlinných matricích, je správnost metody charakterizována a ověřována analýzou cíleně kontaminované matrice minimálně v šesti opakováních. Průměrné výsledky validačních pracovních charakteristik metody stanovení PA v herbálním čaji a koření, včetně výtěžnosti [%], získaných z 6-ti opakování analýzy matričních kalibračních standardů na hladině 10 µg/kg, jsou uvedeny v **Tabulce VI**.

3.8.2 *Opakovatelnost metody*

Opakovatelnost metody lze charakterizovat relativní směrodatnou odchylkou (RSD) vypočítanou z minimálně šesti opakováních analýz šesti uměle kontaminovaných vzorků. Průměrné výsledky validačních pracovních charakteristik metody stanovení PA v čajích a koření, včetně RSD [%], získaných z 6-ti opakování analýzy matričních kalibračních standardů na hladině 10 µg/kg, jsou uvedeny v **Tabulce VI**.

3.8.3 *Selektivita metody*

Kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickým detektorem umožňuje velice selektivní detekci jednotlivých sledovaných analytů.

3.8.4 *Rozsah metody a linearita*

Vzhledem k tomu, že se analyzované kontaminanty mohou vyskytovat v reálných vzorcích v širokém rozsahu koncentrací, je nutné volit kalibrační rozsah koncentrací standardů v dostatečně širokém rozmezí odpovídajícím reálným nálezům. Linearita kalibrace se kontroluje vynesáním odezev jednotlivých analytů vůči koncentraci do grafu a pomocí koeficientu determinace (R^2). Pro analyty v rámci dané metody se hodnoty R^2 pohybují od 0,9950 do 0,9999. Odezvy detektoru pro PA jsou lineární pro daný analyt v rozsahu koncentrací LOQ-1000 µg/kg pro obě validované matrice.

3.8.5 *Mez stanovitelnosti*

Mez stanovitelnosti je nejmenší množství stanovované látky (analytu) ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s předem definovanou přesností. Většinou se stanovuje jako

trojnásobek meze detekce. Pro uvažované aplikace je mez stanovitelnosti (LOQ = limit of quantification) zpravidla brána jako nejnižší hladina kalibrační křivky (použitého standardu o nejnižší koncentraci). Meze stanovitelnosti PA v čajích a koření, vyjádřené jako nejnižší hladina kalibrační křivky (LOQ [$\mu\text{g/kg}$])^d, jsou uvedeny v **Tabulce VI**.

3.8.6 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.

^d Aktuální hodnota LOQ je dána stavem chromatografického systému LC-MS (opotřebenost kolony, čistota systému, atd.).

Tabulka VI: Validační pracovní charakteristiky metody pro stanovení pyrrolizidinových alkaloidů v herbálních čajích (hladina 10 µg/kg, n = 6) a v koření (hladina 10 µg/kg, n = 6)

Analyt Jednotky	KOŘENÍ (oregano) - 10 µg/kg			HERBÁLNÍ ČAJ - 10 µg/kg		
	Výtěžnost [%]	RSD [%]	LOQ [µg/kg]	Výtěžnost [%]	RSD [%]	LOQ [µg/kg]
Echimidine*	94	10	1	109	12	1
Echimidine-N-oxide*	94	10	1	99	14	2
Europine*	98	11	2	113	10	5
Europine-N-oxide*	103	6	2	102	4	10
Heliotrine*	94	9	1	99	18	1
Heliotrine-N-oxide*	86	13	1	97	6	1
Intermedine*	105	17	1	98	12	1
Intermedine N-oxide*	95	8	2	119	11	2
Lasiocarpine*	90	8	2	99	11	1
Lasiocarpine-N-oxide*	97	7	10	103	8	10
Lycopsamine*	97	7	1	94	12	10
Lycopsamine-N-oxide*	101	13	1	85	16	10
Retrorsine*	86	10	5	83	7	5
Retrorsine-N-oxide*	85	14	2	91	4	10
Senecionine*	90	7	2	117	9	10
Senecionine N-oxide*	110	8	2	118	2	10
Seneciophylline*	93	11	5	128	6	5
Seneciophylline-N-oxide*	112	16	10	102	10	5
Senecivernine*	80	8	2	98	7	10
Senecivernine-N-oxide*	87	13	2	103	9	5
Senkirkine*	94	9	1	111	14	1
Echinatine-N-oxide	96	10	5	100	14	10
Erucifoline	83	19	10	94	8	10
Erucifoline-N-oxide	106	7	5	95	7	5
Jacobine	84	12	10	103	11	5
Jacobine-N-oxide	98	11	5	103	14	2
Monocrotaline	112	8	2	99	7	10
Monocrotaline-N-oxide	87	8	5	-	-	20
Trichodesmine	98	8	2	91	8	2

* Analyty očekávané v sumě PA ošetřených v budoucí legislativě (předpokládaný termín přijetí: rok 2020)

4 Srovnání novosti postupů

Vzhledem k předpokladu zavedení nových maximálních limitů minimálně pro sumu 21 PA v řadě rostlinných matric (viz úvodní kapitola pojednávající o současném stavu řešené problematiky) v průběhu roku 2020, je vhodné, co nejdříve začít sledovat v rámci rutinních analýz široké spektrum těchto kontaminantů a jejich výskyt v daných matricích pomocí přesných, rychlých a efektivních analytických metod jako je metoda předložená v této metodice.

Z hlediska dostupnosti je technika U-HPLC–MS/MS v kontrolních laboratořích již běžně používanou instrumentací.

Novost popsané metodiky spočívá především ve výrazném zkrácení doby analýzy, dosaženém jednoduchou přípravou vzorku bez nutnosti zdlouhavé extrakce analytů a následné purifikace extraktu. Aplikace tohoto přístupu je umožněna zapojením vysoce citlivého systému pro separaci a detekci analytů, jakým je spojení ultra-účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí typu QTRAP® 6500+ a využitím 15 cm dlouhé analytické kolony. Využitím této instrumentace je dosaženo nízkých limitů kvantifikace pyrrolizidinových alkaloidů i bez předchozího přečištění a zakoncentrování analytů. Otázkou samozřejmě zůstává, jak nízké maximální limity budou v chystaných nových nařízeních schváleny, aby bylo jasné jak nízkých limitů kvantifikace (za předpokladu, že LOQ pro sumu PA se rovná součtu LOQ pro každou individuální sloučeninu zastoupenou v dané sumě) bude muset být dosaženo, aby mohla být tato metoda bez problému aplikována i po jejich zavedení. Do metody je aktuálně zahrnuto 32 zástupců PA, jejichž souhrnná LOQ odpovídají 100 µg/kg pro matrici koření a 179 µg/kg pro matrici herbální čaj.

5 Popis uplatnění certifikované metodiky

Předložená cílová analytická metoda, využívající instrumentaci typu U-HPLC–MS/MS, je vysoce vhodná pro získání relevantních kvantitativních výsledků reflektujících přesné zastoupení jednotlivých pyrrolizidinových alkaloidů primárně v herbálních čajích a koření (celkem 32 stanovovaných analytů). Výsledky získané aplikací této metodiky přispějí k posouzení potenciálního zdravotního rizika pro populaci a pomohou při zavádění zmiňovaných nových legislativních opatření.

Metodika byla vyvinuta jako výsledek projektu TJ02000238 (Vývoj inovativních analytických strategií využitelných pro kontrolu bezpečnosti a autenticity potravin a potravinářských surovin), za účelem využití 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 na základě předpokladu, že laboratoř, která chce uvedenou metodu zavést, již má zkušenosti s LC-MS analýzou, tzn. již disponuje instrumentací typu kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr a nemusí zaměstnávat a zaškolovat nový odborný personál. V případě, že laboratoř U-HPLC–MS/MS zařízení nevlastní bylo by nutné do celkových nákladů zahrnout samozřejmě také pořizovací náklady na dané vybavení, které se pohybuje v řádech milionů Kč.

Uvedená metoda má poskytovat komplexní informaci o výskytu 32 pyrrolizidinových alkaloidů v analyzovaných vzorcích. Implementace metody zahrnuje tudíž pořízení analytických standardů PA a dále pak také verifikaci pracovních charakteristik metody (limity kvantifikace, linearita, výtěžnost a opakovatelnost metody vyjádřená jako RSD v minimálním počtu vyhotovení šesti opakování). Celková pořizovací cena analytických standardů závisí na výběru akreditovaného dodavatele a výši poplatků za dovoz. V případě této metodiky byly analytické standardy pořízeny od německé firmy Phytolab s katalogovou pořizovací cenou konkrétních analytů cca 200 000 Kč (včetně dopravy do ČR). Za předpokladu, že by bylo provedeno 20 verifikačních a kontrolních analýz, přičemž provozní náklady na jednu analýzu byly orientačně vykalkulovány na 1 000 Kč, pak celkové náklady na implementaci metody by se rovnaly 220 000 Kč.

Výhoda výše popsané metodiky přímé analýzy methanolicko-vodného extraktu testovaných vzorků herbálních čajů, koření, apod. metodou U-HPLC–MS/MS spočívá především v jednoduché přípravě vzorku bez nutnosti použití zdlouhavých postupů, jako např. zařazení kroku přečištění a zakoncentrování pomocí extrakce na tuhou fázi (*solid phase extraction*, SPE), kdy se cena komerčně dostupných SPE kolonek pohybuje v řádu desítek, ale i stovek korun za kus. Tento krok značně prodlužuje dobu přípravy vzorku a navyšuje finanční nároky na analýzu nejen prostřednictvím jednorázového pořizování nového laboratorního vybavení (skleněný vakuový manifold cca 25 000 Kč, membránová vývěva cca 10 000 Kč, rotační vakuová odparka cca 70 000 Kč, atd.), ale i prostřednictvím vyšších nákladů na obsluhujícího odborného pracovníka, který přípravou vzorků stráví mnohonásobně více času v řádech desítek minut a je i více limitován množstvím vzorků, které je schopen zpracovat simultánně v jednom pracovním dni. Cena nejčastěji využívaných SPE kolonek Oasis MCX a Oasis HLB je přibližně 80 – 120,- Kč/ks (závisí na dodavateli a výši přepravních nákladů).

7 Seznam související použité literatury

1. Lukavcová, T. Spotřeba potravin, nápojů a cigaret na 1 obyvatele v ČR v letech 2008 - 2017, **4.12.2018**. <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2017>. (accessed Nov 15, 2019).
2. Moreira, R.; Pereira, D. M.; Valentao, P.; Andrade, P. B. Pyrrolizidine Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Food Safety. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, 19 (6), 1668. <https://doi.org/10.3390/ijms19061668>
3. EFSA CONTAM Panel, Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, **2011**, 9 (11), 2406, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2406>
4. Schulzová V., Hajšlová J., Toxické alkaloidy v potravním řetězci člověka, Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí, 2007, 2-9. <http://www.phytosanitary.org/?link=cs/projekty/>. (accessed Nov 15, 2019)
5. EFSA CONTAM Panel, Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA Journal*, **2017**, 15 (7), 4908, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4908>
6. World Health Organization; IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans, **16. 7. 2019**. <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>. (accessed Nov 15, 2019).
7. EUROPEAN COMMISSION; Health and Food Safety Directorate General Summary report of the standing committee on plants, animals, food and feed held in Brussels on 17 april 2018, **2018**. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/reg-com_toxic_20180417_sum.pdf. (accessed Nov 15, 2019).
8. Avula B., Sagi S., Wang Y-H., Zweigenbaum J., Wang M., Khan I. A., Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry, *Food Chemistry*, **2015**, 178, 136-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.053>

8 Seznam publikací, které předcházely metodice

Metodika dosud nebyla publikována, jedná se o originální práci VŠCHT Praha. Publikace v odborném periodiku je v přípravě. Předpokládaný termín podání publikace je v průběhu 1. poloviny roku 2020.

AUTOŘI

Metodu zpracovali:

Ing. Petra Jonátová, Ing. Zbyněk Džuman, doc. Ing. Milena Stránská, Ph.D., prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,

Ústav analýzy potravin a výživy, FPBT

Technická 3, 166 28 Praha 6 - Dejvice

Petra Jonátová, Zbyněk Džuman, Milena Stránská, Jana Hajšlová

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Multi-detekční metoda pro analýzu toxických pyrrolizidinových alkaloidů a jejich N-oxidů v potravinách

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

Počet stran: 25

Vydání: první