



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

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

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Metabolomická analýza vybraných druhů hmyzu
a výrobků**

Ondřej Pospíšil, Kateřina Šebelová, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová

**VŠCHT Praha
Praha, srpen 2025**

© Ondřej Pospíšil, Kateřina Šebelová, Vladimír Kocourek, Jana Hajšlová,
VŠCHT Praha, 2025

Publikace neprošla jazykovou ani redakční kontrolou, za obsah příspěvků odpovídají autoři.

Kontakt na vedoucí autorského kolektivu: jana.hajslova@vscht.cz

ISBN 978-80-7592-316-5

OBSAH

1	Cíl metodiky	4
2	Vlastní popis metodiky	5
2.1	Použitelnost zvolené analytické strategie.....	5
2.2	Princip analytické metody	5
2.3	Chemikálie a spotřební materiál	6
2.4	Přístroje a zařízení.....	6
2.5	Použitý software.....	7
2.6	Vzorky použité pro tvorbu klasifikačních modelů.....	7
2.7	Příprava vzorku	7
2.8	Podmínky měření pomocí U-HPLC-HRMS	8
2.9	Postupy zpracování naměřených dat.....	9
2.10	Necílená metabolická analýza.....	11
2.11	Identifikace charakteristických markerů pro účely detekce a rozlišení jednotlivých druhů hmyzu.....	15
2.12	Cílový screening diagnostických markerů – ověření jejich aplikovatelnosti pro autentikaci reálných vzorků.....	16
2.13	Diagnostické markery hmyzu vhodné pro autentikaci.....	26
2.14	Pracovní charakteristiky metody.....	30
3	Srovnání novosti postupů	31
4	Popis uplatnění metodiky	32
5	Ekonomické aspekty.....	33
6	Seznam použité související literatury	34
7	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	35
8	Seznam použitých zkratk	36
9	Přílohy	38

1 Cíl metodiky

Cílem projektu Komplexní laboratorní strategie pro identifikaci druhů hmyzu určeného k lidské spotřebě a produkci zpracované živočišné bílkoviny, autentikace potravin na jeho bázi (QK23020101), podporovaného Ministerstvem zemědělství ČR, bylo navrhnout moderní laboratorní metody pro identifikaci druhů hmyzu určených pro lidskou spotřebu. Projekt zahrnoval i problematiku falšování potravin na bázi jedlého hmyzu.

Pro naplnění výše stanoveného cíle byly na základě necílené metabolomické analýzy (fingerprinting) autentických druhů hmyzu vytipovány specifické molekuly (tzv. markery) pro jednotlivé druhy. Tato metodika pak nabízí pro kontrolní a inspekční praxi screeningové postupy a markery určené k ověření autenticity výrobků na bázi jedlého hmyzu dostupného na evropském trhu.

2 Vlastní popis metodiky

2.1 Použitelnost zvolené analytické strategie

Metabolomický fingerprinting představuje současný trend, který je aplikovaný nejen při autentikaci potravin. Pro tuto studii byla zvolena pokročilá analytická technika ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií (U-HPLC-HRMS/MS), která umožňuje analýzu široké škály malých molekul izolovaných ze zkoumaného vzorku. Naměřená vícerozměrná data je nutné zpracovat a vyhodnotit pomocí vícerozměrných statistických metod, která umožňují vytvořit klasifikační modely a identifikovat diagnostické markery.

Představená strategie navrhuje aplikaci metody metabolomického fingerprintingu pro klasifikaci jednotlivých druhů hmyzu, popř. způsobu jejich usmrcení, na základě analýzy ethanolicých extraktů. Pro vytvoření statistických modelů bylo použito 142 autentických vzorků 10 druhů hmyzu (**Příloha 1**), které byly odchovány 15 chovateli původem z České republiky ($n = 14$) a Litvy ($n = 1$) v průběhu dvou let (celkem 5 odběrů). Studovanými druhy jsou cvrček domácí (*A. domesticus*), cvrček banánový (*G. assimilis*), potěmník moučný (*T. molitor*), potěmník stájový (*A. diaperinus*), potěmník brazilský (*Z. morio*), moucha bráněnka (*H. illucens*), saranče stěhovavé (*L. migratoria*), saranče všežravé (*S. gregaria*), šváb argentinský (*B. dubia*) a šváb turkistánský (*S. tartara*). Vzorky se lišily v použitém krmivu, délce lačnění a způsobu usmrcení. Získané vytipované markery jednotlivých druhů mohou být použity pro cílený screening ve vzorcích hmyzu a výrobků z něj dostupných v tržní síti.

2.2 Princip analytické metody

Izolace metabolitů ze zhomogenizovaných vzorků se provádí použitím extrakční směsi ethanol:voda (1:1, v/v). Ethanolicke extrakty jsou následně analyzovány pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií (U-HPLC-HRMS/MS) s hmotnostním analyzátozem typu kvadrupól-Orbitrap (Q-Orbitrap). Naměřená data jsou zpracována s využitím pokročilých statistických metod, konkrétně analýzou hlavních komponent (Principal component analysis, PCA) a diskriminační analýzou částečných nejmenších čtverců (Partial Least Square Discriminant Analysis, PLS-DA). Vytvořené modely dokážou rozlišit jednotlivé druhy hmyzu mezi sebou, popř. i dle způsobu usmrcení. Po statistickém zpracování jsou vybrány nejvíce diagnostické ionty (m/z) charakterizované přesnou hmotou m/z , izotopovým profilem, fragmentačním (MS^2) spektrem,

sumárním vzorcem a přiřazenou identifikací. Tyto markery mohou být dále, za použití knihovny MS/MS spekter, cíleně screenovány v nových vzorcích hmyzu a výrobků s obsahem hmyzu. Jejich přítomnost ve vzorku je v takovém případě hodnocena na základě shody retenčního času, přesné hmoty m/z , izotopového profilu a charakteristických fragmentů s příslušnou knihovnou.

2.3 Chemikálie a spotřební materiál

- Methanol pro LC-MS, čistota $\geq 99,9\%$ (Honeywell, Německo)
- Propan-2-ol pro LC-MS, čistota $\geq 99,9\%$ (Honeywell, Německo)
- Acetonitril pro LC (Merck KGaA, Německo)
- Ethanol 96 % p.a. (Ing. Petr Švec – PENTA s.r.o., Česká republika)
- Deionizovaná voda (zařízení Milli-Q Millipore, Německo)
- Mravenčan amonný, čistota 99,9 %, (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina mravenčí, čistota pro MS - 98 %, (VWR Chemicals, Velká Británie)
- Běžné laboratorní pomůcky a vybavení

2.4 Přístroje a zařízení

- Lyofilizátor L10-55 PRO (Gregor Instruments s.r.o., Sázava, Czech Republic)
- Analytický mlýnek IKA[®] A11 basic (IKA, Německo)
- Homogenizátor Geno/Grinder[®] 2010 (Cole-Parmer[®], USA)
- Analytické váhy Newton EJ-200 (A&D Instruments Ltd., Velká Británie)
- Automatická pipeta Transferpette[®] S 10-100 μl (Brand, Německo)
- Automatická pipeta Transferpette[®] S 100-1000 μl (Brand, Německo)
- Elektronická krokovací pipeta Multipette E3 (Eppendorf, Německo)
- Přístroj na přípravu deionizované vody Milli-Q (Merck Millipore, Německo)
- Centrifuga Rotina 35R (Hettich, Německo)
- Běžné laboratorní nádoby

Instrumentální systém U-HPLC-HRMS:

- Kapalinový chromatograf U-HPLC Vanquish[™] Horizon (Thermo Scientific, USA)
- Hmotnostní spektrometr Exploris[™] 240 (Thermo Scientific, USA)
- Analytická kolona Acquity HSS T3 (2,1 \times 100 mm, 1,8 μm ; Waters, USA)

2.5 Použitý software

- Compound Discoverer 3.3 (Thermo Scientific, USA)
- mzVault 2.3 (Thermo Scientific, USA)
- MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca, Kanada)
- MS Finder verze 3.52 (CompMS, Japonsko)
- SIMCATM verze 13.0 (Umetrics, Švédsko)
- Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA)
- TraceFinder verze EFS 5.2 (Thermo Scientific, USA)

Poznámka: Kromě přístroje a zařízení uvedených dodavatelů, které byly použity pro tuto metodiku, lze použít instrumentaci od alternativních dodavatelů, pokud jsou pro daný účel vhodné. Vhodnost musí být dokumentována při implementaci metody v konkrétních podmínkách.

2.6 Vzorky použité pro tvorbu klasifikačních modelů

Pro necílovou analýzu a tvorbu klasifikačních modelů je potřeba použít dostatečný počet vzorků pokrývajících možnou variabilitu, která může být způsobena např. různými podmínkami při skladování, chovu a různým technologickým zpracováním. Pro vytvoření klasifikačních modelů v této metodice bylo použito celkem 10 druhů hmyzu získaných od 14 různých chovatelů z České republiky a jednoho chovatele z Litvy. Vzorky byly shromažďovány během dvou let v rámci 5 odběrů. Vzorky hmyzu byly dodány v živém stavu po vylačnění (alespoň 24 hodin). Každý vzorek byl rozdělen na dvě poloviny, kdy jedna polovina byla usmrcena mrazem (-18 °C, 24 hod) a druhá polovina ve vroucí vodě (100 °C) po dobu 5 min v hmotnostním poměru 1:10 (hmyz/voda). Poté byly všechny vzorky lyofilizovány a kryogenně homogenizovány po podchlazení tekutým dusíkem. Těmito postupy bylo získáno celkem 142 vzorků rozdílných v druhu, stáří (době skladování), původu, chovných podmínkách a metodě usmrcení.

2.7 Příprava vzorku

Lyofilizované a homogenizované vzorky hmyzu (0,5 g) nejprve navážíme do centrifugačních kyvet o objemu 50 ml. Následuje extrakce malých molekul (metabolitů) přidáním 10 ml směsi ethanol:voda (1:1, v/v) a třepáním na vertikální třepačce (5 min, 1 000 min⁻¹). Dalším krokem je vymrazení při teplotě -18 °C po dobu 24 hodin, ihned poté vzorky odstředíme (5 min, 10 000 min⁻¹, 5 °C). Ethanolický extrakt je následně odebrán do skleněné vialky a před analýzou uchováván při -80 °C.

Výrobky na bázi jedlého hmyzu jsou nejprve homogenizovány. Kryogenní mletí za použití tekutého dusíku je aplikováno u matric, které není možné homogenizovat konvenčním mletím z důvodu jejich struktury (např. tvrdost, lepivost). Může se jednat například o výrobky typu proteinové tyčinky. Tekuté a pastovité/kašovitě matrice jsou homogenizovány mixováním, popřípadě důkladným promícháním. Další příprava je shodná s přípravou vzorků hmyzu včetně navážky a přidaného extrakčního činidla. Pro účely cílového screeningu je možné pro výrobky s předpokládaným nízkým obsahem hmyzí složky poměr vzorku a rozpouštědla upravit.

Vzorek pro řízení kvality (QC), sloužící pro posouzení naměřených dat, připravíme smísením alikvotních podílů (100 µl) ze všech připravených ethanolických extraktů. Slepý vzorek je připraven stejně jako ostatní vzorky.

2.8 Podmínky měření pomocí U-HPLC-HRMS

Analýza vzorků je realizována technikou U-HPLC-HRMS/MS s hmotnostním analyzátozem typu kvadrupól-orbitrap (Q-Orbitrap). Podmínky měření ethanolických extraktů jsou uvedeny v **Tabulce 1 a 2**:

Tabulka 1: Podmínky U-HPLC separace

Vanquish™ Horizon (Thermo Scientific, USA)				
Kolona	ACQUITY® HSS T3 (2,1 x 100 mm, 1,8 µm; Waters, USA)			
Teplota kolony	45 °C			
Mobilní fáze	A: 5 mM HCOONH ₄ v dH ₂ O + 0,1 % HCOOH B: 5 mM HCOONH ₄ v MeOH + 0,1 % HCOOH			
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min			
Gradient mobilní fáze	čas (min)	A (%)	B (%)	průtok (mL/min)
	0	95	5	0,4
	1	95	5	0,4
	8	0	100	0,4
	13	0	100	0,4
	13,1	95	5	0,4
	15	95	5	0,4

Tabulka 2: Podmínky HRMS/MS detekce

Exploris™ 240 (Thermo Scientific, USA)	
Ionizační technika	ESI+/-
Akviziční mód	MS ¹ (full scan) + MS ² (DDA)

Napětí na sprejovací kapiláře	± 4 kV
Teplota na kapiláře a vypařovací teplota	250 °C
Rozsah detekce <i>m/z</i>	MS ¹ : 100-1200 MS ² : 50-1200
Rozlišení FWHM	MS ¹ : 120 000 MS ² : 15 000
Kolizní energie	30; 45 NCE

Pro posouzení kvality měřených dat je použit QC vzorek, který je nastříknut v 10 opakováních před začátkem sekvence, dále po každých 10 vzorcích v průběhu sekvence a ve 2 opakování na konci sekvence (při analýze hlavních komponent musí všechny nástříky QC vzorku tvořit jeden klastr v grafu komponentního skóre). Pro zhodnocení kvality měření jsou porovnány intenzity signálů, retenční časy analytů a tlakový záznam systému.

2.9 Postupy zpracování naměřených dat

2.9.1 Zpracování dat pro necílovou metabolomickou analýzu

Naměřená data pro necílovou metabolomickou analýzu musí být před statistickou analýzou zpracována. Zpracování probíhá v programu Compound Discoverer, který umožňuje extrakci proměnných, deizotopizaci, alignment, normalizaci dat a anotaci jednotlivých proměnných. Dále umožňuje provést některé statistické úkony, jako například PCA, což umožňuje posouzení kvality naměřených dat (shlukování QC vzorků do jednoho klastru). Parametry zpracování dat pro necílovou analýzu jsou uvedeny v **Tabulce 3**.

Tabulka 3: Parametry zpracování dat pro necílovou metabolomickou analýzou v programu Compound Discoverer 3.3 pro obě ionizační techniky (ESI+/-)

Compound Discoverer 3.3 (Thermo Scientific, USA)	
Minimální výška píku	100 000
Poměr signál/šum	1,5
Typ aduktů	<p>ESI+: [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺, [M+NH₄]⁺, [M+2H]⁺², [M+3H]⁺³, [2M+H]⁺, [2M+Na]⁺, [2M+K]⁺, [2M+NH₄]⁺, [M+H+Na]⁺², [M+H+K]⁺², [M+H+NH₄]⁺², [M+H-H₂O]⁺, [M+H-NH₃]⁺</p> <p>ESI-: [M-H]⁻, [M+Cl]⁻, [M+HCOO]⁻, [M+CH₃COO]⁻, [M-2H]⁻², [M-2H+K]⁻, [2M-H]⁻, [2M+HCOO]⁻, [2M+CH₃COO]⁻, [M-H-H₂O]⁻</p>
Tolerance retenčního času pro alignment dat	0,2 min

Tolerance přesné hmoty (m/z) pro zarovnání dat	5 ppm
Technika normalizace dat	SERRF (Systematic Error Removal Using Random Forest)
Nástroje pro anotaci proměnných	mzCloud Chemspider Predict Compositions

Výsledkem zpracování dat jsou datové matice zvlášť pro pozitivní a negativní mód ionizace. Proměnné jsou charakterizovány naměřenou přesnou hmotou iontů (m/z), retenčním časem, případně sumárním vzorcem a anotací.

2.9.2 Statistické zpracování dat pro necílovou metabolomickou analýzu

Proměnné jsou nejprve filtrovány podle relativní směrodatné odchylky (RSD) plochy píků z opakovaných analýz QC vzorků. Pro další zpracování jsou dále použity jen ty proměnné, které mají $RSD < 30 \%$.

Následuje statistické zpracování dat, které kombinuje jednorozměrné a vícerozměrné statistické metody s cílem vytvořit klasifikační modely, které budou na základě diagnostických proměnných, tzv. markerů, schopné rozlišit jednotlivé druhy hmyzu.

Následně jsou pomocí softwaru Metaboanalyst vybrány signifikantní proměnné pomocí analýzy rozptylu (Analysis Of Variance, ANOVA) s navazujícím Fisher's Least Significant Difference (LSD) post-hoc testem (p -hodnota $\leq 0,05$). Matice obsahující signifikantní proměnné jsou exportovány do softwaru SIMCA a normalizovány na sumu, logaritmicky transformovány a Pareto škálovány. Následně jsou podrobeny vícerozměrné analýze dat za účelem vytvoření klasifikačních modelů pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) a diskriminační analýzy částečně nejmenších čtverců (PLS-DA). Výběr proměnných je dále zúžen na základě VIP skóre, kdy proměnné s vyšším VIP skóre jsou důležitější pro odlišení jednotlivých tříd. Vybrané proměnné jsou podrobeny bližšímu zkoumání a konfirmaci přiřazené anotace na základě přesné hodnoty m/z , izotopového profilu a charakteristických fragmentů molekuly. Diagnostické markery s navrženou identifikací jsou posléze zaneseny do vytvořené knihovny fragmentačních spekter (software mzVault), která se následně může využít k cílovému screeningu těchto látek.

Klasifikační modely jsou validovány pomocí šestikrokové křížové validace a charakterizujeme jejich rozpoznávací (R_2X , R_2Y) a predikční (Q^2) schopnost. Za validní je považován ten model, jehož hodnoty nabývají minimálně hodnoty 0,5 [1].

2.9.3 Zpracování dat pro cílový screening

Vytvořená MS² databáze je následně využita pro účely cílového screeningu vytipovaných markerů v různých typech vzorků, čímž je ověřena jejich detektabilita a specifita, může ale sloužit i k samotné autentikaci vzorků. Naměřená data jsou nejprve zpracována v programu TraceFinder EFS, kdy dojde k automatické detekci markerů a integraci píků. Nastavení jednotlivých parametrů pro cílový screening shrnuje **Tabulka 5**.

Tabulka 4: Nastavení parametrů cílového screeningu vybraných markerů hmyzu a způsobu usmrcení v programu TraceFinder EFS 5.2

TraceFinder EFS 5.2 (Thermo Scientific, USA)	
Nastavení filtrace píků	
hledat od-do	0-14 min
Šířka chromatografického okna	1 min
Nastavení podmínek identifikace	
Poměr signál/šum (S/N)	5
Tolerance retenčního času	30 s
Tolerance hmoty prekurzorového iontu	5 ppm
Tolerance hmoty fragmentu	7 ppm
Rozdíl izotopového poměru	20 %
Nastavení mzVault	
Tolerance hmoty prekurzorového iontu	10 ppm

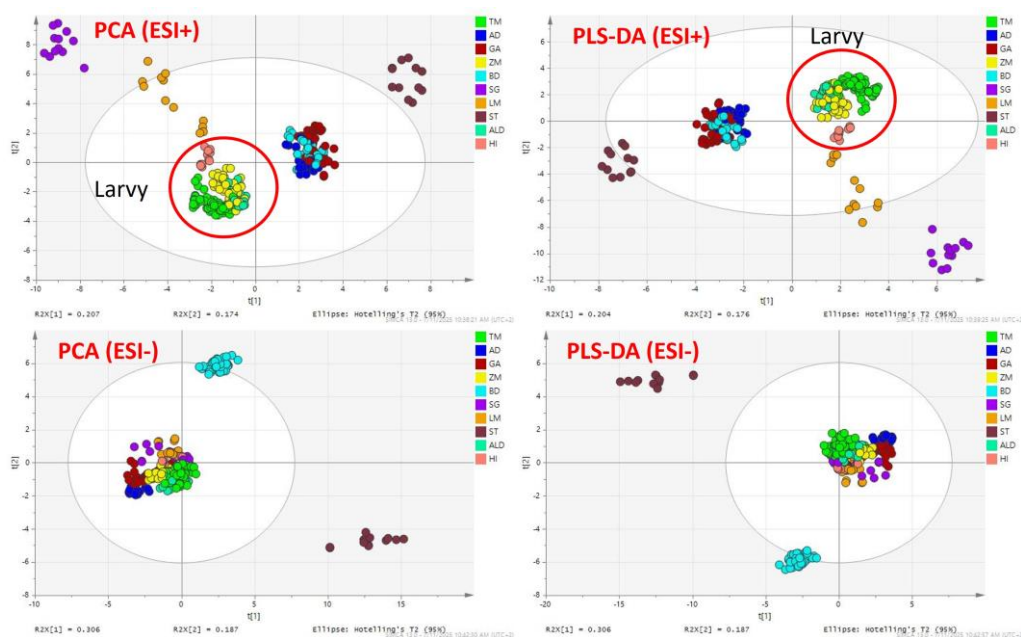
2.10 Necílená metabolická analýza

Ethanolické extrakty jsou analyzovány technikou U-HPLC-HRMS/MS v pozitivním (ESI+) i negativním (ESI-) módu ionizace. Podmínky měření jsou uvedeny v **Kapitole 2.8**. Naměřená data je nutné předzpracovat a podrobit statistické analýze, detailněji je postup popsán v předchozí **Kapitole 2.9**.

2.10.1 Klasifikace hmyzích druhů na základě metabolického fingerprintu

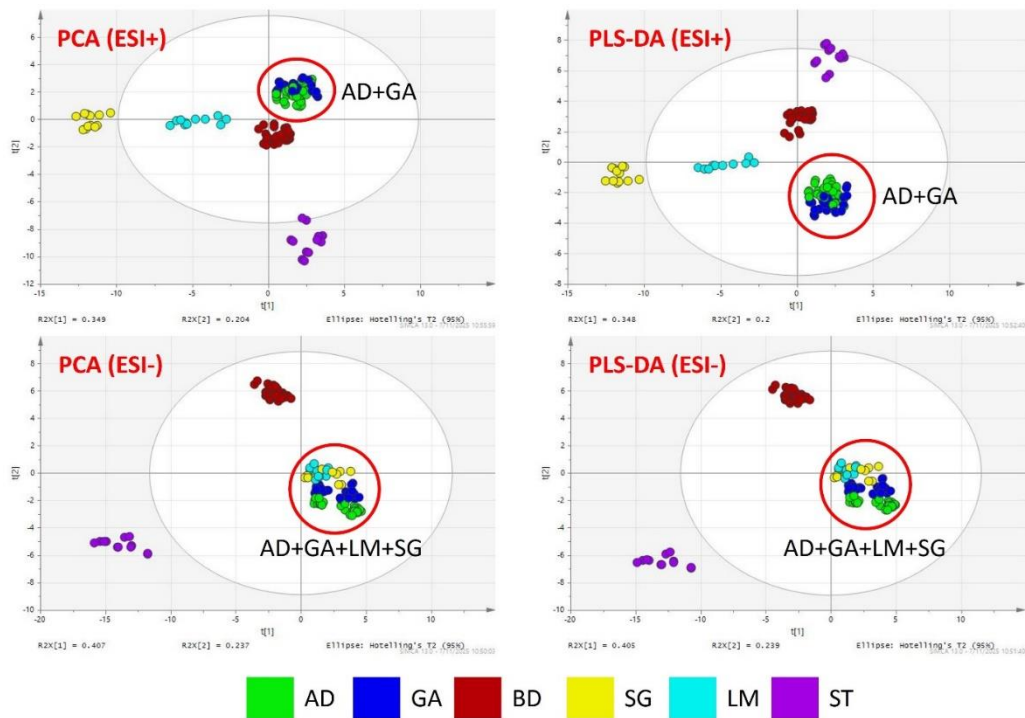
Nejprve jsou metabolické fingerprinty autentických vzorků hmyzu (n = 142, **Příloha 1**) podrobeny PCA a PLS-DA v programu SIMCA, výsledkem jsou grafy komponentního skóre a komponentních vah. Po nastavení hranice VIP skóre ≥ 2 zůstane 69 významných proměnných v ESI+ a 40 v ESI-. Při použití prvních dvou hlavních komponent

(Principal Component, PC) však není dosaženo dobrého vizuálního rozdělení jednotlivých druhů hmyzu, protože vzorky ve vývojovém stadiu larvy tvoří jeden klastř a vzorky v dospělém vývojovém stadiu se oddělují pouze částečně (**Obrázek 2**). Avšak během křížové validace PLS-DA model přiřadil správně 100 % vzorků v pozitivním i negativním módu ionizace. Parametry rozpoznávací (R^2X , R^2Y) a predikční (Q^2) schopnosti modelu byly následující: $R^2X = 0,896$; $R^2Y = 0,937$ a $Q^2 = 0,917$ v ESI+ a $R^2X = 0,964$; $R^2Y = 0,862$ a $Q^2 = 0,799$ v ESI-.



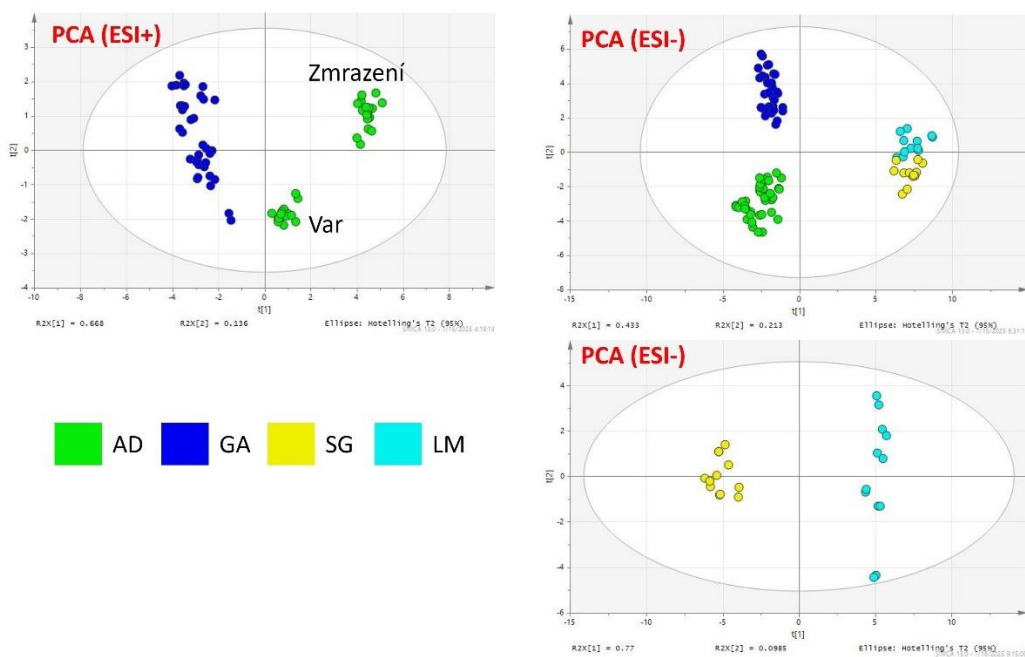
Obrázek 1: Grafy komponentního skóre PCA a PLS-DA modelů při zahrnutí všech druhů hmyzu

Na základě výše uvedených výsledků je soubor vzorků rozdělen na dvě části podle vývojového stadia. Vytvořené modely PCA a PLS-DA pro vzorky v dospělém vývojovém stadiu (*A. domesticus*, *G. sigillatus*, *L. migratoria*, *S. gregaria*, *B. dubia*, *S. tartara*) jsou na **Obrázku 3**. Po nastavení VIP skóre ≥ 2 zůstane 57 signifikantních proměnných v ESI+ a 58 v ESI-. V pozitivním módu je patrné, že vzorky cvrčka domácího (*A. domesticus*) a cvrčka banánového (*G. sigillatus*) stále tvoří jeden klastř. V negativním módu se pak od ostatních vzorků oddělují šváb argentinský (*B. dubia*) a šváb turkistánský (*S. tartara*). První dvě hlavní komponenty popisují 55,3 % variability souboru vzorků v ESI+ (PC1 33,9 % a PC2 20,4 %), v ESI- pak 64,4 % (PC1 40,7 % a PC2 23,7 %). Rozpoznávací (R^2X , R^2Y) a predikční (Q^2) schopnost modelů PLS-DA je pak následující: $R^2X = 0,882$; $R^2Y = 0,956$ a $Q^2 = 0,937$ v ESI+ a $R^2X = 0,937$; $R^2Y = 0,960$ a $Q^2 = 0,951$ v ESI-. Pro ověření vhodnosti PLS-DA modelů je provedena křížová validace, kdy byly všechny vzorky klasifikovány správně.



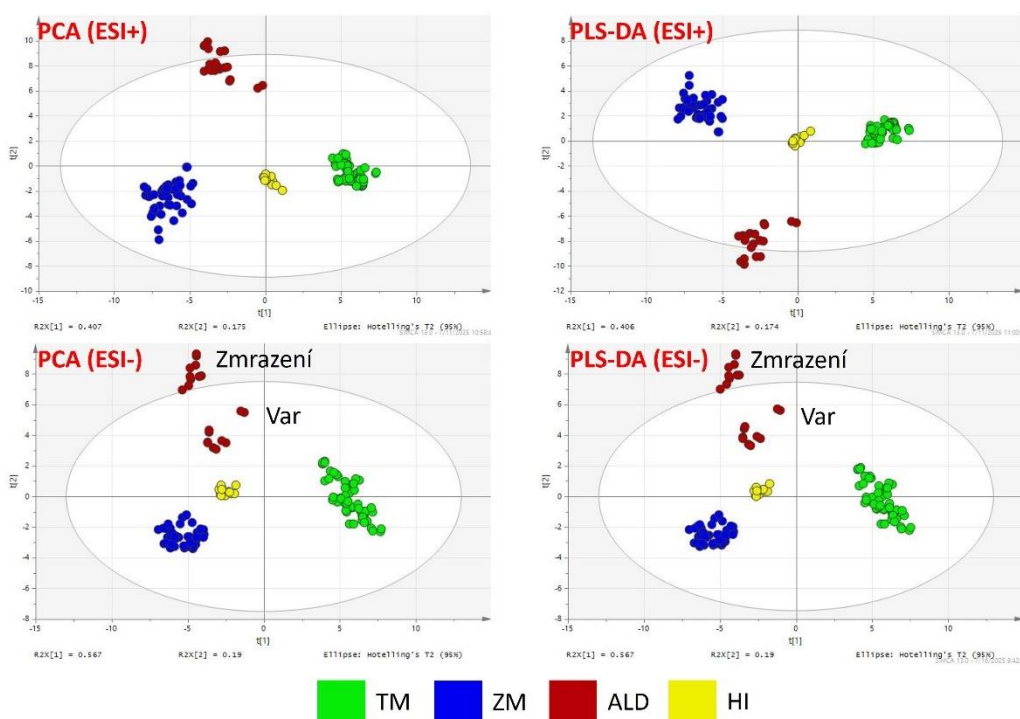
Obrázek 2: Grafy komponentního skóre PCA a PLS-DA modelů při zahrnutí všech vzorků hmyzu v dospělém vývojovém stadiu (*A. domesticus*, *G. sigillatus*, *L. migratoria*, *S. gregaria*, *B. dubia* a *S. tartara*)

Na následujícím **Obrázku 4** je pak možné demonstrovat schopnost modelů rozlišit jednotlivé druhy cvrčka domácího (*A. domesticus*), cvrčka banánového (*G. assimilis*), sarančete stěhovavého (*L. migratoria*) a sarančete všežravého (*S. gregaria*)



Obrázek 3: Grafy komponentního skóre PCA a PLS-DA modelů při zahrnutí všech vzorků cvrčka domácího (*A. domesticus*), cvrčka banánového (*G. sigillatus*), sarančete stěhovavého (*L. migratoria*) a sarančete všežravého (*S. gregaria*)

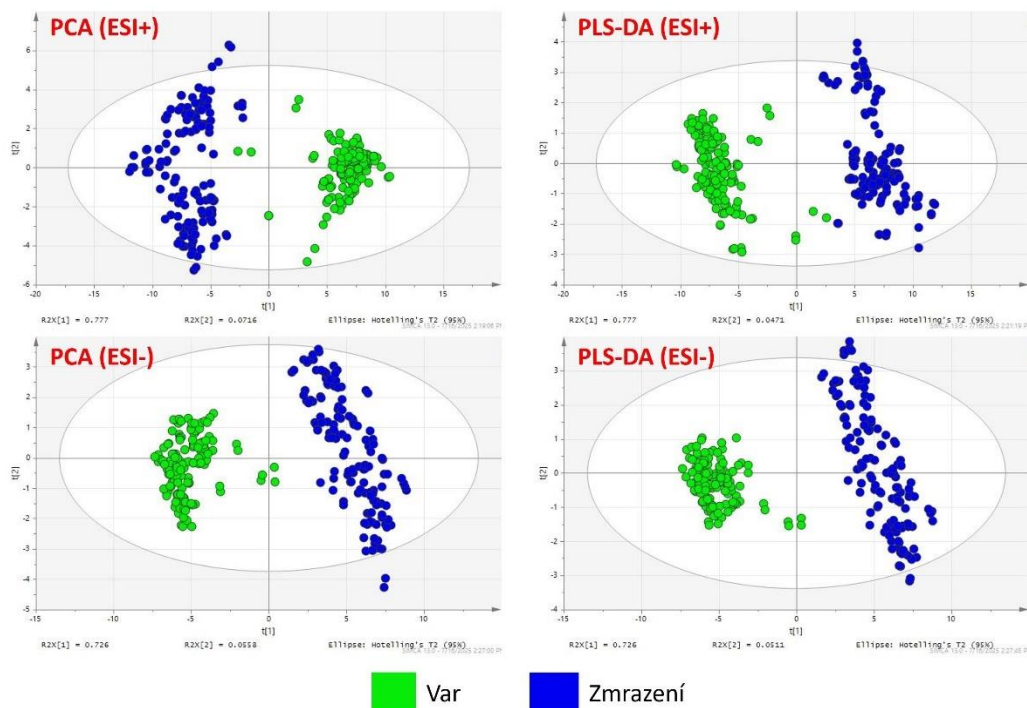
Na **Obrázku 5** jsou pak znázorněny PCA a PLS-DA modely pro vzorky hmyzu v larválním vývojovém stadiu (*T. molitor*, *A. diaperinus*, *Z. morio*, *H. illucens*). Při nastavení VIP skóre ≥ 2 zbyde 96 významných proměnných v ESI+ a 53 v ESI-. Z grafů je na první pohled patrné jasné oddělení jednotlivých druhů. První dvě hlavní komponenty pak popisují 58,2 % variability souboru vzorků (PC1 40,7 % a PC2 17,5 %) v ESI+, v ESI- 75,7 % variability (PC1 56,7 % a PC2 19,0 %). Rozpoznávací (R^2X , R^2Y) a predikční (Q^2) schopnost modelů PLS-DA je následující: $R^2X = 0,810$; $R^2Y = 0,972$ a $Q^2 = 0,967$ pro ESI+ a $R^2X = 0,888$; $R^2Y = 0,956$ a $Q^2 = 0,941$ pro ESI-. Oba PLS-DA modely (ESI+ a ESI-) v rámci křížové validace správně klasifikovaly 100 % vzorků.



Obrázek 4: Grafy komponentního skóre PCA a PLS-DA modelů při zahrnutí všech vzorků hmyzu v larválním vývojovém stadiu (*T. morio*, *A. diaperinus*, *Z. morio* a *H. illucens*)

V dalších vytvořených modelech je navíc možné pozorovat významné rozdělení podle způsobu usmrcení, kdy jsou vzorky rozdělené do dvou skupin dle způsobu usmrcení (zmrazení nebo vaření). Grafy komponentního skóre jsou zobrazeny na **Obrázku 6**. Na první pohled je patrné jasné rozdělení tříd. Varem usmrcené vzorky tvoří těsnější shluky, pravděpodobně kvůli ztrátě některých látek během vaření (vyluhování, degradace během vaření), což snížilo variabilitu mezi varem usmrcenými vzorky. Rozpoznávací (R^2X , R^2Y) a predikční (Q^2) schopnost modelů PLS-DA je následující: $R^2X = 0,864$; $R^2Y = 0,956$ a $Q^2 = 0,948$ pro ESI+ a $R^2X = 0,777$; $R^2Y = 0,962$ a $Q^2 = 0,946$ pro ESI-. V případně ESI+ bylo pomocí křížové

validace PLS-DA modelu správně klasifikováno 99,3 % vzorků, v ESI⁻ pak byly správně klasifikovány všechny vzorky.



Obrázek 5: Grafy komponentního skóre PCA a PLS-DA modelů při zahrnutí všech vzorků hmyzu rozdělených do dvou tříd dle způsobu usmrcení (zmrazení a var)

2.11 Identifikace charakteristických markerů pro účely detekce a rozlišení jednotlivých druhů hmyzu

Proměnné, které byly použity pro tvorbu klasifikačních modelů, jsou podrobeny bližšímu zkoumání, především konfirmaci přiřazených anotací a zhodnocení, zda je jedná o diagnostický marker pro některé skupiny vzorků. Konfirmace byla prováděna na základě přesné hodnoty m/z , izotopového profilu a fragmentačního spektra molekuly. Celkem bylo vybráno 53 potenciálních markerů, které byly zaneseny do první verze interní databáze. Návrh identifikace, naměřené hmoty m/z a retenční čas (RT), navržený sumární vzorec a příslušnost k dané třídě jsou uvedeny v **Příloze 2**. Dále je jednotlivým markerům přiřazena tzv. úroveň identifikace dle studie Schymanski et al. (2014) [2].

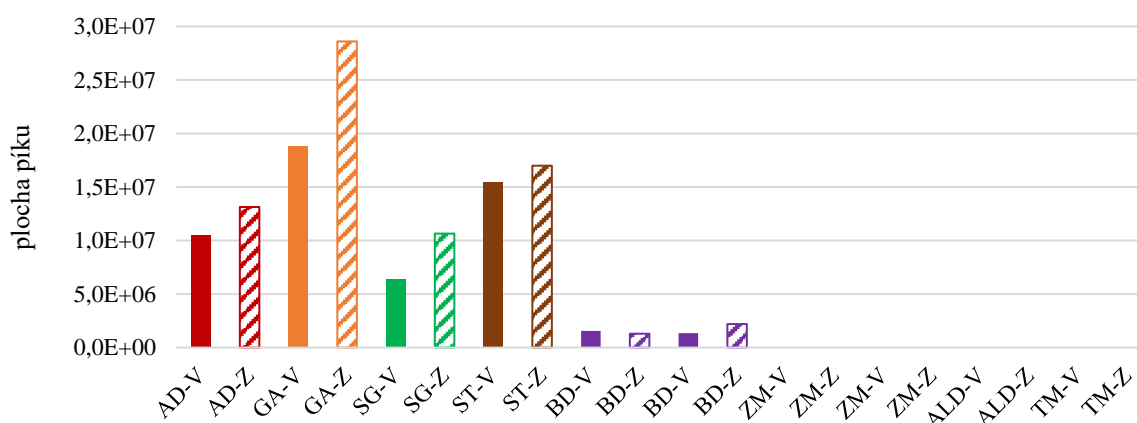
2.12 Cílový screening diagnostických markerů – ověření jejich aplikovatelnosti pro autentikaci reálných vzorků

Po identifikaci charakteristických markerů jednotlivých druhů hmyzu bylo přistoupeno k jejich cílovému screeningu v různých typech vzorků za účelem posouzení jejich citlivosti a specifity. Cílem bylo potvrzení aplikovatelnosti těchto markerů v rutinní kontrolní praxi pro účely autentikace výrobků na bázi hmyzu.

Cílovému screeningu byla podrobena verifikační sada autentických vzorků různých druhů hmyzu ($n = 20$, 6. odběr), vzorky binárních směsí ($n = 140$) připravených smísením dostupných autentických vzorků hmyzu různých druhů v určitých hmotnostních poměrech (5:95, 10:90, 50:50, 90:10, 95:5), výrobků s přídavkem hmyzu ($n = 76$) a výrobků bez hmyzu ($n = 16$). Vzorky s přídavkem jedlého hmyzu zahrnují široké spektrum výrobků dostupných na evropském trhu v letech 2023-2024. Typově se jedná o celý hmyz, hmyzí moučky, chipsy, těstoviny, proteinové tyčinky a nápoje, krekry, čokoládové bonbóny, pomazánky nebo hotové pokrmy původem z 11 evropských zemí (Česká republika, Litva, Finsko, Španělsko, Portugalsko, Nizozemsko, Švýcarsko, Belgie, Dánsko, Francie, Německo) a Vietnamu. Bližší informace ke vzorkům pro cílový screening jsou uvedeny v **Přílohách 3-6**.

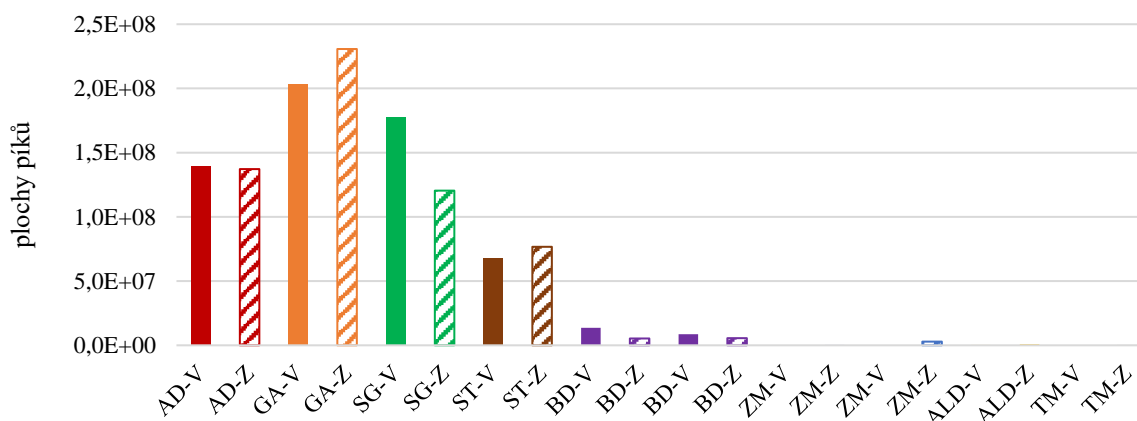
2.12.1 Cílový screening markerů v autentických vzorcích hmyzu

V případě verifikační sady autentických vzorků (**Příloha 3**, 6. odběr) bylo detekováno celkem 37 markerů. Příkladem potvrzených markerů jsou dopamin 3-O-sulfát a methyl O-sulfo-L-tyrosinát (**Obrázek 6-7**), které jsou markery hmyzu v dospělém vývojovém stádiu (tj. dokážeme pomocí nich rozlišit dospělé od hmyzu v larválním vývoji). Zmíněný dopamin-3-O-sulfát je detekován ve všech vzorcích dospělců (*A. domesticus*, *G. assimilis*, *S. gregaria*, *S. tartara* a *B. dubia*) a vyhovuje tedy hypotéze.



Obrázek 6: Zastoupení dopaminu 3-O-sulfátu ($m/z = 232,0285$, $RT = 1,33$ min; $[M-H]^-$) v autentických vzorcích hmyzu (6. odběr). Jedná se o vzorky cvrčka domácího (*A. domesticus*, AD), cvrčka banánového (*G. assimilis*, GA), saranče všežravé (*S. gregaria*, SG), švába turkistánského (*S. tartara*, ST), švába argentinského (*B. dubia*, BD), potemníka brazilského (*Z. morio*, ZM), potemníka stájového (*A. diaperinus*, ALD) a potemníka moučného (*T. molitor*, TM) usmrcené varem (plné sloupce) nebo zmrazením (šrafované sloupce)

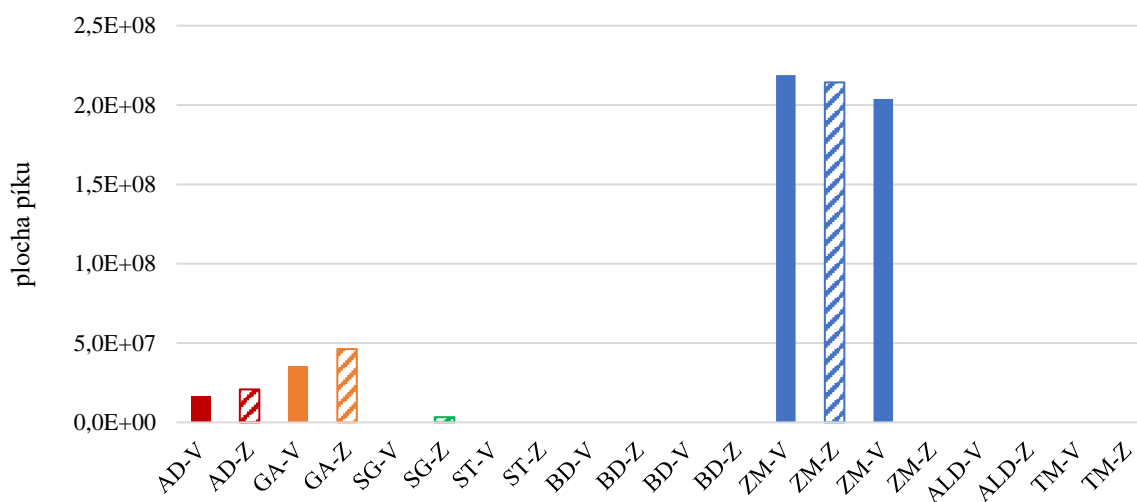
Další marker, který vyhovuje této hypotéze, je methyl O-sulfo-L-tyrosinát. Tento marker je detekován ve všech vzorcích dospělců (*A. domesticus*, *G. assimilis*, *S. gregaria*, *S. tartara* a *B. dubia*) na vysokých hladinách, v ostatních případech je detekován na velmi nízkých hladinách.



Obrázek 7: Zastoupení methyl O-sulfo-L-tyrosinátu ($m/z = 274,0391$, $RT = 3,13$ min; $[M-H]^-$) v autentických vzorcích hmyzu (6. odběr). Jedná se o vzorky cvrčka domácího (*A. domesticus*, AD), cvrčka banánového (*G. assimilis*, GA), saranče všežravé (*S. gregaria*, SG), švába turkistánského (*S. tartara*, ST), švába argentinského (*B. dubia*, BD), potemníka brazilského (*Z. morio*, ZM), potemníka stájového (*A. diaperinus*, ALD) a potemníka moučného (*T. molitor*, TM) usmrcené varem (plné sloupce) nebo zmrazením (šrafované sloupce)

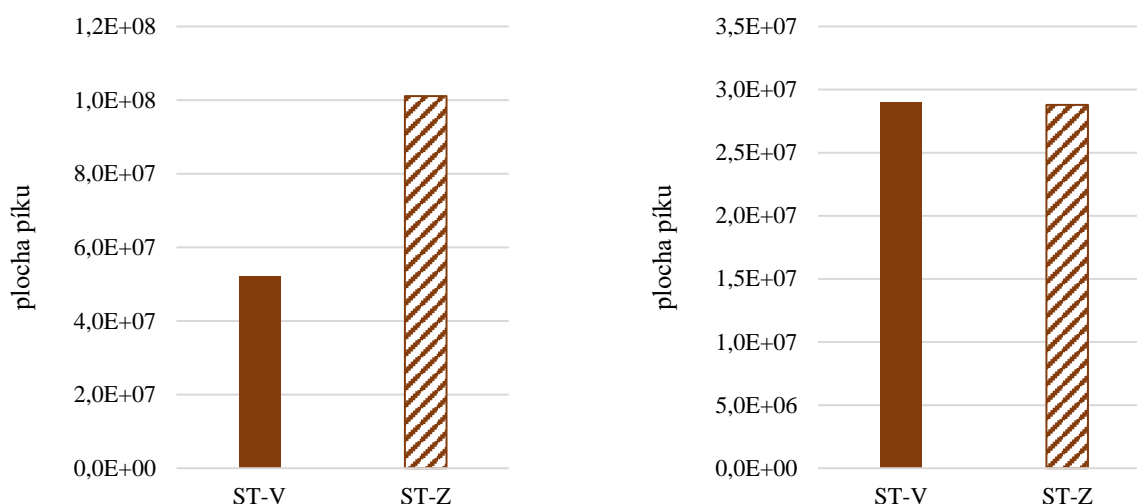
Kombinací guajakol sulfátu ($m/z = 203,0020$, $RT = 3,47$ min; $[M-H]^-$), který je markerem cvrčka domácího (*A. domesticus*), cvrčka banánového (*G. assimilis*) a potemníka brazilského (*Z. morio*), a jiného markeru je možné rozlišit vzorky potemníka brazilského (*Z. morio*) od ostatních druhů hmyzu v larválním vývojovém stádiu. Vhodným kandidátem se jeví některý

z markerů dospělců, například dopamin-3-O-sulfát. Z **Obrázku 8** je pak patrné, že je přítomný u všech autentických vzorků cvrčka domácího (*A. domesticus*), cvrčka banánového (*G. assimilis*) a potemníka brazilského (*Z. morio*) kromě jednoho vzorku potemníků usmrčeného mrazem.



Obrázek 8: Zastoupení guajakol sulfátu ($m/z = 203,0020$, $RT = 3,47$ min; $[M-H]^-$) v autentických vzorcích hmyzu (6. odběr). Jedná se o vzorky cvrčka domácího (*A. domesticus*, AD), cvrčka banánového (*G. assimilis*, GA), saranče všežravé (*S. gregaria*, SG), švába turkistánského (*S. tartara*, ST), švába argentinského (*B. dubia*, BD), potemníka brazilského (*Z. morio*, ZM), potemníka stájového (*A. diaperinus*, ALD) a potemníka moučného (*T. molitor*, TM) usmrčené varem (plné sloupce) nebo zmrazením (šrafované sloupce)

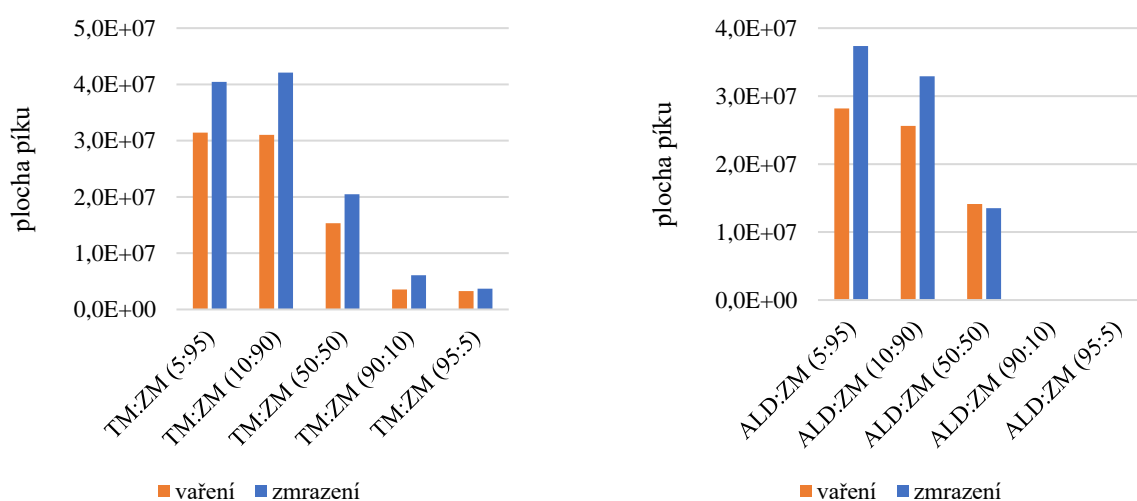
Příkladem markerů, které jsou diagnostické pouze pro jediný druh, v tomto případě pro švába turkistánského (*S. tartara*), jsou 2-hydroxyhippurová kyselina ($m/z = 194,0457$, $RT = 4,52$ min; $[M-H]^-$) a methyllithocholát ($m/z = 413,3023$, $RT = 8,37$ min, $[M+H]^+$). Oba markery jsou detekované pouze ve vzorcích švába turkistánského (*S. tartara*).



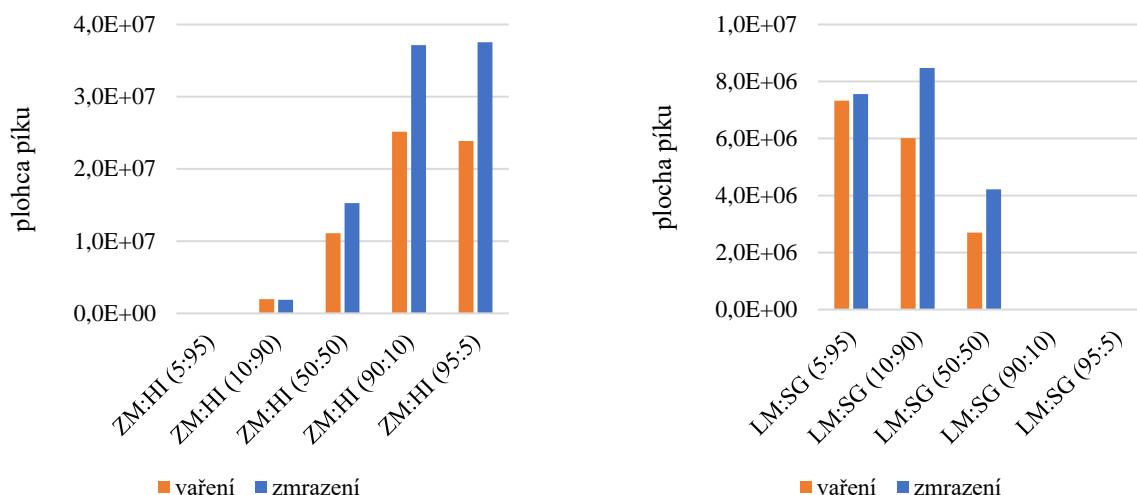
Obrázek 9: Zastoupení 2-hydroxyhippurové kyseliny ($m/z = 194,0457$, $RT = 4,52$ min; $[M-H]^-$) a methyllithocholátu ($m/z = 413,3023$, $RT = 8,37$ min, $[M+H]^+$) v autentických vzorcích hmyzu (6. odběr). Jedná se o vzorky švába turkistánského (*S. tartara*, ST) usmrcené varem (plné sloupce) nebo zmrazením (šrafované sloupce)

2.12.2 Cílový screening markerů v binárních směsích autentických druhů hmyzu

V případě binárních směsí (**Příloha 5**) bylo detekováno 39 markerů. Jedním z příkladů funkčních markerů může být marker se sumárním vzorcem $C_8H_{20}N_2$, který je charakteristický pro potměníka brazilského (*Z. morio*) a saranče všežravé (*S. gregaria*). Marker byl detekován ve čtyřech směsích (TM:ZM, ALD:ZM, ZM:HI a LM:SG), kdy jeho obsah roste s rostoucím podílem daného druhu – potměník brazilský (*Z. morio*) nebo saranče všežravé (*S. gregaria*; **Obrázek 10 a 11**). Ve směsi TM:ZM je detekovatelný již při 5% přídavku ZM, ve směsi ALD:ZM od 50 % ZM, ve směsi ZM:HI od 10 % ZM a ve směsi LM:SG od 50 % SG.

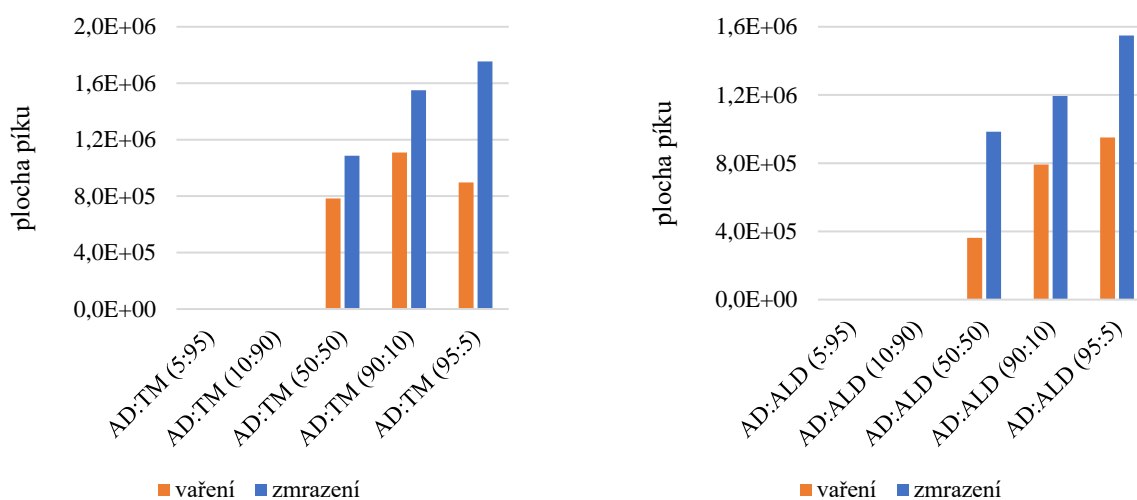


Obrázek 10: Zastoupení markeru $C_8H_{20}N_2$ ($m/z = 145,1698$, $RT = 0,59$ min; $[M+H]^+$) ve směsi TM:ZM (vlevo) a ALD:ZM (vpravo). Směsi jsou smíchány v hmotnostních poměrech

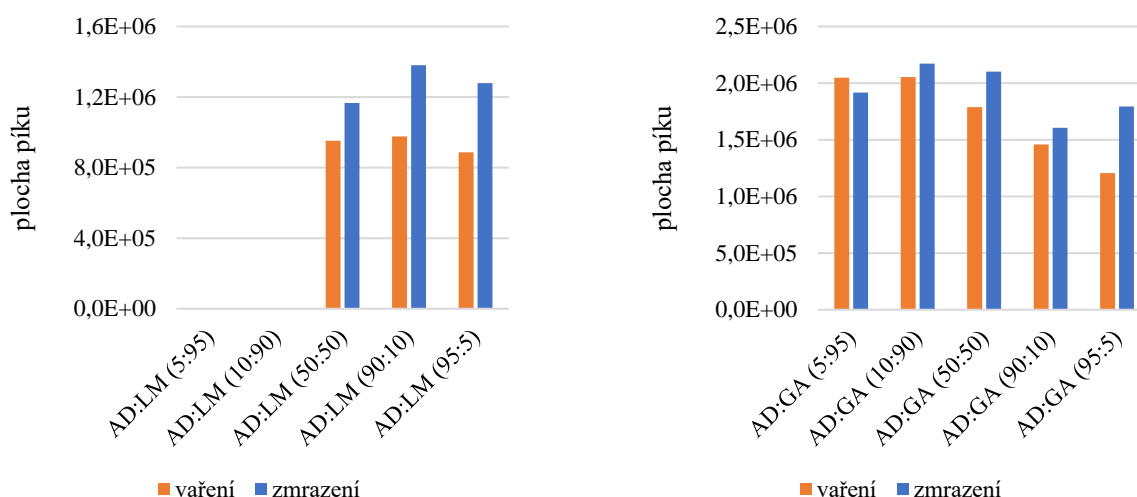


Obrázek 11: Zastoupení markeru $C_8H_{20}N_2$ ($m/z = 145,1698$, $RT = 0,59$ min; $[M+H]^+$) ve směsi ZM:HI (vlevo) a LM:SG (vpravo). Směsi jsou smíchány v hmotnostních poměrech

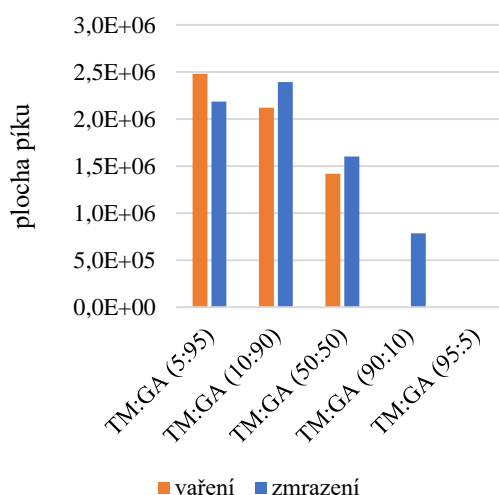
Dalším příkladem může být marker $C_7H_8O_4S$ ($m/z = 187,0070$, $RT = 4,14$ min; $[M-H]^-$), který je diagnostický pro cvrčka domácího (*A. domesticus*) a cvrčka banánového (*G. assimilis*) a dokážeme tak rozlišit tyto druhy od ostatních druhů dospělců (*L. migratoria*, *S. gregaria*, *B. dubia* a *S. tartara*). Zmíněný marker je zjištěn ve všech směsích (Obrázek 12-14), ve kterých byl alespoň jeden z uvedených druhů – celkem 5 směsí (AD:TM, AD:ALD, AD:LM, AD:GA, TM:GA). U všech směsí kromě AD:LM a AD:GA je pak patrný rostoucí trend s rostoucím zastoupením jednoho z cvrčků. Ve třech směsích (AD:TM, AD:ALD a AD:LM) je detekovatelný od 50 % AD, ve směsi AD:GA je detekovaný ve všech případech, ale není zřejmý žádný trend, a ve směsi TM:GA je zjištěný od 10 % (hmyz usmrcený varem) a 50 % (hmyz usmrcený zmrazením) GA.



Obrázek 12: Zastoupení markeru $C_7H_8O_4S$ ($m/z = 187,0070$, $RT = 4,14$ min; $[M-H]^-$) ve směsi AD:TM (vlevo) a AD:ALD (vpravo). Směsi jsou smíchány v hmotnostních poměrech



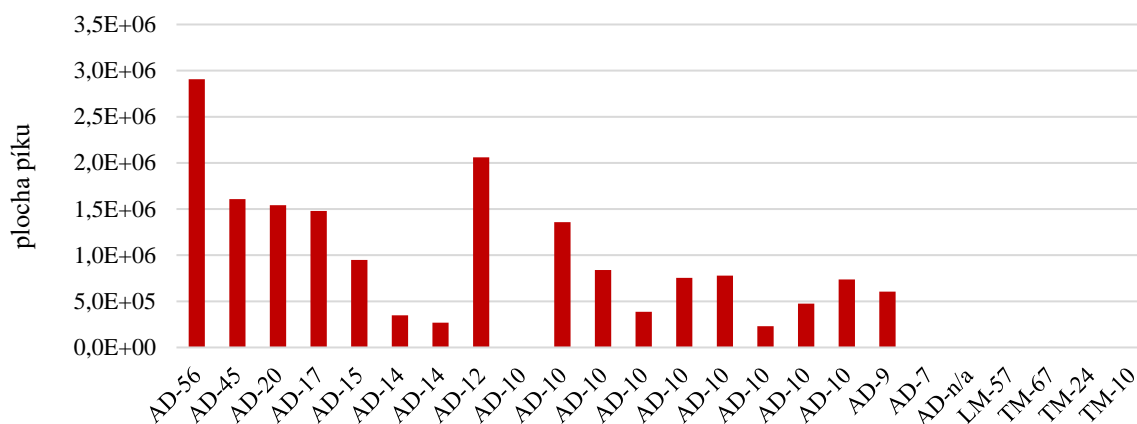
Obrázek 13: Zastoupení markeru $C_7H_8O_4S$ ($m/z = 187,0070$, $RT = 4,14$ min; $[M-H]^-$) ve směsi AD:LM (vlevo) a AD:GA (vpravo). Směsi jsou smíchány v hmotnostních poměrech



Obrázek 14: Zastoupení markeru $C_7H_8O_4S$ ($m/z = 187,0070$, $RT = 4,14$ min; $[M-H]^-$) ve směsi TM:GA. Směsi jsou smíchány v hmotnostních poměrech

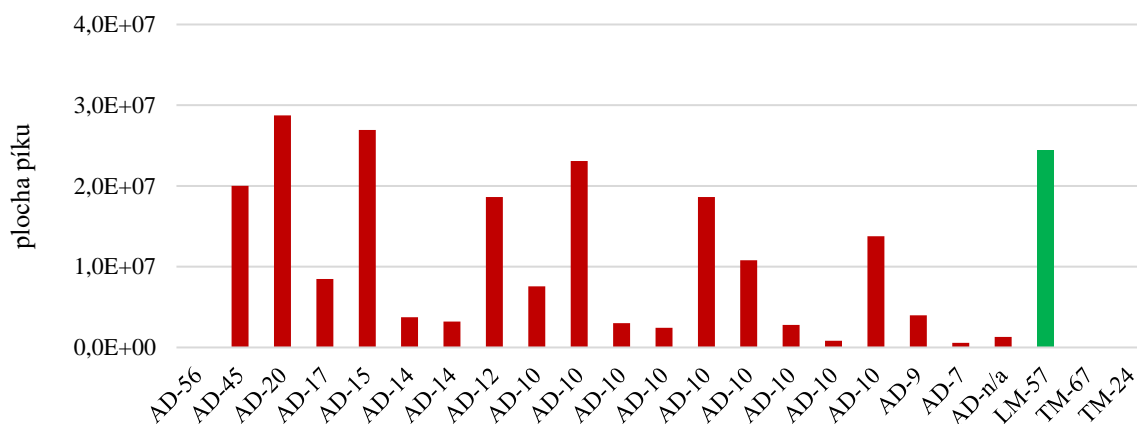
2.12.3 Cílový screening markerů ve výrobcích obsahující hmyz

V první sadě výrobků (**Příloha 5**) bylo detekováno 23 markerů, v druhé sadě výrobků (**Příloha 6**) pak 24 markerů. Příkladem markeru, který byl detekován ve všech vzorcích obsahující cvrčka domácího (*A. domesticus*) kromě výrobků s nižším obsahem cvrččí moučky (*A. domesticus*), je dopamin 3-O-sulfát. Tento marker nebyl detekován ve vzorku tapenády (14 %), proteinové snídaně (10 %), čokoládě (8 %), granole a chipsech (7 %), tyčinkách (5 %), chilli con carne (0,9 %) a belgickém výrobku „cricket spoon“, který neměl deklarovaného množství cvrččí moučky (**Obrázek 15**).



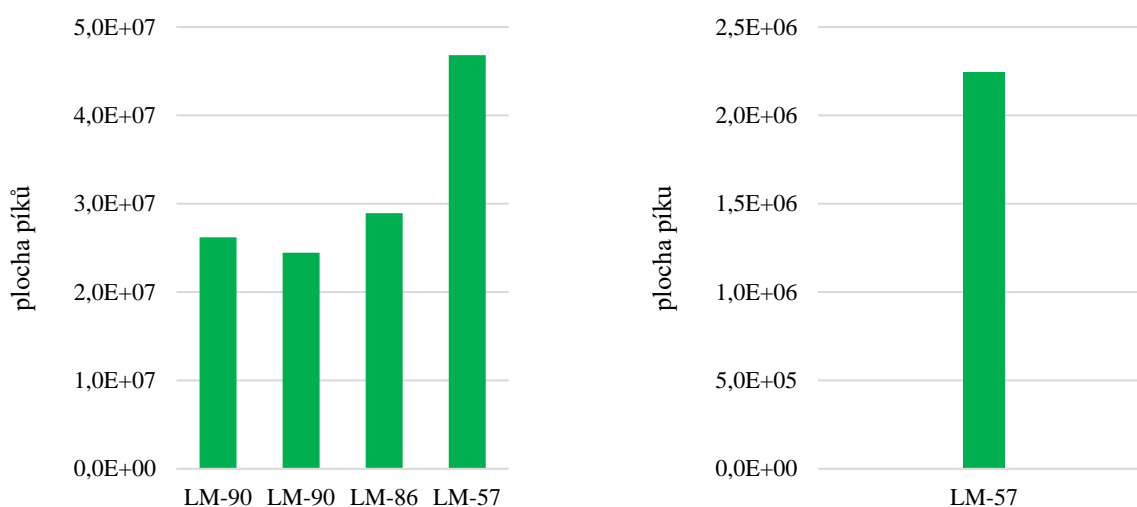
Obrázek 16: Zastoupení dopaminu 3-O-sulfátu ($m/z = 232,0285$, $RT = 1,33$ min; $[M-H]^-$) v druhé sadě výrobků. Výrobky obsahují cvrčka domácího (*A. domesticus*, AD), saranče stěhovavé (*L. migratoria*, LM) a potměníka moučného (*T. molitor*, TM). U každého vzorku je uveden deklarovaný obsah hmyzu (např. AD-100), v jednom případě nebylo množství přidaného hmyzu deklarováno (AD-n/a)

Dalším markerem hmyzu v dospělém vývojovém stadiu je Methyl O-sulfo-L-tyrosinát je detekován především ve vzorcích obsahující cvrčka domácího (*A. domesticus*), cvrčka krátkokřídlého (*G. sigillatus*) a saranče stěhovavé (*L. migratoria*). V ojedinělých případech je detekován i ve vzorcích výrobků s přídavkem moučky potměníka moučného (*T. molitor*) a potměníka stájového (*A. diaperinus*), nicméně na výrazně nižších hladinách než ve vzorcích hmyzu v dospělém vývojovém stadiu a výrobků s přídavkem alespoň 10 % cvrččí moučky (*A. domesticus*). Methyl O-sulfo-L-tyrosinát nebyl detekován ve vzorku čokolády (8 % cvrččí moučky) a chilli con carne (0,9 % cvrččí moučky).



Obrázek 18: Zastoupení methyl O-sulfo-L-tyrosinátu ($m/z = 274,0391$, $RT = 3,13$ min; $[M-H]^-$) v druhé sadě výrobků. Výrobky obsahují cvrčka domácího (*A. domesticus*, AD), saranče stěhovavé (*L. migratoria*, LM) a potemníka moučného (*T. molitor*, TM). U každého vzorku je uveden deklarovaný obsah hmyzu (např. AD-100), v jednom případě nebylo množství přidaného hmyzu deklarováno (AD-n/a)

Čistě specifickým markerem pro saranče stěhovavé (*L. migratoria*) je ninhydrin ($m/z = 179,0338$, $RT = 4,26$ min; $[M+H]^+$), který je detekovaný pouze ve vzorcích výrobků obsahující tento druh sarančete. Dokážeme tak rozlišit výrobky obsahující tento druh sarančete od ostatních výrobků obsahující jedlý hmyz.



Obrázek 19: Zastoupení ninhydrinu ($m/z = 179,0338$, $RT = 4,26$ min; $[M+H]^+$) v první sadě výrobků (vlevo) a druhé sadě vzorků (vpravo). Vzorky obsahovaly saranče stěhovavé (*L. migratoria*, LM)

Detailnější přehled o spolehlivosti identifikovaných markerů na základě necílených přístupů je k dispozici v **Příloze 7-10**. Spolehlivost markerů je založena na základě studie Baratloo et. al (2015), kdy se statisticky vyhodnotí tzn. citlivost, specifita a přesnost pro daný marker. Citlivost odráží schopnost markeru odhalit skutečně pozitivní případy (schopnost správně určit vzorky obsahující hmyz), specifita odráží schopnost markeru vyhnout se falešně pozitivním nálezům (schopnost určit vzorky neobsahující hmyz) a přesnost pak vyjadřuje

celkovou úspěšnost (schopnost správně rozlišit vzorky obsahující hmyz a vzorky neobsahující hmyz). Výše popsané charakteristiky jsou vypočteny podle **Rovnice 2.1-2.3** [3,4].

$$\text{citlivost} = \frac{SP}{SP + FN} \quad (2.1)$$

$$\text{specifita} = \frac{SN}{SN + FP} \quad (2.2)$$

$$\text{přesnost} = \frac{SP + SN}{SP + SN + FP + FN} \quad (2.3)$$

SP = skutečně pozitivní, FP = falešně pozitivní, FN = falešně negativní, SN = skutečně negativní

2.13 Diagnostické markery hmyzu vhodné pro autentikaci

Na základě vypočtených charakteristik (citlivost, specifita a přesnost) jsou vybrány markery, které jsou vhodné pro autentikaci hmyzu a výrobků na bázi jedlého hmyzu. Pro autentické vzorky byla nastavena hraniční hodnota přesnosti markeru 95 % (zachováno 19 markerů), pro binární směsi 90 % (zachováno 18 markerů) a pro výrobky 80 % (zachováno 26 markerů v obou sadách výrobků). V případě binárních směsí a výrobků volíme nižší prahovou hodnotu z důvodu různého obsahu hmyzu, pro které jsou markery diagnostické, a různorodosti analyzovaných výrobků.

Tabulka 5: Vybrané diagnostické markery hmyzu a způsobu usmrcení (prahová hodnota 95 %) ze sady markerů testovaných na verifikační sadě autentických vzorků hmyzu

Marker	Adukt	Třída	Přesnost	Úroveň identifikace
2-hydroxyhippurová kyselina	[M-H] ⁻	ST	100 %	2
4-fenolsulfonová kyselina	[M-H] ⁻	SG, AD, ZM, GA, LM, ALD, ST	100 %	2
6-methoxymellein	[M-H] ⁻	ST	100 %	2
cyklický 4',5'-fosfát riboflavinu	[M-H] ⁻	vaření	98 %	2
kyselina laurová	[M-H] ⁻	HI (zmrazení)	100 %	2
methyllithocholát	[M+H] ⁺	ST	100 %	2
ninhydrin	[M+H] ⁺	LM	100 %	2
prostaglandin D2 ethanolamid	[M+H] ⁺	AD, GA (vaření)	100 %	2
sinapinová kyselina	[M-H] ⁻	ST	100 %	2
sinapoylglukosa	[M+FA-H] ⁻	ST	100 %	2
tyrosine-O-sulfát	[M+H] ⁺	AD, GA	100 %	2

Tabulka 5 – pokračování

Marker	Adukt	Třída	Přesnost	Úroveň identifikace
xanthosin	[M+H] ⁺	GA	98 %	2
xanturenová kyselina 8-O-sulfát	[M-H] ⁻	AD, ALD, GA, TM	95 %	2
hexosa	[M+H] ⁺	zmrazení	100 %	3
C ₁₇ H ₃₄ O ₁₀ S ₂	[M-2H] ⁻²	SG, LM	100 %	4
C ₂₈ H ₅₄ N ₂ O ₆ S ₂	[M-H] ⁻	SG, LM (zmrazení)	100 %	4
C ₇ H ₈ O ₄ S	[M-H] ⁻	GA, AD	100 %	4
1.543_392.17918	[M+H] ⁺	HI	100 %	5
2.186_352.04479	[M-H] ⁻	ST	100 %	5

Tabulka 6: Vybrané diagnostické markery hmyzu a způsobu usmrcení (prahová hodnota 90 %) ze sady markerů testovaných na binárních směsích autentických vzorků hmyzu

Marker	Adukt	Třída	Přesnost	Úroveň identifikace
2-hydroxyhippurová kyselina	[M-H] ⁻	ST	100 %	2
6-methoxymellein	[M-H] ⁻	ST	93 %	2
dopamine-3-O-sulfát	[M-H] ⁻	AD, GA, SG, ST, BD, LM	94 %	2
laurová kyselina	[M-H] ⁻	HI (zmrazení)	99 %	2
methyl O-sulfo-L-tyrosinát	[M-H] ⁻	AD, GA, LM, SG, ST	99 %	2
methyllithocholát	[M+H] ⁺	ST	97 %	2
ninhydrin	[M+H] ⁺	LM	98 %	2
oleoylglycin	[M-H] ⁻	zmrazení	100 %	2
sinapinová kyselina	[M-H] ⁻	ST	97 %	2
sinapoylglukosa	[M+FA-H] ⁻	ST	100 %	2
sukcinyladenoin	[M-H] ⁻	zmrazení	99 %	2
tyrosine-O-sulfát	[M+H] ⁺	AD, GA	100 %	2
xanthopterin (1.3 min)	[M+H] ⁺	LM, SG	92 %	2
xanthosin	[M+H] ⁺	GA	93 %	2
C ₁₇ H ₃₄ O ₁₀ S ₂	[M-2H] ⁻²	SG, LM	91 %	4
C ₃₉ H ₅₉ N ₃ O ₁₅	[M-H] ⁻	SG	93 %	4
C ₈ H ₂₀ N ₂	[M+H] ⁺	ZM, SG	90 %	4
2.19_351.0391	[M-H] ⁻	ST	98 %	5

Tabulka 7: Vybrané diagnostické markery hmyzu a způsobu usmrcení (prahová hodnota 80 %) ze sady markerů testovaných na první sadě výrobků

Marker	Adukt	Třída	Přesnost	Úroveň identifikace
2-hydroxyhippurová kyselina	[M-H] ⁻	ST	100 %	2
2-methyl-7H-purin-6-ol	[M+H] ⁺	TM	100 %	2
3-karboxyindole	[M-H] ⁻	LM, SG, GA, AD, ST, TM	89 %	2
6-methoxymellein	[M-H] ⁻	ST	100 %	2
choline-O-sulfát	[M+H] ⁺	TM, ST, BD, HI, LM	81 %	2
laurová kyselina	[M-H] ⁻	HI (zmrazení)	100 %	2
methyl 2,3-dimethoxy-5-sulfamoylbenzoát	[M-H] ⁻	ALD, LM, ST	91 %	2
methyl O-sulfo-L-tyrosinát	[M-H] ⁻	AD, GA, LM, SG, ST	85 %	2
methyllinderon	[M+H] ⁺	HI	100 %	2
methyllithocholát	[M+H] ⁺	ST	100 %	2
N6-kapryloyllysine	[M+H] ⁺	ZM (zmrazení)	100 %	2
ninhydrin	[M+H] ⁺	LM	99 %	2
palmitoylarginin	[M-H] ⁻	ALD, GA, AD (zmrazení)	100 %	2
sinapinová kyselina	[M-H] ⁻	ST	100 %	2
sinapoylglukosa	[M+FA-H] ⁻	ST	100 %	2
tyrosine-O-sulfát	[M+H] ⁺	AD, GA	90 %	2
xanthopterin (1.3 min)	[M+H] ⁺	LM, SG	94 %	2
C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₉	[M+H] ⁺	HI	100 %	4
C ₁₇ H ₃₄ O ₁₀ S ₂	[M-2H] ⁻²	SG, LM	98 %	4
C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	[M-H] ⁻	LM, SG, BD, ST, TM, ZM, HI	81 %	4
C ₂₈ H ₅₄ N ₂ O ₆ S ₂	[M-H] ⁻	SG, LM (zmrazení)	94 %	4
C ₃₉ H ₅₉ N ₃ O ₁₅	[M-H] ⁻	SG	100 %	4
C ₄₄ H ₇₇ N ₈ O ₁₆ P	[M-H] ⁻	TM, ZM, BD	87 %	4
C ₈ H ₂₀ N ₂	[M+H] ⁺	ZM, SG	96 %	4
2.19_351.0391	[M-H] ⁻	ST	100 %	5
2.51_367.0341	[M-H] ⁻	TM, LM	81 %	5

Tabulka 8: Vybrané diagnostické markery hmyzu a způsobu usmrcení (prahová hodnota 80 %) ze sady markerů testovaných na druhé sadě výrobků

Marker	Adukt	Třída	Přesnost	Úroveň identifikace
2-hydroxyhippurová kyselina	[M-H] ⁻	ST	100 %	2
2-methyl-7H-purin-6-ol	[M+H] ⁺	TM	92 %	2
3-karboxyindole	[M-H] ⁻	LM, SG, GA, AD, ST, TM	83 %	2
4-fenolsulfonová kyselina	[M-H] ⁻	SG, AD, ZM, GA, LM, ALD, ST	93 %	2
6-methoxymellein	[M-H] ⁻	ST	100 %	2
dopamine-3-O-sulfát	[M-H] ⁻	AD, GA, SG, ST, BD, LM	83 %	2
choline-O-sulfát	[M+H] ⁺	TM, ST, BD, HI, LM	92 %	2
laurová kyselina	[M-H] ⁻	HI (zmrazení)	100 %	2
methyl 2,3-dimethoxy-5-sulfamoylbenzoát	[M-H] ⁻	ALD, LM, ST	96 %	2
methyl O-sulfo-L-tyrosinát	M-H-	AD, GA, LM, SG, ST	100 %	2
methyllinderon	[M+H] ⁺	HI	100 %	2
methyllithocholát	[M+H] ⁺	ST	100 %	2
ninhydrin	[M+H] ⁺	LM	100 %	2
sinapinová kyselina	[M-H] ⁻	ST	100 %	2
sinapoylglukosa	[M+FA-H] ⁻	ST	100 %	2
taurin	[M+H] ⁺	AD, GA, LM, ALD, SG, ST, TM	90 %	2
tyrosine-O-sulfát	[M+H] ⁺	AD, GA	83 %	2
xanthopterin (1.3 min)	[M+H] ⁺	LM, SG	96 %	2
C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₉	[M+H] ⁺	HI	100 %	4
C ₁₇ H ₃₄ O ₁₀ S ₂	[M-2H] ⁻²	SG, LM	96 %	4
C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	[M-H] ⁻	LM, SG, BD, ST, TM, ZM, HI	83 %	4
C ₃₉ H ₅₉ N ₃ O ₁₅	[M-H] ⁻	SG	100 %	4
C ₄₄ H ₇₇ N ₈ O ₁₆ P	[M-H] ⁻	TM, ZM, BD	88 %	4
C ₈ H ₂₀ N ₂	[M+H] ⁺	ZM, SG	92 %	4
2.19_351.0391	[M-H] ⁻	ST	100 %	5
2.51_367.0341	[M-H] ⁻	TM, LM	88 %	5

2.14 Pracovní charakteristiky metody

Všechny klasifikační modely (PCA, PLS-DA) byly validovány pomocí křížové validace a jsou charakterizovány rozpoznávací (R^2X , R^2Y) a predikční (Q^2Y) schopností modelů. Dosažené hodnoty R^2X , R^2Y a Q^2 jsou uvedeny a komentovány u jednotlivých modelů. Za validní model je považován takový, jehož hodnota Q^2 nabývá alespoň hodnoty 0,5.

Pro posouzení stability a opakovatelnosti měření byl využit vzorek kontroly kvality (QC), který byl nastříknut před začátkem sekvence v 10 opakováních, na konci sekvence v 2 opakováních a dále byl nastříkovan v pravidelných odstupech každých 10 vzorků v průběhu celé sekvence. Jedním z prvních kritérií při filtraci proměnných byla použita relativní směrodatná odchylka (RSD) proměnných v QC vzorcích z celé sekvence, čímž byly odstraněny nekonzistentní proměnné (zachovány byly proměnné s $RSD < 30 \%$).

Výběr signifikantních proměnných, které tvoří klasifikační modely, je zaručen díky zmíněné filtraci na základě RSD proměnných v QC vzorcích a dále použitím kombinace jednorozměrných a vícerozměrných statistických metod (ANOVA s navazujícím Fisher's Least Significant Difference (LSD) post-hoc testem). Zúžení počtu významných proměnných docílíme zvolením vhodné prahové hodnoty VIP skóre tak, aby výsledný počet proměnných nepřesáhl 100.

Aplikovatelnost identifikovaných markerů je ověřena cílovým screeningem diagnostických markerů v celé řadě vzorků – autentických vzorcích ($n = 20$), binárních směsí ($n = 140$) vytvořených smísením autentických vzorků v pěti různých hmotnostních poměrech (5:95, 10:90, 50:50, 90:10, 95:5) a výrobcích obsahující hmyz ($n = 52$) a bez hmyzu ($n = 16$), které jsou dostupné na evropském trhu. Cílovým screeningem bylo ověřeno, zda dokážeme pomocí kombinace markerů rozlišit binární směsi podobných druhů (např. dva druhy potěmníků) a zjištění detektability jednotlivých markerů ve složitějších maticích (výrobky s různým obsahem hmyzu).

3 Srovnání novosti postupů

Předkládaná metodika vychází z metabolomické analýzy, resp. strategie metabolomického fingerprintingu, tedy využití necílové analýzy, která umožňuje provést rychlé vyšetření vzorků pro autentikaci druhu, případně způsobu usmrcení hmyzu. Vyvinutá metodika přináší nový způsob analýzy celkového metabolomu hmyzu a potravin s přídavkem hmyzu, s využitím ultra-účinné kapalinové chromatografie spojené s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií (U-HPLC-HRMS/MS). Tento přístup je zcela unikátní a nebyl pro autentikaci hmyzích produktů doposud publikován.

Jedinečnost a originalita řešení spočívá zejména ve vytvoření klasifikačních modelů různých druhů hmyzu a MS² databáze markerů hmyzu, případně i způsobu usmrcení, které mohou být použité k ověření jejich autenticity pomocí cílového screeningu. Opakované odběry hmyzu v různých letech, různá místa odchovu a různé podmínky během chovu umožnily podchycení variability metabolomu v rámci jednotlivých druhů a původu. Předností cílového screeningu navazujícího na necílené přístupy metodou U-HPLC-HRMS/MS je rychlé vyšetření vzorků pro autentikaci druhu, případně způsobu usmrcení hmyzu. Metoda poskytuje spolehlivou kvalitativní informaci s potenciálem dalšího vývoje cílových analytických metod. Pomocí ověřených markerů je možné ověřit autenticitu jednodruhových výrobků (celý hmyz, hmyzí moučka), výrobků s komplexnější matricí (výrobky s různým přídavkem hmyzu) či binárních směsí hmyzu a odhalit tak případné falšování. V dostupné odborné literatuře jsme dosud nenašli publikaci týkající se laboratorního vyšetření autenticity jedlého hmyzu či výrobků obsahující jedlý hmyz využívající tento přístup.

4 Popis uplatnění metodiky

Parametry a pracovní charakteristiky uvedené analytické metody, která je založená na principu U-HPLC-HRMS/MS, jsou vhodné pro získání relativně rychlé kvalitativní informace o autenticitě jedlého hmyzu a výrobků z něj, tj. ověření deklarovaného druhu hmyzu.

Metodika byla vyvinuta v rámci řešení projektu **QK23020101 „Komplexní laboratorní strategie pro identifikaci druhů hmyzu určeného k lidské spotřebě a produkci zpracované živočišné bílkoviny, autentikace potravin na jeho bázi“**. Aplikace metody navržené v rámci tohoto projektu významně přispěje k posuzování autenticity jedlého hmyzu a výrobků na jeho bázi uváděných na společný evropský trh.

Metodika je určena zejména pro laboratoře úřední kontroly potravin a zemědělských produktů, vědeckovýzkumné organizace nebo privátní kontrolní laboratoře zabývající se prokazováním autenticity produktů, v obecném pojetí je pak metodika využitelná širokou odbornou veřejností. Mohou ji využít zejména instituce jako Státní veterinární ústav (SVÚ) nebo Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) či komerční laboratoře.

5 Ekonomické aspekty

Ekonomicky významným přínosem je zvýšení účinnosti a spolehlivosti kontroly jedlého hmyzu a výrobků obsahující jedlý hmyz za účelem dodržení nařízení EP a Rady (EU) č. 2015/2283, nařízení Komise (EU) č. 142/2011 a přílohy k nařízení Komise (EU) č. 2017/2470, které definují jedlý hmyz jako novou potravinu a uvádí, které druhy patří mezi nové potraviny a které mezi krmivo pro hospodářská zvířata. Dalším přínosem je zvýšení důvěry veřejnosti k informacím o potravinách uváděných na český trh. To pak má nepochybně velký význam pro podporu českých producentů jedlého hmyzu, respektive zvýšení jejich konkurenceschopnosti. Ekonomické přínosy očekávané v této oblasti však nelze přesně kvantifikovat.

Jednou z výhod výše popsané metodiky analýzy jedlého hmyzu a výrobků z něj pro účely získání komplexních informací o jejich metabolomu je využití ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (U-HPLC), která má oproti konvenční HPLC vyšší separační potenciál, umožňuje významné zkrácení doby analýzy, ale i snížení spotřeby rozpouštědel. To je podstatné nejen pro snížení nákladů na rozpouštědla, ale také z hlediska ochrany životního prostředí. Samotná příprava vzorků je zde jednoduchá, rychlá a levná.

Při hodnocení ekonomických aspektů vycházíme z předpokladu, že laboratoř, která chce uvedenou metodu zavést, již má zkušenosti s analýzou v systémech U-HPLC-HRMS/MS a disponuje ultra-vysokoúčinným kapalinovým chromatogramem s vysokorozlišovacím tandemovým hmotnostním spektrometrem. Implementace metodiky zahrnuje zjištění aktuálních pracovních charakteristik metody, zejména pak limitů detekce jednotlivých analytů a opakovatelnosti jejich kvalitativního stanovení. Provozní náklady na jednu analýzu činí 1 900 Kč, celková výše prostředků na implementaci lze odhadnout v závislosti na počtu verifikačních a kontrolních analýz.

6 Seznam použité související literatury

1. Triba, M. N.; Le Moyec, L.; Amathieu, R.; Goossens, C.; Bouchemal, N.; Nahon, P.; Rutledge, D. N.; Savarin, P., PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular BioSystems* **2015**, *11* (1), 13-19.
2. Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J., Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48* (4), 2097-2098.
3. Baratloo, A.; Hosseini, M.; Negida, A.; El Ashal, G., Part 1: Simple Definition and Calculation of Accuracy, Sensitivity and Specificity. *Emerg (Tehran)* **2015**, *3* (2), 48-9.
4. R Bettencourt da Silva and S L R Ellison (eds.) Eurachem/CITAC Guide: Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis. First Edition, Eurachem (2021). ISBN 978-0-948926-39-6. Dostupné z <https://www.eurachem.org>

7 Seznam publikací, které předcházely metodice

Bechynska K., Sedlak J., Uttl L., Kosek V., Vackova P., Kocourek V., Hajslova J.: *Metabolomics on Apple (Malus domestica) Cuticle—Search for Authenticity Markers*. *Foods* (2024) 13(9): 1308. (DOI: [10.3390/foods13091308](https://doi.org/10.3390/foods13091308))

8 Seznam použitých zkratk

AD	cvrček domácí (<i>Acheta domesticus</i>)
ALD	potemník stájový (<i>Alphitobius diaperinus</i>)
ANOVA	analýzu rozptylu
BD	šváb argentinský (<i>Blaptica dubia</i>)
DDA	data dependent acquisition
ESI	ionizace elektrosprejem
FP	falešně pozitivní
FN	falešně negativní
FWHM	šířka píku v polovině výšky
GA	cvrček banánový (<i>Gryllus assimilis</i>)
GS	cvrček krátkokřídlý (<i>Grylloides sigillatus</i>)
HI	moucha bráněnka (<i>Hermetia illucens</i>)
HRMS/MS	vysokorozlišovací tandemová hmotnostní spektrometrie
LM	saranče stěhovavé (<i>Locusta migratoria</i>)
LSD	Least Significant Difference
m/z	poměr hmotnosti a náboje iontu
NCE	normalizovaná kolizní energie
PCA	analýza hlavních komponent
PLS-DA	diskriminační analýza částečně nejmenších čtverců
Q^2	predikční schopnost
QC	vzorek řízení kvality
R^2X , R^2Y	rozpoznávací schopnost
RSD	relativní směrodatná odchylka
SERRF	Systematic Error Removal Using Random Forest
SG	saranče všežravé (<i>Schistocerca gregaria</i>)
SN	skutečně negativní
SP	skutečně pozitivní
ST	šváb turkistánský (<i>Shelfordella tartara</i>)
TM	potemník moučný (<i>Tenebrio molitor</i>)
U-HPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

VIP	Variable Importance of Projection
ZM	potemník brazilský (<i>Zophobas morio</i>)

9 Přílohy

Příloha 1: Přehled autentických vzorků hmyzu (n = 142) pro necílovou analýzu (1. až 5. odběr)

Druh hmyzu	Zkratka	Počet vzorků	Chovatel
cvrček domácí (<i>Acheta domestica</i>)	AD	20	Ekotron s.r.o. (Ráby), Eurocricquet (Litva), ČZU (Praha)
cvrček banánový (<i>Gryllus assimilis</i>)	GA	18	Ekotron s.r.o. (Ráby), Šprůček (Olomouc), ČZU (Praha)
potemník moučný (<i>Tenebrio molitor</i>)	TM	30	Papek s.r.o. (Jaroměřice nad Rokytnou), BIO-HIV s.r.o. (Bžany), BlackFoodMarker (Plzeň), ČZU (Praha), Bartoš (Habrovany), Šourek (Blatná), Frkalová (Lubojaty)
potemník stájový (<i>Alphitobius diaperinus</i>)	ALD	10	Papek s.r.o. (Jaroměřice n. Rokytnou)
potemník brazilský (<i>Zophobas morio</i>)	ZM	22	Papek s.r.o. (Jaroměřice nad Rokytnou), Python s.r.o. (Nošovice), Polouček (Říčany), Šourek (Blatná)
moucha bráněnka (<i>Hermetia illucens</i>)	HI	6	Hrala (Černíčí-Čechtice)
saranče stěhovavé (<i>Locusta migratoria</i>)	LM	6	Ekotron s.r.o. (Ráby)
saranče všežravé (<i>Schistocerca gregaria</i>)	SG	6	Ekotron s.r.o. (Ráby)
šváb argentinský (<i>Blaptica dubia</i>)	BD	18	Jedlinský (Březová nad Sázavou), Papek s.r.o. (Jaroměřice nad Rokytnou), Šprůček (Olomouc)
šváb turkistánský (<i>Shelfordella tartara</i>)	ST	6	Polouček (Říčany)

Příloha 2: Seznam potenciálních markerů s přiřazenou identifikací

Návrh identifikace	Sumární vzorec	RT (min)	m/z	Adukt	Třída	Úroveň identifikace
2-hydroxyhippurová kyselina	C ₉ H ₉ NO ₄	4,52	194,0457	[M-H] ⁻	ST	2
2-methyl-7H-purin-6-ol	C ₆ H ₆ N ₄ O	1,97	151,0601	[M+H] ⁺	TM	2
3-karboxyindole	C ₉ H ₇ NO ₂	3,43	160,0404	[M-H] ⁻	LM, SG, GA, AD, ST, TM	2
3-O-methyl-dopa-4-sulfát	C ₁₀ H ₁₃ NO ₇ S	1,57	290,0340	[M-H] ⁻	AD, GA, LM, SG, ST	2

Příloha 2 – pokračování

Návrh identifikace	Sumární vzorec	RT (min)	m/z	Adukt	Třída	Úroveň identifikace
4,4'-dinitrokarbanilid	C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O ₅	7,39	301,0578	[M-H] ⁻	AD	2
4-fenolsulfonová kyselina	C ₆ H ₆ O ₄ S	2,92	172,9913	[M-H] ⁻	SG, AD, ZM, GA, LM, ALD, ST	2
6-methoxymellein	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	6,30	207,0661	[M-H] ⁻	ST	2
9-methylurová kyselina	C ₆ H ₆ N ₄ O ₃	1,10	181,0367	[M-H] ⁻	LM, SG, ST, BD, AD, ALD, ZM	2
cyklický 4',5'-fosfát riboflavinu	C ₁₃ H ₁₅ N ₁₀ O ₆ P	4,19	437,0856	[M-H] ⁻	vaření	2
dopamine-3-O-sulfát	C ₈ H ₁₁ NO ₅ S	1,33	232,0285	[M-H] ⁻	AD, GA, SG, ST, BD, LM	2
eicosapentaenová kyselina	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	8,89	301,2172	[M-H] ⁻	GA, AD	2
episterol	C ₂₈ H ₄₆ O	8,18	399,3579	[M+H] ⁺	GA, AD	2
flavinmononukleotid	C ₁₇ H ₂₁ N ₄ O ₉ P	4,26	455,0963	[M-H] ⁻	vaření	2
guajakol sulfát	C ₇ H ₈ O ₅ S	3,47	203,0020	[M-H] ⁻	GA, ZM, AD	2
choline-O-sulfát	C ₅ H ₁₃ NO ₄ S	0,66	184,0638	[M+H] ⁺	TM, ST, BD, HI, LM	2
laurová kyselina	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	8,55	199,1703	[M-H] ⁻	HI (zmrazení)	2
leukopterin	C ₆ H ₅ N ₅ O ₃	1,17	196,0463	[M+H] ⁺	LM, SG, GA, AD	2
leukotrien A4	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	8,22	317,2121	[M-H] ⁻	GA, AD	2
L-tyrosin methyl ester	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	3,50	194,0821	[M-H] ⁻	ALD, GA, ZM	2
methyl 2,3-dimethoxy-5-sulfamoylbenzoát	C ₁₀ H ₁₃ NO ₆ S	1,71	274,0391	[M-H] ⁻	ALD, LM, ST	2
methyl O-sulfo-L-tyrosinát	C ₁₀ H ₁₃ NO ₆ S	3,13	274,0391	[M-H] ⁻	AD, GA, LM, SG, ST	2
methyllinderon	C ₁₃ H ₂₄ O	7,89	197,1536	[M+H] ⁺	HI	2
methyllithocholát	C ₂₅ H ₄₂ O ₃	8,37	413,3023	[M+H] ⁺	ST	2
N6-kapryloyllysine	C ₁₄ H ₂₈ N ₂ O ₃	6,13	273,2173	[M+H] ⁺	ZM (zmrazení)	2
ninhydrin	C ₉ H ₆ O ₄	4,26	179,0338	[M+H] ⁺	LM	2

Příloha 2 – pokračování

Návrh identifikace	Sumární vzorec	RT (min)	m/z	Adukt	Třída	Úroveň identifikace
oleanolová kyselina	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	8,52	457,3676	[M+H] ⁺	AD, GA, BD	2
oleoylglycin	C ₂₀ H ₃₇ NO ₃	8,88	338,2700	[M-H] ⁻	zmrazení	2
palmitoylarginin	C ₂₂ H ₄₄ N ₄ O ₃	8,47	411,3325	[M-H] ⁻	ALD, GA, AD (zmrazení)	2
prostaglandin D2 ethanolamid	C ₂₂ H ₃₇ NO ₅	8,68	396,2742	[M+H] ⁺	AD, GA (vaření)	2
sinapinová kyselina	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	4,34	223,0611	[M-H] ⁻	ST	2
sinapoylglukosa	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	4,34	431,1182	[M+FA-H] ⁻	ST	2
sukcinyladenodin	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₈	3,26	382,0989	[M-H] ⁻	zmrazení	2
sulfát kyseliny homovanilové	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	4,36	261,0074	[M-H] ⁻	AD, GA	2
taurin	C ₂ H ₇ NO ₃ S	0,64	126,0219	[M+H] ⁺	AD, GA, LM, ALD, SG, ST, TM	2
tyrosine-O-sulfát	C ₉ H ₁₁ NO ₆ S	2,95	262,0377	[M+H] ⁺	AD, GA	2
xanthopterin (1.3 min)	C ₆ H ₅ N ₅ O ₂	1,28	180,0516	[M+H] ⁺	LM, SG	2
xanthopterin (1.6 min)	C ₆ H ₅ N ₅ O ₂	1,61	180,0516	[M+H] ⁺	GA, LM, SG, AD	2
xanthosin	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	2,59	285,0828	[M+H] ⁺	GA	2
xanturenová kyselina	C ₁₀ H ₇ NO ₄	3,63	206,0447	[M+H] ⁺	AD, ALD, GA, LM, SG, ST, TM	2
xanturenová kyselina 8-O-sulfát	C ₁₀ H ₇ NO ₇ S	3,28	283,9870	[M+H] ⁺	AD, ALD, GA, TM	2
γ-butyrobetaín	C ₇ H ₁₅ NO ₂	0,83	144,1029	[M-H] ⁻	BD, ST, AD, GA, LM, SG	2
hexosa	C ₁₀ H ₁₉ NO ₆	2,00	250,1283	[M+H] ⁺	zmrazení	3
C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₉	C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₉	1,54	393,1863	[M+H] ⁺	HI	4
C ₁₇ H ₃₄ O ₁₀ S ₂	C ₁₇ H ₃₄ O ₁₀ S ₂	7,23	230,0723	[M-2H] ²⁻	SG, LM	4
C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	4,61	579,1353	[M-H] ⁻	LM, SG, BD, ST, TM, ZM, HI	4
C ₂₈ H ₅₄ N ₂ O ₆ S ₂	C ₂₈ H ₅₄ N ₂ O ₆ S ₂	4,88	577,3356	[M-H] ⁻	SG, LM (zmrazení)	4

Příloha 2 – pokračování

Návrh identifikace	Sumární vzorec	RT (min)	m/z	Adukt	Třída	Úroveň identifikace
C ₃₁ H ₅₅ N ₃ O ₅ P ₂	C ₃₁ H ₅₅ N ₃ O ₅ P ₂	5,36	610,3570	[M-H] ⁻	zmrazení	4
C ₃₉ H ₅₉ N ₃ O ₁₅	C ₃₉ H ₅₉ N ₃ O ₁₅	6,54	808,3884	[M-H] ⁻	SG	4
C ₄₄ H ₇₇ N ₈ O ₁₆ P	C ₄₄ H ₇₇ N ₈ O ₁₆ P	7,67	1003,5121	[M-H] ⁻	TM, ZM, BD	4
C ₇ H ₈ O ₄ S	C ₇ H ₈ O ₄ S	4,14	187,0070	[M-H] ⁻	GA, AD	4
C ₈ H ₂₀ N ₂	C ₈ H ₂₀ N ₂	0,59	145,1698	[M+H] ⁺	ZM, SG	4
2.19_351.0391	-	2,19	351,0391	[M-H] ⁻	ST	5
2.51_367.0341	-	2,51	367,0341	[M-H] ⁻	TM, LM	5

AD: *A. domesticus*, GA: *G. assimilis*, LM: *L. migratoria*, SG: *S. gregaria*, BD: *B. dubia*, ST: *S. tartara*, TM: *T. molitor*, ALD: *A. diaperinus*, HI: *H. illucens*

Příloha 3: Přehled verifikační sady vzorků autentických druhů hmyzu (n = 20) pro cílový screening (6. odběr)

Druh hmyzu	Zkratka	Počet vzorků	Chovatel
cvrček domácí (<i>A. domesticus</i>)	AD	2	Ekotron s.r.o. (Ráby)
cvrček banánový (<i>G. assimilis</i>)	GA	2	Ekotron s.r.o. (Ráby)
potemník moučný (<i>T. molitor</i>)	TM	2	Papek s.r.o. (Jaroměřice nad Rokytou)
potemník stájový (<i>A. diaperinus</i>)	ALD	2	Papek s.r.o. (Jaroměřice n. Rokytou)
potemník brazilský (<i>Z. morio</i>)	ZM	4	Papek s.r.o. (Jaroměřice nad Rokytou), Polouček (Říčany)
saranče všežravé (<i>S. gregaria</i>)	SG	2	Ekotron s.r.o. (Ráby)
šváb argentinský (<i>B. dubia</i>)	BD	4	Polouček (Říčany), Starý (Třebíč)
šváb turkistánský (<i>S. tartara</i>)	ST	2	Polouček (Říčany)

Příloha 4: Přehled binárních směsí autentických druhů hmyzu (n = 140) usmrcených varem či zmrazením. Zvolené směsi jsou označeny křížkem. Každá směs byla smíchána v hmotnostních poměrech 5:95, 10:90, 50:50, 90:10 a 95:5

Druh	AD	TM	ALD	LM	GA	ZM	HI	SG	BD	ST
AD		x	x	x	x					
TM			x		x	x	x		x	x
ALD						x	x			
LM								x		
GA										
ZM							x			
HI										
SG										
BD										
ST										

Příloha 5: První sada vzorků výrobků na bázi jedlého hmyzu (n = 52) a výrobků bez přídavku hmyzu (n = 16) pro cílový screening. Vzorky obsahující hmyz obsahují cvrčka domácího (*A. domesticus*, AD; n = 35), cvrčka krátkokřídlého (*G. sigillatus*, GS; n = 2), saranče stěhovavé (*L. migratoria*, LM; n = 4), potměníka moučného (*T. molitor*, TM; n = 9) a potměníka stájového (*A. diaperinus*, ALD; n = 2). Řazeno dle deklarovaného druhu hmyzu a jeho obsahu

Název výrobku	Druh hmyzu	Obsah hmyzu (%)	Výrobce	Zeměpisný původ
cvrččí prášek	AD	100	Grig	Česká republika
cvrččí prášek	AD	100	Acheta	Litva
cvrččí prášek	AD	100	Sarastus Food	Finsko
cvrččí prášek	AD	100	Agroventa	Litva
cvrččí prášek	AD	100	Entogourmet	Španělsko
cvrččí prášek	AD	100	Eurocrickets	Litva

Příloha 5 – pokračování

Název výrobku	Druh hmyzu	Obsah hmyzu (%)	Výrobce	Zeměpisný původ
cvrččí prášek	AD	100	Albinsecta	Nizozemsko
křupaví cvrčci – jalapenos	AD	93	Grig	Česká republika
křupaví cvrčci – křen	AD	93	Grig	Česká republika
křupaví cvrčci – chilli and lime	AD	90	Grig	Česká republika
křupaví cvrčci – sour cream and onion	AD	90	Grig	Česká republika
křupaví cvrčci – bacon and mustard	AD	90	Grig	Česká republika
cvrččí pomazánka	AD	28.5	Grig	Česká republika
serious cricket protein bar – peanut butter and cinnamon	AD	20	Sens	Česká republika
serious cricket protein bar – peanutbitter cocoa and sesame	AD	20	Sens	Česká republika
crispbread with dried cricket flour and sea salt	AD	17	Acheta	Litva
tapenáda (šarže LOTP1 221021)	AD	14	Nimavert	Belgie
proteinové čipsy s cvrččím práškem – kopr	AD	12,5	Acheta	Litva
grigbar cocoa and orange flavor	AD	10	Grig	Česká republika
cvrččí proteinové tagliatelle (DTM 12/2024)	AD	10	Grig	Česká republika
cvrččí proteinové tagliatelle (DTM 12/2024)	AD	10	Grig	Česká republika
proteinová směs s cvrččí moukou – jahoda	AD	10	Sens	Vietnam
cvrččí pesto	AD	10	Sens	Česká republika
cvrččí čoko kostky – chilli	AD	8	Hey Planet	Dánsko
cricket chips – wasabi	AD	7	Grig	Česká republika
cricket chips – garlic	AD	7	Grig	Česká republika
cricket triangles – tomato and basil	AD	7	Grig	Česká republika

Příloha 5 – pokračování

Název výrobku	Druh hmyzu	Obsah hmyzu (%)	Výrobce	Zeměpisný původ
cricket chips – chilli	AD	7	Grig	Česká republika
cricket chips – natural	AD	7	Grig	Česká republika
cvrččí granola s lískovými oříšky	AD	7	Grig	Česká republika
cricket sticks – chilli	AD	5	Grig	Česká republika
cricket sticks – cheese	AD	5	Grig	Česká republika
chilli con carne	AD	0,9	Grig	Česká republika
proteinové ovocné kousky – detox	AD	neuvedeno	Acheta	Litva
proteinové ovocné kousky – káva a datle	AD	neuvedeno	Acheta	Litva
sušení cvrččí – natural	GS	100	Tobula	Litva
cvrččí moučka	GS	100	Tobula	Litva
kobylky – solené	LM	90	Grig	Česká republika
kobylky – solené	LM	90	Grig	Česká republika
kobylky – chilli	LM	86	Grig	Česká republika
alpine insect snack (Locusta) (DTM 07. 06. 2024)	LM	57	Essento	Švýcarsko
mealworms freeze dried	TM	100	DistriBugs	Nizozemsko
whole mealworm	TM	100	TrecmaFoods	Portugalsko
mealworm powder	TM	100	AgroNutris	Francie
mealworm powder	TM	100	TecmaFoods	Portugalsko
červíci – solení	TM	99	Grig	Česká republika
červíci – slaný karamel	TM	97	Grig	Česká republika
červíci – česnekoví	TM	97	Grig	Česká republika

Příloha 5 – pokračování

Název výrobku	Druh hmyzu	Obsah hmyzu (%)	Výrobce	Zeměpisný původ
červíci – chilli	TM	97	Grig	Česká republika
červíci – parmezán	TM	97	Grig	Česká republika
whole buffalo powder	ALD	100	TH GEYER	Německo
proteinový shake – kokos	ALD	15	ISSAC	Nizozemsko
trvanlivé tyčinky graham	-	0	Havlík	Česká republika
trvanlivé tyčinky pikant	-	0	Havlík	Česká republika
baked amaranth chips – tomato and basil	-	0	McLoyds	Slovensko
Doritos hot corn	-	0	KMV BEV CZ	Česká republika
legume chips original	-	0	Hajra food	Česká republika
complete high protein pasta	-	0	Green Apotheke	Česká republika
vřetena z červené čočky	-	0	Green Apotheke	Česká republika
crème de cassis royal protein tyčinka (šarže E102)	-	0	Bauli SK CZ	Slovensko
crème de cassis royal protein tyčinka (šarže E113)	-	0	Bauli SK CZ	Slovensko
excellent protein bar – marzipan with almonds and milk chocolate	-	0	Nutrend	Česká republika
super ovoce jahoda	-	0	Emco spol.	Česká republika
chocolate flavour protein bar	-	0	Bauli SK CZ	Slovensko
low carb kokos tyčinka (šarže K/19/09/23)	-	0	Top Natur	Česká republika
low carb kokos tyčinka (šarže K/26/04/24)	-	0	Top Natur	Česká republika
fermentovaná granola čokoládová s kokosem	-	0	Probio	Česká republika
lentil multigrain snack wasabi	-	0	Free YU	Polsko

Příloha 6: Druhá sada vzorků výrobků na bázi jedlého hmyzu (n = 24) pro cílový screening. Vzorky obsahují cvrčka domácího (*A. domesticus*, AD; n = 20), saranče stěhovavé (*L. migratoria*, LM; n = 1) a potměníka moučného (*T. molitor*, TM; n = 3). Řazeno dle deklarovaného druhu hmyzu a jeho obsahu

Název výrobku	Druh hmyzu	Obsah hmyzu (%)	Výrobce	Zeměpisný původ
paprika insect snack (Acheta)	AD	56	Essento	Švýcarsko
cvrčí jerky – BBQ	AD	45	Sens	Česká republika
adventure menu – Cricket protein Penne in sauce with beans, spinach and olives	AD	20	Sens	Česká republika
cvrčí proteinovka v tmavé čokoládě – banán a čokoláda	AD	17	Sens	Česká republika
nutricrunch krekry	AD	15	Essento	Švýcarsko
tapenáda (šarže LOTP1 240719)	AD	14	Nimavert	Belgie
humus	AD	14	Nimavert	Belgie
hazelnut cricket protein spread – chocolate	AD	12	Sens	Česká republika
oat cricket protein breakfast – apple and Cinnamon	AD	10	Sens	Česká republika
pea cricket protein chips – poppy seeds and salt	AD	10	Sens	Česká republika
pleasure cricket protein bar – ananas & kokos	AD	10	Sens	Česká republika
gluten-free cricket protein pasta (DMT 02. 06. 2021)	AD	10	Sens	Česká republika
gluten-free cricket protein pasta (DMT 02. 11. 2022)	AD	10	Sens	Česká republika
gluten-free cricket protein pasta (DMT 07. 07. 2023)	AD	10	Sens	Česká republika
gluten-free cricket protein pasta (DMT 20. 03. 2025)	AD	10	Sens	Česká republika
cricket peanut butter with belgian chocolate	AD	10	Grig	Česká republika
hmyzí fusilli	AD	10	BlackFoodMarket	Česká republika
hrachové chipsy s hmyzí moučkou s příchutí wasabi	AD	9	Crunchy	Česká republika
chirpsies original	AD	7	Nimavert	Belgie

Příloha 6 - pokračování

Název výrobku	Druh hmyzu	Obsah hmyzu (%)	Výrobce	Zeměpisný původ
delicious cricket spoon	AD	-	Nimavert	Belgie
pepper insect snack (Tenebrio)	TM	67	Essento	Švýcarsko
snack bällchen	TM	24	Essento	Švýcarsko
granola s červíky – slaný karamel	TM	10	Grig	Česká republika
alpine insect snack (Locusta) (DTM 18. 01. 2025)	LM	57	Essento	Švýcarsko

Příloha 7: Zhodnocení citlivost, specifity a přesnosti identifikovaných markerů na verifikační sadě druhů hmyzu (n = 20, 6. odběr)

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
2-hydroxyhippurová kyselina	4	0	36	0	1,0	1,0	100 %
2-methyl-7H-purin-6-ol	0	0	36	4	0,0	1,0	90 %
3-karboxyindole	19	6	14	1	1,0	0,7	83 %
3-O-methyldopa-4-sulfát	0	0	24	16	0,0	1,0	60 %
4,4'-dinitrokarbanilid	0	0	36	4	0,0	1,0	90 %
4-fenolsulfonová kyselina	28	0	12	0	1,0	1,0	100 %
6-methoxymellein	4	0	36	0	1,0	1,0	100 %
9-methylurová kyselina	0	0	8	32	0,0	1,0	20 %
cyklický 4',5'-fosfát riboflavinu	19	0	20	1	1,0	1,0	98 %
dopamine-3-O-sulfát	20	4	16	0	1,0	0,8	90 %
eicosapentaenová kyselina	4	2	30	4	0,5	0,9	85 %
episterol	4	0	32	4	0,5	1,0	90 %

Příloha 7 – pokračování

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
flavinmononukleotid	19	14	6	1	1,0	0,3	63 %
guajakol sulfát	14	4	20	2	0,9	0,8	85 %
choline-O-sulfát	0	0	24	16	0,0	1,0	60 %
laurová kyselina	0	0	40	0	-	1,0	100 %
leukopterin	0	0	28	12	0,0	1,0	70 %
leukotrien A4	4	2	30	4	0,5	0,9	85 %
L-tyrosin methyl ester	12	32	0	0	1,0	0,0	27 %
methyl 2,3-dimethoxy-5-sulfamoylbenzoát	2	0	32	6	0,3	1,0	85 %
methyl O-sulfo-L-tyrosinát	16	21	3	0	1,0	0,1	48 %
methylinderon	0	20	20	0	-	0,5	50 %
methylithocholát	4	0	36	0	1,0	1,0	100 %
N6-kapryloyllysine	4	14	22	0	1,0	0,6	65 %
ninhydrin	0	0	40	0	-	1,0	100 %
oleanolová kyselina	0	2	22	16	0,0	0,9	55 %
oleoylglycin	20	4	16	0	1,0	0,8	90 %
palmitoylarginin	5	2	32	1	0,8	0,9	93 %
prostaglandin D2 ethanolamid	8	0	32	0	1,0	1,0	100 %
sinapinová kyselina	4	0	36	0	1,0	1,0	100 %
sinapoylglukosa	4	0	36	0	1,0	1,0	100 %
sukcinyladenosin	18	4	16	2	0,9	0,8	85%

Příloha 7 – pokračování

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
sulfát kyseliny homovanilové	5	0	32	3	0,6	1,0	93 %
taurin	0	0	16	24	0,0	1,0	40 %
tyrosine-O-sulfát	8	0	32	0	1,0	1,0	100 %
xanthopterin (1.3 min)	0	0	36	4	0,0	1,0	90 %
xanthopterin (1.6 min)	0	0	28	12	0,0	1,0	70 %
xanthosin	3	0	36	1	0,8	1,0	98 %
xanturenová kyselina	2	0	16	22	0,1	1,0	45 %
xanturenová kyselina 8-O-sulfát	14	0	24	2	0,9	1,0	95 %
γ -butyrobetain	0	0	20	20	0,0	1,0	50 %
hexosa	20	0	20	0	1,0	1,0	100 %
$C_{16}H_{28}N_2O_9$	0	0	40	0	-	1,0	100 %
$C_{17}H_{34}O_{10}S_2$	4	0	36	0	1,0	1,0	100 %
$C_{26}H_{28}O_{15}$	6	0	12	22	0,2	1,0	45 %
$C_{28}H_{54}N_2O_6S_2$	2	0	38	0	1,0	1,0	100 %
$C_{31}H_{55}N_3O_5P_2$	8	0	20	12	0,4	1,0	70 %
$C_{39}H_{59}N_3O_{15}$	0	5	31	4	0,0	0,9	78 %
$C_{44}H_{77}N_8O_{16}P$	0	0	20	20	0,0	1,0	50 %
$C_7H_8O_4S$	8	0	32	0	1,0	1,0	100 %
$C_8H_{20}N_2$	0	0	28	12	0,0	1,0	70 %
2.19_352.0448	4	0	36	0	1,0	1,0	100 %

Příloha 7 – pokračování

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
2.51_367.0341	0	0	36	4	0,0	1,0	90 %

Příloha 8: Zhodnocení citlivost, specifity a přesnosti identifikovaných markerů na vzorcích binárních směsích (n = 140) připravených smísením autentických druhů hmyzu v poměru 5:95, 10:90, 50:50, 90:10, 95:5

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
2-hydroxyhippurová kyselina	20	0	260	0	1.0	1.0	100 %
2-methyl-7H-purin-6-ol	0	140	140	0	-	0.5	50 %
3-karboxyindole	191	0	60	29	0.9	1.0	90 %
3-O-methyl-dopa-4-sulfát	6	0	120	154	0.0	1.0	45 %
4,4'-dinitrokarbanilid	60	0	180	40	0.6	1.0	86 %
4-fenolsulfonová kyselina	137	1	39	103	0.6	1.0	63 %
6-methoxymellein	0	1	259	20	0.0	1.0	93 %
9-methylurová kyselina	0	0	40	240	0.0	1.0	14 %
cyklický 4',5'-fosfát riboflavinu	65	0	140	69	0.5	1.0	75 %
dopamine-3-O-sulfát	142	0	120	18	0.9	1.0	94 %
eicosapentaenová kyselina	11	0	180	89	0.1	1.0	68 %
episterol	19	0	180	81	0.2	1.0	71 %
flavinmononukleotid	80	3	137	60	0.6	1.0	78 %
guajakol sulfát	5	0	120	155	0.0	1.0	45 %
choline-O-sulfát	29	0	79	172	0.1	1.0	39 %

Příloha 8 – pokračování

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
laurová kyselina	28	0	250	2	0,9	1,0	99 %
leukopterin	30	0	160	90	0,3	1,0	68 %
leukotrien A4	5	0	180	95	0,1	1,0	66 %
L-tyrosin methyl ester	145	86	34	15	0,9	0,3	64 %
methyl 2,3-dimethoxy-5-sulfamoylbenzoát	1	0	140	139	0,0	1,0	50 %
methyl O-sulfo-L-tyrosinát	158	0	120	2	1,0	1,0	99 %
methyllinderon	20	0	220	40	0,3	1,0	86 %
methyllithocholát	12	0	260	8	0,6	1,0	97 %
N6-kapryloyllysine	10	74	176	20	0,3	0,7	66 %
ninhydrin	34	1	239	6	0,9	1,0	98 %
oleanolová kyselina	1	1	159	119	0,0	1,0	57 %
oleoylglycin	139	0	140	1	1,0	1,0	100 %
palmitoylarginin	33	0	200	47	0,4	1,0	83 %
prostaglandin D2 ethanolamid	25	0	180	75	0,3	1,0	73 %
sinapinová kyselina	12	0	260	8	0,6	1,0	97 %
sinapoylglukosa	19	0	260	1	1,0	1,0	100 %
sukcinyladenosin	137	0	140	3	1,0	1,0	99 %
sulfát kyseliny homovanilové	12	0	180	88	0,1	1,0	69 %
taurin	220	14	6	40	0,8	0,3	81 %
tyrosine-O-sulfát	100	1	179	0	1,0	1,0	100 %

Příloha 8 – pokračování

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
xanthopterin (1.3 min)	19	1	239	21	0,5	1,0	92 %
xanthopterin (1.6 min)	0	0	160	120	0,0	1,0	57 %
xanthosin	20	0	240	20	0,5	1,0	93 %
xanturenová kyselina	230	0	10	30	0,9	1,0	89 %
xanturenová kyselina 8-O-sulfát	0	0	40	240	0,0	1,0	14 %
γ -butyrobetain	114	5	114	47	0,7	1,0	81 %
hexosa	0	0	140	140	0,0	1,0	50 %
$C_{16}H_{28}N_2O_9$	0	0	220	60	0,0	1,0	79 %
$C_{17}H_{34}O_{10}S_2$	16	0	240	24	0,4	1,0	91 %
$C_{26}H_{28}O_{15}$	0	0	40	240	0,0	1,0	14 %
$C_{28}H_{54}N_2O_6S_2$	1	0	240	39	0,0	1,0	86 %
$C_{31}H_{55}N_3O_5P_2$	30	1	139	110	0,2	1,0	60 %
$C_{39}H_{59}N_3O_{15}$	0	0	260	20	0,0	1,0	93 %
$C_{44}H_{77}N_8O_{16}P$	0	0	100	180	0,0	1,0	36 %
$C_7H_8O_4S$	70	0	180	30	0,7	1,0	89 %
$C_8H_{20}N_2$	58	5	195	22	0,7	1,0	90 %
2.19_351.0391	0	2	275	3	0,0	1,0	98 %
2.51_367.0341	0	0	100	180	0,0	1,0	36 %

Příloha 9: Zhodnocení citlivost, specifity a přesnosti identifikovaných markerů na první sadě výrobků (n = 68). Vynechány jsou markeru způsobu usmrcení (var nebo zmrazení)

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
2-hydroxyhippurová kyselina	0	0	136	0	-	1,0	100 %
2-methyl-7H-purin-6-ol	18	0	118	0	1,0	1,0	100 %
3-karboxyindole	82	0	36	14	0,9	1,0	89 %
3-O-methyl-dopa-4-sulfát	17	0	55	56	0,2	1,0	56 %
4,4'-dinitrokarbanilid	2	0	66	68	0,0	1,0	50 %
4-fenolsulfonová kyselina	36	0	50	46	0,4	1,0	65 %
6-methoxymellein	0	0	136	0	-	1,0	100 %
9-methylurová kyselina	0	0	54	82	0,0	1,0	40 %
dopamine-3-O-sulfát	52	0	54	30	0,6	1,0	78 %
eicosapentaenová kyselina	0	0	66	70	0,0	1,0	49 %
episterol	0	0	66	70	0,0	1,0	49 %
guajakol sulfát	0	0	66	70	0,0	1,0	49 %
choline-O-sulfát	0	0	110	26	0,0	1,0	81 %
laurová kyselina	0	0	136	0	-	1,0	100 %
leukopterin	0	0	58	78	0,0	1,0	43 %
leukotrien A4	0	0	66	70	0,0	1,0	49 %
L-tyrosin methyl ester	4	58	74	0	1,0	0,6	57 %
methyl 2,3-dimethoxy-5-sulfamoylbenzoát	0	0	124	12	0,0	1,0	91%
methyl O-sulfo-L-tyrosinát	76	18	36	2	1,0	0,7	85%

Příloha 9 – pokračování

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
methyllinderon	0	0	136	0	-	1,0	100 %
methyllithocholát	0	0	136	0	-	1,0	100 %
N6-kapryloyllysine	0	0	136	0	-	1,0	100 %
ninhydrin	8	2	126	0	1,0	1,0	99 %
oleanolová kyselina	0	0	66	70	0,0	1,0	49 %
palmitoylarginin	0	0	136	0	-	1,0	100 %
prostaglandin D2 ethanolamid	0	0	66	70	0,0	1,0	49 %
sinapinová kyselina	0	0	136	0	-	1,0	100 %
sinapoylglukosa	0	0	136	0	-	1,0	100 %
sulfát kyseliny homovanilové	16	3	63	54	0,2	1,0	58 %
taurin	65	0	32	35	0,7	1,0	73 %
tyrosine-O-sulfát	61	0	62	13	0,8	1,0	90 %
xanthopterin (1.3 min)	0	0	128	8	0,0	1,0	94 %
xanthopterin (1.6 min)	0	0	58	78	0,0	1,0	43 %
xanthosin	0	39	97	0	-	0,7	71 %
xanturenová kyselina	63	0	32	37	0,6	1,0	72 %
xanturenová kyselina 8-O-sulfát	44	5	34	49	0,5	0,9	59 %
γ -butyrobetain	0	0	58	78	0,0	1,0	43 %
$C_{28}H_{54}N_2O_6S_2$	0	0	128	8	0,0	1,0	94 %
$C_{16}H_{28}N_2O_9$	0	0	136	0	-	1,0	100 %

Příloha 9 – pokračování

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
C ₁₇ H ₃₄ O ₁₀ S ₂	5	0	128	3	0,6	1,0	98 %
C ₂₈ H ₅₄ N ₂ O ₆ S ₂	0	0	110	26	0,0	1,0	81 %
C ₃₉ H ₅₉ N ₃ O ₁₅	0	0	136	0	-	1,0	100 %
C ₃₉ H ₅₉ N ₃ O ₁₅	0	0	136	0	-	1,0	100 %
C ₄₄ H ₇₇ N ₈ O ₁₆ P	0	0	118	18	0,0	1,0	87 %
C ₇ H ₈ O ₄ S	20	6	60	50	0,3	0,9	59 %
C ₈ H ₂₀ N ₂	0	6	130	0	-	1,0	96 %
2.19_351.0391	0	0	136	0	-	1,0	100 %
2.51_367.0341	0	0	110	26	0,0	1,0	81 %

Příloha 10: Zhodnocení citlivost, specifity a přesnosti identifikovaných markerů na druhé sadě výrobků (n = 24). Vynechány jsou markeru způsobu usmrcení (var nebo zmrazení)

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
2-hydroxyhippurová kyselina	0	0	48	0	-	1,0	100 %
2-methyl-7H-purin-6-ol	0	0	44	4	0,0	1,0	92 %
3-karboxyindole	40	0	0	8	0,8	-	83 %
3-O-methyldopa-4-sulfát	1	0	6	41	0,0	1,0	15 %
4,4'-dinitrokarbanilid	4	0	8	36	0,1	1,0	25 %
4-fenolsulfonová kyselina	22	0	6	2	0,9	1,0	93 %
6-methoxymellein	0	0	48	0	-	1,0	100 %

Příloha 10 – pokračování

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
9-methylurová kyselina	0	0	6	42	0,0	1,0	13 %
dopamine-3-O-sulfát	34	0	6	8	0,8	1,0	83 %
eicosapentaenová kyselina	0	2	6	40	0,0	0,8	13 %
episterol	0	0	6	42	0,0	1,0	13 %
guajakol sulfát	0	0	8	40	0,0	1,0	17 %
choline O-sulfát	4	2	40	2	0,7	1,0	92 %
laurová kyselina	0	0	48	0	-	1,0	100 %
leukopterin	14	0	4	30	0,3	1,0	38 %
leukotrien A4	0	0	8	40	0,0	1,0	17 %
L-tyrosin methyl ester	0	34	14	0	-	0,3	29 %
methyl 2,3-dimethoxy-5-sulfamoylbenzoát	0	0	46	2	0,0	1,0	96 %
methyl O-sulfo-L-tyrosinát	42	0	6	0	1,0	1,0	100 %
methyllinderon	0	0	48	0	-	1,0	100 %
methyllithocholát	0	0	48	0	-	1,0	100 %
ninhydrin	2	0	46	0	1,0	1,0	100 %
oleanolová kyselina	18	4	2	24	0,4	0,3	42 %
prostaglandin D2 ethanolamid	0	0	6	42	0,0	1,0	13 %
sinapinová kyselina	0	0	48	0	-	1,0	100 %
sinapoylglukosa	0	0	48	0	-	1,0	100 %
sulfát kyseliny homovanilové	2	0	8	38	0,1	1,0	21 %

Příloha 10 – pokračování

Návrh identifikace	Skutečně pozitivní (SP)	Falešně pozitivní (FP)	Skutečně negativní (SN)	Falešně negativní (FN)	Citlivost	Specifita	Přesnost
taurin	43	0	0	5	0,9	-	90 %
tyrosine-O-sulfát	32	0	6	8	0,8	1,0	83 %
xanthopterin (1.3 min)	0	0	46	2	0,0	1,0	96 %
xanthopterin (1.6 min)	16	0	6	26	0,4	1,0	46 %
xanthosin	0	25	23	0	-	0,5	48 %
xanturenová kyselina	8	0	0	40	0,2	-	17 %
xanturenová kyselina 8-O-sulfát	0	0	2	46	0,0	1,0	4 %
γ -butyrobetain	0	0	6	42	0,0	1,0	13 %
$C_{16}H_{28}N_2O_9$	0	0	48	0	-	1,0	100 %
$C_{17}H_{34}O_{10}S_2$	0	0	46	2	0,0	1,0	96 %
$C_{26}H_{28}O_{15}$	0	0	40	8	0,0	1,0	83 %
$C_{39}H_{59}N_3O_{15}$	0	0	48	0	-	1,0	100 %
$C_{44}H_{77}N_8O_{16}P$	0	0	42	6	0,0	1,0	88 %
$C_7H_8O_4S$	16	0	8	24	0,4	1,0	50 %
$C_8H_{20}N_2$	0	2	44	2	0,0	1,0	92 %
2.19_351.0391	0	0	48	0	-	1,0	100 %
2.51_367.0341	0	0	42	6	0,0	1,0	88 %

Autoři metodiky:

Ing. Ondřej Pospíšil.	podíl 40 %
Ing. Kateřina Šebelová	podíl 30 %
prof. Ing. Vladimír Kocourek, CSc.	podíl 5 %
prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.	podíl 25 %

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Ústav analýzy potravin a výživy
Technická 1905/5
166 28 Praha 6 – Dejvice

Jména oponentů:

prof. Ing. Jiří Mlček, Ph.D.

Ústav analýzy a chemie potravin, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Ing. Martin Kubík

Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Praha

Dedikace:

Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky a je výstupem řešení projektu NAZV QK23020101s názvem „Komplexní laboratorní strategie pro identifikaci druhů hmyzu určeného k lidské spotřebě a produkci zpracované živočišné bílkoviny, autentikace potravin na jeho bázi.“

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 1905/5, 166 28 Praha 6

Oponenti: Jiří Mlček, Martin Kubík

Rok vydání: 2025

Počet stran: 58

Vydání: první