

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA KOPRIVNIK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA KOPRIVNIK

RAZVOJ HITRE EKSTRAKCIJSKE METODE ZA
SEMIKVANTITATIVNO DETEKCIJO ALKALOIDOV V SEMENIH
VRTNEGA MAKA (*Papaver somniferum L.*)

THE DEVELOPEMENT OF RAPID EXTRACTION METHOD FOR
SEMIQUANTITATIVE DETECTION OF ALKALOIDS IN OPIUM
POPPY (*Papaver somniferum L.*)

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta in somentorstvom asist. dr. Matjaža Ravnikarja mag. farm. Meritve s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti je opravila asist. dr. Eva Tavčar Benković, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Samu Keftu za strokovno pomoč in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge, somentorju asist. dr. Matjažu Ravnikarju mag. farm. za pomoč, potrpežljivost in usmerjanje pri delu v laboratoriju in izdelavi diplomske naloge ter asist. dr. Evi Tavčar Benković, mag. farm. za opravljanje meritev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in svetovanje pri delu.

Najlepša hvala tudi staršem in vsem bližnjim, ki so mi bili v podporo med študijem.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta in somentorstvom asist. dr. Matjaža Ravnikarja mag. farm.

Sara Koprivnik

Ljubljana, september 2016

VSEBINA

SEZNAM SLIK	V
SEZNAM PREGLEDNIC	V
SEZNAM GRAFIKONOV	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD	1
1.1 VRTNI MAK.....	1
1.1.1 <i>Sistematika</i>	1
1.1.2 <i>Opis</i>	1
1.1.2.1 Rastlina	1
1.1.2.2 Mleček	1
1.1.2.3 Makova semena in olje	2
1.1.3 <i>Rastišča</i>	2
1.1.4 <i>Uporaba</i>	3
1.2 ALKALOIDI VRTNEGA MAK (OPIJEVI ALKALOIDI)	3
1.2.1 <i>Morfin</i>	3
1.2.2 <i>Kodein</i>	4
1.2.3 <i>Noskapin</i>	5
1.2.4 <i>Papaverin</i>	5
1.3 ALKALOIDI V SEMENIH VRTNEGA MAK	6
1.3.1 <i>Primeri zastrupitev</i>	7
1.3.2 <i>Vzrok za vsebnost alkaloidov v semenih</i>	8
1.3.3 <i>Priporočila in ocene tveganja</i>	9
1.3.3.1 Državni zakoniki.....	9
1.3.3.2 Nemški inštitut za ocenjevanje tveganj	9
1.3.3.3 Evropska agencija za varnost hrane.....	9
1.3.4 <i>Metode za zmanjševanje vsebnosti</i>	10
1.4 METODE DETEKCIJE ALKALOIDOV IZ MAKOVH SEMEN.....	11

1.4.1	<i>Tekočinska kromatografija v kombinaciji s tandemsko masno spektrometrijo na trojnem kvadrupolnem instrumentu</i>	11
1.4.2	<i>Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti</i>	11
1.4.3	<i>Tankoplastna kromatografija</i>	12
2	NAMEN	13
3	MATERIALI IN METODE	14
3.1	MATERIALI	14
3.1.1	<i>Rastlinski material</i>	14
3.1.2	<i>Standardi</i>	14
3.1.2.1	Standardne raztopine posameznih alkaloidov	14
3.1.2.2	Standardne raztopine vseh alkaloidov	15
3.1.3	<i>Kemikalije in reagenti</i>	15
3.2	METODE DELA	15
3.2.1	<i>Ekstrakcija opijevih alkaloidov iz makovih semen</i>	15
3.2.1.1	Ekstrakcija z vodo in organskim topilom	15
3.2.1.2	Ekstrakcija z aluminijevim oksidom	18
3.2.1.3	Ekstrakcija v nakisani vodi.....	19
3.2.1.4	Ekstrakcija v metanolu in nakisanem metanolu	19
3.2.1.5	Ekstrakcija v naalkaljenem etilacetatu	19
3.2.2	<i>Tankoplastna kromatografija</i>	19
3.2.2.1	Stacionarna faza.....	19
3.2.2.2	Mobilna faza	20
3.2.2.3	Nanos raztopin standardov in vzorcev.....	20
3.2.2.4	Razvijanje kromatografskih plošč	20
3.2.2.5	Detekcija alkaloidov	21
3.2.2.6	Retencijski faktorji	21
3.2.3	<i>Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti</i>	22
3.2.3.1	Stacionarna faza.....	22
3.2.3.2	Mobilna faza	22
3.2.3.3	Nanos raztopin standardov in vzorcev.....	22
3.2.3.4	Retencijski faktorji	22
3.2.3.5	Umeritvene premice	22

4	REZULTATI.....	23
4.1	TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA	23
4.1.1	<i>Optimizacija mobilne faze</i>	<i>23</i>
4.1.2	<i>Retencijski faktor ter meja detekcije.....</i>	<i>23</i>
4.1.3	<i>Kromatografija vzorcev.....</i>	<i>26</i>
4.1.3.1	Ekstrakcija z vodo in organskim topilom.....	26
4.1.3.2	Ekstrakcija z aluminijevim oksidom	28
4.1.3.3	Namakanju v vodi, (nakisanem) metanolu in etilacetatu	28
4.1.3.4	Ekstrakcija z vodo in organskim topilom in močno koncentriranje	29
4.2	TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI	31
4.2.1	<i>Optimizacija mobilne faze</i>	<i>31</i>
4.2.2	<i>Izbira medija za nanos standardov in vzorcev</i>	<i>31</i>
4.2.3	<i>Retencijski faktorji.....</i>	<i>31</i>
4.2.4	<i>Umeritvene premice.....</i>	<i>32</i>
4.2.5	<i>Kromatografija vzorcev po ekstrakciji z vodo in organskim topilom.....</i>	<i>32</i>
5	RAZPRAVA.....	34
5.1	RAZVOJ METODE EKSTRAKCIJE.....	34
5.2	PRIMERJAVA Z OSTALIMI METODAMI EKSTRAKCIJE	34
5.3	VSEBNOST VEZANIH IN NEVEZANIH ALKALOIDOV, IZGUBA ALKALOIDOV Z MLETJEM.....	35
5.4	VSEBNOST ALKALOIDOV V MAKOVIH SEMENIH	35
6	SKLEP	38
7	LITERATURA	39

SEZNAM SLIK

SLIKA 1: STRUKTURNA FORMULA MORFINA	4
SLIKA 2: STRUKTURNA FORMULA KODEINA	4
SLIKA 3: STRUKTURNA FORMULA NOSKAPINA.....	5
SLIKA 4: STRUKTURNA FORMULA PAPAVERINA	5
SLIKA 5: SHEMA POSTOPKA EKSTRAKCIJE Z VODO IN ORGANSKIM TOPILOM.....	16
SLIKA 6: KADIČKA MED RAZVIJANJEM TLC PLOŠČE	21
SLIKA 7: TLC STANDARDOV.....	24
SLIKA 8: TLC 10-KRAT REDČENIH STANDARDOV	25
SLIKA 9: TLC VZORCEV MAKOVIH SEMEN PO EKSTRAKCIJI Z VODO IN ORGANSKIM TOPILOM	27
SLIKA 10: TLC KONCENTRIRANIH VZORCEV PO EKSTRAKCIJI Z VODO IN ORGANSKIM TOPILOM IN STANDARDA	30
SLIKA 11: Rf MORFINA, KODEINA, PAPAVERINA IN NOSKAPINA PO VRSTI OD LEVE PROTI DESNI	32

SEZNAM PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: VZORCI MAKOVIH SEMEN.....	14
PREGLEDNICA II: KOLIČINA STANDARDA IN MASA POSAMEZNEGA ALKALOIDA GLEDE NA POZICIJO NA PLOŠČI	24
PREGLEDNICA III: KOLIČINA NANEŠENEGA STANDARDA IN MASE ALKALOIDOV GLEDE NA POZICIJO NA PLOŠČI	25
PREGLEDNICA IV: PODATKI O VZORCIH MAKOVIH SEMEN GLEDE NA POZICIJO NA KROMATOGRAFSKI PLOŠČI.....	27
PREGLEDNICA V: VSEBNOST ALKALOIDOV V VZORCIH MAKOVIH SEMEN.....	28
PREGLEDNICA VI: PODATKI O VZORCIH IN STANDARDU GLEDE NA POZICIJO NA TLC PLOŠČI	30
PREGLEDNICA VII: PRIMERJAVA REZULTATOV TLC IN HPLC ZA VSEBNOST ALKALOIDOV V MAKOVIH SEMENIH	37

SEZNAM GRAFIKONOV

GRAFIKON 1: UMERITVENE PREMICE ZA POSAMEZNE ALKALOIDE	32
GRAFIKON 2: VSEBNOST ALKALOIDOV V VZORCIH MAKOVIH SEMEN	33

POVZETEK

Semena vrtnega maka imajo pomembno mesto v živilski industriji. Zaradi potencialne visoke vsebnosti opijevih alkaloidov pa je njihova varnost ob uživanju vprašljiva. Dokaz so številna poročila, ki pričajo o posledicah uživanja makovih semen: pozitivni rezultati doping testiranja, vsebnost opijevih alkaloidov v krvi in urinu v količinah nad dovoljeno mejo in celo zastrupitve, ki vključujejo smrtne primere.

Ker še vedno ni splošnega zakona, ki bi določal zgornjo mejo za vsebnost posameznih alkaloidov v makovih semenih, je nadzor makovih semen temu primerno slab. Na trgu so tako na eni strani na razpolago semena z zelo nizko, skoraj ničelno vsebnostjo alkaloidov, in na drugi strani z zelo visoko, potrošnikom nevarno količino alkaloidov.

Razvitih je bilo že precej metod ugotavljanja alkaloidov v semenih vrtnega maka, vendar v nam dostopni literaturi ni nobene zelo enostavne, poceni in hitre metode, ki ne bi zahtevala posebnih in dragih aparatov. V ta namen smo razvili in optimizirali metodo, ki ima vse našete lastnosti in je primerna za semikvantitativno določanje najpomembnejših alkaloidov v makovih semenih. Lahko se uporablja za laboratorijske in didaktične namene ter za rutinsko preverjanje kakovosti v živilski industriji.

Metoda ekstrakcije in detekcije alkaloidov v makovih semenih poteka v dveh fazah. V prvem delu smo s pomočjo ekstrakcije z vodo in etilacetatom iz semen izolirali alkaloidne in jih nato skoncentrirali z uparjanjem pri znižanem tlaku. V drugem delu pa smo jih ločili s tankoplastno kromatografijo (TLC) in detektirali z Dragendorffovim reagentom, ki alkaloidne obarva. Rezultate smo preverili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

Z razvito in optimizirano metodo smo izmerili vsebnost štirih pomembnih alkaloidov v sedmih vzorcih makovih semenih. Najvišja izmerjena vsebnost morfina v vzorcih je bila 4 mg/kg semen, najvišja vsebnost kodeina in papaverina 2 mg/kg ter najvišja vsebnost noskapina 0,5 mg/kg semen. Glede na trenutno veljavna priporočila in smernice smo iz rezultatov meritev vzorce semen označili za varne.

Pri analizi meritev smo ugotovili, da so bila semena z najvišjo vsebnostjo alkaloidov turškega izvora, semena z najmanj alkaloidi pa slovenskega porekla. Pri primerjavi vsebnosti alkaloidov v nabranih in kupljenih semenih nismo opazili bistvenih razlik. Velike razlike pa so se pokazale pri meritvah celih in mletih semen. Mleta semena so namreč pokazala

bistveno nižjo vsebnost alkaloidov kot cela, kar pomeni, da mletje zmanjša vsebnost alkaloidov v makovih semenih.

S primerjanjem rezultatov vsebnosti alkaloidov v celih semenih, mletih predhodno spranih semenih in mletih še nespranih semenih smo ugotovili, da semena sama po sebi vsebujejo zelo malo ali pa nič alkaloidov. Semena se namreč kontaminirajo ob stiku z mlečkom in tako vsebujejo alkaloidne le na svojem površju. S spiranjem bi tako lahko odstranili večino alkaloidov iz makovih semen.

Ključne besede: *Papaver somniferum L.*, makova semena, opijski alkaloidi, morfin, kodein, papaverin, noskapin, ekstrakcija, tankoplastna kromatografija, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

ABSTRACT

Poppy seeds have an important role in food industry. However, the safety of their consumption is questionable due to high content of opium alkaloids. Many reports have shown the consequences of consuming poppy seeds: positive doping tests, contents of opium alkaloids in blood and urine in amounts over the permitted limit, and also poisonings that included cases of death.

There is no general law which would establish the upper limit of alkaloid content in poppy seeds and this leads to poor control of poppy seeds on the market. On one hand there are seeds with very little or no alkaloids and on the other hand there are seeds that contain hazardous amounts of alkaloids which are dangerous for the consumers.

There have been many different methods developed for detecting alkaloids in poppy seeds, yet none of them is simple, inexpensive and fast according to the accessible literature. So we have developed and optimized a method that has all of these enumerated properties and enables semi-quantification of the most important alkaloids in poppy seeds. It can be used for laboratory and educational purposes and also for routine verification of food quality.

The method of extraction and detection of alkaloids in poppy seeds consists of two parts. First, we extracted alkaloids from the seeds using water and ethyl acetate. Then we concentrated extracts by evaporation at reduced pressure. In the second part, we separated

alkaloids with thin layer chromatography (TLC) and detected them with Dragendorff's reagent that colors the alkaloids. We verified the results with high pressure liquid chromatography (HPLC).

We measured the content of four important alkaloids in seven different poppy seed samples by using this method. The highest measured contents were: 4 mg/kg of morphine, 2 mg/kg of codeine and papaverine and 0,5 mg/kg of noscapine. The level of alkaloids in our seeds was in accordance with current guidelines and recommendations, so we assessed them as safe.

The analysis of the results has shown that the seeds with the highest alkaloid contents were from Turkey and those with the lowest from Slovenia. The comparison of alkaloid contents of purchased seeds in the store and those collected from the field showed no significant difference. However a big difference was noted between poppy seeds that were whole and those that were ground. Ground poppy seeds showed significantly lower alkaloid content in comparison with whole ones. That means that grinding of poppy seeds can reduce their alkaloid content.

We also compared alkaloid content of whole poppy seeds, ground poppy seeds that were previously washed and those ground poppy seeds that were unwashed in order to find out if seeds themselves contain alkaloids or is it the consequence of the contamination of seeds with latex. As all the ground seeds showed very little or no alkaloids, we assumed that the presence of the majority of alkaloids is the result of contamination. Washing or soaking seeds would therefore help to reduce the mayor part of alkaloids from poppy seeds.

Key words: *Papaver somniferum L.*, poppy seeds, opium alkaloids, morphine, kodeine, papaverine, noscapine, extraction, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography

SEZNAM OKRAJŠAV

ARfD	acute reference dose (akutna referenčna doza)
AUC	area under the curve (površina pod krivuljo)
BfR	BundesInstitut für RisikoBewertung (Nemški inštitut za ocenjevanje tveganj)
DEA	dietilamin (C ₄ H ₁₁ N)
EFSA	European Food Safety Authority (Evropska agencija za varnost hrane)
HPLC	high-performance liquid chromatography (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti)
LC-MS	liquid chromatography in combination with mass spectrometry (tekočinska kromatografija v kombinaciji z masno spektrometrijo)
LC-MS/MS	liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry on a triple quadrupole instrument (tekočinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo na trojnem kvadrupolnem instrumentu)
LOD	limit of detection (spodnja meja detekcije)
R _f	retencijski faktor
STD K	standardna raztopina kodeina v vodi
STD M	standardna raztopina morfina v vodi
STD MIX	standardna raztopina vseh alkaloidov v vodi
STD MIX Etilacet	standardna raztopina vseh alkaloidov v etilacetatu
STD MIX Met	standardna raztopina vseh alkaloidov v metanolu
STD N	standardna raztopina noskapina v vodi
STD P	standardna raztopina papaverina v vodi
TEA	triethylamin (C ₆ H ₁₅ N)
TFA	trifluoroacetic acid (CF ₃ COOH)
TLC	thin layer chromatography (tankoplastna kromatografija)
UV	ultravioletno

1 UVOD

Makova semena so zaradi bogate sestave zelo zanimiva za prehransko industrijo, poleg tega so sestavina mnogih tradicionalnih sladici. Vendar pa se je v zadnjem času pojavil dvom o varnosti njihove uporabe zaradi potencialne visoke vsebnosti opija, kar predstavlja tveganje za neželene učinke. Ker še vedno ni enotne mednarodne zakonodaje, ki bi določala zgornjo mejo dovoljene vsebnosti opijevih alkaloidov v semenih, je tudi nadzor nad semeni na tržišču, namenjenimi prehrani, slab (1, 2).

Do danes je bilo razvitih že kar nekaj metod za ugotavljanje alkaloidov v makovih semenih, najbolj pa se je uveljavila tekočinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo na trojnem kvadrupolnem instrumentu (LC-MS/MS). Meja detekcije za morfin in njemu podobne alkaloidne je običajno pod 1 mg/kg semen, kar omogoča dovolj natančno analizo (1, 3).

1.1 Vrtni mak

1.1.1 Sistematika

Vrtni mak (*Papaver somniferum L.*) spada v družino makovk (*Papaveraceae*), katerih skupna značilnost je proizvodnja mlečka. Med 26 rodovi, na katere se deli družina makovk, spada vrtni mak v rod *Papaver*, ki združuje od 50 do 100 vrst maka (4).

1.1.2 Opis

1.1.2.1 Rastlina

Vrsta *Papaver somniferum L.* je enoletnica in zraste 0,5 – 1,5 m visoko. Steblo je ravno, iz njega pa izraščajo pernato deljeni, gladki in na koncu nazobčani listi. Cvet sestavljata dva čašna lista, ki ob odprtju cveta odpadeta, in štirje beli ali vijoličasti venčni listi. Plod je 3 – 6 cm široka glavica, ki jo sestavlja več zraslih plodnih listov. Ti delijo notranjost glavice na več prekatov, v katerih se nahajajo semena, ki so lahko različnih barv (4, 5).

1.1.2.2 Mleček

Nezrela glavica vsebuje v notranjosti bel mleček. Ko se ta posuši, nastane opij, tj. rjava smolnata snov z značilnim vonjem in ostrim okusom. Opij je sestavljen iz vode, sladkorja in opijevih alkaloidov, ki so v obliki soli z organskimi kislinami. Manjši delež opija predstavljajo tudi gumiji, lipidi, smole, kavčuk in minerali (4, 5).

Celoten delež opijevih alkaloidov v mlečku vrtnega maka je 20 – 25 % in je odvisen od sorte, lokacije, prsti, klime, vremena in časa žetve. Med njimi prevladuje morfin, ki ga mleček vsebuje v povprečju 12 %, odvisno od izvora vrtnega maka pa se njegova vsebnost giblje med 7 in 20 %. Sledijo pa mu z nekoliko nižjo vsebnostjo še kodein, tebain, noskapin in papaverin. Skupno je bilo do sedaj izoliranih že okoli 50 različnih alkaloidov (1, 2).

Mleček pronica v vse dele rastline, razen v semena, ki so edini del rastline, kamor mleček ne zaide. Starejša literatura navaja, da semena ne vsebujejo alkaloidov, vendar novejša raziskave temu nasprotujejo. Semena naj bi vsebovala sicer majhne, vendar zaznavne količine alkaloidov, ki lahko dosežejo tudi vrednosti do 1000 mg alkaloidov na kg makovih semen, kar je najverjetneje posledica kontaminacije semen z mlečkom (2).

V poskusu, kjer so rastlini *P. somniferum* v kritični fazi razvoja odvzeli večino mlečka, so bila nastala semena veliko manj viabilna kot semena, dozorela v rastlini brez odstranjenega mlečka. To nakazuje, da so snovi v mlečku izrednega pomena pri razvoju semen (6).

1.1.2.3 Makova semena in olje

Semena vrtnega maka vsebujejo približno 50 % olja, ki je svetlo rumene barve in blagega vonja ter okusa. Bogato je z linolno kislino, ki je pomembna omega 6 maščobna kislina, poleg nje pa trigliceride makovega olja sestavljajo tudi oleinska, stearinska, palmitinska in vakcenska maščobna kislina. Vsebuje tudi magnezij, kalcij, fosfor in minerale (5, 7).

1.1.3 Rastišča

Območje današnje Turčije je najverjetneje izvorno ozemlje vrtnega maka, ki pa se je do danes razširil že skoraj povsod po Aziji, Evropi ter ponekod v Severni Ameriki, Afriki in Avstraliji. Danes največ vrtnega maka za potrebe po opiju gojijo legalno v Indiji, Turčiji, Tasmaniji in Avstraliji. Največ nelegalno posajenega pa je na območju Zlatega trikotnika, ki zajema ozemlje Mjanmara, Laosa in Vietnam ter na območju Zlatega polmesca, ki zajema Afganistan, Iran in Pakistan (5, 7, 8, 9).

Prst in klima na rastišču zelo vplivata na morfološke lastnosti in na vsebnost opija. Najprimernejše razmere za rast vrtnega maka so zmerna, topla klima z nizko vlažnostjo in dolgi dnevi ter kratke noči, saj je zelo odziven na svetlobo. Tla morajo biti bogata, vlažna in ilovnata, običajno ga najdemo sredi njiv in vrtov (4, 7, 8).

1.1.4 Uporaba

Razlog za gojenje vrtnega maka je najpogosteje izolacija opijevih alkaloidov za uporabo v medicini kot protibolečinsko in uspavalno sredstvo (8).

Gojijo pa ga tudi za proizvodnjo semen in olja za prehransko in kozmetično industrijo. Semena vrtnega maka najpogosteje uporabljajo v kulinariki, kjer služijo za posipe pekovskih izdelkov in nadeve sladice. V kozmetiki se semena uporabljajo kot abraziv v pilingih za telo. Olje, iztisnjeno iz makovih semen na kožo deluje emolientno, zaradi visoke vsebnosti linolne kisline pa ugodno vpliva tudi na nečisto, poškodovano in vneto kožo. Kljub ugodnim učinkom je uporaba makovega olja redka, saj je zelo slabo stabilno. Zanimiva je predvsem njegova uporaba v slikarstvu za premazovanje slik, saj se hitro suši in ohranja lepe barve (5).

Vrtni mak pa se ne goji samo za potrebe industrije, pač pa je zaradi zanimivega izgleda plodnih glavic v zadnjem času priljubljen za aranžiranje in zaradi velikih barvitih cvetov kot okrasna rastlina vrtov (4).

1.2 Alkaloidi vrtnega maka (opijevi alkaloidi)

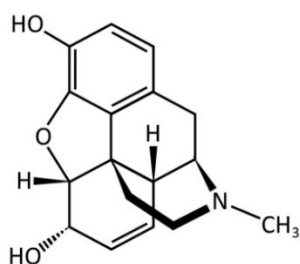
Vrtni mak je zaradi vsebovanega opija že od časa Sumercev (cca 4000 let p.n.š.) znan po močnih psiholoških učinkih. S tem namenom so to rastlino uporabljali tudi stari Egipčani in stari Grki (7). Danes vemo, da so za učinke opija odgovorni v njem prisotni alkaloidi. Najbolj znani med njimi so morfin, kodein, noskapin in papaverin, vendar samo morfin in kodein izkazujeta opioidno delovanje (1).

Vse alkaloide opija skupno imenujemo opijati. Snovi, ki imajo močno analgetično in narkotično delovanje pa imenujemo opiodi. Slednji lahko izvirajo iz maka (na primer morfin in kodein) ali pa tudi ne (na primer metadon). Opiodi torej interagirajo z opiodnimi receptorji v centralnem živčnem sistemu (delujejo analgetično, povzročajo evforijo, dihalno depresijo, slabost, bruhanje, skrčenje zenice in preprečujejo kašelj) in v prebavilih (povečajo tonus gladkih mišic in zmanjšajo motiliteto prebavil), poleg tega pa povzročijo sproščanje histamina, skrčenje bronhijev in znižujejo krvni tlak (4, 9).

1.2.1 Morfin

Morfin je bil prvi alkaloid, izoliran iz surovega opija v čisti obliki, kar je leta 1805 uspelo nemškemu farmacevtu Sertürnerju. Zaradi narkotičnih lastnosti je dobil ime po Morfeju, grškemu bogu sanj. Že od takrat se uporablja v medicini za lajšanje bolečin (4, 10, 11).

Kemijsko spada med fenantrenske alkaloide, njegova strukturna formula pa je prikazana na Sliki 1. Morfin je glavna aktivna komponenta opija in se v medicini uporablja kot analgetik za lajšanje hudih do ekstremnih bolečin, v večjih odmerkih pa kot anestetik. Kadar je bolečina vzrok za nespečnost, se lahko morfin uporablja tudi kot uspavalno. Pri peroralni uporabi doseže največji učinek že 30 minut po aplikaciji, ta pa nato traja še 4 – 6 ur. Najnižji terapevtski odmerek za lajšanje bolečin je 1,9 mg morfina. Zaradi različne občutljivosti nanj je težko poenotiti standardni enkratni odmerek. Ta se giblje med 1,9 in 1900 mg (v večini primerov pod 100 mg) in se dozira vsake 4 ure (2, 12).

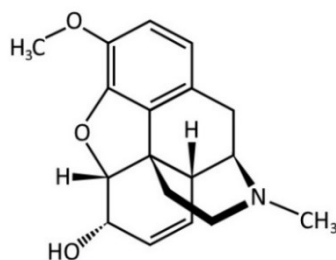


Slika 1: Strukturna formula morfina

Stranski učinki morfina so slabost, bruhanje, omotica, oteženo dihanje, učinek na srčno-žilni sistem, zaprtje, sedacija in srbenje kože. Dolgoročna uporaba lahko vodi do razvoja tolerance in do psihične in fizične odvisnosti. Pri poskusih na živalih je imel morfin tudi negativne učinke na razvoj in razmnoževanje, opazni pa so bili tudi mutageni učinki (9, 11, 13, 14).

1.2.2 Kodein

Kodein je kemijsko 3-metileter morfina, njegova struktura pa je prikazana na Sliki 2. Prav tako kot morfin spada med fenantrenske alkaloide in ima morfinu podobne farmakološke učinke. Protibolečinsko delovanje kodeina doseže okoli 8 % moči morfina in se uporablja za lajšanje srednje do hude bolečine. Uporablja se tudi pri akutni diareji in za lajšanje simptomov suhega kašlja. Priporočljiv enkratni peroralni terapevtski odmerek za lajšanje kašlja je 10 – 20 mg in proti bolečinam 15 – 60 mg, pri doziranju na 3 – 6 ur (2, 9, 11).

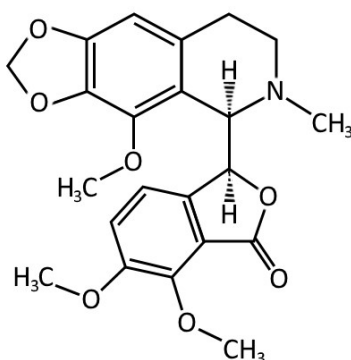


Slika 2: Strukturna formula kodeina

Njegovi stranski učinki so zaprtje in sedacija, lahko pa se pojavijo tudi enaki stranski učinki kot pri morfinu, ker je le-ta metabolit pri presnovi kodeina. Pri dolgoročni uporabi je možen razvoj tolerance, povzroča pa tudi psihično in fizično odvisnost (2, 4, 9).

1.2.3 Noskapin

Noskapin spada med benzilosiloksanske alkaloide. Strukturno se zelo razlikuje od morfina in kodeina, kar je razvidno iz Slike 3, zato je tudi njegovo delovanje precej drugačno. Zavira suh kašelj, stimulira dihanje in sprošča gladke mišice. Enkratni peroralni odmerek za odrasle je 25 – 50 mg in se dozira 3-krat dnevno (2).

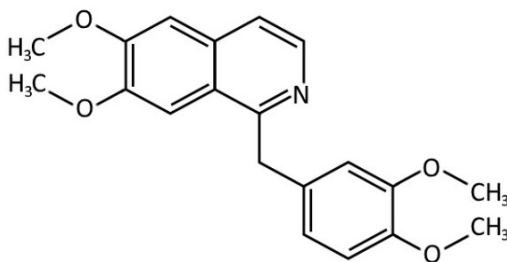


Slika 3: Strukturna formula noskapina

Stranski učinki so zaspanost, omotica, slabost in glavobol, pri visokih odmerkih pa tudi skrčenje bronhijev in zmanjšan mišični tonus. Noskapin pa za razliko od morfina in kodeina ne povzroča odvisnosti in tolerance (2).

1.2.4 Papaverin

Enako kot noskapin tudi papaverin kemijsko uvrščamo med benzilosiloksanske alkaloide, njegova struktura pa je prikazana na Sliki 4. Uporablja se za sproščanje gladkih mišic in ima močnejši učinek kot noskapin. Enkratni terapevtski odmerek za peroralno uporabo je 100 mg, ki se odmerja večkrat dnevno, vendar skupno ne sme preseči 542 mg na dan (2).



Slika 4: Strukturna formula papaverina

Stranski učinki so lahko omotica, glavobol, utrujenost, prebavne motnje, vročina, kožni izpuščaji, znojenje in oslavljen mišični tonus. Ob dolgoročni uporabi se lahko pojavijo spremembe jetrnih encimov, zlatenica in eozinofilija. Enako kot noskapin ne povzroča razvoja tolerance in odvisnosti (2).

1.3 Alkaloidi v semenih vrtnega maka

V mnogo raziskavah je že bila dokazana prisotnost alkaloidov v makovih semenih (1, 2, 3, 6, 8, 9, 15, 16, 17). Večina virov trdi, da semena sama po sebi ne vsebujejo alkaloidov, ampak se z njimi kontaminirajo ob stiku z mlečkom iz makovih glav (1, 2, 3, 8, 9). Nasprotno pa v literaturi zasledimo podatke o vezanem morfinu, ki naj bi se v semena vezal med zorenjem (6, 15, 16, 18). Če vezan morfin v semenih vendarle obstaja pa ga je v primerjavi z morfinom in ostalimi alkaloidi, prisotnimi zaradi kontaminacije iz mlečka, zanemarljivo malo in je za prehransko industrijo povsem nepomemben (3).

Iz zbranih podatkov o raziskavah po vsem svetu, pri katerih so z različnimi metodami merili vsebnost alkaloidov v makovih semenih, je razvidno, da kontaminiranost semen močno variira. Najnižje izmerjene količine alkaloidov so bile komaj zaznavne količine, najvišje izmerjene vsebnosti pa so bile: za morfin 330 mg/kg, kodein 57 mg/kg, papaverin 67 mg/kg in noskapin 230 mg/kg (najvišja vrednost za vsak posamezen alkaloid je bila izmerjena v različnih vzorcih makovih semen) (2).

Opravljenih je bilo tudi mnogo raziskav, pri katerih so testirane osebe v različni obliki in količini zaužile makova semena z različno vsebnostjo alkaloidov. Osebe so nato poročale o počutju v različnih časovnih razmikih. Zaradi različne občutljivosti posameznikov na učinke opioidov učinki niso bili vedno sorazmerni s količino zaužitega morfina in ostalih alkaloidov. Kljub temu pa je iz objavljenih raziskav razvidno, da je v določenih primerih že z zaužitjem normalne količine makovih semen oz. jedi z makovimi semeni možno zaužiti dovolj visoke količine opioidov za pojav neželenih učinkov, tipičnih zanje (2).

Nemalo je tudi primerov, ko so rezultati forenzičnih raziskav oseb, ki so pred tem uživale makova semena, pokazali izmerljive količine opijatov v krvnem serumu, urinu ali ustni tekočini. Zaužitje makovih semen lahko torej privede do lažno pozitivnih rezultatov doping testiranja. Da do takšnih neprijetnosti ne bi prišlo, bi bilo potrebno razviti metode, ki bi jasno ločevale, kdaj je vzrok za pozitivne rezultate uživanje makovih semen in kdaj zloraba opijatov (1, 2, 19, 20, 21, 22).

Na spletu je mogoče najti tudi recepte za domačo ekstrakcijo opija in njegovih alkaloidov iz makovih semen s pomočjo citronske kisline. Zaradi dostopnosti navodil in enostavnosti ekstrakcije je velika nevarnost zlorab in s tem pojava odvisnosti (2).

1.3.1 Primeri zastrupitev

V literaturi je zaznati kar nekaj primerov žrtev posledic zaužitja močno kontaminiranih makovih semen z alkaloidi. Prvi primer je oseba, ki je poročala o neprijetnem občutku v glavi in bruhanju naslednji dan po zaužitju jedi, potresene z mešanico makovih semen in sladkorja. Ugotovili so, da je oseba zaužila okoli 75 g makovih semen z vsebnostjo morfina 210 mg/kg in kodeina 39 mg/kg, kar pomeni, da je zaužila skupno okoli 16 mg morfina in 3 mg kodeina, kar že presega najnižji terapevtski odmerek za morfin (2).

Poznanih pa je tudi kar nekaj smrtnih primerov zaradi zaužitja pripravkov iz makovih semen. Prvi primer je 6-tednov star otrok, ki mu je mati za lajšanje težav s spanjem po navodilih starega recepta naredila mlečni pripravek z makovimi semeni. V 500 mL mleka je namočila 200 g makovih semen in mu dala 75 mL takega pripravka. Kmalu po zaužitju je moral otrok zaradi težav z dihanjem in oslABLJENE zavesti v bolnišnico, kjer so ga pridržali na intenzivni negi. Izmerili so mu visoke količine morfina in kodeina v urinu in tako postavili diagnozo zastrupitve z opijati. Po preiskavi so ugotovili, da so makova semena, ki jih je otrokova mati uporabila za pripravek, vsebovala 1000 mg morfina in 30 mg kodeina na kg semen (2).

Naslednji primer se je zgodil 30-letniku, ki ga je oče mrtvega našel na tleh svoje sobe skupaj s steklenico čaja iz makovih semen. Po pregledu so poročali, da je bil razlog za smrt predoziranje morfina (23).

Tudi oče 17-letnika je nekega jutra našel svojega sina neodzivnega na tleh njegove sobe, z rumenkasto tekočino, ki je tekla iz njegovih ust. 17-letnik je pred tem nekaj mesecev redno pil čaj iz makovih semen za lajšanje tesnobe, pri čemer je vedno uporabil enako količino makovih semen. Pri preiskavah makovih semen, uporabljenih za pripravo čaja so v njih našli visoke koncentracije morfina in sledi kodeina. Obdukcija je prav tako pokazala visoke koncentracije morfina v urinu in krvi (24, 25, 26, 27).

27-letnik si je prav tako pripravil čaj iz makovih semen z namenom, da bi ta povzročil prijeten in rahlo zaspan učinek. Naslednje jutro ga prijatelj, ki je skupaj z njim prejšnji večer zaužil pripravek, ni mogel zbuditi. Kmalu za tem je 27-letnik umrl. Po preiskavah so potrdili prisotnost morfina in kodeina tako v makovem čaju kot v telesu žrtve (28).

Tragičen primer se je zgodil tudi v primeru 5-mesecev starega otroka, ki mu je mati zaradi močne nervoze in vznemirjenosti, po nasvetu farmacevta dala makov sirup. Odmerila mu je malo večjo količino od naročene s strani farmacevta. Otrok je zaspal, nato pa se kmalu zbudil v močni agoniji. Mati je poskusila s pripravkom za bruhanje, ki ni pokazal uspeha, zato je z otrokom odšla v ambulanto, kjer mu niso mogli več pomagati in otrok je nato umrl. Zaradi pomanjkanja podatkov ostaja količina alkaloidov v uporabljenem makovem sirupu neznan (29), je pa iz tega in zgornjih primerov razvidno, da je izpostavljenost morfinu in ostalim opijatom z makovimi semeni lahko ob veliki kontaminaciji semen precejšnja. Posebej previdni moramo biti pri dojenčkih, ki so bolj občutljivi od odraslih oseb (2).

1.3.2 Vzrok za vsebnost alkaloidov v semenih

Glavni razlog za kontaminacijo makovih semen bi lahko pripisali nepravilnostim pri žetvi in poškodbam kapsul ob pikih žuželk (1). V zadnjem času beležijo znatno višje količine alkaloidov v makovih semenih, kar bi lahko bilo zaradi uvedbe strojnih tehnik žetve, pri katerih makove glavice zmeljejo in tako pridejo semena enostavno v stik z mlečkom, med njimi pa ostanejo tudi ostanki kapsul. Tradicionalno so namreč makove glavice pobirali in iz njih izločali semena ročno, pri čemer je bila nevarnost kontaminacije semen z alkaloidi iz kapsule veliko manjša. Danes se tradicionalnih tehnik poslužujejo le še redko, večinoma v manj razvitih državah. Drugod pa se zaradi velike količine pridelka in razvite tehnologije uporabljajo le agresivne strojne tehnike žetve (2).

Na količino alkaloidov bi lahko vplivali tudi čas žetve, geografski izvor in sorta maka. Vsebnost alkaloidov v vrtnem maku med zorenjem namreč niha in če žetev poteka v obdobju nizke vsebnosti alkaloidov, je možnost kontaminacije manjša (2).

Pri proučevanju vzorcev iz različnih držav po svetu so ugotovili, da sicer ni jasne povezave med državo izvora in vsebnostjo alkaloidov, vendar je bilo razvidno, da so bili vsi vzorci iz Avstralije močno kontaminirani z alkaloidi, v nasprotju z vzorci iz Turčije in Danske, katerih vsebnost alkaloidov je bila nizka (2).

Razlike se pojavljajo tudi med različnimi sortami maka. Obstajajo sorte bogate z opijevimi alkaloidi, ki se gojijo predvsem za potrebe medicine, in sorte z nizko vsebnostjo alkaloidov, namenjene gojenju makovih semen in olja za prehransko industrijo. Seveda pa se v praksi večinoma ob gojenju vrtnega maka za proizvodnjo opija uporabijo in prodajo tudi njihova semena (1, 2).

1.3.3 Priporočila in ocene tveganja

1.3.3.1 Državni zakoniki

Mednarodno še vedno ni določene nobene omejitve za vsebnost alkaloidov v makovih semenih. Madžarska je edina država v Evropski Uniji, ki ima z državnim zakonom določeno najvišjo dovoljeno količino za alkaloidne v makovih semenih. Ta znaša 30 mg/kg za morfin, 40 mg/kg za morfin in noskapin, 20 mg/kg za noskapin in 20 mg/kg za kodein (12).

V Belgiji pa je celotna rastlina *P. somniferum* prepovedana za uporabo v prehrani. Izjemoma dovoljujejo uporabo makovih semen, ampak le za dekoracijo pekovskih izdelkov (1).

1.3.3.2 Nemški inštitut za ocenjevanje tveganj

Nemški inštitut, ki se ukvarja z ocenjevanjem tveganj in varovanjem zdravja potrošnikov (BfR) je leta 2005 določil začasne smernice in priporočila za količino morfina v makovih semenih. Izhajali so iz najnižjega enkratnega peroralnega terapevtskega odmerka za morfin, ki znaša 31,7 µg/kg telesne teže (tj. 1,9 mg za osebo težko 60 kg). Z varnostnim faktorjem 5 so za priporočljiv najvišji dnevni odmerek določili 6,3 µg/kg telesne teže (tj. 0,4 mg morfina na osebo težko 60kg). Te količine naj posameznik ne bi presegel med enim dnevnim obrokom oz. z obroki tekom celega dneva. Glede na to, da 100 g makovih semen velja za visok dnevni vnos, so za najvišjo vsebnost morfina v makovih semenih določili 4 mg/kg (2).

Veliko vzorcev, ki jim je bila izmerjena vsebnost morfina, presega to usmeritveno vrednost, zato so dodatno določili »usmeritveno vrednost z omejenim vnosom«. Ta določa, da lahko makova semena vsebujejo do 20 mg morfina na kg, vendar lahko oseba zaužije največ 20 g takih semen dnevno, kar mora biti jasno označeno na embalaži izdelka (2).

Te vrednosti veljajo zgolj kot podlaga za ukrepanje in niso bile vključene v zakonodajo. Poleg tega je BfR predlagal, da se določijo usmeritvene vrednosti še za ostale alkaloidne v makovih semenih. Pomemben je tudi podatek, da se povišana vsebnost kodeina običajno pojavlja v makovih semenih, v katerih je povišana tudi količina morfina, kar bi bilo potrebno upoštevati v nadaljnjih študijah in pri določanju meje vsebnosti posameznih kontaminantov v makovih semenih zaradi možnega sinergističnega delovanja teh dveh alkaloidov (2).

1.3.3.3 Evropska agencija za varnost hrane

Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) je na željo Evropske komisije leta 2011 priskrbelo znanstveno mnenje o tveganju za javno zdravje, povezano s prisotnostjo opijevih

alkaloidov v makovih semenih, namenjenih prehrani. Upoštevali so najnižji enkratni peroralni terapevtski odmerek, zaokrožen na 30 µg/kg telesne teže, in varnostni faktor 3 ter tako določili 10 µg morfina na kg telesne teže za akutno referenčno dozo (ARfD). Ocenjujejo, da je izpostavljenost morfinu s hrano, ki vsebuje makova semena, tolikšna, da je ARfD možno preseči že z enim obrokom, še posebej izpostavljeni pa naj bi bili otroci. Kljub temu so potrebne nadaljnje študije za natančno določitev izpostavljenosti z upoštevanjem vseh faktorjev, ki na to vplivajo (1).

1.3.4 Metode za zmanjševanje vsebnosti

Vsebnost alkaloidov v makovih semenih in v jedeh, ki vsebujejo makova semena se lahko zmanjša z določenimi metodami predelave in obdelave. Za najučinkovitejše veljajo namakanje in spiranje semen z vodo ali rahlo nakisano vodo, mletje in segrevanje semen. Z namakanjem in spiranjem omogočimo, da se alkaloidi, prisotni večinoma na površini semen, odstranijo. Pri segrevanju semen pride najverjetneje do termičnega razpada morfina in ostalih alkaloidov (30). Vzrok za nižjo vsebnost alkaloidov v zmletih semenih pa bi lahko bila večja specifična površina in s tem več možnosti oksidacije morfina pod vplivom fenolne oksidaze v kombinaciji s kavno kislino, ki poteka ob prisotnosti kisika (3).

Vsebnost alkaloidov v obdelanih semenih naj bi bila znižana tudi do 90 % v primerjavi z neobdelanimi, poroča EFSA (1). Na odstotek znižanja vsebnosti alkaloidov vplivata tudi čas spiranja in temperatura segrevanja (višja temperatura in daljši čas spiranja oz. namakanja pomenita večji delež odstranjenih alkaloidov) (12).

Danes je tehnologija tako napredovala, da na trgu že obstajajo sorte maka brez ali z nižjo vsebnostjo alkaloidov. Izdelane so posebej za proizvodnjo makovih semen in olja za prehransko industrijo. V Nemčiji je odobrena ena sorta takšnih semen (»Przemko«), v Avstriji pa kar šest (»Edel-Weiß«, »Edel-Rot«, »Florian«, »Josef«, »Zero«, in »Zero 2000«). Nobena sorta ne vsebuje morfina, vsebnost ostalih alkaloidov pa je zelo nizka (2). V Indiji prav tako obstajata dve biotehnološko predelani sorti maka z namenom zmanjšanja vsebnosti alkaloidov v semenih. Prva se imenuje »Sujata«, ki je povsem brez opija, druga pa »TOP 1« (»Thebaine Ortopaverine Poppy 1«), ki ne vsebuje morfina in kodeina. Uporaba takih semen v prehranski industriji bi pomenila trajno rešitev na področju varnosti (9).

1.4 Metode detekcije alkaloidov iz makovih semen

Do danes je bilo po svetu uporabljenih že veliko metod merjenja vsebnosti alkaloidov v makovih semenih, najbolj uporabljane pa so bile tekočinska kromatografija z masnim detektorjem (LC-MS) oz. izboljšana tekočinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo na trojnem kvadrupolnem instrumentu (LC-MS/MS) in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) z ultravijoličnim (UV) ali fluorescentnim detektorjem (1). Tako metoda LC-MS/MS kot HPLC omogočata visoko občutljivost in natančnost, vendar pa zahtevata zelo usposobljenega analitika za izvajanje meritev in drage aparature, ki vsem niso dostopne. S tem namenom smo razvili nizkocenov, enostaven in hiter sistem za detekcijo alkaloidov s TLC metodo. Za potrditev ustreznosti rezultatov, dobljenih s to metodo, smo za referenčno metodo uporabili metodo HPLC (8).

1.4.1 Tekočinska kromatografija v kombinaciji s tandemsko masno spektrometrijo na trojnem kvadrupolnem instrumentu

LC-MS/MS je bila za detekcijo alkaloidov v makovih semenih prvič predstavljena leta 2005 v raziskavah Trafkovski J., et al. (21), nato pa ponovno uporabljena naslednje leto, ko so jo poenostavili, optimizirali in izboljšali (3).

Vzorci se pripravijo tako, da se makova semena ob stalnem mešanju namaka v ekstrakcijskem topilu (etanol z 0,1 % očetne kisline) v zaprti posodi. Po 60 minutah se supernatant prefiltrira in rezultat so izolirani alkaloidi. Ta ekstrakt se nato vstavi v napravo LC-MS/MS, ki je sestavljena iz več delov: LC (tekočinska kromatografija) poskrbi za ločevanje alkaloidov, medtem ko MS/MS (masna spektrometrija na trojnem kvadrupolnem instrumentu) alkaloide detektira. Ločevanje poteka v reverzno fazni koloni pri 40°C (3).

Ta metoda je uporabna za rutinsko analizo, saj ne zahteva pretiranega čiščenja vzorca, in je hkrati visoko občutljiva in specifična zaradi trojnega kvadrupolnega instrumenta, ki zmanjša šume. Meja kvantifikacije je pod 1 mg/kg, meja detekcije pa pod 0,3 mg/kg, kar dokazuje visoko občutljivost metode. Kljub omenjenim prednostim pa ta metoda zahteva zelo dobro opremljen laboratorij z dragimi aparaturnami in specializiranega analitika za izvedbo postopkov (3).

1.4.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Ta metoda je bila predstavljena leta 2002, ko so Szucs Z., et al. (31) merili vsebnost alkaloidov v makovih glavicah, nato pa jo je leta 2011 uporabil Gevenkiriş A. za merjenje

vsebnosti alkaloidov v makovih semenih turškega izvora (8). Mi smo jo uporabili kot referenčno metodo za potrditev rezultatov, dobljenih z metodo, ki smo jo razvili.

Za pripravo vzorcev je potrebno alkaloidne iz makovih semen izolirati s pomočjo aktivnega kislega aluminijskega oksida (Al_2O_3). Najprej se jih zdrobi skupaj z Al_2O_3 in namoči v destilirano vodo za 60 min, nato pa jih je potrebno prestaviti v vnaprej pripravljeno stekleno kolono, ki ima na dnu kos vate in spran Al_2O_3 , namočen v destilirani vodi. Makova semena se nato počasi spirajo s pretokom 0,5 mL/min ob konstantnem dodajanju vode. Zbran ekstrakt se pred injiciranjem v HPLC kolono prefiltrira skozi 0,45 μm filter injekcijske brizge (8).

Prednost HPLC metode je visoka resolucija med alkaloidi in ostalimi komponentami vzorca, vendar je podobno kot pri metodi LC-MS/MS potreben usposobljen in specializiran analitik za delo z aparaturami, katerih cena je sicer malo nižja kot pri prej opisani metodi, vendar še vedno cenovno nedostopna mnogim laboratorijem (8).

1.4.3 Tankoplastna kromatografija

TLC je dvodimenzionalna analizna tehnika za ločevanje komponent vzorca. Separacija poteka med potovanjem mobilne faze po stekleni plošči, na katero je vezan adsorbent, ki predstavlja stacionarno fazo sistema. Najpogosteje uporabljeni adsorbenti so silikagel, aluminijev oksid, derivati celuloze in razni poliamidi. Glede na različno afiniteto komponent vzorca na mobilno in stacionarno fazo, potujejo iskane snovi v vzorcu skupaj z mobilno fazo z različno hitrostjo. Razmerje med prepotovano potjo posamezne komponente in potjo mobilne faze imenujemo retencijski faktor (R_f) komponente. Snovi, ki jih ločujemo, morajo imeti dovolj različne R_f v izbrani kombinaciji mobilne in stacionarne faze, da jih med sabo lahko ločimo (4).

Ta kromatografska tehnika je uporabna za kvalitativno in kvantitativno analizo vzorcev. Mi jo bomo uporabili za semikvantitativno analizo, saj bomo poleg potrditve in ovržbe prisotnosti izbranih alkaloidov, določili tudi njihovo približno vsebnost.

Metoda je zelo enostavna, ekonomična in hitra ter omogoča sočasno analizo več vzorcev. Je pa manj občutljiva in slabše ponovljiva. Pričakujemo lahko tudi večje napake meritev, vendar je kljub vsem slabostim še vedno zelo primerna za hitro rutinsko določanje komponent v vzorcih, predvsem v primeru zelo velikega števila vzorcev za analizo (4).

2 NAMEN

Namen diplomske naloge je razvoj enostavne, hitre in poceni metode za ekstrakcijo in semikvantifikacijo alkaloidov v makovih semenih, uporabne tako za grobo rutinsko ocenjevanje makovih semen s tržišča v analiznih laboratorijih, kot za demonstracijo ekstrakcije in merjenja količine alkaloidov v makovih semenih v šolah. Metoda je namenjena predvsem manjšim laboratorijem, ki si ne morejo privoščiti drage opreme in specializiranega osebja, pa vendar želijo zanesljive rezultate analiz vzorcev makovih semen. Razvito metodo bomo primerjali še z drugimi metodami ekstrakcije (ekstrakcija semen z Al_2O_3 in namakanje semen v različnih topilih).

V okviru diplomskega dela bomo z razvito in optimizirano metodo izmerili vsebnost najpomembnejših alkaloidov v šestih vzorcih makovih semen različnih blagovnih znamk s tržišča, namenjenih prehrani (pet kupljenih v obliki celih semen in enega v obliki mletih) ter v enem vzorcu nabranih makovih semen. Slednja so nabrana v Sloveniji, kupljena makova semena pa izvirajo iz Slovenije, Turčije in Češke. Primerjali bomo razlike v vsebnosti alkaloidov med nabranimi makovimi semeni in makovimi semeni s tržišča ter primerjali kontaminiranost z alkaloidi glede na poreklo (slovensko, turško in češko), vendar bomo zaradi majhnega števila vzorcev pri tem omejeni. Z referenčno metodo HPLC bomo potrdili ali ovrgli zanesljivost dobljenih rezultatov in ovrednotili točnost metode.

Dobljene rezultate vsebnosti alkaloidov v vzorcih maka bomo primerjali s smernicami, ki jih določa BfR in z madžarsko zakonodajo, ki z zakonom omejuje vsebnost alkaloidov v makovih semenih. Tako bomo ocenili, ali makova semena, ki se prodajajo na slovenskem tržišču, sovpadajo z javnimi priporočili za varnost potrošnikov.

Poskusili bomo tudi ugotoviti, ali makova semena vsebujejo vezane alkaloidne in ali je njihova vsebnost primerljiva s količino nevezanih alkaloidov, ki jih semena vsebujejo zaradi kontaminacije semen z mlečkom iz makovih glavic. To bomo preverili tako, da bomo pomerili vsebnost alkaloidov v celih semenih (vsebnost nevezanih alkaloidov), mletih semenih (vsebnost vsote vezanih in nevezanih alkaloidov) in v mletih semenih, ki smo jih pred tem že spirali z nakisano vodo (vsebnost samo vezanih alkaloidov). Mletje pa že samo po sebi povzroči izgubo alkaloidov v semenih zaradi interakcije alkaloidov z zrakom, ki povzroči njihovo oksidacijo. Tako se bomo lahko prepričali tudi ali mletje res značilno zmanjša vsebnost alkaloidov v semenih maka.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Rastlinski material

Merili smo vsebnost alkaloidov sedmih različnih vzorcev makovih semen, prikazanih v Preglednici I. V trgovini smo kupili šest paketov makovih semen, ki se prodajajo pod različnimi blagovnimi znamkami, za sedmi vzorec pa smo uporabili nabran mak iz območja Slovenije. Od vseh makovih semen so bila samo ena mleta, ostala so bila kupljena (oz. nabrana) v obliki celih semen. Makova semena smo označili za lažje razlikovanje:

Preglednica I: Vzorci makovih semen

Ime vzorca	Oblika semen (cela/mleta)	Blagovna znamka	Poreklo
A	cela	Aroma začini	Turčija
B	mleta	Franch	Češka
C	cela	Panvita	Slovenija
D	cela	Spar	Češka
E	cela	Šafram	Češka
F	cela	Davert	Turčija
G	cela	/	Slovenija

3.1.2 Standardi

Za pripravo standardnih raztopin smo uporabili čiste alkaloidne v obliki belega prahu in jih raztopili v različnih topilih. Naredili smo standardno raztopino vsakega posameznega alkaloida v vodi in standardne raztopine mešanice vseh alkaloidov v vodi (STD MIX), metanolu (STD MIX Met) in etil acetatu (STD MIX Etilacet). Vsak standard smo nato še 10-krat zredčili.

3.1.2.1 Standardne raztopine posameznih alkaloidov

Za pripravo standardne raztopine morfina (STD M) smo zmešali 6 mg morfina v 1 mL vode, za pripravo standardnih raztopin kodeina (STD K), papaverina (STD P) in noskapina (STD N) pa smo uporabili 3 mg vsakega alkaloida in jih vsakega posebej raztopili v 1 mL vode. STD M je bil torej 2-krat bolj koncentriran (6 mg/ml) od ostalih (3 mg/ml), saj se morfin na TLC ploščah ob obarvanju z Dragendorffovim reagentom vidi slabše od ostalih alkaloidov.

Vsako posamezno standardno raztopino smo nato za natančnejše meritve 10-krat razredčili tako, da smo zmešali vsako posamezno standardno raztopino z vodo v razmerju 1:9.

3.1.2.2 Standardne raztopine vseh alkaloidov

Po 10 mg vsakega alkaloida (morfina, kodeina, papaverina in noskapina) smo raztopili v treh različnih topilih (vodi, metanolu in etilacetatu), da smo dobili tri različne standardne raztopine (STD MIX, STD MIX Met in STD MIX Etilacet). Pri vsaki smo uporabili 5 mL posameznega topila, da smo dobili koncentracijo 2 mg vsakega alkaloida na 1 mL topila. Za natančnejše meritve smo pripravili tudi 10-kratno redčitev vsake standardne mešanice in dobili koncentracijo 0,2 mg posameznega alkaloida na 1 mL vode.

3.1.3 Kemikalije in reagenti

- aluminijev oksid (Al_2O_3)
- bizmutov subnitrat (BiNO_2)
- destilirana voda (H_2O)
- dietilamin (DEA; $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$)
- etanolamin ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$)
- etilacetat ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)
- kalijev jodid (KI)
- klorovodikova kislina (HCl)
- metanol (CH_3OH)
- natrijev karbonat (Na_2CO_3)
- očetna kislina (CH_3COOH)
- silikagel (SiO_2)
- trietilamin (TEA; $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$)
- trifluorocetna kislina (TFA; $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$)
- toluen ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)
- vinska kislina ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6(\text{s})$)

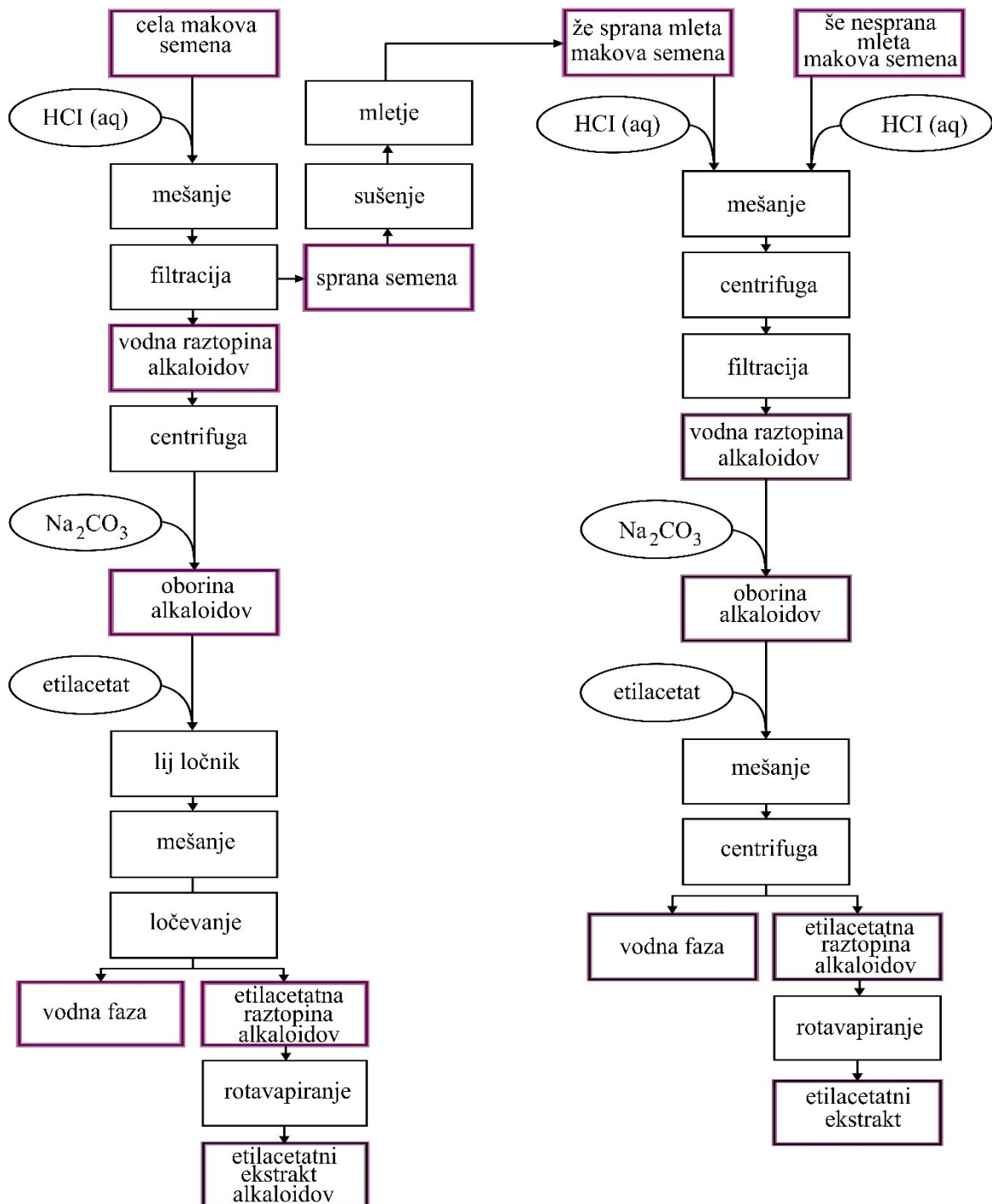
3.2 Metode dela

3.2.1 Ekstrakcija opijevih alkaloidov iz makovih semen

3.2.1.1 Ekstrakcija z vodo in organskim topilom

Kot je prikazano na Sliki 5, smo s postopkom ekstrakcije z vodo in organskim topilom ekstrahirali:

- cela makova semena, pri čemer smo izolirali nevezane alkaloide s površine makovih semen, ki so posledica kontaminacije;
- makova semena, ki smo jih po ekstrakciji shranili in nato mlete ponovno ekstrahirali, s čimer smo želeli izolirati samo vezane alkaloide v notranjosti semen in
- sveža (brez predhodne ekstrakcije) mleta makova semena z namenom izolacije vezanih in nevezanih alkaloidov.



Slika 5: Shema postopka ekstrakcije z vodo in organskim topilom

Ekstrakcija iz celih semen:

Natančno smo natehtali približno 50 g celih makovih semen in jih namočili v 200 mL prečiščene vode, v katero smo dodali HCl do pH približno 2, s čimer smo omogočili alkaloidom, da se izločijo iz površine semen in raztopijo v vodni fazi. Namočena semena smo postavili na stresalnik in jih pustili, da se mešajo 60 min. Nato smo pripravek prefiltrirali in ostanek semen na filter papirju shranili za kasnejšo ponovno ekstrakcijo, prefiltrirano tekočino pa centrifugirali 5 min pri 10000 g. Po centrifugiranju smo tekočino prelili v čašo in ji dodali Na₂CO₃ do pH 9 – 10. Tekočina je postala motna, saj so se alkaloidi oborili.

Sledila je priprava lijn ločnika. Najprej smo vanj natočili izolat alkaloidov in čezenj previdno natočili še 50 mL etilacetata, ki je predstavljal organsko fazo, v katero smo želeli raztopiti alkaloidne. Lijn ločnik smo narahlo zavrteli, da sta se vodna in organska faza premešali, vendar ne preveč, da ni nastala emulzija. Nato smo z rahlim odprtjem pipe na lijn ločniku počasi iz njega spustili vodno fazo in jo zbrali v bučko ter shranili. Organsko fazo smo zbrali posebej v okroglo bučko in jo skoncentrirali z rotavaporjem. Ker je pri rotavapiranju nemogoče zbrati enake volumne ekstraktov, smo pri vsakem vzorcu zapisali končni volumen in ga upoštevali pri računanju vsebnosti alkaloidov v makovih semenih. Zbrali smo 1 – 2 mL vzorca, ga prestavili v plastično epruveto, označili volumen in shranili za analizo (32).

Ekstrakcija že spranih mletih semen:

Postopek smo ponovili z makovimi semeni, ki smo jih shranili po predhodni ekstrakciji z vodo in organskim topilom. Ekstrakcija je potekala podobno kot s celimi semeni, le da smo morali nekoliko prirediti količine in vmesne postopke.

Shranjena posušena semena smo zmleli v mlinčku in jih natančno odtehtali približno 40 g. Zmešali smo jih z vodno raztopino HCl s pH približno 2 in jih namakali na stresalniku približno 60 min. Pri tem je v vodni fazi nastala belorumena brozga, verjetno kot posledica vsebovanih trigliceridov in površinsko aktivnih snovi prisotnih v semenih, ki smo jih z mletjem izpostavili in omogočili interakcije ter nastanek emulzije. Ker je brozga zaradi viskoznosti onemogočala filtracijo, smo tekočino najprej centrifugirali 5 min na 10000 g, nato odlili zgoščeno snov na vrhu centrifugirke, ter preostanek prefiltrirali skozi filter papir. Brozgo smo zavrgli, v vodno fazo pa dodali Na₂CO₃ do pH 9 - 10. Nato je pri mešanju vodne faze z organsko (30 mL etilacetata) spet takoj nastala emulzija, kar je onemogočilo ločevanje z lijn ločnikom. Ponovno smo se odločili za centrifugiranje 5 min pri 10000 g. Vodno fazo

smo nato shranili v bučko, organsko fazo pa zbrali v okroglo bučko in jo rotavapirali do volumna 1 - 2 mL. Zapisali smo natančen volumen in koncentrat shranili za analizo.

Ekstrakcija svežih mletih semen:

Postopek ekstrakcije svežih mletih makovih semen je bil povsem enak zgoraj opisanemu postopku z že spranimi mletimi semeni, le da smo izhajali iz iste količine makovih semen kot pri ekstrakciji celih semen (tj. 50 g) in je bila tako tudi količina ostalih reagentov enaka kot pri ekstrakciji celih makovih semen.

3.2.1.2 Ekstrakcija z aluminijevim oksidom

Ekstrakcija z Al_2O_3 je metoda, prirejena po Gevenkiriş, A. (2011). Z njo smo ekstrahirali cela makova semena in sveže mleta makova semena.

Ekstrakcija celih semen:

Za ekstrakcijo po tem postopku smo potrebovali stekleno kolono, na dno katere smo potlačili majhen kos vate in jo napolnili s 25 mL destilirane vode. Med konstantnim mešanjem s stekleno palčko smo dodali 8 g Al_2O_3 in počakali da se v celoti posede. Za tem smo odprli pipo na dnu kolone in iz nje izpustili vodo. Kolono smo ponovno napolnili z destilirano vodo in jo nato izpustili, da smo sprali Al_2O_3 . Nazadnje pa smo kolono še napolnili s 5 mL vode.

Natančno smo natehtali približno 2,0 g celih makovih semen in 2,0 g Al_2O_3 , ju združili v čašo in mešali 30 min. Mešanico smo nato navlažili s 7 mL destilirane vode in mešali še 60 min, nato pa jo prestavili v prej pripravljeno kolono. S previdnim mešanjem smo se znebili zračnih mehurčkov, nato pa smo začeli s spiranjem alkaloidov iz makovih semen. Pipo smo odprli za toliko, da je bila hitrost pretoka skozi kolono približno 10 kapljic na minuto (0,5 mL/min) in v kolono dolivali destilirano vodo tako, da nivo vode v koloni ni nikoli drastično upadel. Ko smo zbrali 50 mL eluata, je bilo spiranje končano in eluat pripravljen za analizo. Enak postopek ekstrakcije smo izvedli za vsa cela semena.

Ekstrakcija svežih mletih semen:

Postopek, kjer smo ekstrahirali mleta semena se razlikuje od opisanega postopka za cela semena samo v tem, da smo pred tehtanjem semen, ki smo jih nameravali uporabiti za ekstrakcijo, le-ta zmleli v kavnem mlinčku. Zmleta semena smo nato natančno natehtali približno 2,0 g in sledili postopku za cela semena. Ekstrakcijo smo ponovili za vsa sveže mleta semena in kupljena že zmleta semena.

3.2.1.3 Ekstrakcija v nakisani vodi

Alkaloide smo poskusili ekstrahirati tudi z namakanjem semen v nakisani vodi. Najprej smo vodo nakisali z dodajanjem HCl do pH 2 – 3, da smo dobili vodno raztopino za namakanje. Nato smo zmešali cela makova semena in narejen vodni medij v razmerju 1:2 (uporabili smo 50 g semen in 100 mL medija), pustili mešanico na stresalniku 60 min in jo prefiltrirali skozi filter papir. Makova semena smo zavrgli, filtrat pa skoncentrirali z rotavaporjem do približno 1 – 2 mL in ekstrakt shranili za analizo.

3.2.1.4 Ekstrakcija v metanolu in nakisanem metanolu

Podobno kot z nakisano vodo smo poskusili tudi z metanolom. Natančno smo natehtali približno 50 g celih makovih semen in jih namočili v 100 mL metanola. Pokrite z aluminijasto folijo smo pustili na stresalniku za 60 min, jih nato prefiltrirali in raztopino alkaloidov rotavapirali do približno 1 – 2 mL ter koncentrat shranili za analizo.

Popolnoma enako je potekalo namakanje makovih semen v nakisanem metanolu, le da smo namesto čistega metanola uporabili metanol z 0,2 % očetne kisline.

3.2.1.5 Ekstrakcija v naalkaljenem etilacetatu

Ponovno smo natehtali 50 g makovih semen in jih tokrat namočili v 100 mL etilacetata s 5 % etanolamina ter pokrili z aluminijasto folijo. Po eni uri na stresalniku smo zmes še centrifugirali 5 min na 6000 g in nato odlito raztopino (brez makovih semen) rotavapirali do približno 1 – 2 mL in jo shranili za analizo.

3.2.2 Tankoplastna kromatografija

3.2.2.1 Stacionarna faza

Za stacionarno fazo pri TLC analizi smo izbrali plošče za TLC velikosti 10x20 cm, prevlečene s silikagelom in z vsebovanim fluorescentnim indikatorjem fluoresceinom, ki fluorescira zeleno pri valovni dolžini 254 nm. Alkaloide smo opazovali na dva načina:

- z detekcijo pod UV svetlobo v obliki temnih lis in
- z obarvanjem z Dragendorffovim reagentom, ki alkaloide obarva oranžno.

3.2.2.2 Mobilna faza

Preizkusili smo štiri različne mobilne faze za ločevanje alkaloidov na TLC ploščah:

- Voda : metanol : TEA = 1 : 1 : 2 (v/v/v)
- Voda z 0,1 % TFA in 0,2 % TEA : metanol = 3 : 7 (v/v)
- Voda z 0,1 % TFA in 0,2 % DEA : metanol = 1 : 4 (v/v)
- DEA : etilacetat : toluen = 1 : 2 : 7 (v/v/v) (32)

3.2.2.3 Nanos raztopin standardov in vzorcev

Uporabljali smo standarde in vzorce raztopljene v metanolu, etilacetatu ali vodi. Pri vzorcih raztopljenih v metanolu in etilacetatu ni bilo posebnosti, saj sta oba topila dobro hlapna. Pri vzorcih, raztopljenih v vodi pa smo morali počakati dlje časa oz. TLC ploščo pihati z enakomernim tokom hladnega zraka, da se je plošča pred razvijanjem popolnoma posušila.

Raztopine standardov in vzorcev smo nanašali z avtomatskim aparatom Camag Linomat IV pri naslednjih pogojih:

- Širina plošče: 200 mm
- Začetna pozicija (odmik od roba plošče): 15 mm
- Širina lise: 8 mm
- Razmik med lisami: 6 mm
- Hitrost nanašanja: 6 sek/ μ l

3.2.2.4 Razvijanje kromatografskih plošč

Za razvijanje kromatografskih plošč smo uporabili nasičene kadičke z dvoprekatnim dnom, v katere smo nalili mobilno fazo. Zrak v kadički smo nasičili tako, da smo ob steno položili kos filter papirja, kadičko pokrili in jo pustili stati nekaj časa pred začetkom analize. Le ob popolni nasičenosti zraka je namreč koncentracija mobilne faze v vseh delih kadičke enaka, kar prepreči neenakomerno ločevanje komponent vzorca.

Po avtomatskem nanosu vzorcev in standarda z linomatom, smo ploščo dobro posušili s tokom hladnega zraka in jo dali v kadičko z mobilno fazo in nasičenim zrakom. Kapilarne sile so začele vleči mobilno fazo skupaj s komponentami vzorca navzgor po plošči. Razvijanje TLC plošče je prikazano na Sliki 6 in je potekalo pri sobni temperaturi približno pol ure oz. toliko časa, da je mobilna faza prepotovala približno 2 cm do zgornjega roba kromatografske plošče.



Slika 6: Kadička med razvijanjem TLC plošče

3.2.2.5 Detekcija alkaloidov

Kromatografske plošče smo takoj po končanem razvijanju pogledali pod UV lučko pri valovni dolžini 254 nm, saj smo uporabili plošče, premazane s flourescinom, ki plošče pod UV svetlobo pobarva zeleno, alkaloidi pa so vidni kot temne lise. Nato smo jih dobro posušili z enakomernim tokom hladnega zraka, pri čemer smo pazili, da so bile ves čas v vodoravnem položaju. Ko smo se prepričali, da so dobro posušene, smo jih za nekaj sekund potopili v posodo z Dragendorffovim reagentom, ki alkaloide obarva oranžno. Plošče smo nato ponovno posušili s tokom hladnega zraka in shranili.

Dragendorffov reagent smo pripravili tako, da smo v prvi čaši naredili raztopino A, ki je vsebovala 0,85 g bizmutovega subnitrata (BiNO_2), 10 g vinske kisline in 40 mL vode. V drugi čaši smo pripravili raztopino B, ki je vsebovala 20 g kalijevega jodida (KI) in 50 mL vode. Na koncu smo v večji bučki zmešali 1000 mL vode, 200 g vinske kisline in na koncu dodali še raztopini A in B.

3.2.2.6 Retencijski faktorji

Na prvo kromatografsko ploščo smo nanesti tri različne količine STD M, STD K, STD P in STD N, na drugo pa tri različne količine 10-kratnih redčin istih standardov. Iz razvitih in obarvanih kromatografskih plošč smo izračunali R_f za vsak posamezen alkaloid in vizualno ovrednotili linearnost med količino posameznega alkaloida in močjo lise.

R_f smo izračunali po naslednji formuli: $R_f = \frac{\text{pot standarda}}{\text{pot topila}}$

3.2.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

3.2.3.1 Stacionarna faza

Uporabili smo kolono Kinetex 2,6 μm C18 100 (100 x 4,6 mm). Temperatura kolone med merjenjem je bila 40°C (33).

3.2.3.2 Mobilna faza

Preizkusili smo več mobilnih faz za ločevanje alkaloidov z metodo HPLC. Najprej smo uporabili mobilno fazo po Gevenkiriş, A. (2011). Nato smo preizkusili še mobilne faze, pri katerih smo zmešali topilo A in topilo B v različnih razmerjih. Topilo A je vsebovalo vodo z 0,1 % TFA in 0,2 % TEA, topilo B pa je bil metanol.

3.2.3.3 Nanos raztopin standardov in vzorcev

Preden smo raztopine standardov in vzorcev injicirali v HPLC kolono, smo jih prefiltrirali skozi 0,45 μm filter injekcijske brizge, da ni prišlo do mašenja kanalov v HPLC aparaturi. Nanašali smo vodne, etilacetatne in metanolne vzorce. Za metanol in etilacetat smo kasneje ugotovili, da nista primerni topila za nanos vzorcev, saj zelo vplivata na elucijo in močno poslabšata ločljivost.

3.2.3.4 Retencijski faktorji

Za določitev R_f alkaloidov na HPLC smo nanegli STD MIX in razvili kromatogram, ki je pokazal štiri vrhove. Za določitev identitete vsakega vrha smo posebej na HPLC nanegli še standard vsakega alkaloida (STD M, STD K, STD P in STD N). Iz osi x grafičnega prikaza smo nato odčitali R_f za vsak alkaloid.

3.2.3.5 Umeritvene premice

Na HPLC kolono smo nanegli po 10 μl standardne raztopine alkaloidov s koncentracijami 0 mg/ml, 0,2 mg/ml in 2,0 mg/ml. Podatke o površinah pod krivuljami (AUC) smo nato uporabili za izris umeritvenih premic za alkaloide.

4 REZULTATI

4.1 Tankoplastna kromatografija

4.1.1 Optimizacija mobilne faze

Preizkusili smo štiri različne mobilne faze za razvijanje TLC plošč:

- 1) Voda : metanol : TEA = 1 : 1 : 2 (v/v/v)
- 2) Voda z 0,1 % TFA in 0,2 % TEA : metanol = 3 : 7 (v/v)
- 3) Voda z 0,1 % TFA in 0,2 % DEA : metanol = 1 : 4 (v/v)
- 4) DEA : etilacetat : toluen = 1 : 2 : 7 (v/v/v) (32)

Mobilni fazi 1) in 2) nista bili kompatibilni z Dragendorffovim reagentom, saj je le-ta obarval TEA oranžno (enako kot alkaloidi) in je bila detekcija alkaloidov tako nemogoča. Pri mobilni fazi 3), kjer smo TEA zamenjali z DEA in malo povečali količino metanola, smo pričakovali boljše rezultate, vendar smo ugotovili, da so lise slabo ločene in da je kontrast med lisami in ozadjem zelo slab. Mobilna faza 4) je prinesla željene rezultate, saj so se z njo alkaloidi dobro ločili in obarvali, zato smo jo uporabili za vse nadaljnje meritve.

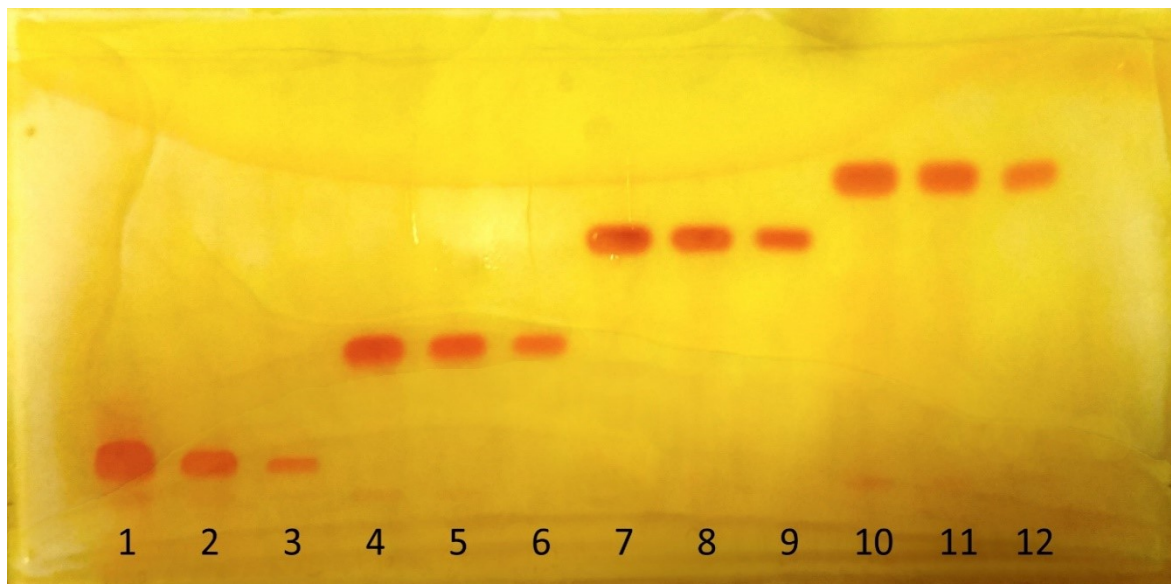
4.1.2 Retencijski faktor ter meja detekcije

Kot je prikazano na Sliki 7, smo na kromatografsko ploščo nanesti 3 različne količine standardov vsakega posameznega alkaloida, katerih koncentracija je bila 6 mg/ml za STD M in 3 mg/ml za STD K, STD P ter STD N. Na drugo kromatografsko ploščo pa smo nanesti 3 različne količine 10-krat zredčenih standardov posameznih alkaloidov in razvita plošča je prikazana na Sliki 8. Količine nanešenih standardov in masa posameznega alkaloida v nanosu so zapisani v Preglednici II in Preglednici III. S primerjanjem intenzitete lis standardov in vzorca smo lahko določili približno količino posameznega alkaloida v volumnu nanešenega vzorca in jo preračunali glede na celotno količino ekstrakta v maso alkaloida na kilogram semen.

Rf smo izračunali po formuli: $Rf = \frac{\text{pot standarda}}{\text{pot topila}}$

Rf vrednotenih alkaloidov so:

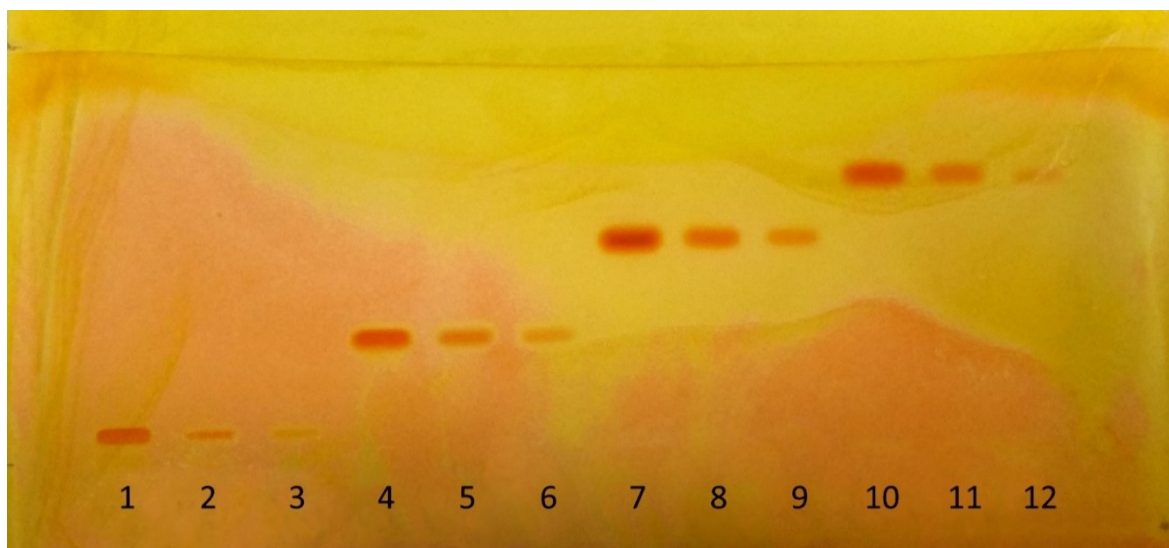
- Za morfin: $Rf_M = 0,076$
- Za kodein: $Rf_K = 0,319$
- Za papaverin: $Rf_P = 0,554$
- Za noskapin: $Rf_N = 0,696$



Slika 7: TLC standardov

Preglednica II: Količina standarda in masa posameznega alkaloida glede na pozicijo na plošči

Pozicija	Vzorec	Količina (v μ l)	Masa alkaloida (v μ g)
1	STD M (6mg/ml)	30	180
2		10	60
3		2	12
4	STD K (3 mg/ml)	10	30
5		5	15
6		2	6
7	STD P (3 mg/ml)	10	30
8		5	15
9		2	6
10	STD N (3 mg/ml)	10	30
11		5	15
12		2	6



Slika 8: TLC 10-krat redčenih standardov

Preglednica III: Količina nanešenega standarda in mase alkaloidov glede na pozicijo na plošči

Pozicija	Vzorec	Količina (v μl)	Masa alkaloida (v μg)
1	STD M (0,6 mg/ml)	20	12
2		5	3
3		2	1,2
4	STD K (0,3 mg/ml)	20	6
5		5	1,5
6		2	0,6
7	STD P (0,3 mg/ml)	20	6
8		5	1,5
9		2	0,6
10	STD N (0,3 mg/ml)	20	6
11		5	1,5
12		2	0,6

Z nanosom različnih količin standardnih raztopin smo določili tudi najmanjšo količino posameznih alkaloidov, ki jih je še moč detektirati na kromatografski plošči. Pri nanosu 2 μL 10-krat zredčenega standarda posameznih alkaloidov so bile lise komaj zaznavne, vendar še vidne. Tako smo določili, da je spodnja meja detekcije alkaloidov manj kot 1,2 μg za morfin in manj kot 0,6 μg za kodein, noskapin in papaverin. Morfin je namreč slabše viden na kromatogramu in je zato potrebna večja količina za detekcijo.

4.1.3 Kromatografija vzorcev

4.1.3.1 Ekstrakcija z vodo in organskim topilom

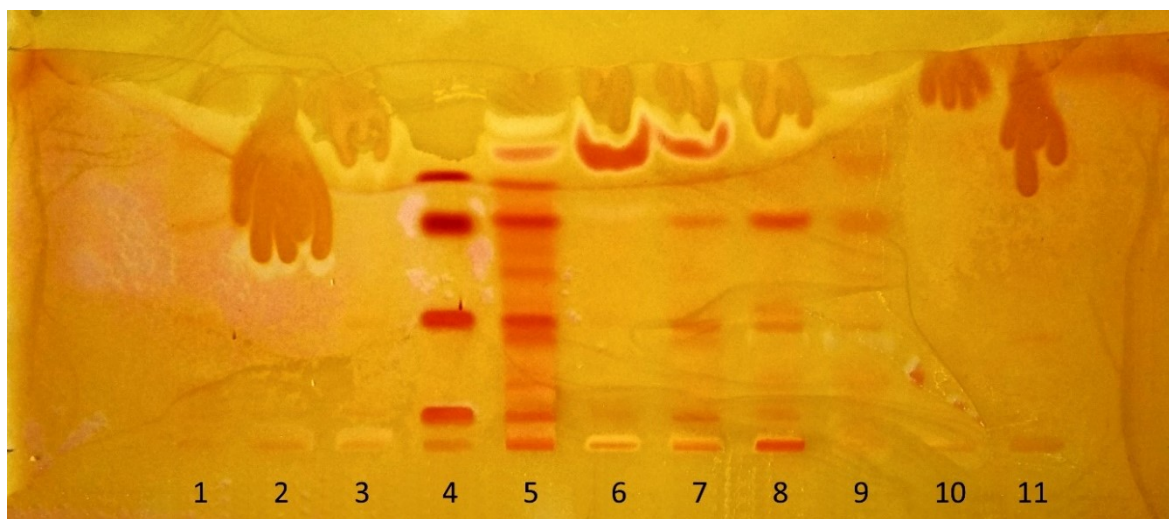
Najprej smo semena ekstrahirali z vodo in organskim topilom, kot je opisano v podpoglavju 3.2.1.1 *Ekstrakcija z vodo in organskim topilom* pri opisu metod dela. Pri ekstrakciji smo uporabili:

- cela kupljena makova semena A in C ter cela nabrana semena;
- mleta makova semena (A, C in nabrana), ki smo jih pred mletjem že ekstrahirali po tem postopku in
- mleta makova semena brez predhodne ekstrakcije (B).

S tem smo želeli primerjati vsebnost nevezanih alkaloidov na površini semen, ki so posledica kontaminacije (cela semena), v primerjavi z vsebnostjo vezanih alkaloidov v notranjosti semen (mleta semena po predhodnem spiranju). Hkrati pa ugotoviti izgube alkaloidov z mletjem (primerjava vsebnosti alkaloidov v mletih, predhodno nespranih semenih in celih semenih).

Po 30 μ l vsakega vzorca tako ekstrahiranih semen smo nanegli po vrsti na kromatografsko ploščo, kot je napisano v Preglednici IV in prikazano na Sliki 9. Vmes smo nanegli še 10 μ l STD MIX Met (pozicija 4 na kromatografski plošči, Slika 9), da smo lahko identificirali posamezne alkaloidne s primerjanjem R_f .

Intenzivnost lis (Slika 9) smo primerjali s standardi (Slika 7, Slika 8), da smo ugotovili količino alkaloidov v nanešenem volumnu posameznega vzorca. Glede na količino celotnega ekstrakta, dobljenega po rotavapiranju pa smo nato preračunali količino alkaloidov v celotnem volumnu posameznega vzorca oz. v masi semen, ki smo jih uporabili za ekstrakcijo. Iz tega podatka smo nato preračunali še vsebnost na kilogram semen.



Slika 9: TLC vzorcev makovih semen po ekstrakciji z vodo in organskim topilom

Preglednica IV: Podatki o vzorcih makovih semen glede na pozicijo na kromatografski plošči

Pozicija	Vzorec	Masa semen (v g)	Volumen ekstrakta (v mL)	Nanešen volumen (v μ l)
1	G vzorec: cela semena	50	3,2	30
2	G vzorec: mleta semena po predhodnem spiranju	40	1,2	30
3	G vzorec: mleta semena brez predhodnega spiranja	50	0,6	30
4	STD MIX	/	/	10
5	A vzorec: cela semena	50	0,5	30
6	A vzorec: mleta semena po predhodnem spiranju	40	0,7	30
7	A vzorec: mleta semena brez predhodnega spiranja	50	1,4	30
8	B vzorec: mleta semena brez predhodnega spiranja	50	0,6	30
9	C vzorec: cela semena	50	0,8	30
10	C vzorec: mleta semena po predhodnem spiranju	50	1,6	30
11	C vzorec: mleta semena brez predhodnega spiranja	50	1,5	30

Rezultati so pokazali precej nizko vsebnost alkaloidov v testiranih vzorcih. Le trije ekstrakti so namreč dosegali vsebnost alkaloidov nad mejo detekcije, ostali pa bodisi niso vsebovali alkaloidov bodisi jih pred nanosom nismo dovolj skoncentrirali. Poleg tega je le en ekstrakt (cela semena A) pokazal količino noskapina nad mejo detekcije. Zaznavne oziroma merljive vrednosti smo lahko odčitali v vzorcih na pozicijah 5, 7 in 8 (Slika 9), kar sovпада z ekstraktom celih in mletih (predhodno nespranih) semen A ter ekstraktom mletih semen B.

Vsebnost alkaloidov smo glede na moč lis preračunali še na kilogram semen. Rezultati so prikazani v Preglednici V.

Preglednica V: Vsebnost alkaloidov v vzorcih makovih semen

Vzorec	Vsebnost alkaloidov (v mg/kg makovih semen)			
	Morfin	Kodein	Papaverin	Noskapin
A cela semena	4	2	2	0,5
A mleta semena	1,1	0,6	0,6	/
B mleta semena	0,5	0,2	0,2-0,6	/

Natančnost določanja vsebnosti alkaloidov v vzorcih je bila omejena zaradi velikega razmika med posameznimi količinami nanešenih standardov na TLC plošče (Slika 7, Slika 8).

Ostanek vodne faze med ekstrakcijo:

Po enakem postopku smo pomerili vsebnost alkaloidov v vodni fazi, ki smo jo shranili med ekstrahiranjem z vodno in organsko fazo. S tem smo želeli preveriti zaostanek alkaloidov pri prenosu iz vode v etilacetat ostalo v vodni fazi, kar bi lahko bil vzrok za nizko koncentracijo alkaloidov v prej pomerjenih etilacetatnih ekstraktih.

Vsebnost alkaloidov je bila v vseh vzorcih pod mejo detekcije, kar je bilo pričakovano, saj smo predvidevali, da v vodni fazi (v kateri zaradi naalkaljenosti alkaloidi niso topni) ne bi smelo ostajati alkaloidov. Kljub temu pa je lahko vzrok za takšne rezultate tudi ta, da vodne faze pred nanosom na TLC ploščo nismo skoncentrirali. Vsebnost alkaloidov bi se tako pokazala le v primeru, da bi izbrani vzorci makovih semen vsebovali zelo visoke koncentracije alkaloidov in bi hkrati večina teh alkaloidov med ekstrakcijo ostala v vodni fazi.

4.1.3.2 Ekstrakcija z aluminijevim oksidom

Pri ekstrakciji vzorcev z Al_2O_3 , smo sledili postopku iz literature (8) in tako za ekstrakcijo uporabili le 2 g semen, skupni volumen ekstrakta pa je bil 50 mL. To pomeni zelo nizko koncentracijo alkaloidov v ekstraktu, zato smo sklepali, da pri TLC analizi ne bo vidnih lis na plošči. To smo nato z izvedbo kromatografije tudi potrdili.

4.1.3.3 Namakanju v vodi, (nakisanem) metanolu in etilacetatu

Poskusili smo poenostaviti ekstrakcijo tako, da smo natehtali 50 g posameznega vzorca makovih semen in jih ločeno namočili za eno uro v 100 mL nakisane vode, metanola, nakisanega metanola in etilacetata. Tako zbrane ekstrakte smo skoncentrirali z rotavaporjem do približno 2 mL in jih nanесли na kromatografsko ploščo po 30 μL .

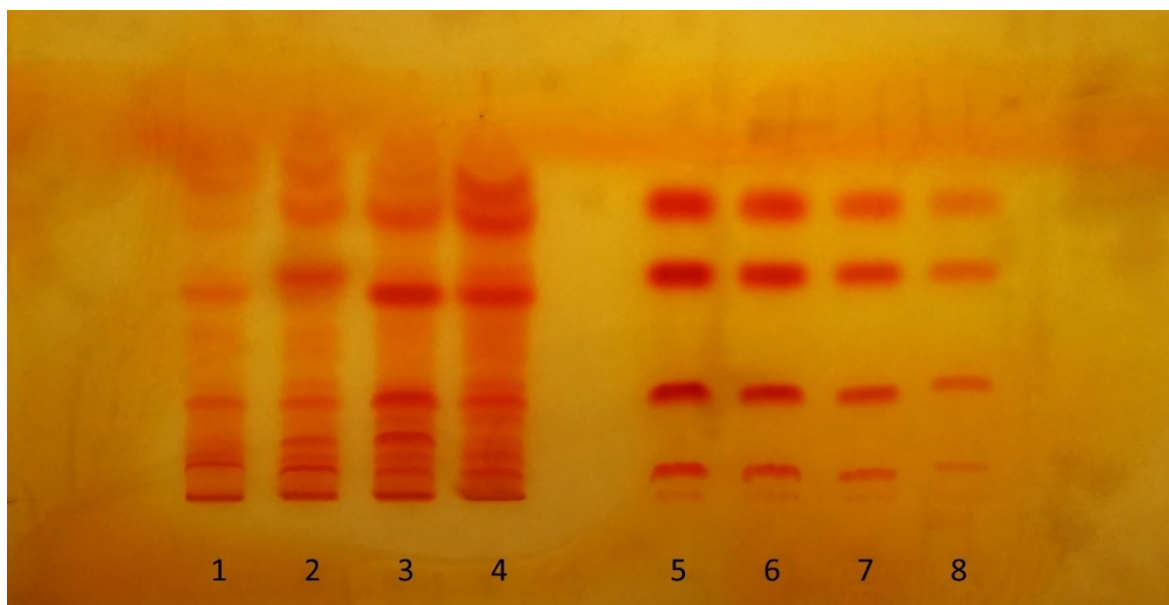
Po razvoju in obarvanju kromatografskih plošč smo ugotovili, da se pri vzorcih, kjer smo makova semena namočili v etilacetat ali nakisan metanol alkaloidi niso ločili. Rezultat je bila pri vseh razmazana črta nanosa. Pri vzorcih, kjer smo makova semena namočili v metanol so se vsi alkaloidi, razen (v nekaterih vzorcih) noskapina, lepo ločili, in bili primerni za kvalitativno določitev. Pri ekstraktih v nakisani vodi pa se je polovica nanešenih vzorcev lepo ločila in so bili alkaloidi zaznavni, pri drugi polovici vzorcev pa ni bilo zaznati alkaloidov.

4.1.3.4 Ekstrakcija z vodo in organskim topilom in močno koncentriranje

Pri skoraj vseh do tedaj opravljenih meritvah smo imeli težave z nizko koncentracijo ali pa premajhnim nanosom vzorcev, zato smo se odločili ponoviti ekstrakcijo z vodo in organskim topilom, ki se je izkazala za najbolj učinkovito, in vzorce močno skoncentrirati. Ekstrakcijo smo ponovili z novimi vzorci celih makovih semen (D, E, F) in z nabranimi celimi semeni (G). Makova semena B so bila kupljena v mletem stanju, zato jih nismo ponovno ekstrahirali. Semen A in C pa nam je zmanjkalo za ponovno ekstrakcijo, poleg tega smo jim že prej določili vsebnost alkaloidov, pri čemer semena C niso pokazala zaznavnih količin alkaloidov.

Makova semena D, E, F in G smo ekstrahirali po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1.1 *Ekstrakcija z vodo in organskim topilom*. Pri rotavapiranju smo zbrali 1 – 2 mL ekstraktov in od vsakega vzeli po 1 mL, ga prestavili v novo plastično epruveto in čez noč postavili v digestorij, da je topilo (etilacetat) popolnoma izhlapelo. Naslednji dan smo vsakega posebej ponovno raztopili v manjši količini etilacetata, količino pa smo prilagodili prvotnemu volumnu ekstrakta, tako da je bil vsak ekstrakt enako skoncentriran. To pomeni, da smo pri nanosu vzorcev na TLC ploščo vsakega nanesli po 30 µl, kar je ustrezalo ekstraktu 6 g makovih semen. Tako so bili rezultati že na pogled primerljivi in smo vsebnost alkaloidov lažje določili.

Na isto TLC ploščo smo nanesli tudi 10-krat zredčen STD MIX (s koncentracijo 0,2 mg/ml vode) v štirih različnih količinah, tokrat v manjših razmikih količin kot na Sliki 7 in Sliki 8. Vsebnost alkaloidov smo lahko tako natančneje določili, saj smo lise primerjali s standardi na Sliki 7 in Sliki 8 ter s standardi, ki smo jih na ploščo nanesli skupaj z vzorci (Slika 10). Rezultati so prikazani na Sliki 10 in v Preglednici VI:



Slika 10: TLC koncentriranih vzorcev po ekstrakciji z vodo in organskim topilom in standarda

Preglednici VI: Podatki o vzorcih in standardu glede na pozicijo na TLC plošči

Pozicija	Vzorec/ standard	Volumen nanosa (v μ l)	Vsebnost alkaloidov (v mg/kg makovih semen za vzorci in v μ g/liso za standarde)			
			Morfin	Kodein	Papaverin	Noskapin
1	D cela	30	0,5	0,2	0,2*	/
2	G cela	30	0,5	0,2	0,3	0,3
3	E cela	30	0,3	0,9	1*	0,3
4	F cela	30	0,3	0,7	0,3*	0,5
5	STD MIX	30	6	6	6	6
6	STD MIX	20	4	4	4	4
7	STD MIX	10	2	2	2	2
8	STD MIX	5	1	1	1	1

Rezultati kažejo, da sta v vseh štirih vzorcih celih makovih semen prisotna morfin in kodein ter v treh tudi noskapin (vzorci G, E in F). Prisotnost papaverina lahko z zagotovostjo potrdimo le v enem ekstraktu (vzorec G), saj imajo pri ostalih vzorcih lise, ki bi lahko predstavljale papaverin, nekoliko nižji R_f kot je R_f papaverina pri nanosu standarda (v Preglednici VI označeno z *).

Skupna vsebnost alkaloidov, če primerjamo te štiri vzorce makovih semen, se giblje med 0,9 in 2,5 mg/kg makovih semen oziroma med 0,7 in 1,5 mg/kg, če štejemo prisotnost papaverina samo v vzorcu G. Vsebnost morfina je med 0,3 in 0,5 mg/kg; vsebnost kodeina med 0,2 in 0,9 mg/kg; papaverin je vsebovan med 0,2 in 1 mg/kg oziroma med 0 in 0,3 mg/kg (če lise pri vzorcih D, E in F niso predstavljale papaverina) in noskapin med 0 in 0,5

mg/kg. Da bi se prepričali o točnosti rezultatov smo iste vzorce pomerili tudi z referenčno metodo HPLC, ki smo jo optimizirali po Gevenkiriş, A. (2011).

4.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

4.2.1 Optimizacija mobilne faze

Najprej smo za nanašanje standardnih raztopin alkaloidov na HPLC uporabili mobilno fazo po Gevenkiriş, A. (2011). Izkazalo se je, da se izbrani standardi ne ločujejo tako dobro, kot je navedeno v literaturi (8), zato smo morali mobilno fazo spremeniti in optimizirati.

Novo mobilno fazo smo sestavili iz topila A in topila B. Topilo A je bila voda z 0,1 % TFA in 0,2 % TEA, topilo B pa čisti metanol. Razmerje topil A in B smo spreminjali tako dolgo, da smo prišli do optimalnega razmerja topil, ki je bilo v našem primeru A : B = 3 : 7. Takšna mobilna faza je omogočila dobro ločevanje alkaloidov med seboj.

4.2.2 Izbira medija za nanos standardov in vzorcev

Preizkusili smo tri medije, za izdelavo standardov: metanol, etilacetat in vodo. Ugotovili smo, da je vpliv metanola in etilacetata na elucijo zelo velik in da oba zelo poslabšata ločljivost. Najmanj je na elucijo vplivala voda, kar se vidi na kromatogramu pri nanosu STD MIX (Slika 11). Šum na kromatogramu je minimalen, vrhovi pa ozki, visoki in lepo ločeni.

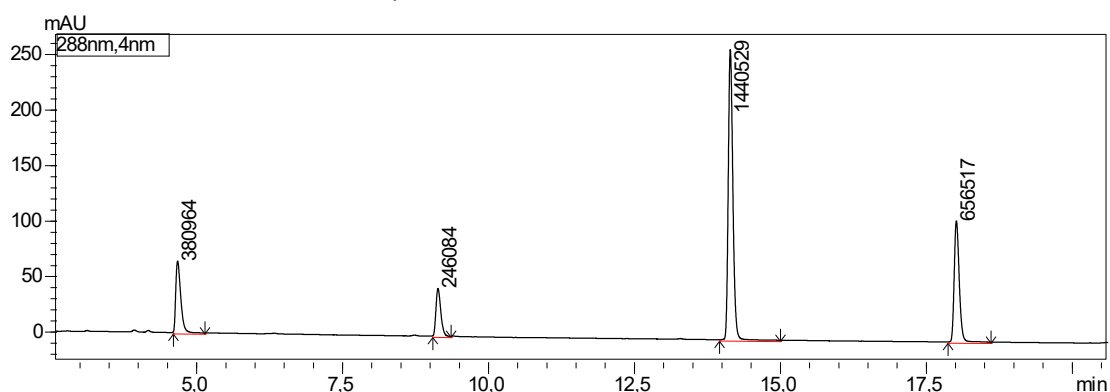
4.2.3 Retencijski faktorji

Rf posameznih alkaloidov so vidni na x osi grafičnih prikazov elucije alkaloidov pri nanosu STD MIX, kar prikazuje Slika 11. Identiteto posameznega alkaloida smo potrdili z nanosom standardov posameznih alkaloidov, raztopljenih v vodi (STD M; STD K; STD P; STD N).

Vrednosti Rf za posamezne alkaloidne so naslednje:

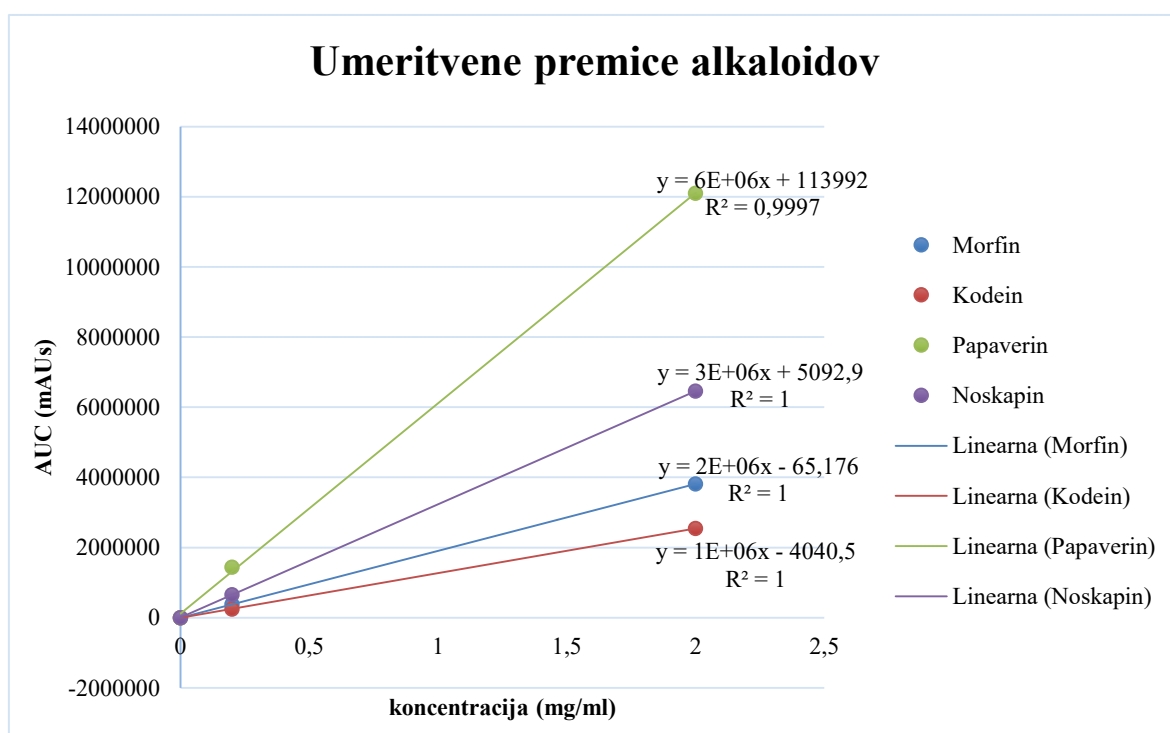
- Za morfin: $Rf_M = 4,696$ min
- Za kodein: $Rf_K = 9,157$ min
- Za noskapin: $Rf_P = 14,164$ min
- Za papaverin: $Rf_N = 18,037$ min

Datafile Name:50, 1uL st.mix v vodi.lcd
Sample Name:72 st.mix v vodi



Slika 11: Rf morfina, kodeina, papaverina in noskapina po vrsti od leve proti desni

4.2.4 Umeritvene premice



Grafikon 1: Umeritvene premice za posamezne alkaloidne

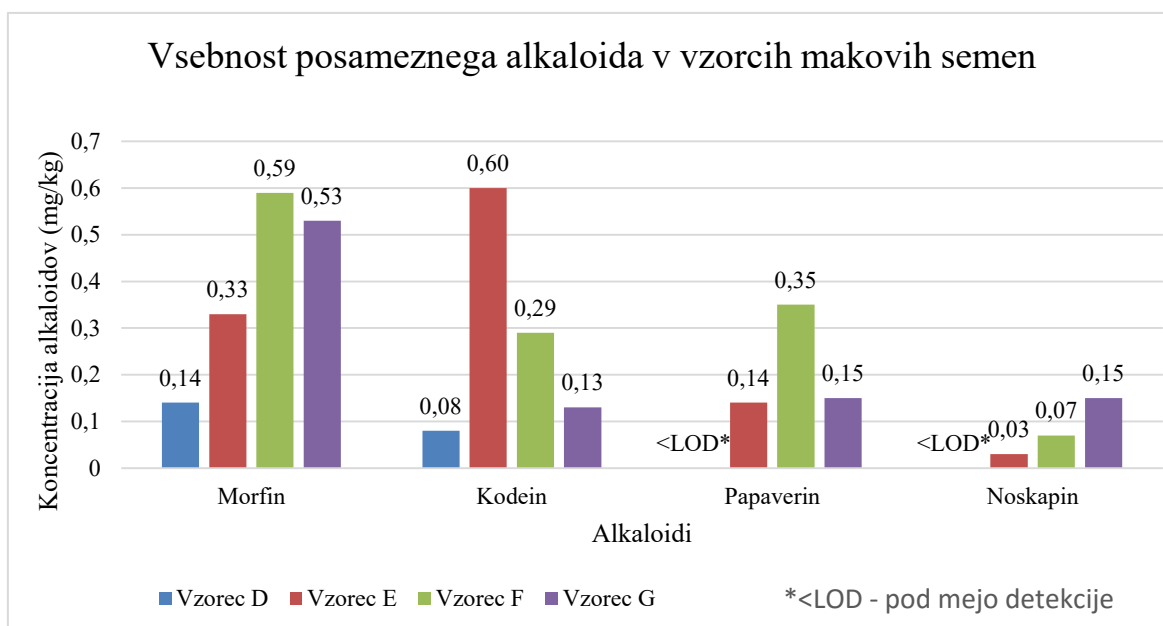
Nanesli smo po 10 µl različnih koncentracij standardov (0 mg/ml, 0,2 mg/ml in 2,0 mg/ml) na HPLC. Upoštevali smo AUC alkaloidov pri vseh koncentracijah in narisali umeritveno premico za vsak posamezen alkaloid ter jih prikazali v Grafikonu 1. Enačbe premic smo nato uporabili za izračun vsebnosti alkaloidov v vzorcih.

4.2.5 Kromatografija vzorcev po ekstrakciji z vodo in organskim topilom

S tako pripravljeno in optimizirano metodo HPLC smo pomerili vsebnost alkaloidov v vzorcih celih makovih semen D, E, F in G po ekstrakciji z vodo in organskim topilom

(poglavje 3.2.1.1 *Ekrstakcija z vodo in organskim topilom*). Vzorcem smo zamenjali medij tako, da smo po 1 mL vsakega vzorca čez noč postavili v digestorij, da je izhlapelo prvotno topilo (etilacetat) in naslednji dan posušen ekstrakt raztopili v enaki količini vode. Voda ima namreč manjši vpliv na elucijo alkaloidov kot etilacetat.

Vzorci smo pred nanosom na HPLC kolono prefiltrirali skozi 0,45 µm filter s pomočjo injekcijske brizge. Nanesli smo po 10 µl posameznega vzorca. Iz dobljenih rezultatov AUC smo s pomočjo enačb umeritvenih krivulj določili vsebnost alkaloidov v vzorcih. Rezultati so zbrani v Grafikonu 2.



Grafikon 2: Vsebnost alkaloidov v vzorcih makovih semen

S HPLC smo torej izmerili vsebnost morfina v štirih vzorcih makovih semen med 0,14 in 0,59 mg/kg semen in vsebnost kodeina med 0,08 in 0,60 mg/kg semen. Najnižja vsebnost papaverina in noskapina v pomerjenih vzorcih je bila pod mejo detekcije, najvišja pa 0,35 mg/kg semen za papaverin in 0,15 mg/kg semen za noskapin.

5 RAZPRAVA

5.1 Razvoj metode ekstrakcije

Razvili in optimizirali smo enostavno in poceni metodo za hitro ekstrakcijo in detekcijo alkaloidov v makovih semenih. Najprej smo alkaloidne soli iz semen izolirali s pomočjo nakisane vode, v kateri so alkaloidi zaradi bazičnega značaja tvorili soli. Nato smo vodo naalkalili, da so se alkaloidi oborili in jih prenesli v organsko fazo – etilacetat, v katerem so alkaloidi topni. S takšno dvofazno ekstrakcijo smo se iz ekstrakta znebili vseh nečistoč, ki niso topne hkrati v nakisani vodi, bazični vodi in etilacetatu. Etilacetatni ekstrakt, ki smo ga na koncu z rotavaporjem skoncentrirali, je bil tako dovolj čist, da alkaloidov ni nič oviralo pri ločevanju na kromatografiji. Vzorcem smo vsebnost alkaloidov merili kvalitativno in semikvantitativno s TLC. Po končni optimizaciji metode ekstrakcije pa smo dobljene vzorce pomerili še s HPLC, pri čemer smo dobili kvantitativne vrednosti alkaloidov v makovih semenih in se prepričali o ustreznosti meritev TLC.

5.2 Primerjava z ostalimi metodami ekstrakcije

Metodo ekstrakcije z vodo in organskim topilom smo primerjali z ekstrakcijo z Al_2O_3 (8) in z namakanje semen v različnih topilih (nakisani vodi, metanolu, nakisanem metanolu in naalkaljenem etilacetatu). Vsem vzorcem, pridobljenim z metodami, ki so služile za primerjavo uspešnosti ekstrakcije, smo alkaloidne soli pomerili le kvalitativno z metodo TLC.

Pri kromatografiji vzorcev, pridobljenih z ekstrakcijo z Al_2O_3 , prirejeno po Gevenkiriş, A. (2011), nismo zaznali alkaloidov. Razlog za to je najverjetneje nizka uporabljena količina makovih semen in velik končni volumen vzorca, kar pomeni zelo nizko koncentracijo alkaloidov v ekstraktu, tudi če bi bila koncentracija alkaloidov v izbranih vzorcih makovih semen zelo visoka (tj. velikostni razred močno kontaminiranih makovih semen, objavljenih v literaturi (2)). Te vzorce bi morali skoncentrirati na najmanjši možen volumen, da bi, če je bila ekstrakcija uspešna in vsebnost alkaloidov v makovih semenih dovolj visoka, dobili zaznavne količine alkaloidov na TLC plošči.

Precej dobre rezultate so pokazali vzorci, kjer smo semena namakali v metanolu ali nakisani vodi. Vsi alkaloidi v vzorcih semen, ki smo jih namakali v metanolu, so se na kromatografski plošči lepo ločili, razen noskapina, ki ga pri nekaterih vzorcih nismo zaznali. Od vseh vzorcev makovih semen, namočenih v nakisani vodi, jih je polovica pokazala zaznavne količine alkaloidov, ki so se na TLC plošči lepo ločili, pri drugi polovici vzorcev pa nismo

zaznali alkaloidov. Slednje smo morda premalo skoncentrirali in je bila vsebnost alkaloidov v nanešeni količini pod mejo detekcije.

Pri vzorcih makovih semen namočenih bodisi v nakisanem metanolu bodisi v naalkaljenem etilacetatu se alkaloidi na TLC plošči niso ločili. Najverjetneje so se skupaj z alkaloidi v topilu raztopile še mnoge druge substance, ki so ovirale alkaloidne pri potovanju skupaj z mobilno fazo navzgor po kromatografski plošči.

S primerjavo različnih metod ekstrakcije smo tako ugotovili, da je razvita metoda ustrežnejša od večine ostalih metod, ki smo jih preizkusili. Za učinkovito se je poleg razvite metode izkazala tudi ekstrakcija alkaloidov z namakanjem semen v metanolu ali nakisani vodi, saj smo pri obeh metodah vsaj polovici vzorcem lahko kvalitativno potrdili vsebnost alkaloidov v makovih semenih.

5.3 Vsebnost vezanih in nevezanih alkaloidov, izguba alkaloidov z mletjem

Pri merjenju vsebnosti alkaloidov v celih in mletih (svežih in predhodno spranih) semenih smo iz rezultatov vzorcev, katerih vsebnost alkaloidov je bila nad mejo detekcije ugotovili, da je vsebnost nevezanih alkaloidov na površini semen veliko večja v primerjavi z vsebnostjo vezanih alkaloidov v notranjosti semen. To je razvidno pri vzorcu A, kjer so cela semena vsebovala zaznavne in merljive količine alkaloidov, medtem ko v mletih, predhodno spranih semenih nismo zaznali alkaloidov. Zaradi nezmožnosti detekcije alkaloidov v mletih, predhodno spranih makovih semenih pa je bilo nemogoče potrditi vsebnost alkaloidov v notranjosti semen in/ali primerjati vsebnost vezanih in nevezanih alkaloidov. Lahko pa na tem primeru potrdimo, da se z namakanjem semen v nakisani vodi (približno eno uro) iz njih odstrani večina alkaloidov

S primerjavo ekstrakta celih semen in mletih, predhodno nespranih semen smo ugotovili, da se s procesom mletja izgubi precej alkaloidov. V našem konkretnem primeru se je izgubilo približno 70 % morfina, kodeina in papaverina. Noskapin je bil v mletih semenih pod mejo detekcije.

5.4 Vsebnost alkaloidov v makovih semenih

Po vseh opravljenih meritvah z razvito metodo TLC smo primerjali vsebnost alkaloidov v testiranih vzorcih makovih semen s smernicami. Koncentracije so se gibale vse od spodnje

meje detekcije pa do 4 mg/kg semen za morfin, 2 mg/kg za kodein in papaverin in 0,5 mg/kg za noskapin. Ugotovili smo, da je bil vzorec A makovih semen, ki je bil od vseh vzorcev najbolj kontaminiran, na zgornji meji po vsebnosti morfina glede na priporočila nemškega inštituta BfR. Vseboval je namreč približno 4 mg morfina na kilogram semen, kar je maksimalna vrednost, ki še zagotavlja varnost po njihovih raziskavah in meritvah. Ostali vzorci so povsem ustrezali smernicam BfR (2). Poleg tega so vsa makova semena ustrezala tudi madžarski zakonodaji, ki trenutno edina vsebuje zakon o najvišji dovoljeni vsebnosti alkaloidov (morfina, kodeina in papaverina) v makovih semenih, namenjenih prehrani (12). Vse vzorce lahko torej označimo za varne.

Primerjava kontaminiranosti semen glede na izvor je bila zaradi majhnega števila vzorcev lahko le okvirna. Semena turškega izvora so med vsemi najbolj izstopala s kontaminiranostjo z alkaloidi (vzorec A). Na drugi strani pa so bili v le enem od vzorcev alkaloidi pod mejo detekcije – to je bil mak slovenskega porekla (vzorec C). Ostali vzorci (po eden iz Turčije in Slovenije ter dva iz Češke) so vsebovali primerljive vrednosti alkaloidov. Kljub temu ne moremo posploševati podatkov na podlagi dobljenih rezultatov zaradi majhnega števila vzorcev makovih semen.

Pričakovali smo, da se bo vsebnost alkaloidov med kupljenimi in nabranimi vidno razlikovala zaradi različnega načina gojenja, obiranja ter ostalih industrijskih procesov, katerim so izpostavljena semena preden pridejo na trg. Kljub temu večjih odstopanj med njimi ni bilo opaziti. Vsebnost alkaloidov v nabranih semenih je bila podobna vsebnosti alkaloidov v srednje kontaminiranih kupljenih semenih.

Po dokončni optimizaciji metode ekstrakcije z vodo in organskim topilom ter razvoju kromatografske metode TLC za semikvantitativno merjenje vsebnosti alkaloidov, smo rezultate preverili še z referenčno metodo HPLC, ki smo jo priredili po Gevenkiriş A. (2011). Ekstraktom smo najprej zamenjali topilo (iz etilacetatnih vzorcev smo naredili vodne), saj smo pri optimizaciji metode ugotovili, da voda najmanj vpliva na elucijo alkaloidov. Nato smo izvedli vse meritve in rezultate istih vzorcev pomejenih na TLC in HPLC prikazali v Preglednici VII.

Preglednica VII: Primerjava rezultatov TLC in HPLC za vsebnost alkaloidov v makovih semenih

Vzorec semen	Morfin (mg/kg)		Kodein (mg/kg)		Papaverin (mg/kg)		Noskapin (mg/kg)	
	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC
A	4	-	2	-	2	-	0,5	-
C	< LOD	-	< LOD	-	< LOD	-	< LOD	-
D	0,5	0,14	0,2	0,08	0,2*	< LOD	< LOD	< LOD
E	0,3	0,33	0,9	0,60	1*	0,14	0,3	0,03
F	0,3	0,59	0,7	0,29	0,3*	0,35	0,5	0,07
G	0,5	0,53	0,2	0,13	0,3	0,15	0,3	0,15

*Lisa na kromatografski plošči je imela malo nižji Rf od Rf_p = 0,554, zato ni zanesljivo, da je prikazovala noskapin.

Zaradi pomanjkanja podatkov HPLC meritev lahko preverimo ustreznost meritev TLC le pri rezultatih vzorcev D, E, F in G semen. Kot kaže je bila TLC metoda precej natančna, saj je več kot polovica vrednosti, ki so bile nad spodnjo mejo detekcije, v istem velikostnem razredu, če primerjamo rezultate istega vzorca na TLC in HPLC. Ostali rezultati se med seboj razlikujejo za največ en velikostni razred (10^1), verjetno pa bi bile razlike manjše če bi bila vsebnost alkaloidov v testiranih vzorcih semen višja. TLC metodo smo torej razvili tako, da je primerna za semikvantitativno ocenjevanje vsebnosti alkaloidov v makovih semenih.

6 SKLEP

Tekom raziskovanja smo razvili metodo za semikvantitativno vrednotenje alkaloidov v makovih semenih. Med delom smo prišli do zanimivih zaključkov in ugotovitev.

- Razvili in optimizirali smo metodo ekstrakcije in detekcije alkaloidov v makovih semenih, ki je hitra, enostavna poceni in zanesljiva. Primerna je tako za demonstracijo v šolah, kot za rutinsko semikvantitativno pomejanje vsebnosti alkaloidov v makovih semenih s tržišča v analiznih laboratorijih.
- S primerjanjem razvite metode z drugimi vrstami ekstrakcije smo ugotovili, da so se merljive količine alkaloidov pokazale tudi v ekstraktih, pridobljenih z namakanjem semen v metanolu in nakisani vodi. Ostale metode ekstrakcije, ki smo jih preizkusili, so bile premalo učinkovite in niso pokazale rezultatov.
- Ugotovili smo, da je vsebnost vezanih alkaloidov v makovih semenih, če so ti v njih prisotni, zelo nizka in jih s TLC nismo mogli zaznati.
- Ugotovili smo tudi, da se z namakanjem semen v nakisani vodi za eno uro iz njih odstrani večina alkaloidov.
- S primerjanjem vsebnosti alkaloidov v celih in mletih semenih smo ugotovili, da se z mletjem izgubi precej alkaloidov. V našem primeru je bilo to 70 % morfina, kodeina in papaverina, medtem ko noskapina v mletih semenih nismo zaznali.
- Pomerili smo vsebnost alkaloidov v šestih vzorcih celih makovih semen s slovenskega tržišča in ugotovili da so bile koncentracije alkaloidov znotraj smernic BfR in skladne z madžarsko zakonodajo (edino veljavno zakonodajo na tem področju).
- Primerjali smo kontaminiranost vzorcev glede na državo izvora in ugotovili, da so bila najbolj kontaminirana semena turškega izvora in najmanj tista s slovenskim poreklom. Zaradi premajhnega števila vzorcev pa teh podatkov ne moremo posploševati na vsa semena istega porekla.
- Nabrana makova semena so bila po vsebnosti alkaloidov zelo podobna tistim kupljenim s srednjimi vrednostmi alkaloidov in niso pokazala nikakršnih odstopanj.

7 LITERATURA

1. EFSA Panel on Contaminants in the Food (CONTAM), 2011. *Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of opium alkaloids in poppy seeds*. EFSA Journal, 9(11).
2. *BfR recommends provisional daily upper intake level and a guidance value for morphine in poppy seeds*, 2005. BfR Health Assessment 012/2006. Dostopno na: http://www.bfr.bund.de/cm/349/bfr_recommends_provisional_daily_upper_intake_level_and_a_guidance_value_for_morphine_in_poppy_seeds.pdf [22. 7. 2016]
3. Sproll, C., Perz, R. C. in Lachenmeier D. W., 2006. Optimized LC/MS/MS analysis of morphine and codeine in poppy seed and evaluation of their fate during food processing as a basis for risk analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), pp. 5292–5298.
4. Perkič, E., 2003. *Ugotavljanje vsebnosti alkaloidov v vzorcih vrtnega maka (Papaver somniferum L.) s pomočjo kapilarne elektroforeze in tankoplastne kromatografije*. Diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo.
5. Kočevar Glavač, N., Janeš, D., Lumpret, M., Stojilkovski, K., Kokalj, M., Tavčar Benković, E., Gosenca, M., Hendrychová, H., Gašperlin, M., Lunder, M., Baumgartner, S., 2015. *Sodobna kozmetika: Sestavine naravnega izvora*. Velenje: Širimo dobro besedo d.o.o., pp. 120–121.
6. Fairbairn, J. W., El-Masry, S., 1968. The alkaloids of *Papaver somniferum* L.–VI. »bound« morphine and seed development. *Phytochemistry*, 7, pp. 181–187.
7. U.S. Department of Justice – National Institute of Justice, 1992. *Opium poppy cultivation and heroin processing in southeast Asia*. Washington, DC. Dostopno na: <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/Digitization/141189NCJRS.pdf> [22. 7. 2016]
8. Gevenkiriş, A., 2011. *Determination of morphine and total phenolic content in poppy seed of turkish origin*. Magistrsko delo. Ankara: Middle East Technical University, The Graduate School of Natural and Applied Sciences.
9. Kishore Mishra, B., Rastogi, A., Siddiqui, A., Srivastava, M., Verma, N., Pandey, R., Sharma, N. C. in Shukla, S., 2013. Opium Poppy: Genetic Upgradation Through Intervention of Plant Breeding Techniques. V: Andersen S. B. *Plant Breeding from Laboratories to Fields*, InTech, pp. 209–238, Pogl. 8. Dostopno na: <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding-from-laboratories-to-fields/opium->

- [poppy-genetic-upgradation-through-intervention-of-plant-breeding-techniques](#) [22. 7. 2016]
10. Brownstein, M. J., 1993. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, pp. 5391–5393.
 11. Smith, M. T. in Goh, W. H., 2012. Opioid analgesics. V: Racz, G. B. in Noe, C. E. *Pain management – current issues and opinions*, InTech, pp. 287–306, Pogl. 14. Dostopno na: <http://www.intechopen.com/books/pain-management-current-issues-and-opinions/opioid-analgesics> [22. 7. 2016]
 12. Zentai, A., Sali, J., Szeitzne-Szabo, M., Szabo, I. J., Ambrus, A., 2011. Exposure of consumers to morphine from poppy seeds in Hungary. *Food Aditives and Contaminants*, 29(3), pp. 403–414.
 13. Thompson, P. I., 1991. *Pharmacology of morphine and the active metabolite morphine 6-glucuronide: A comparison of pharmacological and clinical effects*. Disertacija. London: University of Auckland, Faculty of Medicine.
 14. Dusemund, B., Appel, K. E., Lampen, A., 2010. BfR risk assessment of alkaloids as ingredients and contaminants of food: quinine, opium alkaloids, and senecio pyrrolizidine alkaloids. V: DFG Senate Commission on Food Safety. *Risk assessment of phytochemicals in food: Novel approaches*. Wiley-VCH, Pogl 4.9.
 15. Mohsin, H. F., Abdul Wahab, I., Idiana Md Nasir, N., Zulkefil, N. H. in Shafinas Md Nasir, N. I., 2012. The chemical investigation of papaver seeds. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, 2(4), pp. 38-41.
 16. Grove, M. D., Spencer, G. F., Marjorie, M. V., Tookey, H. L., 1976. Morphine and codeine in poppy seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(4), pp. 896–897.
 17. Fairbairn, J. W., Steele, M. J., 1980. Bound forms of alkaloids in *Papaver somniferum* and *P. bracteatum*. *Phytochemistry*, 19(11), pp. 2317–2321.
 18. Lo, D. S., Chua, T.H., 1992. Poppy seeds: implications of consumption. *Med Sci Law*, 32(4), pp. 296–302.
 19. Concheiro, M., Newmeyer, M. N., Luiz da Costa, J., Flegel, R., Gorelick, D. A. in Huestis, M., A., 2015. Morphine and codeine in oral fluid after controlled poppy seed administration. *Drug Testing and Analysis*, 7(7), pp. 586–591.
 20. Struempfer, R. E., 1987. Excretion of codeine and morphine following ingestion of poppy seeds. *Journal of Analytical Toxicology*, 11, pp. 97–99.

21. Trafkowski, J., Musshoff, F., Madea, B., 2005. Positive opiate results after consumption of poppy seeds: Analytical procedure for discrimination between heroin abuse and poppy seed consumption. *Blutalkohol*, 42(6), pp. 431–441.
22. Regner. Ž., 2016. Nenamerni doping v športu in načini prikrivanja nekoč ter danes. *Spatula*, 68, pp. 4-7.
23. <http://poppyseedtea.com/Other%20Deaths%20Page.html> [28. 7. 2016]
24. <http://poppyseedtea.com/> [28. 7. 2016]
25. https://en.wikipedia.org/wiki/Poppy_tea [28. 7. 2016]
26. <http://abcnews.go.com/Health/PainManagement/story?id=4132469&page=1> [28. 7. 2016]
27. http://poppyseedtea.com/Coroner_report.html [28.7.2016]
28. <http://www.dailymail.co.uk/news/article-2531688/DJ-died-drinking-PINT-deadly-poppy-tea-using-recipe-online.html> [28. 7. 2016]
29. Neznani avtor, 1838. Death of a child from the administration of syrup of poppies. *The Lancet*, 30(767), pp. 239–240.
30. Sproll, C., Perz R. C., Buschmann, R., Lachenmeier, D. W., 2007. Guidelines for reduction of morphine in poppy seed intended for food purposes. *Eur Food Res Technol*, 226, pp. 307–310.
31. Szucs, Z., Szabady, B., Szatmáry, M., Cimpan, G. and Nyiredy, S., 2002. High-throughput analytical strategy with combined planar and column liquid chromatography for improvement of the poppy (*Papaver somniferum* L.) with a high alkaloid content. *Chromatographia*, 56(1), pp. 49–54.
32. Klenovšek, T., Herman, A. *Določitev alkaloidov v makovih semenih in glavicah*. Raziskovalna naloga. Trbovlje: Gimnazija in ekonomska srednja šola Trbovlje.
33. <https://www.phenomenex.com/Kinetex/ApplicationSearch?phase=C8> [29. 8. 2016]