

	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50250.1 – Stanovení obsahu vybraných opiových alkaloidů metodou HPLC	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU VYBRANÝCH OPIOVÝCH ALKALOIDŮ METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup je určen pro stanovení obsahu morfinu ve vzorcích makoviny potravinářských odrůd máku s obsahem do 1,2 % morfinu.

2 Princip

Morfin se z pomletého vzorku makoviny extrahuje buď směsí chloroformu, isopropanolu, ethanolu, amoniaku nebo extrakcí 5% kyselinou octovou, po níž následuje přečištění pomocí SPE. Po odstranění extrakčního, případně elučního činidla, se morfin rozpustí v methanolu a následně stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí v UV oblasti při 284 nm.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- 2 Chloroform.
- 3 Isopropanol.
- 4 Ethanol, $\approx 96\%$, denaturovaný.
- 5 Amoniak, 25-29% vodný roztok.
- 6 Extrakční směs.

Příprava: Smíchá se 600 ml chloroformu (2), 200 ml isopropanolu (3), 150 ml ethanolu (4) a 50 ml amoniaku (5). Směs se důkladně promíchá.

- 7 Kyselina octová, 99,0 % (m/m), $\rho(\text{CH}_3\text{COOH}) = 1,05 \text{ g/ml}$.

- 8 Kyselina octová, $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 5\%$.

Příprava: V 1000ml odměrné baňce se přidá 50,5 ml kyseliny octové (7) do asi 500 ml vody (1). Po vytemperování se doplní vodou (1) po značku.

- 9 Kyselina chlorovodíková, 35% (m/m), $\rho(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50250.1 – Stanovení obsahu vybraných opiových alkaloidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

10 Kyselina chlorovodíková, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Příprava: V 1000ml odměrné baňce se přidá 8,8 ml kyseliny chlorovodíkové (9) k asi 500 ml vody (1). Po vytemperování se doplní vodou po značku.

11 Methanol, pro HPLC.

12 Eluční směs, pro SPE.

Příprava: Smíchá se 50 ml amoniaku (5) s 950 ml methanolu (11). Směs se důkladně promíchá.

13 Acetonitril, pro HPLC (mobilní fáze A).

14 Heptansulfonát sodný, $c(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{SO}_3\text{Na}) = 10 \text{ mmol/l}$, pH 3,5 (mobilní fáze B).

Příprava: 2,0225 g heptansulfonátu sodného (14) se rozpustí ve vodě (1). Poté se roztok kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní po značku vodou (1). pH roztoku se upraví pomocí kyseliny fosforečné (15) na hodnotu 3,5.

15 Kyselina fosforečná, 85 % (m/m), $\rho(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1,70 \text{ g/ml}$.

17 Morfin, standardní roztok v methanolu, $c(\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3) = 1 \text{ mg/ml}$.

Poznámky

1 *Kalibrační roztoky lze připravit v případě potřeby i ze standardu morfin hydrochlorid trihydrátu. Množství navážky pro jednotlivé kalibrační roztoky je potřeba přepočítat na morfin.*

4 Přístroje a pomůcky

1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV/VIS detektorem.

2 Analytické váhy s přesností 0,01mg.

3 pH-metr.

4 Laboratorní třepačka.

5 Ultrazvuková lázeň.

6 Minitřepačka pro zkumavky.

7 Odstředivka, 3900 ot/min.

8 Koncentrátor vzorků, např. Termovap 10.

9 Stříkačkové filtry (PTFE, 0,45μm), stříkačky.

10 SPE manifold s membránovým čerpadlem.

11 SPE kolonky Oasis MCX, 3 ml/60 mg nebo obdobné.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd 50250.1 – Stanovení obsahu vybraných opiových alkaloidů metodou HPLC	Vydání	1
		Revize	1

- 12 Filtrační papír střední hustoty, kruhový výsek , asi 11 cm.
- 13 Automatické pipety s nastavitelným objemem, špičky.
- 14 Vialka se šroubovacím uzávěrem, 2 ml.
- 15 Laboratorní ultraodstředivý mlýnek, např. Retsch ZM 200.

5 Postup

5.1 Příprava zkušební vzorku

Celý laboratorní vzorek makoviny se bez jakékoliv další úpravy pomele na ultraodstředivém mlýnku Retsch ZM 200 nebo obdobném zařízení při 1400 ot/min. Při přípravě vzorku pro extrakci kyselinou octovou (8) s následným přečištěním extraktu na SPE kolonkách se do ultraodstředivého mlýnku použije síto s velikostí ok 0,5 mm. Na přípravu vzorku k extrakci pomocí extrakční směsi (6) se použije síto s velikostí ok 1,0 mm. Pomletý materiál se uchovává v uzavíratelné plastové nádobě při laboratorní teplotě.

5.2 Extrakce morfinu

5.2.1 Extrakce extrakční směsí chloroformu, isopropanolu, ethanolu, amoniaku

Do 100ml kulaté baňky se zábrusem se naváží 1 g makoviny. Přidá se 25 ml extrakční směsi (6), baňka se uzavře zátkou a vzorek se extrahuje 1 h na třepačce při laboratorní teplotě. Poté se extrakt filtruje přes suchý skládaný filtr do 50ml odměrné baňky. Promytí podílu na filtru a doplnění na objem 50 ml se provádí extrakční směsí (6). Z takto připraveného extraktu se odpipetují 2 ml do 5ml extrakční vialky. Ta se umístí do koncentrátoru vzorků, kde se extrakční směs odpaří pod proudem dusíku při 40 °C. K odparku se přidají 2 ml methanolu (11), rozpustí se pomocí ultrazvuku a roztok se přefiltruje přes stříkačkový filtr do 2ml vialky.

5.2.2 Extrakce kyselinou octovou s následným přečištěním pomocí SPE

Do 15ml centrifugační zkumavky se naváží 50 mg makoviny. Přidá se 5 ml roztoku kyseliny octové (8) a zkumavka se uzavře. Vloží se do ultrazvukové lázně a vzorek se 30 min extrahuje. Následně se obsah zkumavky míchá 1 min na minitřepačce. Poté se vzorek odstředí 10 min při 3900 ot/min. Takto připravený extrakt se přečistí na pevné fázi. Na manifold se umístí SPE kolonka, kondicionuje se 3 ml methanolu (11) a následně ekvilibruje 3 ml vody (1). Poté se na kolonku nanese 3 ml připraveného extraktu. Extrakt se nechá vsáknout, promyje se 2 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (10) a 2 ml methanolu (11). Eluce morfinu a dalších opiových alkaloidů se provede 2 × 2 ml eluční směsí (12). Eluát se jímá do 5ml extrakční vialky. Ta se umístí do koncentrátoru vzorků, kde se eluát odpaří pod proudem dusíku při 40 °C. K odparku se přidá 1 ml methanolu (11), rozpustí se pomocí ultrazvuku a převede do 2ml vialky.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50250.1 – Stanovení obsahu vybraných opiových alkaloidů metodou HPLC	Revize	1

5.3 Stanovení kapalinovou chromatografií

5.3.1 Chromatografické podmínky

Vlastní analýza se provádí metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím UV/VIS detektoru. Alkaloidy se separují gradientovou elucí na chromatografické koloně s reverzní fází. Detekce probíhá při 284 nm. Příklad možného nastavení chromatografických podmínek, včetně nastavení gradientového programu, je uveden v tabulkách č. 1 a č. 2.

Tabulka č. 1. Příklad chromatografických podmínek.

Kolona	Poroshell 120 EC-C18 (50 mm × 4,6 mm ID, 2,7 μm)
Předkolona	Poroshell 120 EC-C18 (4,6 mm × 5 mm ID, 2,7 μm)
Mobilní fáze	Mobilní fáze A: Acetonitril (13) Mobilní fáze B: Heptansulfonát sodný (14)
Průtok mobilní fáze	1,0 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Objem nástřiku	1 μl
Detekce	UV 284 nm

Tabulka č. 2. Gradientový program pro stanovení morfinu a dalších opiových alkaloidů.

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	20	80
5	30	70
10	40	60
12	50	50
15	20	80

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50250.1 – Stanovení obsahu vybraných opiových alkaloidů metodou HPLC	Revize	1

5.3.2 Příprava kalibračních roztoků morfinu

Do 2ml tmavých šroubovacích vialek se odměří postupně (5; 10; 50; 100; 200; 300; 400) µl morfinu (17). Vialky se umístí do koncentrátoru vzorků, kde se methanol odpaří pod proudem dusíku při 40 °C. Do každé vialky se pak k odparku přidá 1 ml methanolu (11) a rozpustí se pomocí ultrazvuku. Získají se tak kalibrační roztoky o koncentraci (5; 10; 50; 100; 200; 300; 400) µg/ml. Kalibrační roztoky se připravují čerstvé v den analýzy.

5.3.3 Kvalitativní a kvantitativní analýza

Morfin a případně další alkaloidy se identifikují porovnáním retenčních časů standardů s retenčními časy píků v analyzovaném vzorku. Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnějšího standardu. Pro stanovení morfinu v makovině se připraví nejméně pětibodová kalibrační křivka v rozsahu 5 µg/ml až 400 µg/ml morfinu v methanolu (18).

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah morfinu ve vzorku se vypočítá z kalibrační závislosti. Sestrojí se graf závislosti plochy píku morfinu na koncentraci v požadovaném rozsahu. Ze směrnice kalibrační přímky se zjistí koncentrace morfinu a jeho obsah vyjádřený v procentech se vypočítá v závislosti na použití extrakční metody podle níže uvedených vztahů.

a) extrakce za použití extrakční směsi

$$x = \frac{100 \times c \times V \times 10^{-6}}{m} \quad (\%)$$

b) extrakce 5% kyselinou octovou s následným přečištěním pomocí SPE

$$x = \frac{100 \times c \times V \times 10^{-6}}{m \times V_1} \quad (\%)$$

kde x je obsah morfinu ve vzorku v %,

c je koncentrace morfinu zjištěná z kalibrační závislosti v µg/ml,

V celkový objem extraktu v ml,

V₁ objem extraktu nanesený na SPE kolonku v ml,

m navážka vzorku v g,

10⁻⁶ konverzní faktor pro přepočet z µg na g.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50250.1 – Stanovení obsahu vybraných opiových alkaloidů metodou HPLC	Revize	1

Výsledek stanovení obsahu morfinu se udává jako průměr ze dvou paralelních stanovení. Uvádí se v % a je vyjádřen na dvě desetinná místa.

7 Literatura

- 1 Yoshimatsu, K., Kiuchi, F., Shimomura, K., Makino, Y.: A Rapid and Reliable Solid-Phase Extraction Method for High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Opium Alkaloids from Papaver Plants. Chem. Pharm. Bull. 53(11), 2005, str.1446-1450.
- 2 Zukalová, H., Cihlář, P., Kosek, Z.: Požadavky na kvalitu makoviny, kvantitativní stanovení morfinu v makovině. 4. Makový občasník. Sborník odborných seminářů „Mák v roce 2005“, 1. vydání, ČZU Praha, 2005, 59-62.