

**Krzysztof Michalski**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Poznaniu

## **Jakościowe oznaczanie morfiny, kodeiny i tebainy w makowinach metodą HPLC do celów hodowlanych**

### **HPLC qualitative analysis of morphine, codeine and thebaine in poppy capsules for breeding purposes**

Słowa kluczowe: alkaloidy, morfina, tebaina, kodeina, folkodyna, analiza chromatograficzna, HPLC

Hodowla maku ma na celu zarówno wyhodowanie maków o niskiej zawartości alkaloidów (poniżej 0,05% morfiny), jak i selekcję odmian dla celów medycznych charakteryzujących się wysoką zawartością niektórych alkaloidów (morfina, tebaina). Stosowana dotychczas kolorymetryczna metoda oznaczania zawartości morfiny nie uwzględnia pozostałych alkaloidów. Ponieważ jednym z celów w hodowli maku jest mak wysokotebainowy zmodyfikowano metodę chromatografii cieczowej do seryjnych analiz składu alkaloidów w makowinach, aby dostarczyć hodowcom narzędzia do selekcji nowych genotypów maku o pożądanym cechach

Key words: alkaloids, morphine, thebaine, codeine, pholcodin, chromatographic analysis, HPLC

Modern poppy seed breeding target is obtaining new varieties with low alkaloid content (below 0.05% morphine) and varieties with high content of some alkaloids (morphine, thebaine) for medical purposes as well. Colorimetric method used until now allows only morphine estimation, without other existing alkaloids. One of the main targets of contemporary poppy seed breeding is development of the varieties with high thebaine yield. HPLC method was adopted for alkaloid analysis. Samples were extracted with the method developed for colorimetric analysis of morphine content and extract was injected into HPLC column C18 BDH. Alkaloids were eluted by gradient acetonitrile : phosphate buffer (pH = 3.8). Signal from diode array detector was measured at 230 nm. During method development alkaline elution (Gomez-Serranillos) and acidic elution (Singh) were examined as well. Due to the problems with columns stability the acidic method was selected and optimized. Analysis by acidic method is comparatively cheaper and faster. The resolution is good. The calibration coefficients against pholcodine were calculated and applied for estimation of alkaloid composition. The method is environmentally safe. The developed method provides plant breeders with a tool for selection of new varieties with desired alkaloid content and composition.

## **Wstęp**

Hodowla maku ma na celu zarówno wyhodowanie maków o niskiej zawartości alkaloidów (poniżej 0,05% morfiny), jak i selekcję odmian charakteryzujących się wysoką zawartością niektórych alkaloidów (morfina, tebaina) dla celów me-

dycznych (Bernath 1998). Stosowana dotychczas kolorymetryczna metoda analizy zawartości morfiny nie uwzględnienia pozostałych alkaloidów (Krzymański, Przyłuska 1967; Michalski, Kołodziej 1997). Do oznaczania składu alkaloidów stosuje się różne odmiany wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej w odwróconej fazie (Gomez 1994, Singh 2000, Trenerry 1995, Shoyama 1998). Najczęściej stosowane są kolumny C18 w szerokiej gamie dostępnych na rynku wersji. Z uwagi na zróżnicowaną polarność poszczególnych alkaloidów wskazana jest elucja gradientowa. Silnie polarny eluent (woda, bufor fosforanowy (Singh), octan amonu (Gomez-Serranillos)) modyfikowany jest metanolem lub acetonitrylem, aby rozciągnąć chromatogram i lepiej rozdzielić piki poszczególnych alkaloidów. Ponieważ jednym z celów w hodowli maku jest mak wysokotebainowy zmodyfikowano metodę chromatografii cieczowej do rutynowej analizy składu alkaloidów w makowinach, aby dostarczyć hodowcom narzędzia do selekcji nowych genotypów maku o pożądanym składzie.

## **Materiały i metody**

---

Do oznaczeń zastosowano chromatograf cieczowy HP 1090 z detektorem „diode array” (DAD) pozwalającym na pomiar absorpcji w całym widmie lub jego wycinkach. Materiały badawcze pochodziły z kolekcji IHAR. Ekstrakcję alkaloidów prowadzono wykorzystując metodykę opracowaną dla metody kolorymetrycznej (Krzymański, Przyłuska 1967; Michalski, Kołodziej 1997). Rozdziału alkaloidów makowych dokonywano pracując w odwróconych fazach. Sygnał frakcji opuszczających kolumnę mierzono za pomocą spektrometru DAD przy długości fali 230 nm (został dobrany na podstawie widm czystych składników). Dane opracowano za pomocą oprogramowania chromatograficznego Chemstation. Do ustalenia czasów retencji użyto wzorce czystych alkaloidów — tebainę, morfinę i kodeinę zakupione wcześniej z Polfa — Kutno oraz folkodynę (Smith-Macfarlane).

Kolumny Hypersil BDH C18, Zorba C18 oraz Avanti BDH C18 zakupiono w firmie Altech.

## **Wyniki**

---

### **Preparatyka próbki**

#### **Ekstrakcja alkaloidów z makowin i wstępne oczyszczenie**

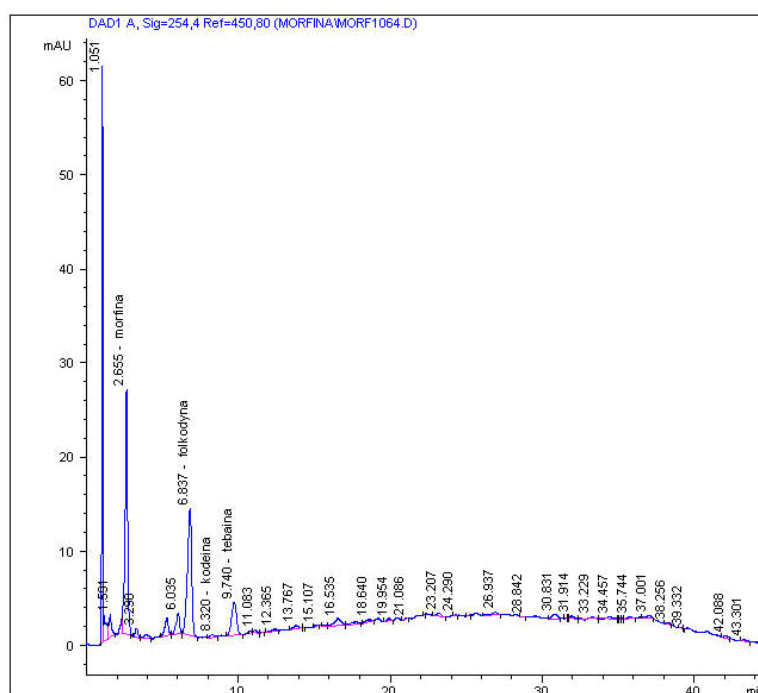
Próbkę 0,5 g roztartych makówek mieszano z węglanem sodu, dodawano 1 ml roztworu heksan – n-butanol (5 : 13), po czym mieszaniną nabijano kolumnę ekstrakcyjną (30 cm × 1 cm) zakorkowaną sączkiem z waty. Alkaloidy ekstrahowano

15 ml roztworu heksan – butanol. Z przecieku pobierano 2 ml roztworu i odparowywano do sucha pod strumieniem powietrza. Osad rozpuszczano w 2 ml buforu fosforanowego lub octanu amonu, w zależności od fazy ciekłej stosowanej do elucji narkotyków z kolumny HPLC, a następnie roztwór przesączało przez bibułę filtracyjną.

Otrzymany przesącz podawano na kolumnę przez zawór dozujący (20  $\mu$ l) chromatografu. Sygnał mierzono przy długości fali 230 nm wybranej na podstawie analizy widm czystych alkaloidów.

### Rozdział chromatograficzny

W pierwszym etapie badań zastosowano metodę rozdzielania przy wysokim pH, opisaną przez Gomez-Serranillosa i in. (1994). Użyto kolumny Hypersil BDS C18 15  $\mu$ M 150  $\times$  4,6 mm. Do ekstraktu dodawano folkodynę jako wzorec wewnętrzny otrzymując zadowalające rozdzielanie (rys. 1), przy czym czas trwania jednej analizy wynosił 40 minut. Do elucji użyto układu rozpuszczalników: (A) metanol – (B) wodny roztwór octanu amonu + metanol (33:67) o pH 10,5; skład eluentu zmieniano gradientowo od 10 do 30% składnika A. Na podstawie posiadanych wzorców (morfina, tebaina, kodeina i folkodyna) ustalono położenie pików, a obróbkę ilościową wyników ograniczono do analizy składu alkaloidów. Przykładowy



Rys. 1. Analiza roztworu wzorców alkaloidów metodą zasadową — *Alkaloids standards solution analysis by basic method*

rozdział pokazano na rysunku 1. Użyta kolumna (Hypersil C18 BDS) wytrzymała około 200 rozdzielów, gdyż okazała się nieodporna na wysokie pH. Podjęto więc próbę z kolumną Zorbax C18 odporną na wysokie pH, lecz otrzymane za jej pomocą rozdziały były niezadowalające, podobnie niezadowalające wyniki uzyskano na innych testowanych kolumnach C18.

Trudności z dobraniem kolumny odpornej na wysokie pH spowodowały, że zdecydowano się na przebadanie alternatywnej metody rozdzielu chromatograficznego w środowisku kwaśnym (pH = 3–3,8) w układzie eluentów: acetonitryl – bufor fosforanowy (20 : 80) przy pH = 3,8 (Singh 2000). Metodę tę zmodyfikowano wprowadzając wymywanie gradientowe, aby lepiej oddzielić pik morfiny od zanieczyszczeń oraz uzyskać czas rozdzielu nie przekraczający 20 minut. W wyniku opracowano wymywanie w gradiencie podanym w tabeli 1.

Tabela 1

Zmodyfikowana metoda elucji alkaloidów metodą kwaśną

*Modified method of elution of alkaloids by acidic method*

Wymywanie w gradiencie (zbiornik A — acetonitryl, zbiornik B — bufor fosforanowy o pH = 3,8)

*Gradient elution (tank A — acetonitrile, tank B — phosphate buffer pH = 3.8)*

Czas [min.] <i>Time</i>	Udział % buforu fosforanowego <i>Percent of phosphate buffer</i>
0	95
5,5	90
6	80
14	80
15	95
20	95

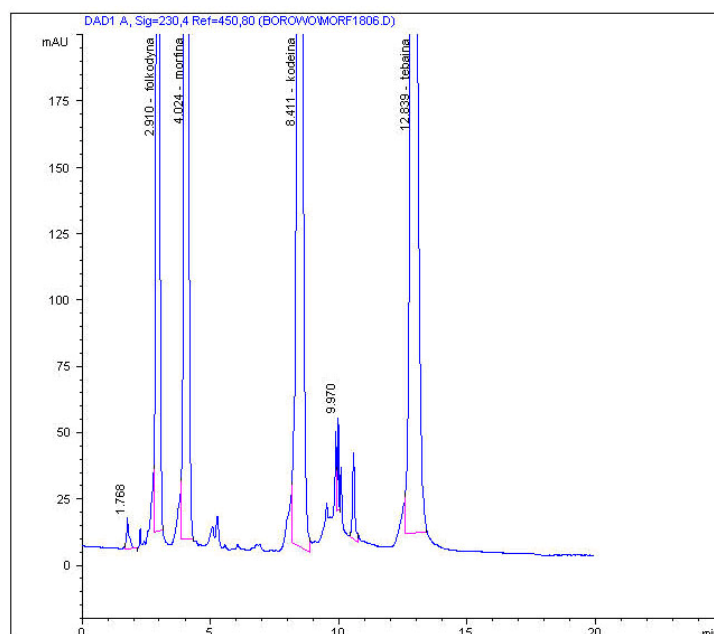
Wyniki analizy wzorcowej mieszaniny alkaloidów pokazuje rysunek 2, a analizę ekstraktu z makowin rysunek 3. Przy stosowaniu folkodyny jako wzorca wewnętrznego konieczne jest precyzyjne dobranie gradientu, aby rozdzielić folkodynę od morfiny. Na podstawie wzorców ustalono wzajemne współczynniki kalibracyjne (tab. 2), co umożliwiło oznaczenie składu alkaloidów w próbce. Za pomocą opracowanej metody przebadano serię próbek makowin dla potrzeb prac hodowlanych.

Ponieważ dla wstępnych prac hodowlanych wymagany jest głównie skład alkaloidów, ograniczono się do badania składu, rezygnując ze stosowania drogiego wzorca wewnętrznego potrzebnego do oznaczeń ilości poszczególnych alkaloidów w makowinach. Kolumna HPLC wytrzymała ok. 300 oznaczeń. Przeprowadzone próby przemywania jej izopropanolem pozwalały na przejściowe przywrócenie jej sprawności, jednak nie dało się w ten sposób przedłużyć znacząco jej użyteczności.

Tabela 2

Współczynniki kalibracyjne w odniesieniu do wzorca wewnętrznego (folkodyna)  
*Calibration coefficients against internal standard (pholcodine)*

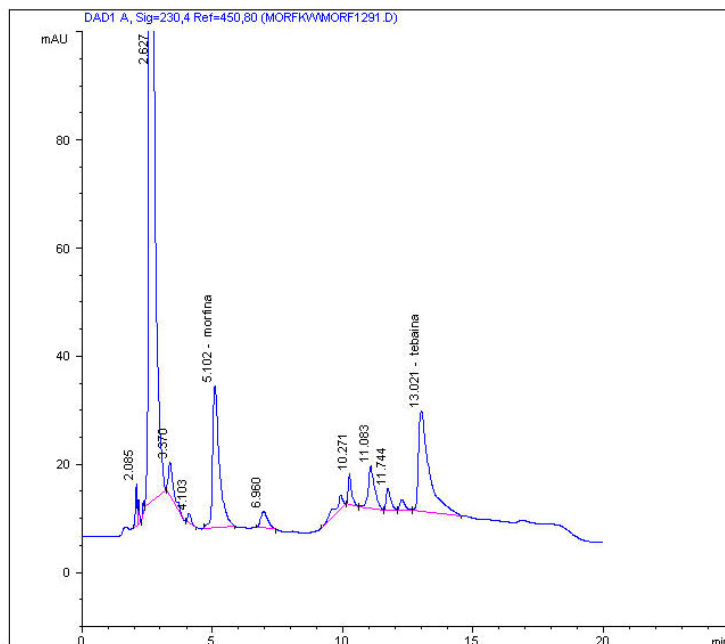
Alkaloid <i>Alkaloid</i>	Współczynnik kalibracyjny względem folkodyny <i>Calibration coefficient</i>	Czas retencji <i>Retention time</i>
Morfina — <i>Morphine</i>	1,273 ± 0,01	4,024
Kodeina — <i>Codeine</i>	1,422 ± 0,01	8,411
Tebaina — <i>Thebaine</i>	1,593 ± 0,02	12,839



Rys. 2. Analiza roztworu wzorców alkaloidów metodą kwaśną — *Alkaloids standards solution analysis by acidic method*

## Wnioski

1. Opracowana modyfikacja metody jest stosunkowo szybka i pozwala na określenie składu alkaloidów nawet w pojedynczej makówce.
2. Możliwe jest stosowanie niedrogich kolumn, a odczynniki używane do elucji są tanie i niegroźne dla środowiska
3. Metoda jest wystarczająca do pierwszej fazy selekcji polegającej na wyszukiwaniu roślin o dominującej zawartości jednego z alkaloidów.



Rys. 3. Analiza alkaloidów wyekstrahowanych z makowin (mak wysokomorfiny) metodą kwaśną  
*Analysis of alkaloids extracted from poppy seed capsules (high morphine poppy) using acidic method*

## Literatura

- Bernath J. 1988. The Poppy, Genus papaver Harwood Academic Publishers Australia, 159-188.
- Singh D.V., Prajapati S., Verma R.K., Gupta M.M., Kumar S. 2000. Simultaneous Determination of important alkaloids in *Papaver Somniferum* Using Reversed Phase HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 23 (11): 1757-1764.
- Gomez-Serranillos P., Carretero E., Villar A. 1994. Analysis of Poppy straw and poppy concentrate by reversed phase High-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 5: 15-18.
- Michalski K., Kołodziej K. 1997. Zmodyfikowana metoda oznaczania zawartości morfiny w makowinach bez użycia benzenu. *Sprawozdanie roczne, niepublikowane*, 1-3.
- 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 chromatography. *J. Chromatogr.*, 718 (1): 217-225.
- Shoyama Y., Kawachi F., Tanaka H., Nakai R., Shibata T., Nishi K. 1998. Genetic and alkaloid analysis of *Papaver* species and their F<sub>1</sub> hybrid by RAPD, HPLC and ELISA. *Forensic Sci. Int.*, 91 (3): 207-217.
- Krzyżmański J., Przyłuska F. 1967. Wstępne badania nad wpływem stopnia dojrzałości maku niebieskiego KM na zawartość morfiny. *Biuletyn IHAR*, 6: 119-222.