

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

XLI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin

23. – 25. 5. 2011

Skalský Dvůr



Ed. Cejpek K., Doležal M., Špicner J.
Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT v Praze
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.
Praha 2011

ISSN 1802-1433

HODNOCENÍ AUTENTICITY VÍNA NA ZÁKLADĚ METABOLOMICKÝCH FINGERPRINTŮ

Čajka T., Riddellová K., Hajšlová J.

Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6

1 Úvod

Důsledné sledování původu potravin je v popředí zájmu nejen potravinářského průmyslu, ale i spotřebitelů, přičemž důvody jsou nejen etické, ale i ekonomické. Víno představuje velmi populární alkoholický nápoj s vysokým objemem světové produkce ($2,8 \times 10^{10}$ litrů za rok) a kvalitou cíleně pokrývající velice široké rozmezí tak, aby byli uspokojeni konzumenti s různorodým spektrem požadavků. Tento pozitivní fakt však na druhou stranu otevírá možnost pro falšování různé povahy. Zdánlivě podobná vína odlišného původu mohou být podstatně odlišné ceny. Vývoj nových a sofistikovaných metod pro určení původu zemědělských produktů, víno nevyjímaje, je z tohoto důvodu naprosto nezbytný [1].

2 Metabolomika potravin

V době svého vzniku byla metabolomika vnímána jako moderní, specializovaný nástroj analytické biochemie umožňující inovativní výzkum rostlin a dalších organismů. Tento analytický přístup, zaměřený na detekci širokého spektra malých molekul (<1500 Da) ve složitých biologických maticích a případnou interpretaci reakcí vedoucích k jejich vzniku, je v současné době předmětem velkého zájmu jako nová strategie hodnocení kvality a autenticity potravinových surovin a produktů. Spektrum daných nízkomolekulárních metabolitů zahrnuje např. metabolické meziprodukty, hormony či sekundární metabolity, které se označují souhrnně termínem metabolom. Poznatky získané analýzou metabolomu mohou být využity v různých vědních oblastech jako toxikologie, dietologie, farmaceutika, zemědělství nebo genové inženýrství. Pro potřeby analýzy potravin je metabolomika vhodným nástrojem pro sledování složení a kvality potravin, ověření jejich autenticity, eventuálně pro vývoj nových potravin a potravinových doplňků [2].

Pro interpretaci takto získaných dat byly vyvinuty dvě odlišné strategie: metabolomický fingerprinting a metabolomické profilování.

Metabolomický fingerprinting. Jedná se o strategii, kdy není snaha charakterizovat (identifikovat) jednotlivé složky metabolomu, ale jsou zaznamenány výskyty a intenzity pro jednotlivé látky (bez nutnosti jejich identifikace). Profily lze získat např. pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) či hmotnostní spektrometrie (MS). Získané fingerprinty bývají dále porovnávány a vyhodnocovány pomocí chemometrické analýzy. Tento postup je užitečný při ověřování autenticity potravin.

Metabolomické profilování. Tento přístup spočívá v identifikaci/kvantifikaci co největšího množství látek tvořících daný metabolom. Ze získaného souboru látek jsou pak vybrány pomocí chemometrické analýzy markery významné pro daný účel (rozlišení původu apod.). V závislosti na cílech a instrumentální kapacitě může jít o cílenou analýzu, kdy je pozornost zaměřena na skupinu látek (například lipidy, aminokyseliny), nebo komplexní analýzu, která zahrne všechny zjištělé metabolity.

3 Metabolomický fingerprinting jako nástroj detekce falšování potravin

Současné metody pro detekci falšování potravin jsou založeny na fyzikálních zkouškách, chemických analýzách, případně na vyšetření imunochemickými či mikroskopickými technikami. V oblasti chemické analýzy se pro charakterizaci potravin stále více uplatňují metody fingerprintingu/profilování s následným matematicko-statistickým zpracováním získaných rozsáhlých souborů dat. Dané metody využívají výstupů z různých separačních/detekčních analytických technik, jako jsou spektroskopie (IČ, Raman, NMR), spektrometrie (MS) nebo chromatografie (HPLC, GC), přičemž vzorky jsou analyzovány buď přímo bez úpravy, nebo je před vlastní analytickou koncovkou použita jednoduchá extrakční technika [1].

3.1 Příprava vzorku

Zvláště u metabolomického fingerprintingu je úkolem vyvinutých metod pokrýt co nejširší spektrum látek. Extrahované látky se liší chemickou strukturou i koncentracemi. Naopak pro některé aplikace cílené analýzy je možno využít selektivních metod (izolace polárních/nepolárních látek) [3].

Přípravné kroky: • Odběr vzorku a skladování; • Stabilizace (tj. zabránění degradaci analytů); • Homogenizace; • Odstranění interferujících látek; • Adaptace pro zvolenou analytickou metodu (např. derivatizace); • Zakoncentrování

Kapalné vzorky. Kapalné vzorky mohou být analyzovány přímo, eventuálně jen po minimální přípravě vzorku, pomocí NMR, přímé MS nebo LC–MS, přičemž přímá analýza minimalizuje ztráty metabolitů. V případě GC–MS je vhodné použití pro izolaci a zakoncentrování analytů techniku SPME (viz níže).

Pevné vzorky. Klíčovým krokem přípravy pevného vzorku je homogenizace. Ačkoliv některé metody umožňují přímou analýzu pomocí MS nebo NMR, je často nutné vzorek extrahovat. Volba rozpouštědla je komplikovaná komplexností matrice a rozmanitostí očekávaných analytů. Extrakce se provádí nejčastěji organickými rozpouštědly (ethanol, methanol, acetonitril, ethyl-acetát), vodou, eventuálně směsmi rozpouštědel. Účinnost extrakce organickými rozpouštědly je omezena rozpustností a eventuální degradací metabolitů v daném extrakčním činidle. Možností je rovněž simultánní extrakce pomocí rozpouštědel o odlišné polaritě (např. voda, methanol vs. toluen, hexan). Získány jsou pak extrakty s naprosto odlišným spektrem metabolitů. V případě GC–MS je opět vhodné použití pro izolaci a zakoncentrování analytů techniku SPME.

3.2 Separace a detekce

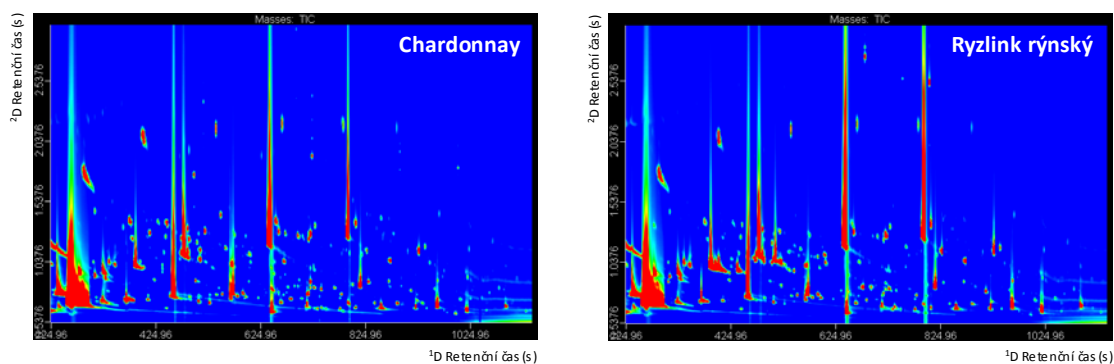
V případě separace analytů jsou vedle NMR nejčastěji používány chromatografické techniky (jednorozměrná plynová chromatografie, 1D-GC, kompletní dvourozměrná plynová chromatografie, GC×GC, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC, ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UHPLC). Pro detekci metabolitů představuje primární techniku hmotnostní spektrometrie (MS) díky své citlivosti a selektivitě [1].

V rámci tohoto příspěvku bude pozornost zaměřena na tři různorodé instrumentální techniky využívající hmotnostní spektrometrii pro získání metabolomických fingerprintů/profilů vín za účelem jejich autentikace. Výsledné vlastnosti jednotlivých instrumentálních technik ve spojení s matematicko-statistickým vyhodnocením a rozdíly mezi nimi budou popsány v připravovaných publikacích.

3.2.1 Head-space mikroextrakce tuhou fází (HS-SPME) ve spojení s kompletní dvourozměrnou plynovou chromatografií (GC×GC) a hmotnostní spektrometrií (MS)

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) v kombinaci s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (GC–MS) je v současné době považována za klíčovou profilovací techniku v analýze těkavých látek potravin. SPME představuje levnou, bezrozpouštědlovou vzorkovací techniku, která umožňuje izolaci nízkomolekulárních analytů díky jejich extrakci z prostoru nad vzorkem (*head-space*, HS) nebo z kapaliny (*direct immersion*, DI) na povrch speciálního vlákna [4].

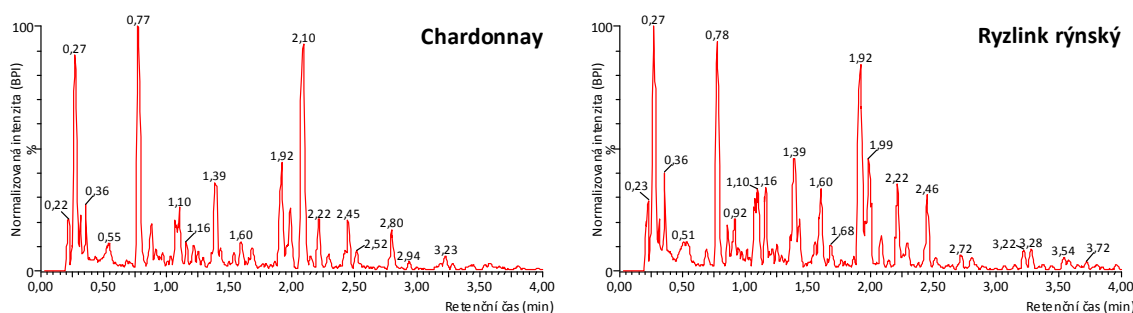
V dalším kroku dochází k tepelné desorpci absorbovaných/adsorbovaných komponent v nástřikovém prostoru plynového chromatografu a následné separaci obvykle pomocí jednorozměrné plynové chromatografie (1D-GC). V případě značně komplexních vzorků však 1D-GC neposkytuje dostatečnou separační účinnost a jako vhodnější se pak jeví použití kompletní dvourozměrné plynové chromatografie (GC×GC). V případě GC×GC jsou analyty separovány na dvou GC kolonách s odlišnými separačními mechanismy [1]. **Obrázek 1** ilustruje rozdílnost GC×GC záznamů profilů těkavých látek vína z hroznů různých odrůd (Chardonnay, Ryzlink rýnský) izolovaných pomocí HS-SPME.



Obrázek 1. HS-SPME–GC×GC–TOFMS záznam profilu těkavých látek vína (Chardonnay, Ryzlink rýnský)

3.2.2 Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC) ve spojení s MS

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) dnes jednoznačně reprezentuje jednu z klíčových technik využívaných v analýze potravin a přírodních produktů. Pomocí HPLC lze stanovit široké spektrum složek potravin a přírodních produktů (např. makronutrienty reprezentované sacharidy, lipidy či bílkovinami, esenciální komponenty jako jsou vitaminy a další biologicky aktivní látky, potravinová aditiva, přírodní toxické sloučeniny, různé skupiny kontaminantů). Zásadním posunem v oblasti vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) je používání menších částic sorbentů v chromatografických kolonách. Zatímco dlouhá léta se v praxi nejběžněji používaly sorbenty s velikostí částic 5 μm , v posledních letech se masivně začaly prosazovat sorbenty s velikostí částic menší než 2 μm . Jejich použití umožňuje dosažení výrazně lepších parametrů separace i detekce [5]. **Obrázek 2** ilustruje rozdílnost UHPLC–TOFMS záznamů profilů polárních látek získaných přímou analýzou vína z hroznů různých odrůd (Chardonnay, Ryzlink rýnský) v pozitivním módu ionizace elektrosprejem (ESI(+)).

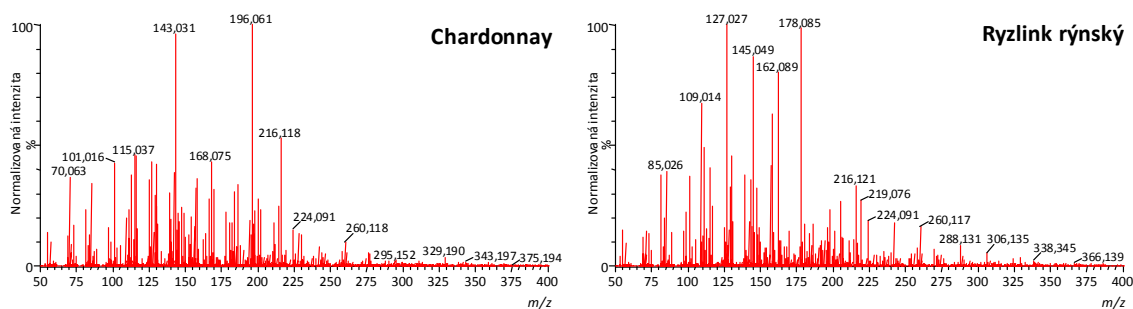


Obrázek 2. UHPLC–ESI(+)-TOFMS záznam profilu polárních látek získaný přímou analýzou vína (Chardonnay, Ryzlink rýnský).

3.2.3 Hmotnostní spektrometrie s desorpční ionizací za atmosférických podmínek

Většina současných aplikací hmotnostní spektrometrie při analýze organických sloučenin v biotických materiálech se neobejde bez předřazení separačního, nejčastěji chromatografického kroku. Tato operace však obvykle vyžaduje nejen časově náročnou optimalizaci, ale i vlastní realizace již optimalizovaného postupu je často také zdoluhavá a bývá tak limitujícím aspektem pro získání rychlé odpovědi o vlastnostech, resp. složení vzorku. Z tohoto pohledu skutečně revoluční řešení přináší hmotnostní spektrometrie s desorpční ionizací za atmosférických podmínek.

Novou desorpční ionizační techniku pro extrémně rychlou analýzu představuje z tohoto pohledu *Atmospheric Solids Analysis Probe* (ASAP) [6]. Její realizace spočívá v následujících krocích: (i) ponoření tyčinky (ukotvené v sondě) do vzorku, popř. nanesení vzorku na tyčinku sondy pomocí mikrostříkačky (1–3 μL); (ii) zanoření sondy do části iontového zdroje; (iii) desorpci analytů vyhříváním plynem (obvykle dusík); (iv) ionizaci analytů v plynné fázi prostřednictvím koronového výboje za atmosférického tlaku za použití obvyklých napětí jako v případě chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) u LC–MS; (iv) záznamu spektra (<1 min) [7]. **Obrázek 3** ilustruje ASAP–TOFMS záznam profilu ionizovatelných látek získaný přímou analýzou vína z hroznů různých odrůd (Chardonnay, Ryzlink rýnský) v pozitivním módu ionizace.



Obrázek 3. ASAP(+)-TOFMS záznam profilu ionizovatelných látek získaný přímou analýzou vína (Chardonnay, Ryzlink rýnský).

3.3 Statistické zpracování dat

S využitím moderních analytických instrumentálních technik používaných v metabolomice je možné získat značné množství informací (proměnných) pro velký počet vzorků (objektů). Z tohoto důvodu je využíváno matematických a statistických postupů umožňujících efektivně získat maximum užitečných informací z naměřených dat [8].

Pro vlastní chemometrickou analýzu jsou používány v první kroku obvykle neřízené techniky strukturního rozpoznávání (*unsupervised pattern recognition techniques*) za účelem zjištění struktury dat. Hlavními zástupci jsou analýza hlavních komponent (*principal component analysis*, PCA) a shluková analýza (*cluster analysis*, CA). Následně jsou používány řízené techniky strukturního rozpoznávání (*supervised pattern recognition techniques*), které slouží nejen pro zjištění struktury dat, ale především pro vytvoření klasifikačního modelu na principu diskriminace mezi třídami, nebo modelování tříd. Mezi nejčastěji používané techniky lze uvést lineární diskriminační analýzu (*linear discriminant analysis*, LDA), diskriminační analýzu částečných nejmenších čtverců (*partial least-squares discriminant analysis*, PLS-DA) a umělé neuronové sítě (*artificial neural networks*, ANN).

Součástí chemometrické analýzy je obvykle i validace modelu. Statistický model, vytvořený na základě některé z výše jmenovaných technik, umožňuje ověření/demonstraci, že získaný model je dostatečně vhodný pro klasifikaci neznámých vzorků. Obvykle je matice dat rozdělena na trénovací sadu (*training set*), která slouží pro tvorbu modelu a testovací sadu (*test set*), která je využita pro testování modelu. Následně pak získáváme informaci o rozpoznávací schopnosti (*recognition ability*), tj. % vzorků v trénovací sadě správně klasifikovaných během tvorby modelu a predikční schopnosti (*prediction ability*), tj. % vzorků v testovací sadě správně klasifikovaných za použití modelu vytvořeného v trénovacím kroku.

4 Závěr

Prezentované techniky vhodné pro metabolomický fingerprinting potravin dovolují získání komplexních informací o analyzovaných vzorcích. Zatímco v případě SPME–GC–MS je analýza zaměřena na těkavé látky, v případě UHPLC–MS se jedná o stanovení profilu především polárních látek. V obou případech jsou vzorky chromatograficky separovány. V případě ionizační techniky ASAP–MS je vzorek analyzován bez chromatografické separace, což umožňuje extrémně rychlou analýzu vzorků.

5 Literatura

- [1] Cajka T., Hajslova J.: Volatile compounds in food authenticity and traceability testing, v knize: *Food Flavors: Chemical, Sensory and Technological Properties*. H. Jelen (ed.), ISBN: 9781439814918, CRC Press (2011) v tisku.
- [2] Wishart D.S. (2008) Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Food Science & Technology* **19**, 482–493.
- [3] Dunn W.B., Ellis D.I. (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* **24**, 285–294.
- [4] Kataoka H., Lord H.L., Pawliszyn J. (2000) Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A* **880**, 35–62.
- [5] Mastovska K.: Recent developments in chromatographic techniques, v knize: *Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 51., Food Contaminants and Residue Analysis*. Y. Pico (ed.), Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko (2008) str. 175–200.
- [6] McEwen C.N., McKay R.G., Larsen B.S. (2005) Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments. *Analytical Chemistry* **77**, 7826–7831.
- [7] Fussell R.J., Chan D., Sharman M. (2010) An assessment of atmospheric-pressure solids-analysis probes for the detection of chemicals in food. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* **29**, 1326–1335.
- [8] Berrueta L.A., Alonso-Salces R.M., Héberger K. (2007) Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A* **1158**, 196–214.

6 Poděkování

Tato studie byla realizována v rámci projektů MSM6046137305 a MŠMT č. 21/2011 financovaných Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.