



**Stanovení kvality semen a makoviny
máku setého
metodou spektroskopie
v blízké infračervené oblasti**



Opava 2020



OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Stanovení kvality semen a makoviny
máku setého
metodou spektroskopie
v blízké infračervené oblasti**

2020



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Stanovení kvality semen a makoviny máku setého metodou spektroskopie v blízké infračervené oblasti

Dedikace: Certifikovaná metodika vznikla za podpory MZe jako součást řešení projektu NAZV QK1810391 „Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi“ (2018 – 2022) a institucionální podpory MZe-RO1820.

Autorský kolektiv a podíl práce jednotlivých autorů na tvorbě metodiky:

Mgr. Lenka Endlová, Ph.D., zástupce autorského kolektivu (OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.): 70 %

Mgr. Viktor Vrbovský, zástupce autorského kolektivu (OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.): 20 %

Ing. Andrea Rychlá, zástupce autorského kolektivu (OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.): 10 %

Oponentní posudky vypracovali:

Ing. Martin Liška (Ministerstvo zemědělství, Sekce zemědělských komodit a ekologického zemědělství, Odbor rostlinných komodit, Oddělení polních plodin)

Mgr. Michal Haluzík, Ph.D. (Ostravská univerzita)

Vydal:

OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.,

Provozovna Opava

Purkyňova 10

764 01 Opava

1. vydání, 2020

© OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

ISBN 978-80-905808-8-6

OBSAH

1	Cíl metodiky	1
2	Vlastní popis metodiky	4
2.1	Úvodní část.....	4
2.2	Vývoj a validace kalibračních modelů	4
2.3	Zhodnocení vyvinutých kalibračních modelů a metody spektroskopie v blízké infračervené oblasti pro predikci kvality máku setého a makoviny	10
2.4	Stanovení kvality máku setého a makoviny metodou spektroskopie v blízké infračervené oblasti	12
3	Novost postupů.....	14
4	Popis uplatnění metodiky	15
5	Ekonomické aspekty	16
6	Seznam použité související literatury	17
7	Seznam výsledků, které předcházely vydání metodiky	18

1 Cíl metodiky

Mák setý je pro naši republiku tradiční plodinou, sklizňová plocha se pohybuje kolem 20 000 – 30 000 ha s průměrným výnosem 0,5 – 0,8 t/ha semene. Tato plodina poskytuje olejnatá semena s velmi dobrými dietetickými vlastnostmi a makovou slámu (makovinu) pro využití ve farmaceutickém průmyslu. Většina pěstovaných odrůd jsou materiály modrosemenné, zbylou část tvoří bělosemenné. Makové semeno se na rozdíl od jiných olejnin zpravidla dále nezpracovává pro získání oleje, ale bývá určeno pro přímý konzum. Semeno máku obsahuje 46 % oleje v sušině. Největší zastoupení v makovém oleji má kyselina linolová (70 %), jde tedy o olej vysychavý, lehce degradovatelný (náchylný ke žluknutí). Významným přínosem pro lidskou výživu je obsah vápníku v semeni máku - ve 100 g makových semen je obsaženo 1400 mg vápníku, což je 12 x více než v mléce. Konzumace 100 g makového semene tedy zabezpečí 100 % doporučené denní dávky tohoto prvku. Jedná se o optimální alternativu pro lidi s alergií na kravské mléko, pro děti ve vývinu i ženy v době přechodu [1, 2].

V České republice a dalších slovanských státech se pěstuje mák potravinářský. Zatímco v ostatních státech světa je pěstován mák technický. Ten je využíván k produkci alkaloidů pro farmaceutické účely, v horším případě je zneužíván pro produkci drog (opium, heroin). Pěstování pro obsah alkaloidů je diametrálně rozdílné s nutností dopadu do použité odrůdové skladby. Máky z tohoto důvodu dělíme do skupin potravinářských a technických. Zatímco potravinářské máky se šlechtí především na výnos semene, technické na výnos makoviny a co nejvyšší obsah alkaloidů v ní. Semeno máku alkaloidy neobsahuje, protože ty se tvoří v mléčnicích, které v semeni obsaženy nejsou. Při kombajnové sklizni (a to především u máků technických, pěstovaných v západní Evropě pro produkci alkaloidů) se prach z makoviny usazuje na povrchu semen a kontaminuje je nežádoucími alkaloidy. Nejvýznamnějším alkaloidem je opiový alkaloid morfin tvořený pouze několika druhy rodu mák (*Papaver*). Kromě makovic se společně s dalšími alkaloidy (kodein, tebain, papaverin, narkotin a řady dalších) nalézá ve všech částech rostliny máku, kromě semen. Morfin je farmaceuticky ceněnou a zatím stále nenahraditelnou látkou, která se využívá v lékařství pro tlumení akutních i chronických nesnesitelných bolestí po úrazech, operacích, srdečním infarktu a při předoperační přípravě [1, 2, 3].

Cílem této certifikované metodiky je rozšíření spektra vyšetřovacích metod pro účely hodnocení hlavních kvalitativních parametrů máku setého. Doposud byly tyto parametry ve f. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. sledovány pomocí přesných laboratorních referenčních metod



(LRM), což je velmi náročné časově i finančně. Proto jsou klasické metody, jakými jsou např. plynová chromatografie (GC), extrakce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo gravimetrie, v provozní praxi nahrazovány modernějšími, levnějšími a rychlejšími metodami hodnocení, především v případě nutnosti hodnocení většího množství vzorků v omezeném čase. Typickým příkladem takové metody je spektroskopie v blízké infračervené oblasti.

V předložené metodice je uveden postup hodnocení primárního produktu máku setého - makového semene (stanovení olejnatosti a skladby hlavních mastných kyselin v oleji) a makoviny (obsah morfinu a kodeinu) pomocí spektroskopie v blízké infračervené oblasti. Metoda spektroskopie v blízké infračervené oblasti s Fourierovou instrumentací (FT-NIRS) je v současné době, pro svoji časovou nenáročnost, nedestruktivnost a nižší náklady na analýzu, běžně používanou metodou v celé řadě výzkumných i kontrolních laboratoří. Touto jednoduchou, ale zároveň dostatečně přesnou metodou je možné stanovit široké spektrum složek potravin, krmiv, produktů a souvisejících materiálů. FT-NIRS je velmi vhodná pro rychlou a souběžnou analýzu většího rozsahu kvalitativních znaků testovaných vzorků.

Konkrétním cílem vlastní certifikované metodiky je:

- vyvinutí FT-NIR kalibračních modelů pro stanovení hlavních kvalitativních znaků;
- optimalizace využití metody FT-NIRS pro stanovení obsahu oleje, skladby mastných kyselin v semeni máku setého a obsahu morfinu a kodeinu v makovině;
- popsání a vyhodnocení kalibrace a věrohodnosti výsledků stanovení olejnatosti semen, skladby mastných kyselin v oleji a obsahu alkaloidů v makovině (morfin, kodein).

Zavedením hodnocení kvalitativních parametrů máku pomocí spektroskopie v blízké infračervené oblasti dojde k výraznému zefektivnění práce v těchto oblastech:

(1) zefektivnění šlechtitelského procesu - zavedení rychlé a levné metody stanovení kvalitativních parametrů makového semene a makoviny umožní efektivnější selekci šlechtitelských materiálů (při srovnatelných nákladech bude možno realizovat analýzu mnohem větší kolekce materiálů než s využitím přesných metod). Stejně jako u řady jiných plodin, je také u máku setého hlavním faktorem rozhodujícím o kvalitě výsledného produktu genetický základ materiálu. Šlechtění, tedy tvorba nových odrůd, se tak nabízí jako vhodný prostředek pro ovlivňování kvalitativních parametrů a sledování požadovaných užitkových směrů. Např. na základě obsahu alkaloidů v makovině, především morfinu, jsou odrůdy máku diferencovány na technické (farmaceutické) a potravinářské, případně kombinované typy. Z hlediska potravinářské kvality jsou pak důležitými ukazateli obsah oleje v semeni a obsah mastných kyselin v oleji.



(2) při hodnocení genetických zdrojů v rámci Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity (NP). NP je zaměřen na shromažďování a uchovávání cenných genetických zdrojů hospodářsky významných zemědělských plodin, mezi které patří i mák setý. Nově získaný materiál od dárců je nejprve zařazen do kolekce pracovní, kde jsou shromažďována jeho dostupná pasportní data. Dále je vzorek regenerován, aby se získalo dostatečné množství osiva pro uložení do Genové banky a pro realizaci maloparcelních pokusů k získání popisných dat, jako jsou popsány morfologické a fenologické znaky, výnosové parametry a kvalitativní ukazatele produkce. Mezi ně patří jak olejnatost semen, skladba mastných kyselin v oleji, tak obsah hlavních alkaloidů v makovině (např. morfin, kodein).

2 Vlastní popis metodiky

2.1 Úvodní část

Metoda FT-NIRS patří obecně mezi metody molekulové spektroskopie založené na principu absorpce části infračerveného záření jednotlivými molekulami analyzovaného vzorku. Infračervená spektra zaznamenávají změny ve vibračních a rotačně vibračních pohybech molekul. Infračervené záření je část elektromagnetického spektra v rozsahu vlnových délek 780 nm až 1000 nm (v přepočtu na vlnčet $12\,821 - 10\text{ cm}^{-1}$). Z praktických důvodů se podle vlnočtů rozlišuje oblast vzdálená, střední a blízká. Blízká oblast (near infrared, NIR) je charakteristická rozmezím vlnočtů $12\,821 - 4000\text{ cm}^{-1}$. Při porovnání s běžně používanými postupy nabízí tato metoda mnoho výhod: NIR spektrum může být zaznamenáno v několika málo sekundách, charakter analýzy je nedestruktivní, nevyžaduje obvykle žádnou úpravu vzorku a v mnoha případech připouští, že vzorky mohou být po měření znovu použity. Metoda FT-NIRS je pro svou predikční schopnost používána nejen v zemědělství, ale hlavně v oblasti potravinářského, chemického či farmaceutického průmyslu. FT-NIRS má také své nevýhody. Je to metoda sekundární a pořizovací cena přístroje je relativně vysoká [4, 5].

2.2 Vývoj a validace kalibračních modelů

Vývoj NIR metody pro stanovení sledovaného parametru v požadovaných matricích je založen na vytvoření kalibrační rovnice (modelu) z dostatečně rozsáhlého souboru měřených vzorků, která kvantifikuje vztah mezi informací NIR absorpce a hodnotu stanovenou laboratorní referenční metodou. Kalibrační model pro určitý parametr vyjadřuje míru korelace mezi výsledky získanými NIR metodou a laboratorní referenční metodou a pro jeho spolehlivé vytvoření je potřeba získat dostatečně obsáhlý soubor analyzovaných vzorků. Pro sestavení kalibračních modelů je vždy potřeba shromáždit dostatečný počet vzorků s přijatelným rozpětím hodnot z hlediska dostatečné robustnosti celé metody. Zároveň by měla četnost hodnot jednotlivých složek být rovnoměrně rozložena, což je v případě biologického materiálu, jako jsou maková semena a makovina, značně obtížné [4, 5].

Ve f. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. byly postupně vytvořeny kalibrační modely pro stanovení obsahu oleje, hlavních mastných kyselin (kyseliny palmitové, stearové, olejové, linolové, linolenové a erukové) v semeni máku a morfinu a kodeinu v makovině. K experimentálním účelům a pro realizaci přesných analýz za účelem tvorby kalibračních modelů byly použity vzorky semen a makoviny máku setého. Rostlinný materiál pocházel ze šlechtitelského

programu f. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. a kolekce NP. Tyto vzorky byly během let 2017 – 2019 získány z polních maloparcelních odrůdových pokusů v Opavě. U všech sklizených položek byla získána spektra v blízké infračervené oblasti. Po nasnímání vzorků spektrometrem byly následně vzorky analyzovány pomocí LRM. Stanovení obsahu oleje bylo provedeno extrakční metodou podle normy ČSN EN ISO 659, která definuje vážkové stanovení obsahu oleje po extrakci petroletherem, oddestilování rozpouštědla a vysušení vyextrahovaného tuku vzorku. Obsah sušiny byl stanoven gravimetrickou metodou podle normy ČSN EN ISO 665 po 4 hodinách sušení při 103 °C. Pro zjištění obsahu alkaloidů byla použita metoda HPLC/UV-VIS. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve formě methylesterů mastných kyselin bylo zjištěno pomocí GC/FID podle normy ČSN EN ISO 12966-1, 12966-2. Všechny použité metody jsou validované a rutinně na pracovišti používané [6, 7, 8]. Celkový počet vzorků a rozsahy nalezených koncentrací jednotlivých složek jsou uvedeny v tabulce I.

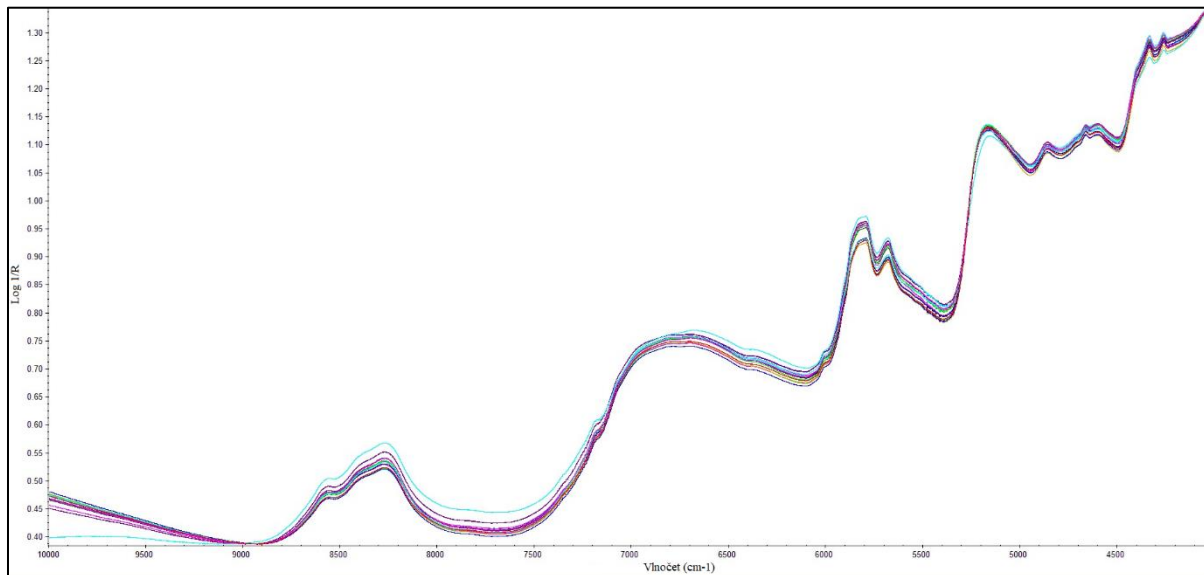
Tabulka I

Charakteristika souborů máku setého a makoviny pro tvorbu kalibračních modelů

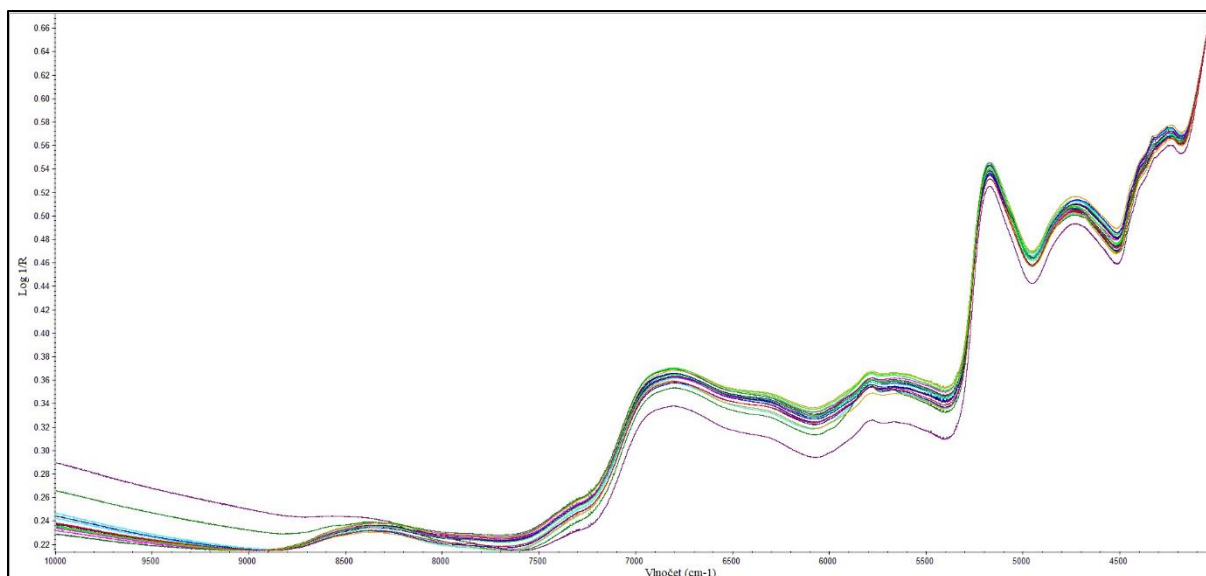
Složka	Jednotky	Metoda	n ^a	Rozsah	Průměr
Vlhkost	%	Gravimetrie	78	4,56-9,44	6,81
Olej	% při 8 % vlhkosti	Extrakce	123	37,28-48,18	42,68
C16:0 ^b	%	GC/FID	145	7,00-10,60	8,91
C18:0 ^c	%	GC/FID	141	1,00-2,50	1,86
C18:1 ^d	%	GC/FID	152	9,70-24,10	18,07
C18:2 ^e	%	GC/FID	149	63,10-78,30	70,41
C18:3 ^f	%	GC/FID	149	0,20-1,40	0,69
Morfin	%	HPLC/UV-VIS	672	0,03-2,64	0,75
Kodein	%	HPLC/UV-VIS	633	0,01-0,67	0,10

^a Počet vzorků, ^b kyselina palmitová, ^c kyselina stearová, ^d kyselina olejová, ^e kyselina linolová, ^f kyselina linolenová

Při vývoji jednotlivých kalibračních modelů byly vzorky semen máku nebo pomleté makoviny proměřovány v rotačních kruhových kyvetách, které jsou opatřeny křemenným dnem propustným pro NIR záření na spektrometru FT-NIR Antaris II (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) vybaveným interferometrem a integrační sférou pracující technikou difusní reflektance. Spektra byla získána v rozsahu $10\ 000 - 4000\text{ cm}^{-1}$ při rozlišení 2 cm^{-1} , počtem scanů 128 a pomocí softwaru Omnic for Antaris. Výsledný signál záření byl zaznamenáván na detektoru z InGaAs. Každý vzorek byl měřen dvakrát a pro výpočet bylo použito průměrné spektrum. Kalibrační modely pro kvantitativní analýzu příslušných analytů byly vyvinuty vhodnou regresní metodou s využitím chemometrického programu Thermo Scientific TQ Analyst (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Na základě získané závislosti mezi spektrálními informacemi a složením vzorku byl vytvořen pro každou kvantitativní analýzu zvlášť kalibrační model pomocí algoritmu Partial Least Squares (PLS, metoda částečných nejmenších čtverců) bez derivace nebo byla spektra upravena 1. derivací a vyhlazením za použití Norrisova derivačního filtru (obrázek 1 příklad FT-NIR spekter semen máku a obrázek 2 příklad FT-NIR spekter makoviny). K vývoji kalibračních modelů pro jednotlivé analyty byly využity rozdílné spektrální intervaly (tabulka II).



Obrázek 1 FT-NIR spektra vybraných 20 vzorků semen máku



Obrázek 2 FT-NIR spektra vybraných 20 vzorků makoviny

Tabulka II

Použité spektrální intervaly pro tvorbu kalibračních modelů nejvýznamnějších složek sledovaných během šlechtění máku setého

Složka	Spektrální intervaly (cm ⁻¹)
Vlhkost (%)	8943-5949; 5620-4508
Olej (% při 8 % vlhkosti)	8439-8144; 5967-5508; 4954-4101
C16:0 ^a (%)	8760-7542; 6819-6083; 5368-5266; 4388-4062
C18:0 ^b (%)	8787-4395
C18:1 ^c (%)	9456-8858; 8389-8179; 7104-6810; 5935-5609; 5280-5190
C18:2 ^d (%)	9169-8747; 8126-6031; 5918-5577; 4476-4183
C18:3 ^e (%)	8434-7582
Morfin (%)	7068-5870; 5262-4861
Kodein (%)	5931-5619; 4902-4102

^a kyselina palmitová, ^b kyselina stearová, ^c kyselina olejová, ^d kyselina linolová, ^e kyselina linolenová



Optimální spektrální oblasti byly vybrány na základě diagnostiky „Statistical Spectra“, která generuje sérii syntetických spekter, jež ilustrují variabilitu prezentovanou v kalibračních standardech. Pokud vzorky vykazovaly velkou odchylku mezi naměřenými a predikovanými hodnotami, nebo objevila-li se spektrální odchylka ve změřeném spektru, byly ze souboru vyloučeny pomocí diagnostik Spectrum Outlier, Leverage a Principal Component Scores. Byla vyjádřena standardní chyba kalibrace (RMSEC) a korelační koeficient kalibrace (R). Pro ověření spolehlivosti, robustnosti a přesnosti kalibračních modelů byla použita úplná křížová a externí validace. Křížová validace poskytuje optimální počet latentních proměnných (hlavních komponent). Při křížové validaci se vycházelo ze stejné sady vzorků jako při kalibraci, byla vyjádřena chyba křížové validace (RMSECV) a hodnota korelačního koeficientu křížové validace (R_{CV}). Externí validace byly provedeny softwarově, automatickým výběrem validačních standardů z kalibračního souboru. Při výpočtu chyby predikce byly validační standardy z kalibračního souboru vyloučeny. Jejich počet byl vždy roven přibližně 10 procentům z celkového počtu standardů zadaných a rovnoměrně pokrývaly kalibrační intervaly. Byla vyjádřena chyba predikce (RMSEP) a hodnota korelačního koeficientu predikce (R_P). Predikční schopnosti vytvořených kalibračních modelů byly ověřeny porovnáním LRM a NIR metody na testovaných vzorcích, které nebyly zahrnuty do vývoje kalibračního modelu. Mezi průměry predikovaných a referenčních hodnot nezávislého souboru vzorků nebyl zjištěn statistický významný rozdíl.

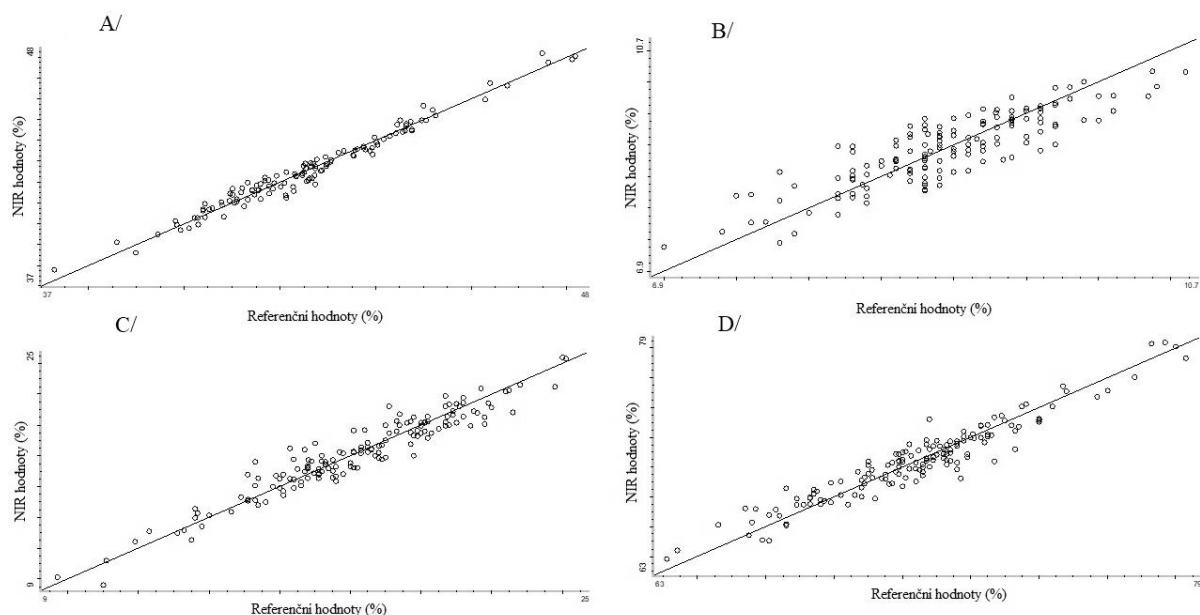
Vytvořené kalibrační modely budou kontinuálně doplňovány nejen o vzorky s malou četností, ale i o vzorky běžné, protože sklizňový rok, zejména pokud se průběh počasí významně liší od ročníků, ve kterých byly shromážděny kalibrační standardy, může mít na spektra a tím i na přesnost analýz vliv. Modely zůstanou průběžnou aktualizací robustní a částečně se eliminuje vliv proměnné matrice přírodního materiálu. V tabulce III a na obrázku 3A – D, 4E - F jsou uvedeny výsledky kalibrace vybraných jakostních znaků, charakteristiky a kvalita NIR modelů máku setého a makoviny.

Tabulka III

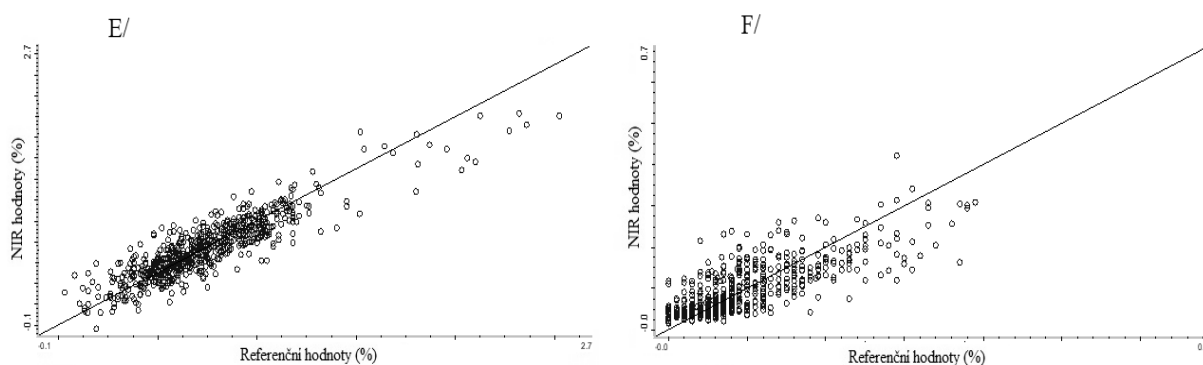
Parametry kalibračních modelů máku setého a makoviny

Složka	n ^a	Počet faktorů	Derivace	RMSEC ^b	R ^c	RMSECV ^d	R _{CV} ^e	RMSEP ^f	R _P ^g
Vlhkost (%)	78	6	bez derivace	0,085	0,998	0,111	0,997	0,134	0,995
Olej (% při 8 % vlhkosti)	123	11	bez derivace	0,224	0,993	0,324	0,985	0,310	0,987
C16:0 ^h (%)	145	11	bez derivace	0,335	0,859	0,430	0,830	0,413	0,827
C18:0 ^{ch} (%)	141	11	bez derivace	0,147	0,904	0,177	0,858	0,211	0,870
C18:1 ⁱ (%)	152	11	bez derivace	0,499	0,983	0,680	0,958	0,793	0,954
C18:2 ^j (%)	149	10	první derivace	0,448	0,986	0,618	0,953	0,890	0,836
C18:3 ^k (%)	149	11	bez derivace	0,026	0,988	0,098	0,933	0,110	0,974
Morfin	672	12	bez derivace	0,119	0,936	0,154	0,891	0,151	0,947
Kodein	633	13	bez derivace	0,054	0,859	0,064	0,756	0,087	0,768

^a Počet vzorků, ^b chyba kalibrace, ^c korelační koeficient kalibrace, ^d chyba křížové validace, ^e korelační koeficient křížové validace, ^f korelační koeficient predikce, ^g korelační koeficient predikce, ^h kyselina palmitová, ^{ch} kyselina stearová, ⁱ kyselina olejová, ^j kyselina linolová, ^k kyselina linolenová



Obrázek 3A - D Křížová validace modelu pro stanovení obsahu oleje ($RMSECV = 0,324$, $R_{CV} = 0,985$), kyseliny palmitové ($RMSECV = 0,430$, $R_{CV} = 0,830$), olejové ($RMSECV = 0,680$, $R_{CV} = 0,958$) a linolové ($RMSECV = 0,618$, $R_{CV} = 0,953$)



Obrázek 4E - F Křížová validace modelu pro stanovení obsahu morfinu ($RMSECV = 0,154$, $R_{CV} = 0,891$) a kodeinu ($RMSECV = 0,064$, $R_{CV} = 0,756$)

2.3 Zhodnocení vyvinutých kalibračních modelů a metody spektroskopie v blízké infračervené oblasti pro predikci kvality máku setého a makoviny

Kalibrační model pro predikci obsahu oleje vykazuje široký rozsah znaku a vysokou úroveň korelačních koeficientů. Standardní chyba kalibrace byla pro olej 0,224, chyba křížové validace 0,324 a chyba predikce 0,310. Chybami RMSEC, RMSECV a RMSEP je ověřována použitelnost kalibračních modelů. Malý rozptyl hodnot všech tří chyb u modelů svědčí o jejich vhodnosti k praktickému použití. Hodnota chyby predikce je srovnatelná s referenční metodou a publikovanými hodnotami, např. Čižmár (2014) udává $RMSECV = 0,38$ [9].

Kalibrační model pro predikci obsahu vody vykázal hodnotu korelačního koeficientu kalibrace 0,998, což opět ukazuje na velmi silnou regresní závislost. Model se vyznačuje poměrně vysokou robustností, charakterizovanou přijatelným kalibračním rozsahem, dobrou úrovní korelačních koeficientů, obecně nízkou a vzájemně vyrovnanou chybou křížové validace i chybou predikce. Standardní chyba kalibrace pro vlhkost byla 0,085, chyba křížové validace 0,111 a chyba predikce 0,134. Model je možné používat pro rutinní hodnocení vzorků.

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny palmitové vykazuje běžnou šíři znaku a dostatečný počet standardů. Hodnota korelačního koeficientu kalibrace byla 0,859 (středně silná závislost). RMSEC byla 0,335, RMSECV 0,430 a RMSEP 0,413. Standardní chyby kalibrace, křížové validace i predikce dosáhly vyrovnaných, ale vyšších hodnot.

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny stearové vykázal hodnoty korelačního koeficientů 0,858 - 0,904. Nižší hodnoty korelačních koeficientů mohou být způsobeny užším koncentračním rozsahem této kalibrace. RMSEC byla 0,147, RMSECV 0,177 a RMSEP 0,211. Malý rozptyl hodnot všech tří chyb tohoto modelu svědčí o vhodnosti použití kalibračního modelu pro potřeby hodnocení testovaných vzorků.

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny olejové vykázal hodnotu korelačního koeficientu kalibrace 0,983 (silná závislost) a pro predikci obsahu kyseliny linolenové 0,986. RMSEC byla v případě kyseliny olejové 0,499, RMSECV 0,680 a RMSEP 0,793 a v případě kyseliny linolenové 0,448, RMSECV 0,618 a RMSEP 0,890. Byl nalezen akceptovatelný rozptyl hodnot všech tří chyb u obou modelů a z praktického hlediska poskytuje NIR metoda dostatečně spolehlivé výsledky pro stanovení obsahu těchto parametrů.

Kalibrační model pro predikci obsahu kyseliny linolové vykázal hodnotu korelačního koeficientu kalibrace 0,988 (velmi silná závislost). RMSEC byla 0,026, RMSECV 0,098 a RMSEP 0,110. Větší rozptyl hodnot chyb je možné vysvětlit tím, že kalibrační soubor není v celém rozsahu znaku optimálně vyvážený. Model bude postupně v problematických oblastech doplňován o standardy, čímž bude možné snížit míru predikční nejistoty.

Kalibrační model pro predikci obsahu morfinu v makovině vykázal hodnotu korelačního koeficientu kalibrace 0,936. RMSEC byla 0,119, RMSECV 0,154 a RMSEP 0,151. Malý rozptyl hodnot všech tří chyb tohoto modelu svědčí o vhodnosti kalibračního modelu pro využití pro daný cíl. Některé publikace udávají nižší chybu predikce oproti výše uvedené hodnotě, např. Schulz (2004) udává RMSECV 0,059 [10].

Kalibrační model pro predikci obsahu kodeinu byl vytvořen z velmi početného souboru standardů. Korelační koeficienty dosáhly 0,768 – 0,859, počet vysvětlujících faktorů je vyšší, vykázal hodnotu 13. Nižší hodnoty korelačních koeficientů mohou být způsobeny užším



koncentračním rozsahem těchto kalibrací. RMSEC byla 0,054, RMSECV 0,064 a RMSEP 0,087. Byl nalezen větší rozptyl hodnot všech tří chyb, který může být způsoben nerovnoměrným rozložením koncentračního zastoupení kalibračních standardů. Některé publikace udávají nižší chybu predikce oproti výše uvedené, např. Schulz (2004) udává RMSECV 0,025 [10].

Uvedené příklady devíti kalibračních modelů pokrývající parametry posuzujících kvalitu makového semene a makoviny. Naznačují v řadě případů významný potenciál a rovněž univerzálnost využití FT-NIR spektroskopie. Na základě výsledků kalibrace byla ověřena použitelnost kalibračních modelů (vlhkost, olej, kyselina olejová a linolenová, morfin). Získané výsledky ukázaly, že FT-NIR metodu lze využívat k rutinnímu hodnocení vzorků. Výsledky také prokázaly, že predikce obsahu kyseliny palmitové, stearové, linolové a kodeinu je zatížena buď vyšší chybou RMSEP, nebo nižší hodnotou korelačního koeficientu. Nicméně i přesto mohou být všechny vyvinuté modely považovány za využitelné pro potřeby předběžného screeningu ve šlechtitelských programech máku setého. Vyvinuté modely je možné použít za definovaných podmínek např. v řadě šlechtitelských aktivit, kde je smyslem v rámci posuzovaného znaku nedestruktivně odlišit kontrastní genotypy. Zpřesnění modelů je možné v následujících letech dosáhnout zařazením méně početně zastoupených znaků. Dále průběžnou aktualizací, která je nutná k zajištění dostatečné robustnosti modelů při změně matrice vzorků vlivem sklizňového ročníku, neboť každý ročník vykazuje v tomto ohledu odchylky od ročníků jiných, což se v důsledku promítá do drobných posunů kvalitativních ukazatelů.

2.4 Stanovení kvality máku setého a makoviny metodou spektroskopie v blízké infračervené oblasti

Princip

Vzorky semen máku setého a makoviny se proměřují metodou FT-NIRS v oblasti (4 000 - 10 000 cm^{-1} , resp. 1 000 – 2 500 nm) s reflektanční detekcí. Vyhodnocení daného parametru se provádí matematickými statistickými postupy z kalibračního modelu. Měření probíhá v pevném, nepomletém vzorku semen máku. V případě makoviny se vzorek před měřením upraví mletím a důkladně se homogenizuje.

Přístroje a pomůcky

- Homogenizátor – laboratorní mlýnek (např. typ TUBE-MILL control, firma IKA).
- Síto s průměrem ok 1 mm.



- FT-NIR spektrometr (např. typ ANTARIS II, firma Thermo Scientific).
- Drobné laboratorní pomůcky – lžička, hadřík, vatové tyčinky, nálevka, štětce, pinzeta, kádinka.
- Křemenná měřící kyveta – o vhodném průměru 10, 30 a 50 mm a výšce 12, 15 a 25 mm.

Postup analýzy

Úprava vzorku

Metoda FT-NIRS nevyžaduje ve většině případů speciální přípravu vzorků, ale musejí být dodrženy přesné postupy pro sušení, mletí a homogenizaci vzorků. Je důležité, aby laboratoř připravila skutečně reprezentativní vzorek s homogenní jakostí. K rozboru se vždy použije vzorek bez příměsí a nečistot (zbytky slámy, půda, kamínky, aj.). Způsob úpravy vzorků před analýzou musí být totožný s postupy, které byly použity při tvorbě kalibračních modelů.

Sušení vzorku

V případě, že je potřeba vzorek před analýzou sušit, teplota v sušárně nebo sterilizátoru nesmí přesáhnout 50 °C. Způsob úpravy vzorků musí být totožný s postupy, které byly použity při tvorbě kalibračních modelů.

Mletí vzorku

V případě vzorků z celých makovic je úprava následující: tobolka máku se odlomí od stonku v kolénku, dále se odřízne blizna a semeno máku se vysype. Vzorky tobolek včetně blizen (tzv. makovina v užším slova smyslu) se jemně rozmáčkou v ruce nebo v sáčku, pomelelou se na laboratorním mlýnku po dobu 1 minuty při otáčkách 22000 rpm. Následuje přesetí pomleté makoviny přes síto s průměrem ok 1 mm. Semenné vzorky máku setého nevyžadují před vlastním měřením úpravu mletím a analyzují se v surovém stavu.

Homogenizace vzorku

Upravené vzorky vyžadují před vlastním měřením důkladné promíchání, aby bylo dosaženo maximální homogenity vzorků. Pokud vzorky nejsou homogenní, může být významně ovlivněna přesnost a správnost analýzy.

Měření vzorků na FT-NIR spektrometru

Před měřením vzorků se přístroj nastaví podle doporučení výrobce. NIR spektra upravených vzorků se snímají v křemenných kyvetách. Nadávkované vzorky se umístí do měřící části



přístroje a nasníká se jeho NIR spektrum. Všechna měření se provádějí v režimu reflektance a každý vzorek se měří paralelně.

Plnění kyvet nemletými vzorky

Vyčištěný a dokonale promíchaný vzorek se rovnoměrně nadávkuje do měřící kyvety v takovém množství, aby bylo možné kyvetu uzavřít (v případě kompresní kyvety). Jestliže se použije nekompresní kyveta, vzorek se dávkuje v max. množství odpovídajícímu objemu kyvety. Vzorek se musí nadávkovat tak, aby pokrýval celou kyvetu a aby se eliminovaly vzduchové mezery mezi částmi vzorku, které by mohly negativně ovlivnit správnost měření. Po naplnění se dolní částí nekompresní kyvety z tohoto důvodu dvakrát poklepe o měkkou podložku.

Plnění kyvet mletými vzorky

Upravený a dokonale promíchaný vzorek se rovnoměrně nadávkuje do měřící kompresní kyvety v takovém množství, aby bylo možné kyvetu uzavřít. Plnění makovinou: vzorek se sype do kyvety pomocí nálevky, až se vytvoří kopeček, kyvetou se dvakrát jemně poklepe o podložku, opět se přisype makovina, aby se vytvořil kopeček, který se poté zarovná pomocí stěrky, resp. setře se v horizontálním směru přebytečná makovina. Kyveta se uzavře víčkem a horní část se očistí štětečkem. Je vhodné otřít hadříkem i skleněné dno s ohledem na možnost ulpívání prachu z makoviny.

Vyjádření výsledků

Vyhodnocení výsledků vzorků pro danou matici a parametr se provádí softwarově s použitím matematických a statistických postupů aplikovaných na vytvořené příslušné kalibrační modely. K vyhodnocení získaných spektrálních dat se používá vhodný vyhodnocovací software (např. Omnic for Antaris). Naměřená NIR spektra jsou v tomto programu uložena a následně je možné k jednotlivým vzorkům přiřadit laboratorní referenční hodnoty. Výsledky analýz vzorků se uvádějí jako průměr ze dvou paralelních stanovení. Uvádí se v % a jsou vyjádřeny na dvě desetinná místa.

3 Novost postupů

Navržený postup analýzy umožňuje sledovat kvantitativní a kvalitativní parametry semen máku setého a makoviny během procesu šlechtění a vybírat potencionálně vhodné materiály

z hlediska kvality. Neperspektivní materiály s nevyhovující kvalitou tak mohou být ze šlechtitelského procesu vyřazeny dříve, což povede k jeho značnému odlehčení a zefektivnění. Vytvořené kalibrační modely budou mít využití nejen ve šlechtění máku setého, ale také při standardním hodnocení genových zdrojů kolekce máku Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity. Zaváděním metodiky do šlechtitelské praxe se významně zefektivní výběr genotypů s požadovanou kvalitou. Analýza rozsáhlejší kolekce šlechtitelských materiálů umožní výběr pouze perspektivních genotypů, eliminuje se nutnost dalšího pěstování neperspektivních materiálů, což povede v konečném důsledku k významnému snížení časové náročnosti, úspore personálních i materiálních nákladů a možnosti rozšíření šlechtitelské kolekce o nové perspektivní materiály.

4 Popis uplatnění metodiky

Budoucí uživatelé metodiky mohou být šlechtitelská a výzkumná pracoviště a univerzity, která ji mohou uplatnit ve svých šlechtitelských programech při hodnocení rozpracovaných materiálů a k urychlení selekčního procesu tvorby nových odrůd. Vyvinuté kalibrační modely budou ve f. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. použity pro předběžné hodnocení genotypů ve šlechtění máku setého a při hodnocení genových zdrojů kolekce olejnin.

Metoda FT-NIRS bude pro šlechtitele účinným nástrojem na selekci šlechtitelských materiálů máku setého z hlediska kvality. Pokud některé materiály vykazují nadlimitní obsahy nežádoucích látek (např. morfin v případě potravinářských odrůd), jsou tyto položky ze šlechtitelského procesu většinou vyřazeny, nebo je zapotřebí s nimi dále šlechtitelsky pracovat (zpětné křížení pro zlepšení kvality). Úkolem následných selekcí a stabilizace genotypů je pak cílené zlepšení kvality za současné fixace požadovaných vlastností. Naopak pozitivní výběr se provádí na základě vyššího obsahu oleje v semeni nebo některých mastných kyselin. Za tímto účelem je nezbytné realizovat velmi velký počet analýz, který je aktuálně prakticky proveditelný pouze za využití uvedené metody FT-NIRS. Z hlediska šlechtění je velkým kladem metody její nedestruktivnost. Vzorčky makových semen, jakožto základu příští generace, není třeba nijak před analýzou upravovat, čímž nedochází k jejich poškozování a ztrátě klíčivosti.

Uvedená metoda bude mít rovněž praktický význam při hodnocení GZ máku setého v rámci řešení NP, který pomáhá shromáždit velké množství dat o kvantitativních parametrech produkce a to ve víceletých cyklech hodnocení. Kolekce máku setého z NP patří v evropském prostředí k jedné z největších a každoročně uspokojuje požadavky širokého spektra domácích i zahraničních uživatelů [11]. Šlechtitelé i ostatní uživatelé GZ z kolekce máku v následujících

letech ocení přístup k informacím o chemickém složení oleje a obsahu významných alkaloidů v makovině. Každoročně se hodnotí přes 250 genových zdrojů a pomocí metody FT-NIRS bude možné hodnotit 9 kvalitativních parametrů. Díky FT-NIRS se tak podaří získat kolem 2250 zhodnocených popisných znaků za rok, charakterizujících materiály i z pohledu zdravotního přínosu pro konzumenty. Tento objem by v žádném případě nebylo možno realizovat běžnými přesnými laboratorními metodami a to jak z pohledu časové náročnosti, tak neúnosných finančních nákladů. Získaná data, a to z minimálně tří let hodnocení, budou zpracována a uložena do Informačního systému GRIN Czech, který je přístupný na webu všem zájemcům a uživatelům (např. z řad šlechtitelů, výzkumníků aj.).

5 Ekonomické aspekty

Použití FT-NIR metody je velmi efektivní z hlediska úspory času, nedestruktivnosti, vysokého množství stanovených vzorků, možnosti získání většího počtu zhodnocených kvalitativních znaků z jednoho měření, ale hlavně kvůli výrazně nižším nákladům na vlastní analýzu. Z pohledu vstupních nákladů je v případě používání spektroskopie v blízké infračervené oblasti významnou položkou pořizovací cena přístroje (cca 1,5 mil Kč), dále je nutné počítat s náklady na tvorbu predikčních kalibračních modelů. Naopak přímé provozní náklady, pracovní a časová náročnost na obsluhu jsou nízké a tak jsou vstupní náklady v poměrně krátkém časovém období kompenzovány. Příklad konkrétního ekonomického přínosu pro f. OSEVA vývoj a výzkum s.r.o. je uveden v Tabulkách IV a V, které srovnávají výši přibližných nákladů na analýzu 900 vzorků, což je počet řádově odpovídající roční potřebě analýz v rámci šlechtění a NP ve výše uvedené organizaci. Klasickými metodami je tento počet, především z důvodů nákladovosti, v současné době nerealizovatelný. V případě analýz semen se podle uvedeného vyčíslení úspora provozních nákladů za využití metody FT-NIRS pohybuje okolo 1.170 tis. Kč ročně, v případě analýz makoviny pak 1.710 tis. Kč ročně.



Tabulka IV

Příklad ekonomického přínosu metody FT-NIRS na souboru 900 analyzovaných vzorků semen máku

Typ analýzy	Cena analýzy (Kč)
Mastné kyseliny (GC) - 1000 Kč/vzorek	900 000
Olej (extrakčně) - 300 Kč/vzorek	270 000
Vlhkost (gravimetricky) - 100 Kč/vzorek	90 000
FT-NIRS - 100 Kč/vzorek	90 000

Tabulka V

Příklad ekonomického přínosu metody FT-NIRS na souboru 900 analyzovaných vzorků makoviny

Typ analýzy	Cena analýzy (Kč)
Alkaloidy (HPLC/UV-VIS) - 2000 Kč/vzorek	1 800 000
FT-NIRS - 100 Kč/vzorek	90 000

Zefektivnění šlechtitelského procesu zavedením metody FT-NIRS lze spatřovat především v možnosti rozsáhlejší kvalitativní charakterizaci širšího spektra šlechtitelských materiálů a cílené selekci genotypů s požadovanou kvalitou. Šlechtitelský proces tak nebude zatěžován vedením a testováním neperspektivních materiálů. Při předpokladu ročních nákladů na vedení jedné linie cca 1200 Kč, bude úspora při včasné eliminaci cca 100 nevhodných materiálů ročně 120 tis. Kč.

6 Seznam použité související literatury

- [1] Vašák J. a kol.: Mák. *Powerprint s.r.o.* (2010): 18 – 20. ISBN 978-80-904011-8-1.
- [2] Baranyk P. a kol.: Olejniny. *Profi Press s.r.o.* (2010): 81 – 82. ISBN 978-80-86726-38-0.
- [3] Laryšová A., Endlová L., Vrbovský V., Navrátilová Z. (2015): Analýza alkaloidů v makovině metodou vysokoúčinné chromatografie. *Chemické listy* roč. 109, číslo 3, s. 229 – 234. ISSN 0009-2770.
- [4] Musílek J. (2012): Aplikace blízké infračervené spektroskopie ve farmaceutické analýze. *Chemické listy* roč. 106, s. 10 – 15. ISSN 0009-2770.



- [5] Endlová, L., Vrbovský, V., Navrátilová, Z., Tenkl, L. (2017): Využití spektroskopie v blízké infračervené oblasti ve šlechtění řepky olejky. *Chemické listy*. č. 111, s. 524-530. ISSN 1213-7103.
- [6] ČSN EN ISO 659 Olejnatá semena – Stanovení obsahu oleje (Referenční metoda).
- [7] ČSN EN ISO 12966-1 Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 1: Směrnice pro moderní plynovou chromatografii methylesterů mastných kyselin.
- [8] ČSN EN ISO 12966-2 Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Plynová chromatografie methylesterů mastných kyselin - Část 2: Příprava methylesterů mastných kyselin.
- [9] Čížmár D., Šulová R. (2014): Vývoj kalibrační rovnice na olej ve vzorcích máku metodou FT-NIRS. In *Bulletin Národní referenční laboratoře 2014*, roč. XVIII, č. 2/2014, s. 31 – 39. ISBN 1801-9196.
- [10] Schulz H., Nothnagel T. (2004): Determination of valuable alkaloids in poppy capsules by near-infrared spectroscopy. In *sborník 11th, International conference on near infrared spectroscopy*, Cordoba, Spain in NEAR INFRARED SPECTROSCOPY, s. 883-886. ISBN 0952866641.
- [11] Holubec V. a kol.: Rámcová metodika Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity. Dostupné z: http://genbank.vurv.cz/genetic/nar_prog_rostlin/dokumenty [online]. (Cit.27.11.2019).

7 Seznam výsledků, které předcházely vydání metodiky

- [1] Rychlá A., Endlová L. (2018): Moderní technologie hodnocení kvalitativních parametrů oleje a jejich využití. *Genetické zdroje rostlin. Moderní technologie konzervace a hodnocení*. Ministerstvo zemědělství, Praha, s. 49-55. ISBN 978-80-7434-483-1.
- [2] Endlová L., Rychlá A., Vrbovský V. (2019): Hodnocení kvalitativních parametrů máku setého (*Papaver Somniferum*) pomocí FT-NIR spektroskopie. In *Sborník příspěvků XLIX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin*, Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT v Praze, Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i. Praha, s. 118 – 120. ISBN 978-80-7592-057-7. ISSN 1808-1433.
- [3] Rychlá A., Endlová L., Vrbovský V. (2019): Predikce kvality genetických zdrojů a novošlechtění máku setého s využitím FT-NIR spektrometru. *Česká technologická platforma rostlinných biotechnologií*. *Česká technologická platforma rostlinných biotechnologií* [online]. Dostupné z:



<http://www.rostlinyprobudoucnost.eu/ctprb/novinky/zajimavosti/128-predikce-kvality-genetickych-zdroju-a-novoslechteni-maku-seteho-s-vyuzitim-ft-nir-spektrometru.html>.

- [4] Rychlá A., Endlová L., Vrbovský V. (2019): Kvalitativní parametry genových zdrojů kolekcí máku setého (*Papaver somniferum* L.). *In 18. Makový občasník – sdružení Český mák informuje, sborník odborných seminářů „Mák v roce 2019“*, Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, s. 15 – 17. ISBN 978-80-213-2930-0.



Tato publikace neprošla jazykovou úpravou.
Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři.

OSEVA vývoj a výzkum s.r.o.

Provozovna Opava

Purkyňova 10

764 01 Opava

1. vydání, 2020

Tel: +420 553 624 160

e-mail: opava@oseva.cz

www.oseva-vav.cz