

Krzysztof Michalski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Poznaniu

Oznaczanie morfiny w dojrzałych pustych makówkach za pomocą NIRS dla potrzeb prac hodowlanych

Measuring of morphine content in ripe empty poppy capsules by NIRS method for breeding purposes

Słowa kluczowe: morfina, analiza NIR, narkotyki, mak oleisty

Keywords: morphine, analysis NIR, narcotics, oilseed poppy

Nasiona maku lekarskiego i jego wersji niskomorfino-
wej używane są szeroko w piekarnictwie i przemyśle spożywcym. Mimo wprowadzenia odmian niskomorfino-
wych nadal konieczna jest kontrola pól makowych na zawartość morfiny, a to z uwagi na sprowadzane z zagranicy nasiona maku lekarskiego o wysokiej zawartości morfiny. Nasiona te pozostają zdolne do kiełkowania, co powoduje ryzyko ich zasiania. Celem pracy było sprawdzenie możliwości zastosowania metody NIR do oznaczania morfiny. Użyto 200 próbek makowin o zmienności morfiny w zakresie 0,02 do 2,46%. Wykonano kalibracje dla całego zakresu i podzakresu 0,02–0,12%. Kalibracja dla całego zakresu wykazuje wysoką korelację, lecz daje za duży błąd, obniżenie zakresu pomiarowego pozwoliło osiągnąć lepszą estymację wyników dla maku niskomorfino-
wego. Metoda nadaje się do screeningu materiałów hodowlanych.

Seeds of medicine poppy and low morphine poppy are widely used in food industry. Although the low morphine varieties were introduced some years ago, it is still necessary to control growing plants due import of fertile poppy seeds from abroad. The aim of the study was testing the opportunity of applying of NIR method for morphine estimation. 200 samples were used as calibration set ranging in morphine content from 0.02% to 2.46%. Calibration covering full range, although with good correlation coefficient ($R = 0.95$) and standard error ($SEC = 0.13$), was too rough for low morphine varieties, thus additional calibration for range 0.02–0.12% was calculated ($SEC = 0.008$, $R = 0.85$). The results of the second calibration qualify it as a screening method for breeding purposes for low morphine content.

Wstęp

Nasiona maku lekarskiego i jego wersji niskomorfino-
wej używane są szeroko w piekarnictwie i przemyśle spożywcym. Mimo wprowadzenia odmian niskomorfino-
wych nadal konieczna jest kontrola pól obsianych makiem i badanie zawartości morfiny, a to z uwagi na sprowadzane z zagranicy nasiona maku

lekarskiego o wysokiej zawartości morfiny. Nasiona posiadają pełną zdolność do kiełkowania, co powoduje ryzyko zakładania nielegalnych plantacji oraz zanieczyszczenia pól samosiewami.

Zawartość morfiny kontroluje się za pomocą metod analitycznych opartych na analizie spektrometrycznej lub chromatograficznej wyciągów z makowin. Pierwsza z metod, spektrometryczna, której podstawową reakcją opisał Lautenschlager (1919) została rozwinięta w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych przez Wegnera (1950, 1951, 1953, 1954), Koppa (1959, 1961, 1962), Achora (1954) i Pfeifera (1956, 1962, 1958, 1955). Badania prowadzili także Horak (1962), Trojanek (1965), Fromming (1962), Poethke (1951, 1949), Romisch (1958), Barheim (1958), Pinxteren (1963), Hassan (1960). Jest ona tania i precyzyjna, ale pozwala określić tylko sumę alkaloidów, co spełnia wymogi ustawowe, lecz nie zawsze satysfakcjonuje hodowców. W IHAR analiza kolorymetryczna została wprowadzona w latach sześćdziesiątych (Krzymański 1967). Niemniej jest ona z powodzeniem stosowana do dziś, po modyfikacjach (Czernik-Kołodziej 1999) mających na celu zmniejszenie udziału szkodliwych odczynników. Inne metody to, podstawowa, oparta na chromatografii HPLC — Venkateshwaran (1995), Gomez-Serranillos (1994) oraz chromatografia gazowa — Mitsui (1995), chromatografia cienkowarstwowa — Jiang (1995), elektroforeza kapilarna — Bjornsdottir (1995), Trenerry (1995). Analiza chromatograficzna pozwala określić zawartość poszczególnych alkaloidów, ale jest bardziej pracochłonna i kosztowna. Brak na razie metody instrumentalnej, która pozwoliłaby szybko i dokładnie określić zawartość morfiny.

W pracy podjęto próbę zastosowania analizy spektrofotometrycznej w bliskiej podczerwieni do analizy morfiny.

Materiały i metody

Do analizy użyto ogółem 200 próbek makowin, zmielonych na proszek. Próbkę pochodziły z zasobów IHAR i Hodowli Roślin Strzelce ze zbioru w 2001 roku. Została w nich oznaczona morfina, stosowaną w Laboratorium Biochemicznym IHAR metodą spektrofotometryczną (Czernik-Kołodziej 1999). Zawartość morfiny mieściła się w zakresie 0,02 do 2,46%. Widma zeskanowano za pomocą spektrofotometru NIR Systems 6500 w zakresie 400–2500 nm. Obliczenia matematyczne i kalibrację wykonano za pomocą pakietu WINISI II wersja 1.50. Zastosowano metodę analizy głównych składowych PCA, która do obliczenia równania regresji wykorzystuje wszystkie zmienne widma.

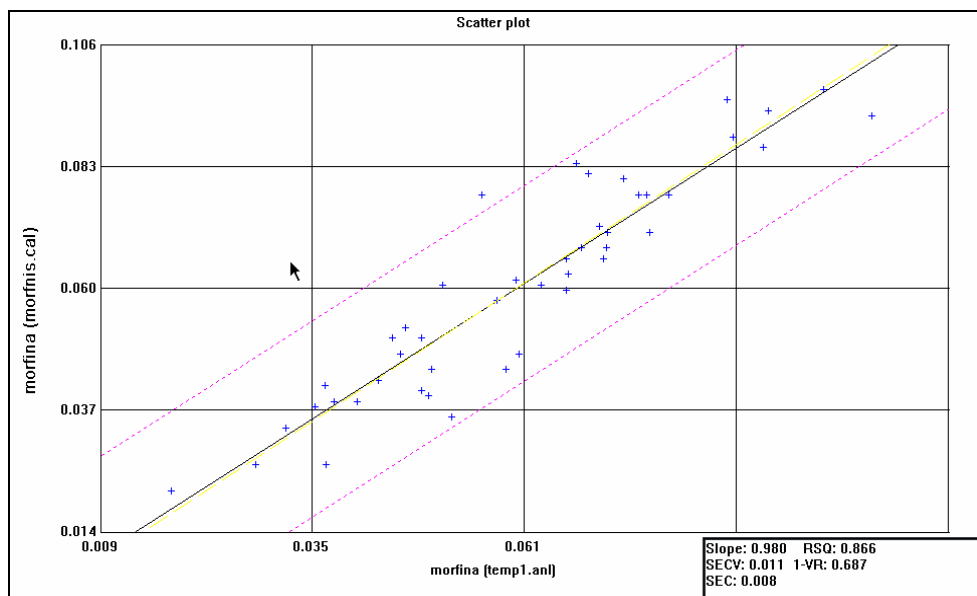
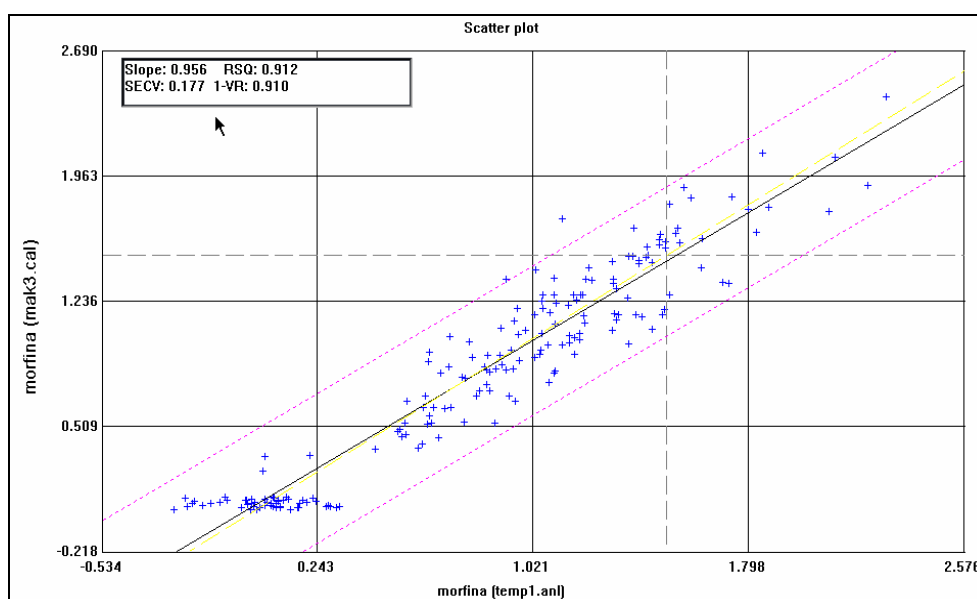
Rys. 1. Kalibracja dla maku niskomorfynowego — *Calibration for low morphine poppy*Rys. 2. Kalibracja dla maku wysokomorfynowego — *Calibration for high morphine poppy*

Tabela 1

Statystyka równań korelacji — *Equation's statistic*

Wyszczególnienie <i>Specification</i>	Mak niskomorfinowy <i>Low morphine poppy</i>	Mak wysokomorfinowy <i>High morphine poppy</i>
Liczba próbek — <i>Number of samples</i>	45	192
Średnia wartość — <i>Mean value</i>	0,0607	0,8325
Zakres zmienności — <i>Data range</i>	0,02–0,12	0,02–2,60
SEC	0,008	0,1326
R	0,85	0,95
SECV	0,011	0,18
1-VR	0,69	0,91

Dyskusja

- Wykonana kalibracja dla całego zakresu, której wyniki pokazano w tabeli 1 i na rysunku 2 wykazuje dobrą korelację i błąd, który niestety jest w całym zakresie wielokrotnie wyższy od błędu metody referencyjnej oraz od dokładności niezbędnej przy selekcji odmian niskomorfinowych.
- Kalibracja wykonana tylko dla makowin roślin niskomorfinowych daje znacznie lepsze wyniki, ale obejmuje tylko mały zakres — wystarczający przy hodowli tego typu odmian.
- Nie udało się otrzymać równania, które byłoby liniowe w zakresie 0,02–0,3%.
- Jak widać na rysunku 2 w zakresie niskiej zawartości morfiny równanie pełnozakresowe (0,02–2,6%) nie zachowuje liniowości, a wszystkie próby z niską zawartością morfiny grupują się na jednym poziomie wartości wyliczonej.
- Otrzymane równania mogą służyć do analizy screeningowej materiałów hodowlanych.

Discussion

- Full range calibration, results of which are shown in Table 1 and Fig. 2 is giving good correlation, but Standard error is much higher than error of reference method and not suitable for selection of low morphine poppy.
- Calibration calculated for low morphine poppy capsules is giving much better results, but cover only small range – although it is sufficient for breeding low morphine varieties.

- It was impossible to get linear equation for range 0,02–0,3%.
- As it is presented on Fig. 2, for low morphine range, the full range calibration did not keep linearity, and all low morphine samples are estimated on the same level.
- Obtained equations could be used as screening method for breeding materials.

Literatura

- Achor L.A., Geiling E.M.K. 1954. Isolation and purification of submicro quantities of morphine. *Anal. Chem.* 26/6: 1061-1062.
- Barheim, Svendsen A.B., Kolboe T. 1963. Zur quantitativen Bestimmung des Morphins in Mohnkapseln als dinitrophenyl aether. *Norsk Farmaceutisk Selskap.* 8: 117-123.
- Bjornsdottir I., Hansen S.H. 1995. Determination of opium alkaloids in opium by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (4-5): 687-693.
- Chang W.B., Zhang B.L., Lu N.Q., Ci Y.X. 1995. The chemiluminescent detection of morphine. *Fenxi Shiyanshi* 14 (1): 1-5.
- Czernik-Kołodziej K., Krzymański J., Michalski K. 1999. Modyfikacja oznaczania morfiny w makuwinach metodą kolorymetryczną w postaci związku dwuazowego. *Rośliny Oleiste XX* (2): 591-598.
- Fromming K.H., Schenck G., Kluge H.J. 1962. Quantitative Bestimmung einiger Inhaltsstoffe in Mohnkapseln (*Papaver Somniferum* L.). *Deut. Apoth. Zeit.* 102: 1276-1277.
- Gomez-Serranillos P., Carretero E., Villar A. 1994. Analysis of poppy straw and poppy straw concentrate by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 5 (1): 15-18.
- Hassan S.S.M., El-Naby E.H., Elnemma E.M. 1960. Kinetic determination of morphine in illicit powders, using a fluoride-selective electrode, based on reaction with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Mikrochim. Acta* 124 (1-2): 55-62.
- Horak P., Holoubek J., Bumba V., Cekan Z. 1962. Methoden zur Trennungen von Naturstoffen Bestimmung von Morphin in Mohnkapsel Extrakten. *Czechoslov. Chem. Commun.* 27: 1037-1042.
- Jiang S.X., He Y.X., Guo P.J., Zhou Y.X. 1995. Detection of opium alkaloids by thin-layer chromatography. *Yaowu Fenxi Zazhi* 15 (3): 46-47.
- Kopp E., Kotilla E., Csedo K. 1959. Mikrochemische Bestimmung des Morphingehalte reifer Mohnkapseln mittels einer nephelometrischen Methode. *Die Pharmazie* 5: 263-265.
- Kopp E.W., Kotilla E., Csedo K., Matyas S. 1961. Weitere Versuche zur Zuchtjung einer alkaloidreichen Mohnsorte. *Die Pharmazie* 4: 224-231.
- Kriz D., Mosbach K. 1995. Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilized molecularly imprinted polymer. *Anal. Chim. Acta* 300 (1-3): 71-75.
- Krzymański J., Przyłuska F. 1967. Wstępne badania nad wpływem stopnia dojrzałości maku niebieskiego KM na zawartość morfiny. *Biuletyn IHAR* 6: 119-122.
- Lautenschlager L. 1919. Die Diazooreaktion des Morphiums. *Arch. Pharmaz.* 257/19: 13-18.
- Li W., Zhang X., Chen J., Jiang J. 1994. Determination of morphine in pulverized opium by thin-layer chromatographic scanning. *Fenxi Shiyanshi* 13/1: 92-93.

- Mitsui T., Hida M., Fujimura Y. 1995. Determination of the total amount of morphine alkaloids in opium by pyrolysis-gas chromatography using principal component analysis. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 32: 205-212.
- Niezmany 1940. Über den Alkaloidengehalt der Moonkapseln. *De los Anales E. Merck* 29-40.
- Pfeifer S. 1956. Über die Bestimmung des Morphins in einzelnen Mohnkapseln oder teilen derselben. *Die Pharmazie* 11: 387-390.
- Pfeifer S. 1958. The quantitative assay of the principal alkaloids in the poppy and in opium by micro-measurement. *Bull. Narc.* 3: 18-33.
- Pfeifer S., Keller W. 1956. Polarographische Morphin Bestimmung in Mohnkapseln. *Pharm. Zentr.* 5: 190-193.
- Pfeifer S., Weiss F. 1955. Über die Bestimmung des Morphins in Mohnkapseln. *Die Pharmazie* 12: 701-708.
- Pinxteren J.A.C., Verloop M.E. 1963. Die Bestimmung von Morphin in Mohnkapseln durch Oxydation zu pseudomorphin mittels Kaliumferritzyanid. *Pharm. Acta Helv.* 38: 437-441.
- Poethke W., Arnold E. 1949. Über die Bestimmung des Morphins in Mohnkapseln. *Pharmaz. Zentr.* 88/1: 1-5.
- Poethke W., Arnold E. 1951. Untersuchungen über den Morphingehalt der Mohnpflanze. *Die Pharmazie* 8: 406-420.
- Poethke W., Arnold E. 1951. Über die Bestimmung des Morphins in Mohnkapseln und anderen Teilen der Mohnpflanze. 2 Mitteilung *Pharmaz. Zentr.* 90/5: 146-151.
- Pruner G. 1958. Determination of morphine in poppy capsules. *Bulletin of Narcotics* 10/3 34-36.
- Pruner G. 1959. Determinazione della morfina nelle capsule di papavera. *Estratto dai Rendiconti* 22: 710-716.
- Remberg B., Krenn L., Kopp B., Buchbauer G., Nikiforov A. 1994. Principal component analysis (PCA) of opium alkaloid contents for origin determination. *Pharmazie* 49 (10): 766-768.
- Romisch H.H. 1958. Morphin aus Grunmohn. *Pharmazie* 13: 769-777.
- Rondina R.V.D., Bandoni A.L., Coussio J.D. 1973. Quantitative determination of morphine in poppy capsules by differential spectrophotometry. *J. Pharmac. Sci.* 62/3: 502-504.
- Trenerry V.C., Wells R.J., Robertson J. 1995. Determination of morphine and related alkaloids in crude morphine, poppy straw and opium preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr.* 718 (1): 217-225.
- Trojanek J., Kavka F., Vit J., Cekan Z. 1965. Isolierung von Morphin aus Mohnkapseln. *Die Pharmazie* 3: 172-175.
- Wegner E. 1950. Beitrag zur photometrischen Bestimmung der Mohnalkaloiden. *Pharmazie* 5/1: 648-650.
- Wegner E. 1950. Beitrag zur photometrischen Bestimmung der Mohnalkaloide. *Pharmazie* 5/9: 445-447.
- Wegner E. 1951. Beitrag zur photometrischen Bestimmung der Mohnalkaloide. 3 Mitteilung. *Pharmazie* 2: 55-57.
- Wegner E. 1953. Vergleichende Untersuchungen über die Verteilung des Morphins in den Vegetationsorganen, 'gekopfer' and normaler Mohnpflanzeln. *Pharmazie.* 8/10: 839-845.
- Wintersteiger R., Barary M.H., EI-Yazbi F.A., Sabry S.M., Wahbi A-A.M. 1994. Fluorometric determination of morphine in codeine. *Spectrosc. Lett* 27 (10): 1447-1460.