

ANALÝZA ALKALOIDŮ V MAKOVINĚ METODOU VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

Aneta Laryšová, Lenka Endlová

Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Katedra chemie, 30. dubna 22, Ostrava, 606 468 010, Aneta.la@seznam.cz

Abstrakt

Ve vzorcích makoviny máku setého (*Papaver somniferum L.*) byl analyzován obsah opiových alkaloidů (morfinu, kodeinu, thebainu, papaverinu a noskapinu) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Byly optimalizovány podmínky pro zavedení extrakce na pevné fázi, a bylo prokázáno, že připravený extrakt je stabilní po dobu 2 týdnů při teplotě 4 °C. Vyvinutá metoda byla validována. Pomocí softwaru EffiValidation 3.0 byly vyhodnoceny validační parametry (opakovatelnost metody nižší než 5 %, korelační koeficient linearity vyšší než 0,985; odchylka správnosti nižší než 10 %, nízké hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti). Výsledky validace prokázaly, že lze metodu využít jako rutinní, rychlou, spolehlivou a přesnou pro stanovení alkaloidu morfinu ve vzorcích makoviny při šlechtění máku setého.

Klíčová slova: mák; makovina; alkaloidy; extrakce; HPLC

Úvod

Mák setý je plodina, která nachází své uplatnění zejména v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Česká republika patří v celosvětovém měřítku k jeho nejvýznamnějším pěstitelům [1, 2]. Hlavním využitím máku setého je jeho semeno, které je v ČR výhradně používáno v potravinářském průmyslu. Vedlejším produktem je makovina, která je bohatá na alkaloidy, jež jsou velmi významnými surovinami pro výrobu farmaceutik, avšak vzhledem ke svým biologickým účinkům mohou být považovány za potenciální hrozbu pro vznik drogové závislosti [3, 4].

Ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení významných alkaloidů máku setého se nejčastěji využívají metody chromatografické, lišící se přípravou vzorků, především způsobem extrakce [5-7]. Tato práce byla zaměřena na modifikaci metody, jež pro přípravu vzorků využívala přímou extrakci extrakčním činidlem a byla doposud používaná pro stanovení alkaloidů morfinu a kodeinu v makovině ve firmě Oseva PRO s.r.o. Výzkumném ústavu olejin Opava [8]. Nová metodika, využívající extrakci na pevnou fázi, měla za cíl především zrychlení a zjednodušení stanovení alkaloidů v makovině, a také rozšíření stanovení o další alkaloidy, například thebain, papaverin a noskapin.

Materiál a metody

K analýze bylo vybráno deset vzorků různých odrůd máku setého, lišících se obsahy morfinu v makovině. Prázdná tobolka máku setého tzv. makovina, byla pomleta na práškový vzorek na mlýnku IKA TUBE-MILL control po dobu 40 sec při 22 000 rpm, a přeseta přes síto o velikosti ok 1 mm pro extrakci extrakčním činidlem a 0,5 mm pro extrakci na pevné fázi.

Přímá extrakce (PE) byla provedena smícháním 25 ml extrakční směsi (NH_3 (25% vodný roztok - p.a.) : CH_3OH (p.a.) : CHCl_3 (p.a., vše Fisher Scientific, Pardubice, ČR) = 1:9:15), s 500 mg vzorku v 60 ml lékovce. Po uzavření se vzorek nechal stát do dalšího dne, kdy byl protřepán v třepačce typu TE III. (Chirana) při 240 $\text{kmitech}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 8 hodin. Třetí den vzorek protřepán za stejných podmínek 2 hodiny a poté 5 ml extraktu přefiltrováno přes mlynářské síto pomocí filtračního zařízení do kalibrované kónické zkumavky. Obsah zkumavky

byl převeden do 50 ml baňky se zábrusem, odpařen po dobu 3 minut ve vakuové rotační odparce typu RV 8 (IKA) a ponořen do horké vodní lázně typu HB 10 (IKA) o teplotě 60 °C. Odparek byl rekonstituován v 5 ml CH₃OH (p.a., Fisher Scientific, Pardubice, ČR) v ultrazvukové lázni TESON 10 (Tesla) po dobu 5 minut a zfiltrován přes membránový filtr - Nylon 66 Membranes, 0,45 μm, průměr 47 mm (Sigma Aldrich, Praha, ČR). Po filtraci byl 1 ml filtrátu odpipetován do vialky k chromatografické analýze za následujících separačních podmínek systému Agilent 1200 (Agilent, USA) – kolona Discovery HS F5-5 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm, Supelco), teplota kolony 30 °C, průtok mobilní fáze 2 ml/min, mobilní fáze: ledová CH₃COOH (99-100%, ch.č.) : acetonitril (HPLC grade, vše Sigma Aldrich, Praha, ČR) : ultračistá voda = 2: 25: 73, vlnová délka 283 nm, nástřik 50 μl, délka analýzy 23 minut, detektor UV/VIS. Připravená mobilní fáze zfiltrována přes membránový filtr - Nylon 66 Membranes. Analýza byla provedena paralelně.

Extrakci na pevnou fázi (SPE) předcházelo smíchání 50 mg vzorku s 5 ml 5% CH₃COOH (připravena zředěním 99,8% - p.a., Fisher Scientific, Pardubice, ČR) v centrifugační zkumavce, která byla vložena na 30 minut do ultrazvukové lázně TESON 10 (Tesla). Poté se vzorek třepal 1 minutu v třepačce typu TE III. (Chirana) a odstředoval na multifunkční vysokootáčkové centrifuze – typ K 2015 (Unimed) po dobu 10 minut při 3900 ot/min. Připravený extrakt byl přečištěn na pevné fázi. Na SPE vakuum manifold s vakuovou rotační vývěvou (Labicom) byla umístěna kolonka CHROMABOND HR-XC (60 mg/3 ml), která se kondiciovala 3 ml CH₃OH (p.a., Fisher Scientific, Pardubice, ČR) a ekvilibrovala 3 ml ultračisté vody. Na kolonku byly nanесeny 3 ml extraktu a byly promyty 2 ml 0,1 M HCl (připravena zředěním 35–36% - p.a., Fisher Scientific, Pardubice, ČR) a 2 ml CH₃OH (HPLC grade., Sigma Aldrich, Praha, ČR). Eluce byla provedena 2krát 2 ml eluční směsi (5% NH₃ v CH₃OH, vše Fisher Scientific, Pardubice, ČR) do 50 ml baňky se zábrusem. Eluát byl po dobu 3 minut ponořen v horké vodní lázni typu HB 10 (IKA) o teplotě 60 °C a odpařován na vakuové rotační odparce typu RV 8 (IKA). Poté byl vzorek rekonstituován ve 3 ml CH₃OH (HPLC grade, Sigma Aldrich, Praha, ČR) a umístěn na 3 minuty do ultrazvukové lázně TESON 10 (Tesla). Následně byl odpipetován 1 ml vzorku do vialky k provedení chromatografické analýzy za následujících podmínek chromatografického systému Agilent 1200 (Agilent, USA) - kolona Ascientis Express F5, (150 mm x 4,6 mm, 5 μm, Supelco), teplota kolony 40 °C, průtok mobilní fáze 1 ml/min, mobilní fáze A: 5% acetonitril, mobilní fáze B: acetonitril (HPLC grade) : ledová CH₃COOH (99-100%, ch.č.) : triethylamin (GC ≥ 99,5 %, vše Sigma Aldrich, Praha, ČR) = 979:20:1, vlnová délka 284 nm, nástřik 50 μl, délka analýzy 30 minut, detektor UV/VIS. Separace alkaloidů byla provedena pomocí gradientové eluce dle následujícího programu.

Tabulka 1. Gradientový program pro separaci alkaloidů

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	90	10
5	85	15
10	80	20
20	65	35
30	90	10

Výsledky a diskuse

Byly připraveny kalibrační řady jednotlivých stanovovaných alkaloidů, tak aby obsahy alkaloidů v neznámých vzorcích spadaly do rozsahu kalibračních řad. Rovnice získaných koncentračních závislostí byly použity pro stanovení obsahů jednotlivých alkaloidů v neznámých

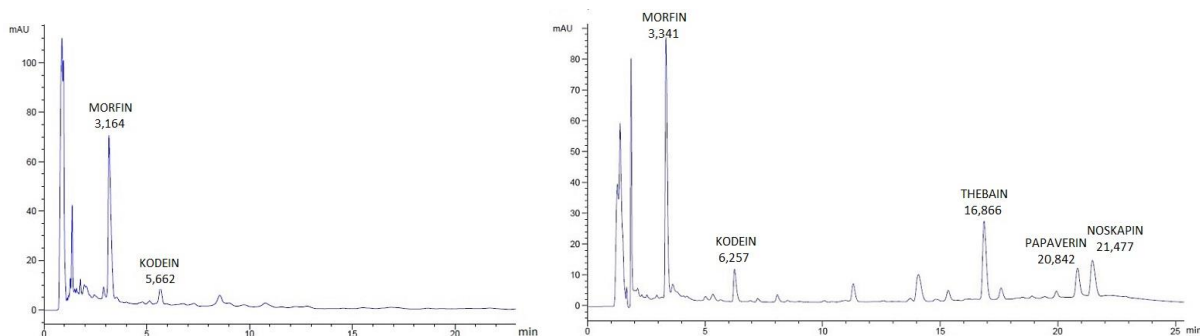
vzorcích pomocí dvou metod, lišících se přípravou vzorků a chromatografickými podmínkami (PE HPLC, SPE-HPLC).

Tabulka 2. Shrnutí dat, získaných proměřením kalibračních řad jednotlivých alkaloidů

Alkaloid	Metoda	Korelační koeficient	Rovnice přímky
Morfin	PE-HPLC	0,9997	$y = 0,1751x - 5,1331$
Kodein	PE-HPLC	0,9993	$y = 0,1860x - 3,5449$
Morfin	SPE-HPLC	0,9997	$y = 15,211x - 2,4029$
Kodein	SPE-HPLC	0,9995	$y = 10,853x + 1,2417$
Thebain	SPE-HPLC	0,9995	$y = 175,82x + 1,4766$
Papaverin	SPE-HPLC	0,9997	$y = 49,851x - 1,2950$
Noskapin	SPE-HPLC	0,9998	$y = 15,719x + 0,2686$

Identifikace jednotlivých alkaloidů v chromatogramech byla provedena porovnáním retenčních časů standardu s retenčními časy píků analyzovaných vzorků.

Metodou PE-HPLC byla analýza alkaloidů v makovině provedena paralelně a hodnocené výsledky jsou průměrem dvou stanovení. Metodou SPE-HPLC byly analyzovány totožné vzorky. Ve výsledných chromatogramech byla provedena identifikace píků a byly vypočítány obsahy jednotlivých alkaloidů.



Obrázek 1. Analýza neznámého vzorku metodou PE-HPLC (vlevo) a SPE-HPLC (vpravo)

V chromatogramech získaných metodou PE-HPLC byly zaznamenány pouze dva z pěti stanovovaných alkaloidů - morfin a kodein, kdežto v chromatogramech získaných metodou SPE-HPLC bylo identifikováno pět alkaloidů – morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin.

Naměřená data získaná analýzou vzorků oběma metodami byla srovnána z několika hledisek. Metody byly zhodnoceny z ekonomického hlediska, časové náročnosti či šetrnosti k životnímu prostředí. Srovnání stanovených obsahů se týkalo především alkaloidu morfinu, jakožto výhradního alkaloidu v máku setém, který je ukazatelem kvality makoviny [2].

U nově vyvinuté metody byl pak dále zkoumán vliv doby extrakce na stanovené množství morfinu v makovině, a byla také sledována stabilita vzorků v různých časových intervalech. Byla provedena validace metody SPE-HPLC a pomocí softwaru EffiValidation byly stanoveny validační parametry.

Závěr

Vývojem nové metody pro kvalitativní a kvantitativní stanovení významných alkaloidů v makovině byla nahrazena přímá extrakce extrakcí na pevnou fázi, a kromě přípravy vzorků byly také modifikovány chromatografické podmínky.

Uvedené výsledky prokázaly, že novou metodou SPE-HPLC lze stanovit porovnatelné, případně vyšší obsahy alkaloidu morfinu ve vzorcích makoviny. Metoda je časově méně náročná a vzhledem k nižší spotřebě organických rozpouštědel šetrnější jak pro životní prostředí, tak také pro pracovní prostředí laboratoře. Mimo jiné lze touto metodou stanovit kromě obsahu kodeinu a morfinu kvantitu dalších významných alkaloidů, jako je thebain, papaverin a noscapin. Validace metody SPE-HPLC umožnila její využití ve firmě Oseva PRO s.r.o., jako rutinní, spolehlivou, přesnou a rychlou metodu pro stanovení kvality makoviny při šlechtění máku setého.

Poděkování

Poděkování patří celému Výzkumnému ústavu olejnin v Opavě za umožnění provádění veškerých prací v jejich výzkumné laboratoři, a dále také všem jejím pracovníkům za pomoc a cenné rady při prováděných pracích.

Literatura

- [1.] BARANYK, P. a kol. *Olejniny*. Praha: Profi Press, 2010. ISBN 978-80-86726-38-0
- [2.] BECHYNĚ, M., KADLEC, T., VAŠÁK J. a kol. *Mák*. Praha: Semafor, 2001.
- [3.] VAŠÁK, J. a kol. *Mák*. Praha: Powerprint, 2010. ISBN 978-80-904011-8-1
- [4.] MORAVCOVÁ, J. *Biologicky aktivní přírodní látky*. Interní studijní pomůcka. VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie. Praha, 2006.
- [5.] YOSHIMATSU, K., KIUCHI, F., SHIMOMURA, K., MAKINO, Y. *A Rapid and Reliable Solid-Phase Extraction Method for High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Opium from Papaver Plants*. Pharmaceuticals Society of Japan, 2005, roč. 53, č. 11, s. 1446-1450.
- [6.] PETRUCZYNIK, A. *Analysis of alkaloids from different chemical groups by different liquid chromatography methods*. Central European Journal of Chemistry, 2012, roč. 3, č. 10, s. 802-835.
- [7.] STRANSKA, I., SKALICKY, M., NOVAK, J., MATYASOVA, E., HEJNAK, V. *Analysis of selected poppy (*Papaver somniferum* L.) cultivars: Pharmaceutically important alkaloids*. Industrial Crops and Products, 2013, roč. 41, s. 120-126.
- [8.] Interní metodika Oseva PRO: *Stanovení obsahu alkaloidů v máku setém (*Papaver somniferum*) metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie*. Pořadové číslo 6.

Abstract

The content of opium alkaloids (morphine, codeine, thebaine, papaverine and noscapine) was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) in samples of poppy straw. Conditions were optimized for application of solid phase extraction, and it was certified that the prepared extract was stable for two weeks at 4 °C temperature. The developed method was validated. Validation parameters were evaluated using the software EffiValidation 3.0 (repeatability of the methods is less than 5 %, correlation coefficient linearity higher than 0.985, deviation accuracy is less than 10 %, the low value of the limit of detection and limit of quantification). Results of validation have shown that the method can be used as a routine, rapid, reliable and precise determination of the alkaloid morphine in samples of poppy straw for cultivation in *Papaver somniferum* L.