

**Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**

**Národní referenční laboratoř**



**Bulletin 2013**

**Ročník XVII, číslo 1/2013**

**Brno 2013**

## Obsah

1. **Multireziduální stanovení pesticidů metodou LC-MS/MS**  
Petra Kosubová, Pavla Tieffová, Barbora Foltová  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 1
2. **Přímá extrakce DNA z půdních vzorků**  
Jiří Čuhel  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-OMB Brno,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 13
3. **Stanovení obsahu morfinu v makovině metodou HPLC**  
Naděžda Kabátová, Radvana Šulová  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, NRL-RO Brno,  
Hroznová 2, 656 06 Brno 24

Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

# Multireziduální stanovení pesticidů metodou LC-MS/MS

*Petra Kosubová, Pavla Tieffová, Barbora Foltová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,  
Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno  
petra.kosubova@ukzuz.cz

## 1 Souhrn

Multireziduální stanovení pesticidů se pro účely národního monitoringu a úřední kontroly těchto látek v krmivech provádí v laboratořích RO Brno od roku 2007 pomocí plynové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS/MS). Skupina pesticidů zahrnuje také látky, které není možné stanovit pomocí GC-MS/MS a které vyžadují analýzu pomocí kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). V roce 2010 byl do laboratoře RO Brno zakoupen ultra-účinný kapalinový chromatograf s trojnásobným kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (UPLC-MS/MS) Xevo TQ MS (Waters). V rámci zavedení techniky UPLC-MS/MS do akreditované zkoušky pro multireziduální stanovení pesticidů byla provedena validace stanovení 35 vybraných látek a správnost validované metody ověřena analýzou interních referenčních materiálů a účastí v testu způsobilosti EUPT-C5/SRM6.

## 2 Úvod

Pesticidy představují širokou škálu látek, které se nejčastěji stanovují pomocí multireziduálních metod zahrnující GC-MS i LC-MS analýzu. Pro účely úřední kontroly a monitoringu krmiv je nutné provádět stanovení v souladu s platnými normami Evropské unie (EU). V současnosti existují dvě evropské normy pro multireziduální stanovení pesticidů s využitím LC-MS techniky. ČSN EN 15662 představuje extrakci acetonitrem a čištění pomocí disperzní extrakce na pevnou fázi (DSPE) (1) a ČSN EN 15637 methanolovou

extrakci a přečištění na křemelině (2). V RO Brno je stanovení pesticidů založeno na ČSN EN 15662, označované jako metoda QuEChERS. Acetonitrilové extrakty QuEChERS jsou vhodné pro obě analytická koncová stanovení, avšak pro účely GC-MS je nutné surový vymražený extrakt přečistit pomocí DSPE s PSA (primární sekundární amin) anebo směsí PSA s aktivním uhlím a/nebo se silikagelem modifikovaným oktadecylsilanolem. Snadnější příprava vzorku pro LC-MS stanovení představuje pouze naředění vymraženého acetonitrilového extraktu deionizovanou vodou (1 : 1) a stabilizaci kyselinou mravenčí.

Po zakoupení UPLC-MS/MS systému Xevo TQ MS Waters bylo nutné zavést multireziduální stanovení pesticidů v krmivech do akreditovaných postupů (3). Pro tento účel byly stanoveny vybrané validační parametry: přesnost (opakovatelnost), správnost, mez stanovitelnosti (reportovací limit), selektivita, nejistota, identifikační parametry. Uvedené parametry byly stanoveny analýzou obohacených vzorků reprezentativních matric a analýzou interních referenčních materiálů (IRM), tj. vzorků obilovin získaných v rámci účasti v mezinárodních testech způsobilosti pořádaných Referenčními laboratořemi EU pro rezidua pesticidů (EUPT) (5). Získané validační parametry byly porovnány s validačními kritérii uvedenými v dokumentu SANCO/10684/2009 (6), který zároveň stanovuje požadavky na kontrolu kvality metod využívaných pro analýzu pesticidů v potravinách a krmivech v laboratořích provádějících úřední kontrolu reziduí pesticidů v rámci EU.

Cílem práce bylo validovat stanovení vybraných pesticidních látek s využitím metody QUEChERS a systému UPLC-MS/MS Xevo Waters a rozšířit tak škálu sledovaných pesticidů v rámci cílené kontroly a monitoringu krmiv v RO Brno.

### **3 Materiál a metody**

Seznam použitých chemikálií, činidel a příprava vzorků k analýze je uveden v JPP ÚKZÚZ Zkoušení krmiv – postup 10610.1 (3). Čistota a vhodnost použitých chemikálií a činidel byla ověřena analýzou laboratorních slepých pokusů. Koncové UPLC-MS/MS stanovení bylo provedeno pomocí systému Acquity UPLC – Xevo TQ MS (Waters) (viz tab. 1). Seznam validovaných pesticidů je uveden v tabulce 2.

**Tabulka č. 1. Nastavení UPLC-MS/MS metody.**

| <b>UPLC podmínky</b>         |                                                                               |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Kolona                       | ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)                                |
| Předkolona                   | ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)                                 |
| Objem nástřiku               | 2 μl                                                                          |
| Slabý promývací roztok       | Deionizovaná voda/methanol (90/10)                                            |
| Silný promývací roztok       | Methanol                                                                      |
| Mobilní fáze A               | 0,1% kyselina octová v deionizované vodě                                      |
| Mobilní fáze B               | 0,1% kyselina octová v methanolu                                              |
| Průtok mobilní fáze          | 0,6 ml/min                                                                    |
| Gradient mobilní fáze        | 0 min (10%B) – 4 min (100%B) – 7 min (100%B) – 7,1 min (10%B) – 10 min (10%B) |
| <b>MS podmínky</b>           |                                                                               |
| Teplota iontového zdroje     | 150 °C                                                                        |
| Teplota desolvatačního plynu | 450 °C                                                                        |
| Průtok desolvatačního plynu  | 700 l/h                                                                       |
| Průtok „cone gas“            | 45 l/h                                                                        |
| Průtok kolizního plynu       | 0,18 ml/min                                                                   |
| Napětí na kapiláře           | 3 kV                                                                          |
| Ionizace                     | Elektrosprej se střídáním polarit                                             |

**Tabulka č. 2. Seznam validovaných pesticidů.**

| <b>Pesticidy</b>                                                                                                                                                                                | <b>Zdůvodnění výběru</b>                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Azoxystrobin, Carbendazim                                                                                                                                                                       | Převedeno z Esquire 6000 Bruker                                       |
| Imazalil, Imidacloprid, Methomyl, Prochloraz, Thiabendazole, Thiophanate-methyl                                                                                                                 | Převedeno z Premier Waters                                            |
| Carbaryl, Omethoate, Pirimicarb, Spiroxamine, Triadimefon, Triadimenol                                                                                                                          | Převedeno z Varian 1200 MS                                            |
| 2,4-D, Dichlorprop, MCPA, Mecoprop, Haloxyfop, Haloxyfop-2-ethoxyethyl, Haloxyfop-methyl                                                                                                        | Významní zástupci ze skupiny fenoxycarboxylových herbicidů            |
| Acephate, Carbofuran, Carbofuran-3-hydroxy, Carboxin, Diflubenzuron, Dimethoate, Desmethyl-pirimicarb, Linuron, Pyraclostrobin, Quinoxifen, Tebufenozide, Thiacloprid, Thiodicarb, D10-diazinon | Významní zástupci z dalších skupin pesticidů stanovitelných pomocí LC |

## **4 Výsledky a diskuse**

### **4.1 Stanovení správnosti a přesnosti**

Validace stanovení vybraných pesticidních látek byla provedena analýzou obohacených vzorků krmiv (viz tab. 3) podle požadavků uvedených v dokumentu SANCO/10684/2009. Testované matrice byly obohaceny v 5 až 6 opakování na 3 hladinách, tj. 10 µg/kg (reportovací limit), 20 µg/kg (záložní hladina) a 100 µg/kg (10 × reportovací limit). Reportovacím limitem se dle SANCO/10684/2009 označuje úroveň odpovídající nejnižší validované hladině. Takto je dle výše uvedeného dokumentu definována mez stanovitelnosti, tj. úroveň, nad kterou lze věrohodně provést kvantitativní stanovení. Koncové stanovení bylo provedeno u obou typů QuEChERS extraktu, tj. čištěného určeného pro GC-MS/MS stanovení a nečištěného zředěného deionizovanou vodou (1 : 1). Obsah pesticidů byl kvantifikován s využitím externí kalibrace pomocí matricových standardů. V rámci validace bylo ověřeno použití systémového vnitřního standardu (D10-diazinon) pro indikaci nestandardního chování vzorku při přípravě či koncovém stanovení.

**Tabulka č. 3. Výběr krmiv pro účely validace.**

| <b>Krmná surovina</b>           | <b>Zástupce</b>     |
|---------------------------------|---------------------|
| Obiloviny                       | Pšenice             |
| Luštěniny                       | Sója                |
| KS s vysokým obsahem chlorofylu | Vojtěškové expelery |
| KS s vysokým obsahem tuku       | Rybí moučka         |

U všech 35 pesticidních látek byla splněna validační kritéria pro správnost (výťažnost) a přesnost (opakovatelnost) dle SANCO/10684/2009, tj. výťažnost v rozmezí (70 – 120) % a opakovatelnost  $\leq 20$  % na vybraných hladinách v nečištěných extraktech. Výjimku představoval acefát (acephate), který vykazoval výťažnost 61 % u vojtěšky a 57 % u rybí moučky. V případě nálezu acefátu v těchto typech krmiv je nutná korekce obsahu na výťažnost. Toto opatření je nutné aplikovat také u nálezů fenoxycarboxylových herbicidů v tučných matricích, kde byly výťažnosti těchto látek také nižší než 70 %.

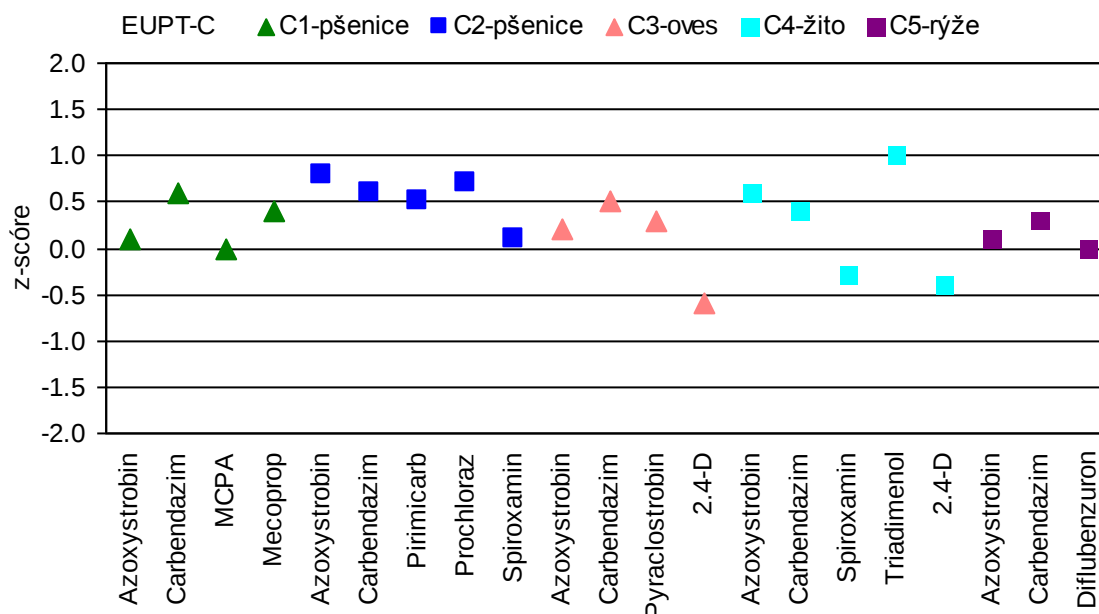
Další výjimku představoval karboxin (carboxin) a thiofanát-methyl (thiophanate-methyl), které vykazovaly v nečištěných extraktech vojtěšky opakovatelnost větší než 20 %. Požadavek na opakovatelnost u těchto látek byl splněn při analýze čištěných vojtěškových extraktů určených pro GC-MS/MS analýzu. Při nálezů karboxinu a thiofanát-methylu v materiálech s vysokým obsahem chlorofylu je nutné analýzu opakovat s využitím čištěných extraktů.

Správnost stanovení validovaných pesticidů byla na závěr ověřena analýzou IRM, přičemž získané hodnoty z-skóre se nacházely v povoleném intervalu –2,0 až +2,0 (viz obr. 1).

**Tabulka č. 4. Souhrn výtěžností (%) v různě ošetřených extraktech validovaných krmných surovin.**

|                         | Čištěná pšenice | Nečištěná pšenice | Čištěná sója | Nečištěná sója | Čištěná vojtěška | Nečištěná vojtěška | Čištěná rybí moučka | Nečištěná rybí moučka | Korekce na výtěžnost |
|-------------------------|-----------------|-------------------|--------------|----------------|------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| 2,4-D                   | 20              | 103               | 7            | 71             | 18               | 73                 | 9                   | 59                    | tučné                |
| 2,4-DP (Dichlorprop)    | 18              | 82                | 15           | 71             | 27               | 71                 | 13                  | 61                    | tučné                |
| Acephate                | 75              | 96                | 60           | 84             | 60               | 61                 | 57                  | 57                    | tučné, chlorofyl     |
| Azoxystrobin            | 117             | 108               | 91           | 108            | 115              | 118                | 112                 | 108                   | -                    |
| Carbaryl                | 116             | 104               | 94           | 100            | 106              | 82                 | 101                 | 102                   | -                    |
| Carbendazim             | 96              | 93                | 74           | 91             | 83               | 96                 | 74                  | 91                    | -                    |
| Carbofuran              | 110             | 103               | 93           | 94             | 98               | 88                 | 91                  | 88                    | -                    |
| Carbofuran-3-hydroxy    | 92              | 98                | 98           | 103            | 129              | 108                | 105                 | 109                   | -                    |
| Carboxin                | 112             | 101               | 95           | 96             | 93               | 47                 | 99                  | 98                    | -                    |
| Desmethyl-pirimicarb    | 101             | 102               | 91           | 117            | 97               | 112                | 92                  | 104                   | -                    |
| Diflubenzuron           | 93              | 98                | 90           | 89             | 77               | 78                 | 83                  | 81                    | -                    |
| Dimethoate              | 114             | 106               | 92           | 93             | 112              | 95                 | 95                  | 90                    | -                    |
| Haloxyfop               | 28              | 101               | 22           | 103            | 34               | 82                 | 25                  | 75                    | -                    |
| Haloxyfop-2-ethoxyethyl | 107             | 101               | 100          | 100            | 87               | 84                 | 89                  | 87                    | -                    |
| Haloxyfop-methyl        | 98              | 97                | 101          | 109            | 90               | 105                | 83                  | 72                    | -                    |
| Imazalil                | 98              | 105               | 85           | 97             | 94               | 94                 | 89                  | 83                    | -                    |
| Imidacloprid            | 107             | 100               | 89           | 90             | 98               | 88                 | 84                  | 85                    | -                    |
| Linuron                 | 107             | 100               | 91           | 90             | 88               | 79                 | 81                  | 87                    | -                    |
| MCPA                    | 18              | 103               | 9            | 71             | 19               | 73                 | 9                   | 53                    | tučné                |
| Mecoprop (MCP)          | 19              | 106               | 10           | 79             | 32               | 80                 | 12                  | 69                    | tučné                |
| Methomyl                | 111             | 98                | 95           | 98             | 104              | 97                 | 91                  | 90                    | -                    |
| Omethoate               | 97              | 94                | 82           | 86             | 69               | 70                 | 71                  | 75                    | -                    |
| Pirimicarb              | 108             | 104               | 92           | 99             | 103              | 101                | 91                  | 94                    | -                    |
| Prochloraz              | 124             | 99                | 94           | 96             | 94               | 99                 | 95                  | 99                    | -                    |
| Pyraclostrobin          | 128             | 96                | 94           | 101            | 97               | 97                 | 89                  | 109                   | -                    |
| Quinoxifen              | 89              | 98                | 71           | 85             | 79               | 78                 | 76                  | 77                    | -                    |
| Spiroxamine             | 56              | 100               | 48           | 86             | 55               | 102                | 43                  | 86                    | -                    |
| Tebufenozide            | 96              | 96                | 80           | 85             | 137              | 105                | 98                  | 109                   | -                    |
| Thiabendazole           | 86              | 94                | 63           | 90             | 70               | 80                 | 72                  | 80                    | -                    |
| Thiacloprid             | 107             | 102               | 89           | 90             | 99               | 89                 | 88                  | 90                    | -                    |
| Thiodicarb              | 88              | 109               | 88           | 97             | 102              | 103                | 109                 | 114                   | -                    |
| Thiophanate-methyl      | 104             | 103               | 92           | 96             | 94               | 47                 | 89                  | 87                    | -                    |
| Triadimefon             | 100             | 114               | 88           | 103            | 116              | 114                | 82                  | 102                   | -                    |
| Triadimenol             | 141             | 99                | 83           | 92             | 145              | 117                | 119                 | 106                   | -                    |
| D10-diazinon            | 105             | 102               | 92           | 95             | 110              | 103                | 89                  | 89                    | -                    |

**Obrázek č. 1. Z-skóre vybraných validovaných pesticidů stanovených v IRM.**



## 4.2 Stanovení selektivity metody

Selektivita je schopnost metody selektivně změřit validovanou vlastnost, tzn., že vliv potenciálních interferentů je nevýznamný. V hmotnostní spektrometrii je mírou selektivity hmotnostní spektrum, které je charakteristické pro každou jednotlivou látku. V případě kvantitativní analýzy s využitím trojitého kvadrupólu se pro každý analyt sledují nejméně dva specifické produktové ionty. Selektivita detekce je splněna v případě, že poměr intenzity zastoupení sledovaných iontů zůstává zachován u standardu i reálných vzorků. V případě LC-MS analýz jsou pozorovány matricové efekty (ME), což znamená ovlivnění signálu analytu přítomností matrice při ionizaci.

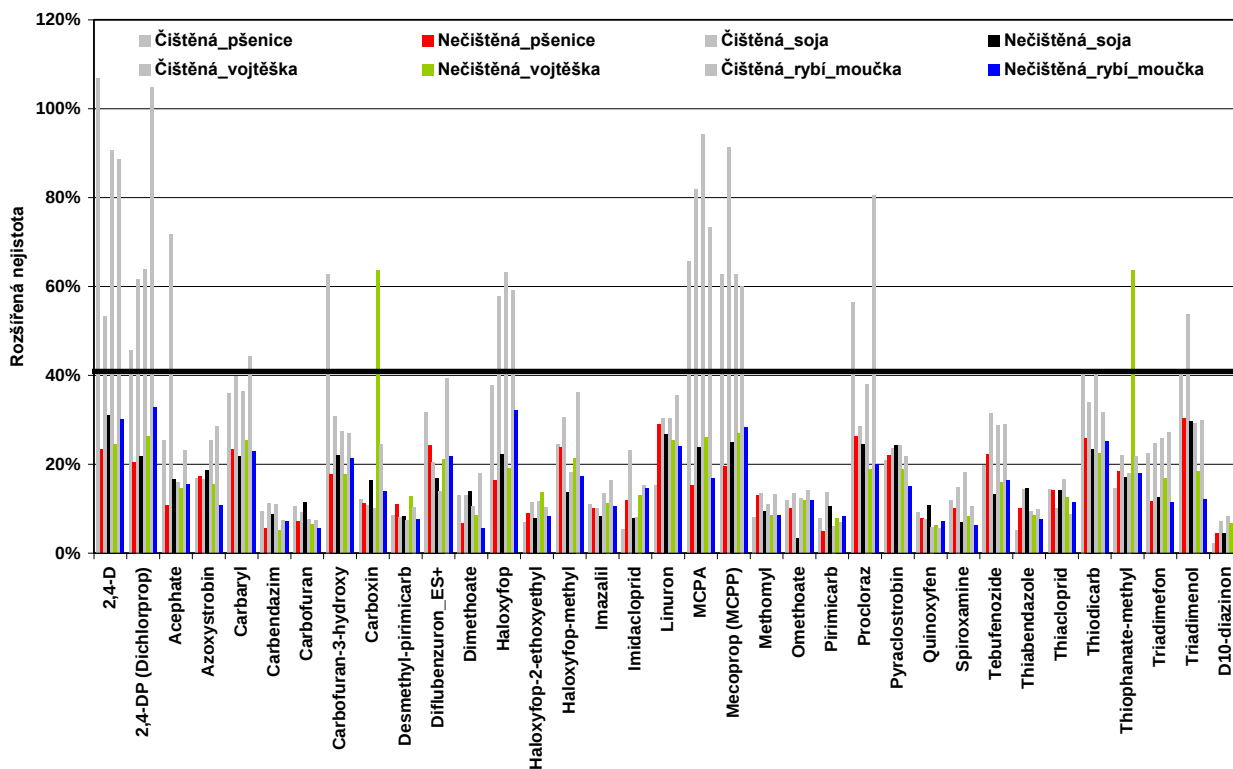
Nejintenzivnější ME byly pozorovány u vojtěšky, tj. zástupce materiálů s vysokým obsahem chlorofylu. V rámci validace byly ME sledovány v obou typech extraktů, tj. v čištěných extraktech pro GC-MS/MS stanovení a v surových vymražených extraktech. Obecně byly pozorovány nižší ME v čištěných extraktech v porovnání s ME stanovených v surových extraktech (viz tab. 5). Vzhledem k nízkým výtěžnostem některých pesticidních látek (herbicidní fenoxykyseliny a spiroxamin) způsobených DSPE čištěním se přesto v praxi upřednostňuje analýza surových extraktů.

**Tabulka č. 5. ME (%) pozorované v různě ošetřených extraktech krmných surovin.**

|                         | Čištěná pšenice | Nečištěná pšenice | Čištěná sója | Nečištěná sója | Čištěná vojtěška | Nečištěná vojtěška | Čištěná rybí moučka | Nečištěná rybí moučka |
|-------------------------|-----------------|-------------------|--------------|----------------|------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 2,4-D                   | 109             | 94                | 110          | 96             | 72               | 65                 | 145                 | 128                   |
| 2,4-DP (Dichlorprop)    | 126             | 135               | 98           | 95             | 102              | 90                 | 138                 | 113                   |
| Acephate                | 111             | 92                | 96           | 85             | 89               | 85                 | 71                  | 76                    |
| Azoxystrobin            | 92              | 98                | 103          | 114            | 144              | 184                | 97                  | 116                   |
| Carbaryl                | 86              | 86                | 88           | 81             | 109              | 119                | 96                  | 101                   |
| Carbendazim             | 100             | 101               | 108          | 117            | 114              | 136                | 112                 | 121                   |
| Carbofuran              | 106             | 101               | 99           | 93             | 91               | 78                 | 105                 | 102                   |
| Carbofuran-3-hydroxy    | 111             | 93                | 118          | 148            | 137              | 170                | 132                 | 149                   |
| Carboxin                | 97              | 93                | 99           | 111            | 121              | 75                 | 99                  | 106                   |
| Desmethyl-pirimicarb    | 104             | 101               | 114          | 129            | 118              | 152                | 117                 | 141                   |
| Diflubenzuron           | 97              | 89                | 88           | 86             | 65               | 44                 | 88                  | 73                    |
| Dimethoate              | 94              | 96                | 101          | 97             | 93               | 99                 | 99                  | 105                   |
| Haloxyfop               | 103             | 91                | 87           | 89             | 92               | 95                 | 79                  | 104                   |
| Haloxyfop-2-ethoxyethyl | 100             | 99                | 104          | 100            | 66               | 55                 | 95                  | 87                    |
| Haloxyfop-methyl        | 108             | 94                | 97           | 97             | 108              | 90                 | 111                 | 140                   |
| Imazalil                | 104             | 96                | 107          | 107            | 103              | 110                | 113                 | 123                   |
| Imidacloprid            | 102             | 97                | 97           | 80             | 78               | 76                 | 101                 | 90                    |
| Linuron                 | 102             | 110               | 104          | 112            | 83               | 66                 | 97                  | 90                    |
| MCPA                    | 94              | 95                | 108          | 99             | 92               | 86                 | 94                  | 110                   |
| Mecoprop (MCP)          | 114             | 89                | 99           | 83             | 83               | 84                 | 99                  | 85                    |
| Methomyl                | 95              | 97                | 104          | 111            | 100              | 104                | 107                 | 112                   |
| Omethoate               | 102             | 100               | 108          | 106            | 106              | 102                | 76                  | 77                    |
| Pirimicarb              | 100             | 97                | 107          | 106            | 100              | 110                | 108                 | 107                   |
| Prochloraz              | 106             | 87                | 83           | 94             | 117              | 103                | 120                 | 149                   |
| Pyraclostrobin          | 93              | 115               | 95           | 98             | 116              | 119                | 116                 | 109                   |
| Quinoxifen              | 104             | 98                | 107          | 108            | 107              | 108                | 111                 | 111                   |
| Spiroxamine             | 107             | 100               | 107          | 107            | 98               | 99                 | 102                 | 102                   |
| Tebufenozide            | 120             | 92                | 116          | 127            | 108              | 147                | 142                 | 152                   |
| Thiabendazole           | 100             | 99                | 106          | 118            | 110              | 122                | 106                 | 116                   |
| Thiacloprid             | 102             | 104               | 96           | 84             | 105              | 102                | 118                 | 118                   |
| Thiodicarb              | 121             | 104               | 119          | 132            | 146              | 178                | 109                 | 159                   |
| Thiophanate-methyl      | 107             | 98                | 104          | 114            | 87               | 61                 | 110                 | 119                   |
| Triadimefon             | 106             | 78                | 111          | 145            | 127              | 136                | 111                 | 111                   |
| Triadimenol             | 99              | 109               | 90           | 133            | 113              | 166                | 128                 | 163                   |
| D10-diazinon            | 101             | 98                | 105          | 102            | 101              | 102                | 104                 | 102                   |

### 4.3 Stanovení nejistoty analýzy

Rozšířená nejistota odpovídá směrodatné odchylce dat stanovených pro hodnocení přesnosti vynásobené faktorem pokrytí 2. Stanovené nejistoty vycházejí z vícenásobných měření vybraných matric obohacených na různých hladinách. Požadavek na maximální rozšířenou nejistotu 50 % stanovený v dokumentu SANCO/10684/2009 byl v případě analýzy nečištěných extraktů splněn u všech validovaných parametrů s výjimkou karboxinu a thiofanát-methylu ve vojtěšce (viz tab. 6). Tyto dva pesticidy v krmných surovinách s vysokým obsahem chlorofylu je nutné stanovit s využitím čištěných extraktů, které však nebylo vhodné pro stanovení řady jiných pesticidních látek, tj. prochlorazu, triadimenolu, acefátu, haloxyfopu a fenoxycarboxylových herbicidů (viz obr. 2).



Obrázek č. 2. Porovnání nejistot v různě ošetřených extraktech validovaných matric.

**Tabulka č. 6. Souhrn rozšířených nejistot (%) stanovených v surových extraktech.**

|                         | Nečištěná pšenice | Nečištěná sója | Nečištěná vojtěška | Nečištěná rybí moučka | Povolená rozšířená nejistota |
|-------------------------|-------------------|----------------|--------------------|-----------------------|------------------------------|
| 2,4-D                   | 23                | 31             | 24                 | 30                    | 50                           |
| 2,4-DP (Dichlorprop)    | 20                | 22             | 26                 | 33                    | 50                           |
| Acephate                | 11                | 16             | 14                 | 15                    | 50                           |
| Azoxystrobin            | 17                | 19             | 15                 | 11                    | 50                           |
| Carbaryl                | 23                | 22             | 25                 | 23                    | 50                           |
| Carbendazim             | 6                 | 9              | 5                  | 7                     | 50                           |
| Carbofuran              | 7                 | 11             | 6                  | 6                     | 50                           |
| Carbofuran-3-hydroxy    | 18                | 22             | 18                 | 21                    | 50                           |
| Carboxin                | 11                | 16             | 64                 | 14                    | 50                           |
| Desmethyl-pirimicarb    | 11                | 8              | 13                 | 7                     | 50                           |
| Diflubenzuron           | 24                | 17             | 21                 | 22                    | 50                           |
| Dimethoate              | 7                 | 14             | 8                  | 6                     | 50                           |
| Haloxifop               | 16                | 22             | 19                 | 32                    | 50                           |
| Haloxifop-2-ethoxyethyl | 9                 | 8              | 14                 | 8                     | 50                           |
| Haloxifop-methyl        | 24                | 14             | 21                 | 17                    | 50                           |
| Imazalil                | 10                | 8              | 11                 | 10                    | 50                           |
| Imidacloprid            | 12                | 8              | 13                 | 14                    | 50                           |
| Linuron                 | 29                | 27             | 25                 | 24                    | 50                           |
| MCPA                    | 15                | 24             | 26                 | 17                    | 50                           |
| Mecoprop (MCPP)         | 19                | 25             | 27                 | 28                    | 50                           |
| Methomyl                | 13                | 9              | 8                  | 8                     | 50                           |
| Omethoate               | 10                | 3              | 12                 | 12                    | 50                           |
| Pirimicarb              | 5                 | 11             | 8                  | 8                     | 50                           |
| Prochloraz              | 26                | 24             | 19                 | 20                    | 50                           |
| Pyraclostrobin          | 22                | 24             | 19                 | 15                    | 50                           |
| Quinoxifen              | 8                 | 11             | 6                  | 7                     | 50                           |
| Spiroxamine             | 10                | 7              | 8                  | 6                     | 50                           |
| Tebufenozide            | 22                | 13             | 16                 | 16                    | 50                           |
| Thiabendazole           | 10                | 14             | 8                  | 8                     | 50                           |
| Thiacloprid             | 14                | 14             | 13                 | 11                    | 50                           |
| Thiodicarb              | 26                | 23             | 22                 | 25                    | 50                           |
| Thiophanate-methyl      | 18                | 17             | 63                 | 18                    | 50                           |
| Triadimefon             | 12                | 12             | 17                 | 11                    | 50                           |
| Triadimenol             | 30                | 30             | 18                 | 12                    | 50                           |
| D10-diazinon            | 4                 | 4              | 7                  | 5                     | 50                           |

## 4.4 Stanovení identifikačních parametrů

K identifikaci byla použita konfirmační kritéria podle SANCO/10684/2009, tj. relativní retenční čas (RRT) a poměr sledovaných kvantifikačních a konfirmačních iontů. Povolená odchylka RRT pro LC stanovení je  $\pm 2,5$  %. Povolený rozsah poměrů sledovaných iontů je závislý na relativní intenzitě sledovaných iontů. Přítomnost sledované látky ve vzorku je potvrzena, pokud jsou splněna výše uvedená kritéria. Identifikační ukazatele validovaných látek pro UPLC-MS/MS jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tabulka č. 7. Identifikační parametry.**

|                         | RT (min) | Kvantifikační MRM | Konfirmační MRM | Poměr iontů |
|-------------------------|----------|-------------------|-----------------|-------------|
| 2,4-D                   | 2,36     | 221 > 163         | 219 > 125       | 1,770       |
| 2,4-DP (Dichlorprop)    | 2,70     | 233 > 161         | 233 > 125       | 0,057       |
| Acephate                | 0,50     | 184 > 143         | 184 > 125       | 0,126       |
| Azoxystrobin            | 2,69     | 404 > 372         | 404 > 329       | 0,580       |
| Carbaryl                | 2,16     | 202 > 145         | 202 > 127       | 1,440       |
| Carbendazim             | 0,94     | 192 > 160         | 192 > 132       | 0,241       |
| Carbofuran              | 2,05     | 222 > 123         | 222 > 165       | 0,392       |
| Carbofuran-3-hydroxy    | 1,38     | 238 > 181         | 238 > 163       | 1,603       |
| Carboxin                | 2,12     | 236 > 143         | 236 > 87        | 0,334       |
| Desmethyl-pirimicarb    | 1,29     | 225 > 72          | 225 > 168       | 0,679       |
| Diflubenzuron           | 3,06     | 311 > 141         | 311 > 158       | 0,400       |
| Dimethoate              | 1,33     | 230 > 125         | 230 > 199       | 0,762       |
| Haloxyfop               | 3,16     | 362 > 316         | 362 > 91        | 0,946       |
| Haloxyfop-2-ethoxyethyl | 3,48     | 434 > 316         | 434 > 91        | 0,693       |
| Haloxyfop-methyl        | 3,36     | 376 > 316         | 376 > 91        | 0,838       |
| Imazalil                | 2,32     | 297 > 159         | 297 > 69        | 0,523       |
| Imidacloprid            | 1,21     | 256 > 175         | 256 > 209       | 0,736       |
| Linuron                 | 2,66     | 249 > 160         | 249 > 182       | 0,556       |
| MCPA                    | 2,46     | 199 > 141         | 201 > 143       | 0,279       |
| Mecoprop (MCP)          | 2,75     | 213 > 141         | 215 > 143       | 0,287       |
| Methomyl                | 0,87     | 163 > 106         | 163 > 88        | 0,659       |
| Omethoate               | 0,58     | 214 > 183         | 214 > 125       | 1,049       |
| Pirimicarb              | 1,86     | 239 > 72          | 239 > 182       | 0,539       |
| Prochloraz              | 3,21     | 376 > 70          | 376 > 307       | 0,012       |
| Pyraclostrobin          | 3,24     | 388 > 163         | 388 > 194       | 0,512       |
| Quinoxyfen              | 3,60     | 308 > 197         | 308 > 162       | 0,704       |
| Spiroxamine             | 2,71     | 298 > 100         | 298 > 144       | 0,969       |
| Tebufenozide            | 3,08     | 353 > 133         | 353 > 297       | 0,422       |
| Thiabendazole           | 1,13     | 202 > 175         | 202 > 131       | 0,987       |
| Thiacloprid             | 1,57     | 253 > 126         | 253 > 90        | 0,229       |
| Thiodicarb              | 2,28     | 355 > 88          | 355 > 108       | 0,616       |
| Thiophanate-methyl      | 2,02     | 343 > 151         | 343 > 93        | 0,278       |
| Triadimefon             | 2,84     | 294 > 197         | 294 > 69        | 0,641       |
| Triadimenol             | 2,92     | 296 > 70          | 296 > 99        | 0,352       |
| D10-diazinon            | 3,16     | 315 > 170         | 315 > 154       | 0,641       |

## 4.5 Stanovení požadavků pro kontrolu kvality metody v rutinní praxi

Správnost provedení stanovení pesticidů pomocí UPLC-MS/MS se kontroluje použitím isotopově značeného vnitřního standardu D10-diazinon, který při validaci vykazoval stabilní výtěžnost (95 – 103) % a vysokou selektivitu (98 – 102) % ME v různých matricích. D10-diazinon je přidán do každého vzorku a významná odchylka ve výtěžnosti tohoto IS (< 80 % a > 120 %) bude indikovat nestandardní chování vzorku při přípravě či stanovení a nutnost provedení opakovaného vzorku. Správnost metody se v pravidelných intervalech kontroluje analýzou obohacených vzorků a IRM.

## 5 Závěr

S využitím metody QuEChERS a systému Xevo TQ MS bylo validováno stanovení 35 pesticidních látek v krmivech a surovinách pro jejich výrobu za účelem rozšíření škály pesticidů sledovaných v rámci cílené kontroly a monitoringu krmiv. Získané validační parametry vyhovovaly požadavkům stanoveným dle SANCO/10684/2009.

## Literatura

1. ČSN EN 15662 – Potraviny rostlinného původu – Stanovení reziduí pesticidů s použitím GC-MS a/nebo LC-MS/MS po extrakci acetonitrilem/separaci a předčištění pomocí disperzní SPE – Metoda QuEChERS
2. ČSN EN 16637 – Potraviny rostlinného původu – Stanovení reziduí pesticidů pomocí LC-MS/MS po methanolové extrakci a přečištění na křemelině
3. JPP ÚKZÚZ, Zkoušení krmiv – postup 10610.1
4. Směrnice NRL ÚKZÚZ 7/09 – Validace metod v Národní referenční laboratoři ÚKZÚZ
5. <http://www.crl-pesticides.eu>
6. SANCO/10684/2009 – Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed

# Přímá extrakce DNA z půdních vzorků

*Jiří Čuhel*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,  
Oddělení mikrobiologie a biochemie, Hroznová 2, 656 06 Brno  
jiri.cuhel@ukzuz.cz

## 1 Úvod

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je základní složkou každého živého organismu. DNA v sobě nese genetickou informaci pro syntézu všech enzymů řídících jakoukoli biologickou aktivitu. Díky studiu sekvencí půdní DNA mnohými molekulárně-biologickými přístupy je možné celkem zřetelně rozlišit a identifikovat jednotlivé půdní mikroorganismy (bakterie, archaea i eukaryota).

Až do nedávné doby byla většina prací, které se pokoušely najít vhodné mikrobiální indikátory pro monitoring kvality půdy, značně omezena nekultivovatelností mnohých mikroorganismů a nízkou citlivostí tradičních mikrobiologických metod. Avšak současné molekulární metody, které jsou založené na amplifikaci fragmentů extrahované DNA, se ukázaly být velice vhodnou alternativou vůči klasickým kultivačním metodám, která účinně rozkrývá problematiku složení, struktury a diverzity společenstva půdních mikroorganismů.

Extrakce DNA z půdy představuje první nezbytný krok naprosté většiny molekulárně-biologických analýz mikrobiálních společenstev. Během posledních dvaceti let byla vyvinuta celá řada metod extrakce DNA z půdních vzorků, přičemž jednotlivé metody se mohou od sebe podstatně lišit a poskytují tak extrahovanou DNA v různém množství a v různé kvalitě (Bakken a Frostegård, 2006). Z tohoto důvodu je mnohdy obtížné srovnávat mezi sebou výsledky molekulárních analýz, u kterých byla DNA z půdy extrahována odlišnými metodami. V roce 2010 byla proto zveřejněna norma ISO 11063 Soil quality – Method to directly extract DNA from soil samples, která zavádí a doporučuje standardizovanou

metodu pro přímou extrakci DNA z půdních vzorků. Tato norma vychází z práce Martin-Laurenta et al. (2001).

Na oddělení mikrobiologie a biochemie ÚKZÚZ byl dosud pro extrakci DNA z půd používán postup založený na extrakci DNA komerčně dodávaným kitem. Jedná se o postup č. 31110.1 (Epicentre Biotechnologies; Zbíral et al., 2011). Tento postup je velice pracný, zdlouhavý a není známo přesné chemické složení jednotlivých komponent kitu.

Nově zaváděná metoda „Přímá extrakce DNA z půdních vzorků“ dle ISO 11063 přináší do izolace DNA krok účinné fyzikální destrukce půdních částic a mikrobiálních buněk a je mnohem rychlejší, elegantnější a v neposlední řadě levnější.

Cílem práce bylo otestovat metodu přímé extrakce DNA z půdních vzorků s různými fyzikálně-chemickými parametry, zavést ji v laboratořích NRL a srovnat tuto metodu s doposud používanou metodou izolace DNA komerčně dodávaným kitem.

## **2 Testování metody přímé extrakce DNA**

DNA byla izolována ze tří půdních vzorků s různými hodnotami fyzikálně-chemických parametrů, a to novou metodou přímé extrakce DNA s využitím mikrohomoogenizátoru („izolace bead-beaterem“, viz kapitola 3) a dosavadní metodou izolace DNA komerčně dodávaným kitem („izolace kitem“) dle již zavedeného postupu č. 31110.1, viz výše. Vybrané fyzikální a chemické parametry půd jsou uvedeny v tabulce 1. Půdní vzorky byly odebrány v říjnu 2011 z horní 15cm vrstvy dle postupu č. 31000.1, přesáty přes síto s velikostí ok 2 mm a uskladněny při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . DNA byla z každého vzorku extrahována v šesti laboratorních opakováních.

**Tabulka č. 1. Základní popis a vybrané fyzikální, chemické a mikrobiologické parametry půd použitých pro testování metody izolace DNA bead-beaterem. Jsou uvedeny průměry hodnot z let 1998-2008 (SNA – krátkodobá nitrifikační aktivita, C<sub>ox</sub> – oxidovatelný uhlík, C<sub>bio</sub> – uhlík mikrobiální biomasy, jíl – zrnitostní frakce < 0,02 mm).**

| Označení vzorku                              | 7006             | 7013          | 7043                 |
|----------------------------------------------|------------------|---------------|----------------------|
| Název plochy                                 | Domanín          | Újezd u Brna  | Nyklovice            |
| Okres                                        | Žďár nad Sázavou | Brno - venkov | Žďár nad Sázavou     |
| Zemědělské využití                           | orná půda        | orná půda     | trvalý travní porost |
| Půdní typ (FAO)                              | Cambisol         | Chernozem     | Planosol             |
| pH <sub>1M KCl</sub>                         | 4,58             | 7,43          | 5,44                 |
| jíl (%)                                      | 16,0             | 29,6          | 7,8                  |
| C <sub>ox</sub> (%)                          | 1,64             | 1,65          | 3,60                 |
| C <sub>bio</sub> (µg C/g)                    | 226              | 214           | 516                  |
| SNA (ng NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N/g/h) | 92,7             | 875           | 570                  |

Testovaná metoda není metodou kvantitativní, jejím smyslem není analyticky stanovit vybranou veličinu. Účelem metody není získat veškerou DNA přítomnou v půdním vzorku, ale získat DNA v dostatečném množství a kvalitě, aby byla využitelná pro další práci. Z tohoto důvodu nebylo možné stanovit validační parametry. Nicméně se laboratoř pokusila otestovat využitelnost získané DNA pro navazující molekulární analýzy. DNA vyizolovaná oběma metodami byla přečištěna dle postupu č. 31130.1, její přítomnost v extraktu ověřena gelovou elektroforézou dle postupu č. 31160.1 s tím rozdílem, že na gel nebyly nanášeny produkty PCR, ale přečištěná DNA. Její koncentrace byla stanovena fluorescenční metodou dle postupu č. 31140.1. DNA byla dále využita pro amplifikaci bakteriálního genu *amoA* polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) dle postupu č. 31150.1. Přítomnost produktů DNA byla ověřena gelovou elektroforézou dle postupu č. 31160.1.

### **3 Metoda přímé extrakce DNA z půdních vzorků**

Úplná metodika přímé extrakce DNA z půdních vzorků je uvedena v JPP Analýza půd III (Zbírál et al., 2011) jako postup č. 31120.1.

#### **3.1 Rozsah použití**

Tato metoda byla vyvinuta především pro izolaci DNA ze zemědělských půd a minerálních horizontů lesních půd. Prakticky nebyla ověřena pro půdy s vysokým obsahem organické hmoty (např. půdy rašelinišť) a pro půdy kontaminované organickými polutanty či těžkými kovy. Získaná DNA je výchozím materiálem pro analýzu složení a abundance mikrobiálních společenstev s využitím metod založených na polymerázové řetězové reakci (PCR).

#### **3.2 Princip**

Metoda přímé extrakce DNA z půdních vzorků se skládá ze tří základních kroků: lyze mikroorganismů, vysrážení proteinů a vysrážení a promývání extrahovaných nukleových kyselin. Půdní vzorek se podrobí mechanické a chemické lyzi mikrobiálních buněk (mikrohomogenizace, inkubace při 70 °C, působení sodiumdodecylsulfátu). Po centrifugaci se v supernatantu vysrážejí bílkoviny octanem sodným. Po další centrifugaci se nukleové kyseliny vysrážejí isopropanolem, dále se promyjí etanolem a resuspendují se ve vodě či pufru.

#### **3.3 Přístroje a pomůcky**

- 1 Homogenizátor typu „mini bead-beater“ s oscilační frekvencí 1600 kmitů/min.
- 2 Skleněné kuličky o průměru 2 mm a kyselinou promyté skleněné kuličky o průměru 106 µm).
- 3 Umělohmotné mikrozkmavky, 1,5 ml a 2 ml.
- 4 Umělohmotné mikrozkmavky 2 ml se šroubovacím uzávěrem a gumovým těsněním.
- 5 Vodní lázeň.
- 6 Sušárna.

- 7 Vhodná nádoba se šupinkovým ledem.
- 8 Stolní chlazená centrifuga s rotorem pro mikrozkušavky 1,5 ml a 2 ml, s nastavitelnou hodnotou g 14000 a pracovní teplotou 4 °C.
- 9 Mrazák s pracovní teplotou –20 °C.
- 10 Digestoř.

### 3.4 Chemikálie

Chemikálie musejí být v čistotě pro molekulárně-biologické analýzy. NaOH a HCl postačují v kvalitě p.a. Činidla a pufrы kromě SDS se sterilizují 20 min při 120 °C a skladují při laboratorní teplotě. Etanol a isopropanol se uchovávají při –20 °C.

- 1 Hydroxid sodný, NaOH, roztok,  $c(\text{NaOH}) = 10 \text{ mol/l}$ .
- 2 Kyselina chlorovodíková, HCl,  $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$ .
- 3 Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid,  $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{-HCl}$ , roztok,  $c(\text{Tris-HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ , pH = 8,0.

Příprava: 121,14 g Tris se rozpustí v 800 ml vody, pomocí HCl se upraví pH na hodnotu 8,0 a doplní se vodou na celkový objem 1000 ml.

- 4 Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA),  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , roztok,  $c(\text{EDTA}) = 0,5 \text{ mol/l}$ , pH = 8,0.

Příprava: Ke 186,10 g EDTA se přidá 800 ml vody, roztokem NaOH se upraví pH na hodnotu 8,0 a doplní se vodou na celkový objem 1000 ml (EDTA se rozpouští až po přidavku roztoku NaOH).

- 5 Chlorid sodný, NaCl, roztok,  $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/l}$ .
- 6 Polyvinylpyrrolidon (PVP),  $[\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}]_n$ , roztok,  $c(\text{PVP}) = 20\%$ .
- 7 Dodecylsulfát sodný (SDS),  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ , roztok,  $c(\text{SDS}) = 20\%$ .
- 8 Extrakční pufr.

Příprava: Smíchá se 100 ml roztoku Tris-HCl, 200 ml roztoku EDTA, 100 ml roztoku NaCl, 50 ml roztoku PVP, 100 ml roztoku SDS a 450 ml vody. Extrakční pufr se připravuje vždy čerstvý.

- 9 Kyselina octová,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , bezvodá,  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 100\%$ .

- 10 Octan sodný,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , roztok,  $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 5 \text{ mol/l}$ .  
Příprava: 410,15 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  se rozpustí v 800 ml vody, přidá se 120 ml kyseliny octové, kyselinou octovou se upraví pH na hodnotu 5,5 a doplní se vodou na celkový objem 1000 ml.
- 11 Etanol,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , roztok,  $c(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70\%$ .
- 12 TE pufr, pH 8,0.  
Příprava: Smíchá se 10 ml roztoku Tris-HCl (3) a 2 ml roztoku EDTA (4) a doplní se vodou (14) na celkový objem 1000 ml.
- 13 Isopropanol,  $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ .
- 14 Voda ve vysoké čistotě pro molekulární biologii,  $\text{H}_2\text{O}$  (rezistivita 18,2  $\text{M}\Omega/\text{cm}$ ).

### 3.5 Pracovní postup

Do 2ml mikrozkušavek se šroubovacím uzávěrem a těsněním se naváží 0,25 g půdy (ekvivalent suché půdy). K naváženým půdním vzorkům se přidají 2 skleněné kuličky o průměru 2 mm a 0,5 g skleněných kuliček o průměru 106  $\mu\text{m}$ . Ke každému vzorku se přidá 1 ml extrakčního pufru a vzorky se nechají 30 s třepat v homogenizátoru při frekvenci 1600 kmitů/min. Poté se 10 min inkubují na vodní lázni při 70 °C. Půdní suspenze se centrifuguje 1 min při 14000 g a 4 °C. Supernatant se opatrně přenesse do nových 2ml mikrozkušavek.

K extraktu se přidá roztok octanu sodného o objemu odpovídajícímu 1/10 objemu extraktu. Obsah mikrozkušavky se promíchá a vzorky se nechají inkubovat 10 min na šupinkovém ledu. Po následné centrifugaci (5 min, 14000 g, 4 °C) se supernatant opatrně přenesse do nových mikrozkušavek o objemu 1,5 ml.

K extraktu se přidá vychlazený isopropanol (−20 °C) o stejném objemu, jako má extrakt a obsah mikrozkušavky se promíchá. Vzorky se ponechají 15 min při −20 °C a poté se 30 min centrifugují při 14000 g a 4 °C. Supernatant se opatrně vylíje a k získanému peletu nukleových kyselin se přidá 200  $\mu\text{l}$  vychlazeného etanolu (−20 °C) tak, aby se pelet nerozpustil. Mikrozkušavky se centrifugují 15 min, při 14000 g a 4 °C. Pak se z mikrozkušavek vylíje etanol, ústí mikrozkušavky se otře buničitou vatou a otevřené mikrozkušavky se na 15 min vloží do sušárny vyhřáté na 37 °C, aby se pelet vysušil.

Pelet nukleových kyselin se poté opatrně rozpustí ve 100 µl pufru TE. Takto získaná DNA se buď podrobí okamžité purifikaci a stanovení koncentrace DNA nebo se uchová při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do dalšího použití. Je třeba zamezit opakovanému zmrazování a rozmrazování DNA.

## 4 Výsledky a diskuse

Pro testování metody „Přímá extrakce DNA z půdních vzorků“ byly vybrány tři půdní vzorky, které se podstatně lišily v základních fyzikálních, chemických i biologických parametrech (tabulka 1), protože mnohé půdní parametry značným způsobem ovlivňují množství, kvalitu a čistotu extrahované DNA (Bakken a Frostegård, 2006). Především vysoký obsah organické hmoty často vede ke koextrakci huminových látek spolu s DNA přítomnost těchto látek v extraktu znesnadňuje další molekulární analýzy. Metoda tedy byla testována na vzorcích orných půd (vzorky 7006 a 7013) a také na vzorku půdy trvalého travního porostu (vzorek 7043) se znatelně vyšším obsahem oxidovatelného organicky vázaného uhlíku.

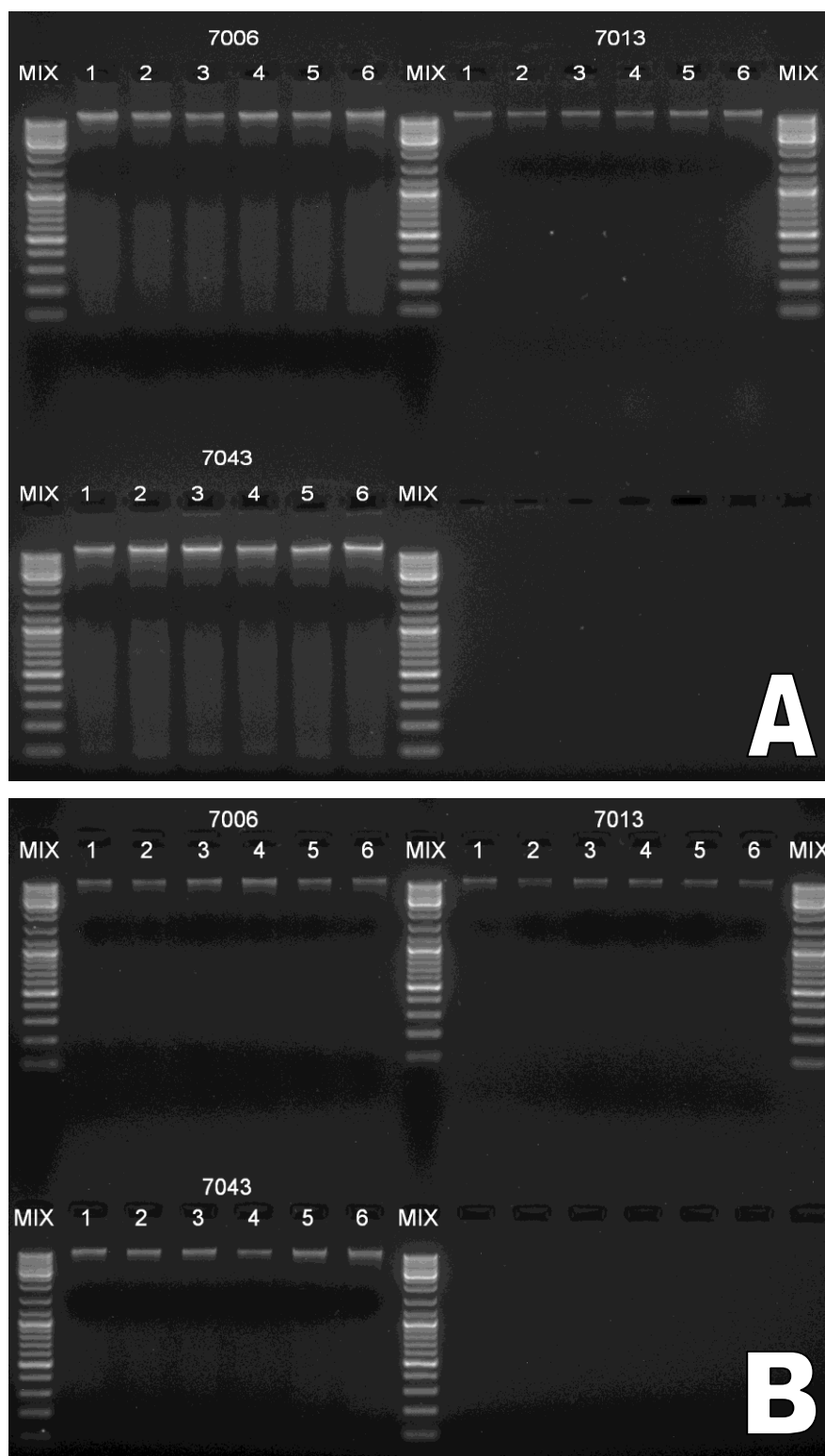
Byla otestována další použitelnost vyextrahované DNA. Obr. 1 ukazuje gely po gelové elektroforéze s nanesenou přečištěnou DNA získanou oběma extrakčními postupy. Je zřetelně viditelné, že extrakcí bead-beaterem se podařilo vyizolovat DNA ze všech tří půd a ze všech šesti opakování. Navíc vizuální porovnání gelů přesvědčivě ukazuje, že tato nová metoda extrakce poskytuje DNA ve vyšší koncentraci než metoda extrakce kitem. Vizuální zhodnocení je též podpořeno výsledky stanovení koncentrace přečištěné DNA fluorescenční metodou (tabulka 2). Koncentrace DNA vyizolované bead-beaterem byla nejméně  $2,3 \times$  vyšší než koncentrace DNA po extrakci kitem a celkový výtěžek DNA byl po izolaci DNA bead-beaterem  $1,9$  až  $2,5 \times$  vyšší než výtěžek DNA po izolaci kitem.

Na druhou stranu není koncentrace DNA pro další molekulárně-biologické využití zcela zásadním parametrem, protože ve většině případů se získaná DNA před dalšími analýzami ředí. Spíše je důležitá celková čistota a integrita DNA, aby mohla posloužit jako vhodný templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Čistota a integrita DNA byla otestována rutinní analýzou prováděnou na Oddělení mikrobiologie a biochemie ÚKZÚZ, a to PCR bakteriálního genu *amoA*. Gen *amoA* kóduje funkční podjednotku enzymu ammoniummonooxygenasy, který katalyzuje první krok mikrobiálního procesu nitrifikace (přeměnu amoniaku na hydroxylamin). Záměrně byly proto do testování extrakční metody bead-beaterem vybrány půdy s rozdílnou krátkodobou nitrifikační aktivitou (SNA), tabulka 1, aby bylo možné posoudit, zda lze amplifikovat gen *amoA* z půdy s vysokou SNA (vzorek

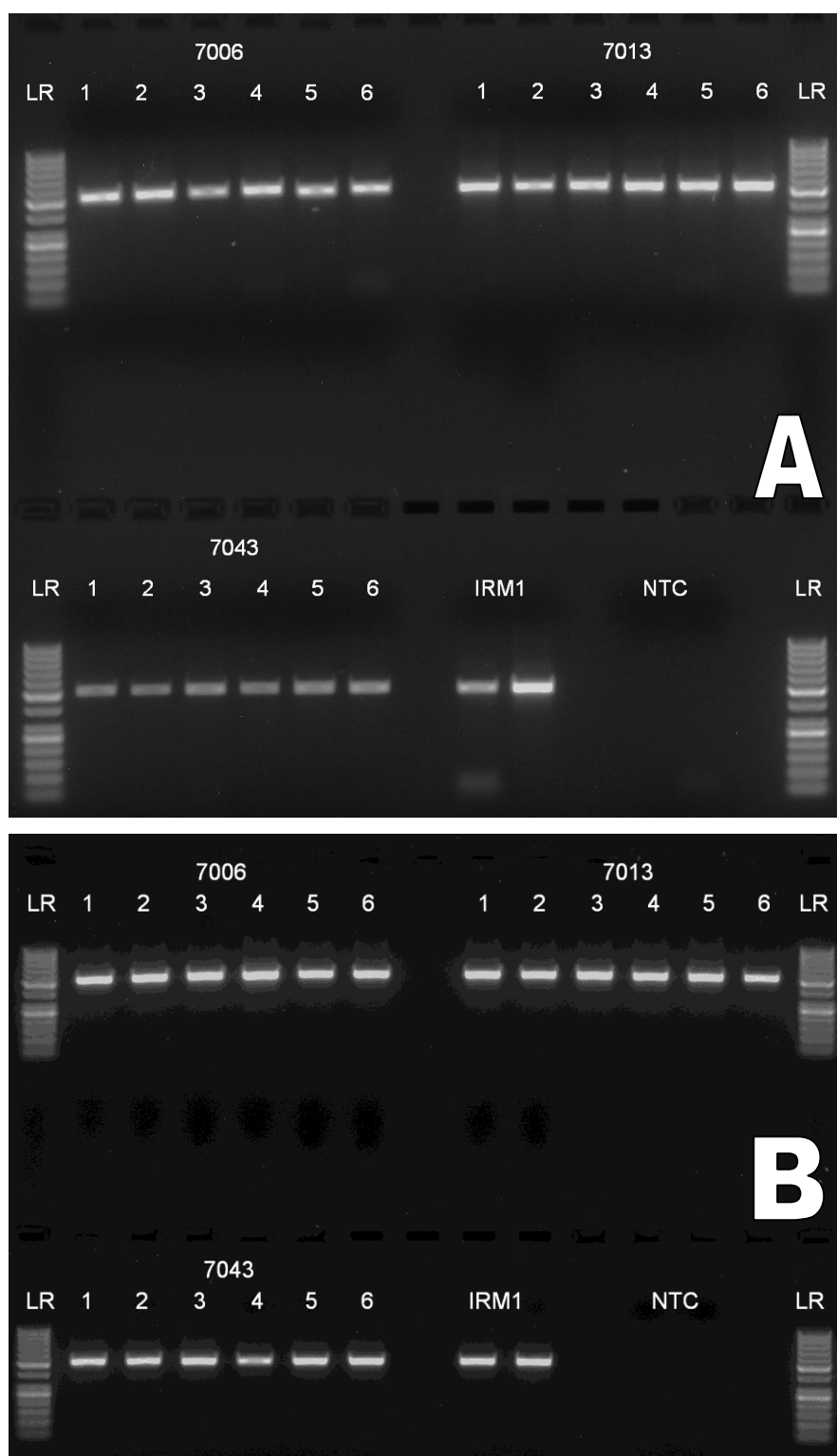
7013), ale především i z půdy s velice nízkou SNA (vzorek 7006). Obr. 2A jasně ukazuje, extrakce bead-beaterem vedla k úspěšné PCR genu *amoA* ze všech tří půd a ze všech šesti laboratorních opakování. Navíc analýza produktů PCR gelovou elektroforézou odhalila, že není znatelného rozdílu mezi oběma metodami extrakce DNA (Obr. 2A a 2B) a extrakce DNA bead-beaterem je plnohodnotnou alternativou vůči dosud používané extrakci DNA komerčně dodávaným kitem.

**Tabulka č. 2. Koncentrace a výtěžek přečištěné DNA po extrakci bead-beaterem a kitem. Jsou uvedeny průměry a směrodatné odchylky (n = 6).**

| Půda        | Izolace bead-beaterem   |                  | Izolace kitem           |                  |
|-------------|-------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
|             | Koncentrace DNA (ng/μl) | Výtěžek DNA (μg) | Koncentrace DNA (ng/μl) | Výtěžek DNA (μg) |
| <b>7006</b> | 22,7 ± 1,24             | 2,50 ± 0,13      | 7,8 ± 2,06              | 1,00 ± 0,27      |
| <b>7013</b> | 24,2 ± 1,26             | 3,00 ± 0,18      | 9,4 ± 1,93              | 1,14 ± 0,20      |
| <b>7043</b> | 25,3 ± 0,83             | 2,82 ± 0,23      | 11,2 ± 1,14             | 1,49 ± 0,18      |



Obr. č. 1. Fotografie gelů po gelové elektroforéze DNA z půd 7006, 7013 a 7043 získané extrakcí bead-beaterem (A) a extrakcí kitem (B) (1-6 – jednotlivá laboratorní opakování při extrakci DNA, Mix – standard DNA).



Obr. č. 2. Fotografie gelů po gelové elektroforéze produktů PCR po amplifikaci bakteriálního genu *amoA*, kde byla jako templát použita DNA z půd 7006, 7013 a 7043 získaná extrakcí bead-beaterem (A) a extrakcí kitem (B) (1-6 – jednotlivá laboratorní opakování při extrakci DNA, NTC – beztemplátová kontrola, IRM1 – pozitivní kontrola, LR – standard DNA „low range“).

## 5 Závěr

V práci byla úspěšně otestována a zavedena metoda přímé extrakce DNA z půdních vzorků. Touto metodou se podařilo izolovat DNA z půd se značně rozdílnými fyzikálními, chemickými a biologickými parametry. DNA je plně využitelná pro další molekulárně-biologické analýzy půdního mikrobiálního společenstva. Bylo ukázáno, že tato metoda extrakce DNA plně nahrazuje doposud používanou extrakci DNA komerčně dodávaným kitem. Navíc v sobě zahrnuje účinnou destrukci půdních částic a buněk mikroorganismů, je rychlejší, elegantnější a v neposlední řadě též výrazně levnější.

## 6 Literatura

1. Bakken LR, Frostegård Å. Nucleic acid extraction from soil. In: Nannipieri P, Smalla K: Nucleic acids and proteins in soil (Eds.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2006**, 49-73.
2. ISO 11063 Soil quality – Method to directly extract DNA from soil samples. International organization for Standardization, 2010.
3. Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67, 2354-2359.
4. Zbírál J, Malý S, Váňa M. Jednotné pracovní postupy, Analýza půd III. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno, 2011, 253 s.

# Stanovení obsahu morfinu v makovině metodou HPLC

*Naděžda Kabátová, Radvana Šulová*

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř,  
Regionální oddělení Brno, Hroznová 2, 656 06 Brno  
nadezda.kabatova@ukzuz.cz

## 1 Úvod

Česká republika patří k nejvýznamnějším pěstitelům máku setého nejen v evropském, ale i celosvětovém měřítku. Převládá zde pěstování potravinářského máku na semeno. Makovina jako vedlejší produkt je z části vykupována jako surovina pro farmaceutický průmysl. Z důvodu možného zneužití opiátů makoviny musejí být na území ČR dodržovány při pěstování máku stanovené podmínky, uvedené v zákoně č. 167/1998 Sb. o návykových látkách. Nové odrůdy máku registruje Národní odrůdový úřad. Nová odrůda musí projít státními odrůdovými zkouškami, které prověří její vlastnosti a znaky a zjistí, zda splňuje stanovené požadavky pro registraci. Jedním z kritérií posuzování nově vyšlechtěných odrůd máku je obsah morfinu v makovině, který se stanovuje v laboratoři RO Brno. V současné době neexistuje v ČR ani v zemích EU závazný postup na jeho stanovení. Dosud používaná metoda stanovení morfinu plynovou chromatografií vyžaduje derivatizační krok s použitím silylačních činidel, která negativně působí na stávající citlivější přístrojové vybavení. Úkolem této práce bylo proto připravit vhodný extrakční a čisticí postup tak, aby mohly být morfin, případně další opiové alkaloidy, stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Mák setý, *Papaver somniferum* L.

#### 2.1.1 Popis rostliny

Mák setý patří do čeledi Papaveraceae (makovité). Je to jednoletá, (70 – 180) cm vysoká kulturní bylina. Lodyha je přímá, na povrchu nejčastěji lysá nebo jen řídce ochlupená, modře ojíňená. Listy jsou střídavé, podlouhlé až vejčité se zubatým zvlněným okrajem. Květy dosahují velikosti až 10 cm v průměru, mají dva opadavé kališní lístky a čtyři korunní plátky, které mohou být zbarveny od bílé přes růžovou až do fialové, obvykle s tmavou nebo naopak světlou skvrnou na bázi. Plodem je tobolka - makovice. Její tvar a velikost závisí na odrůdě. Nejvhodnější z hlediska pěstování jsou makovice široce oválného nebo kulovitého tvaru. Semena jsou drobná, nejčastěji modrá až modrošedá, mohou být ale i bílá, okrová, hnědá či černá.

Celá rostlina s výjimkou semen je protkána mléčnicemi, které při porušení roní bílé mléko (tzv. latex) s vysokým podílem alkaloidů.

Mák se pěstuje v mírných a subtropických pásmech téměř celého světa. Navzdory mezinárodním dohodám je však na řadě míst dodnes pěstován zejména jako nelegální zdroj opia.

#### 2.1.2 Využití máku

Podle užitkových vlastností se rozeznávají dva typy máku

**mák olejný (semenný)** – makovice jsou hrbolaté, lýko je méně vytvořené, tvrdé, s malými mléčnicemi. Téměř nemléčí a nehodí se na produkci opia.

- **máky potravinářské** – semeno máku se využívá především jako pochutina v domácnostech nebo jako surovina v pekařské a cukrářské výrobě. Semeno máku jako zdroj nenasycených mastných kyselin, vlákniny a vápníku, má výborné dietetické vlastnosti. Suché, rozbité makovice s maximálně 15 cm stonku (tzv. makovina), se po výmlatu semen uplatňují ve farmaceutickém průmyslu. Obsah morfinu v makovině se pohybuje od 0,1 % do 1 %. Česká republika je největším světovým producentem a exportérem semen potravinářského máku.
- **máky průmyslové** – pěstují se především pro využití ve farmaceutickém průmyslu. Mají obvykle (1,5 – 2,5) % morfinu v suché makovině. V Tasmánii se pěstují i odrůdy s obsahy nad 3 % morfinu, případně odrůdy s vysokým obsahem nerizikového

thebainu. Největšími producenty máku pro průmyslové využití jsou Tasmánie, Turecko, Španělsko a Maďarsko.

**mák opiový** – rostliny mají bohatě vytvořené, dobře vodivé měkké lýko s velkými mléčnicemi. Makovice jsou hladké. V opiové zralosti, kdy zelené makovice po naříznutí intenzivně mléčí, mají tobolku pokrytou voskovými výpotky. Pěstují se hlavně v Asii (Afghánistán), kde se zneužívají pro produkci opia. Legálně se pěstují máky na produkci opia pro farmaceutické využití v Indii, Číně nebo KLDR.

### 2.1.3 Alkaloidy v máku

Čeleď rostlin makovitých (Papaveracea) je známá bohatstvím a rozmanitostí alkaloidů. U druhu *Papaver somniferum* L. jich bylo popsáno více než čtyřicet. Jak již bylo zmíněno, celá rostlina máku s výjimkou semen je protkána mléčnicemi ronícími při porušení bílé mléko, které po usušení a ztuhnutí představuje surové opium. To obsahuje ze tří čtvrtin látky typické pro mléčné šťávy, tzn. sliz, kaučuk, pryskyřice, bílkoviny, vosky, enzymy atd. Zbývající jednu čtvrtinu tvoří alkaloidy, organické kyseliny (např. kyselina mléčná, mekonová, opiánová) a lakton mekonin. V rostlinách máku se vyskytují alkaloidy především těchto typů [1, 2]:

**morfinanový (fenanthrenový)** – morfin, kodein, thebain, neopin, pseudomorfin,

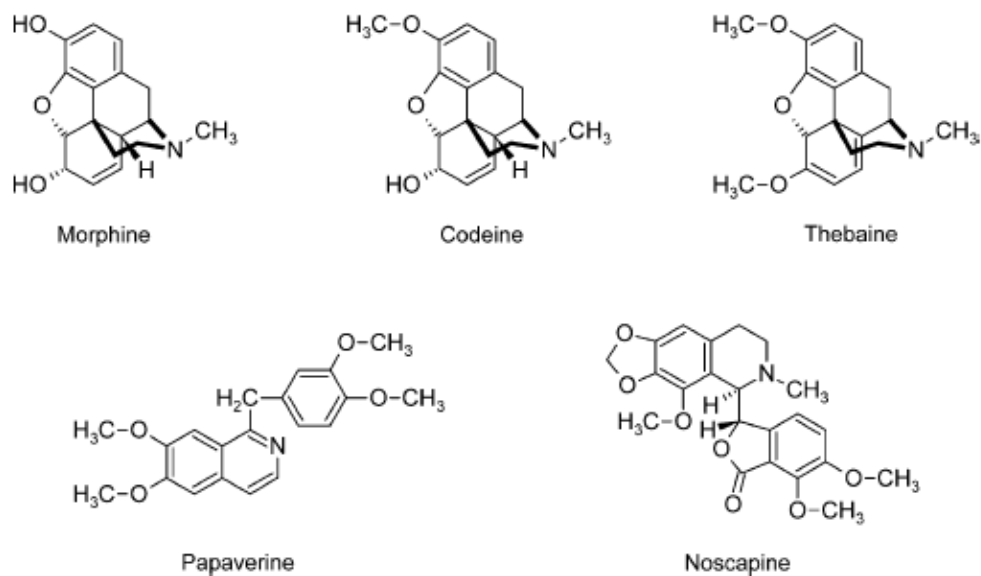
**benzylisochinolinový** – papaverin, laudanin, laudanidin, laudanosin, papaveraldin, kodamin, gnoskopin,

**ftalidisochinolinový** – narkotin (syn. noskapin), narkotolin, narcein, nornarcein,

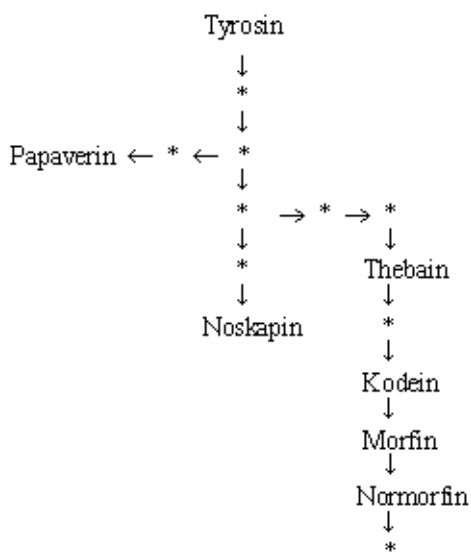
**protoberberinu** – berberin.

Alkaloidy se vyskytují především ve formě solí kyseliny mekonové, sírové a mléčné, pouze narkotin je volný.

Biosyntéza nejdůležitějších alkaloidů je schématicky znázorněna na obrázku č. 2. Zatímco thebain se nachází v celé řadě rostlin čeledi makovitých, kodein a morfin byly nalezeny pouze v rostlinách máku setého (*Papaver somniferum* L.) a máku štětinkatého (*Papaver setigerum* DC). Tyto rostliny mají specifickou schopnost demethylace methoxylových skupin za vzniku kodeinu a morfinu [1].



**Obrázek č. 1. Strukturní vzorce hlavních alkaloidů vyskytujících se v rostlinách máku setého.**



\* předpokládané meziproducty biosyntézy

**Obrázek č. 2. Schéma biosyntézy nejdůležitějších alkaloidů máku (Hall, Nyman, 1974).**

Obsah jednotlivých alkaloidů v máku se v průběhu vegetační doby mění. K nejvyšší akumulaci alkaloidů dochází v době dvou týdnů od počátku opadu korunních plátků. V tobolkách je obsah opia nejvyšší v období opiové zralosti, tzn. asi 10 až 12 dnů před plným dozráváním. Semena máku alkaloidy neobsahují. Stopová množství alkaloidů nalezená

v semeni jsou způsobena jeho znečištěním prachovými částicemi makoviny při sklizni nebo v průběhu skladování.

Výskyt alkaloidů v máku závisí na odrůdě, ale může být ovlivněn i klimatickými podmínkami, obsahem látek v půdě, ovzduší nebo způsobem pěstování. Nové směry ve zpracování alkaloidů vedou ke studiu registrovaných odrůd i z hlediska alkaloidního spektra. Po několik desetiletí byl v popředí zájmu zpracovatelů morfin. Používá se primárně v lékařství jako silné analgetikum a také jako surovina na výrobu dalších opioidů morfinového typu (např. kodeinu, používaného k tišení kašle). Morfin patří k omamným látkám, je silně návykový a vedle svého použití v medicíně je zneužíván jako droga nebo surovina k výrobě heroinu. Proto se v současné době dostává do popředí thebain, který může sloužit pro výrobu řady léků a přitom je obtížně zneužitelný k narkomanii. Jako dominantní alkaloid se thebain vyskytuje v máku listenatém (*Papaver bracteatum*), jehož pěstování je ale v našich podmínkách neekonomické. V roce 1997 byla v Austrálii (Tasmánie) registrována nová vysokothebainová odrůda máku setého Norman. Pomocí mutageneze byla zablokována syntéza alkaloidů na úrovni thebainu. Tato odrůda tak neobsahuje morfin ani kodein. Od ledna 2007 někteří přední světoví zpracovatelé zahájili nákup makoviny i z noscapinových odrůd pro produkci noskapinu.

#### **2.1.4 Makovina**

Za makovinu se považuje vyprázdněná tobolka máku se stonkem dlouhým max. 15 cm. Sklízí se v čase plné zralosti, která je totožná s biologickou zralostí máku. Obsah morfinu v makovině závisí především na odrůdě, pěstební technologii a průběhu počasí v době dozrávání máku. Výhradním odběratelem makoviny pro Českou republiku je firma Zentiva a.s. Hlohovec, která je zároveň monopolním zpracovatelem makoviny ve střední Evropě. Nákup, kontrola a přebírání makoviny se řídí podnikovou normou č. 03-497-PNY. Limitujícím faktorem pro odběr makoviny je obsah morfinu. Zentiva každý rok stanovuje minimální hranici obsahu morfinu pro výkup (obvykle 0,25 %, případně 0,5 % např. v roce 2007).

## **2.2 Analytické metody na stanovení morfinu a dalších opiových alkaloidů**

K nejběžněji používaným metodám na stanovení obsahu morfinu a dalších opiových alkaloidů patří metody chromatografické. V literatuře lze najít řadu prací popisujících jejich stanovení

metodou TLC. Liší se způsoby extrakce, vyvíjecími soustavami i způsoby detekce [4,5,6]. Většina metod však v současné době využívá pro stanovení alkaloidů v makovině a máku techniky GC/FID, GC/MS nebo HPLC/DAD [5,7,8,9,10]. Uvedené metody vyžadují obvykle extrakční a čisticí kroky. Metoda GC vyžaduje navíc derivatizaci silylačními činidly a pro přesnou kvantifikaci i použití vnitřního standardu. Další vhodnou metodou, která vyniká vysokou selektivitou a citlivostí, je kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) v režimu ESI (Electrospray Ionization). Tato metoda nevyžaduje žádné speciální čisticí kroky [11]. Do popředí se dostává i z důvodu zvýšeného zájmu o identifikaci a kvantifikaci opiových alkaloidů v semeni máku. Ten byl vyvolán probíhající diskusí o zavedení regulačních limitů na obsah těchto látek v semeni máku určeném pro potravinářské účely.

Pro stanovení morfinu byly navrženy i metody využívající kapilární elektroforézu s UV nebo MS detekcí. Tyto metody se zatím běžně využívají ke stanovení léčiv, ale v současné době se projevuje zvyšující se zájem o ně i na poli bezpečnosti potravin. Alkaloidy byly stanoveny i micelární elektrokinetickou chromatografií a kapilární zónovou elektroforézou [3].

V některých laboratořích (např. Zentiva a.s. Hlohovec) se obsah morfinu v makovině i nadále stanovuje pomocí polarografie [12].

### **3 Experimentální část**

Na základě literární rešerše byl připraven postup na stanovení obsahu morfinu v makovině metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím detektoru diodového pole. Pomocí směsi vybraných standardů opiových alkaloidů (morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin) byly optimalizovány podmínky měření tak, aby v případě potřeby mohla být metoda rozšířena o stanovení dalších alkaloidů. Bylo odzkoušeno několik extrakčních a čisticích postupů, z nichž byly nakonec vybrány dva. První z postupů využívá extrakční směs chloroform, isopropanol, ethanol a amoniak, druhý způsob extrakce využívá 5% kyselinu octovou s následným přečištěním pomocí extrakce na pevnou fázi (SPE). Navržená metoda byla ověřena na vzorcích makoviny ze sklizně 2009. Vzorky sklizně 2010 byly analyzovány oběma extrakčními postupy a výsledky byly porovnány. Metoda byla validována.

### 3.1 Princip stanovení obsahu morfinu v makovině

Morfin se z pomletého vzorku makoviny extrahuje buď směsí chloroform, isopropanol, ethanol, amoniak nebo 5% kyselinou octovou s následným přečištěním pomocí SPE. Po odstranění extrakčního případně elučního činidla se morfin rozpustí v methanolu a následně se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí v UV oblasti při 284 nm.

### 3.2 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Voda, čistota HPLC.

2 Chloroform.

3 Isopropanol.

4 Ethanol,  $\approx 96\%$ , denaturovaný benzínem.

5 Amoniak, 25% - 29% vodný roztok.

6 Extrakční směs.

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

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

8 Kyselina octová, 5% roztok.

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

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

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

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

11 Methanol, pro HPLC.

12 Eluční činidlo pro SPE.

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

13 Acetonitril, pro HPLC.

14 Heptansulfonát sodný.

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

- 16 Mobilní fáze.  
Mobilní fáze A: Acetonitril (13).  
Mobilní fáze B: Heptansulfonát sodný,  $c(\text{C}_7\text{H}_{15}\text{SO}_3\text{Na}) = 10 \text{ mmol/l}$ , pH 3,5.  
Příprava: 2,0225 g heptansulfonátu sodného (14) se rozpustí ve vodě (1). Poté se roztok kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky a po vytemperování na laboratorní teplotu se doplní po značku vodou (1). pH roztoku se upraví pomocí kyseliny fosforečné (15) na hodnotu 3,5.

Standardní látky opiových alkaloidů.

- 17 Morfin, roztok v methanolu, 1 mg/ml.  
Připraví se řada kalibračních roztoků o koncentraci 10 µg/ml až 400 µg/ml morfinu v methanolu (11).  
18 Morfin hydrochlorid trihydrát.  
19 Thebain, roztok v methanolu, 1 mg/ml.  
20 Kodein, roztok v methanolu, 1 mg/ml.  
21 Noskapin.  
22 Papaverin hydrochlorid.

### 3.3 Přístroje a pomůcky

- 1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent 1100 s detektorem diodového pole.  
2 Analytické váhy s přesností 0,01 mg.  
3 pH-metr.  
4 Laboratorní třepačka.  
5 Minitřepačka typu Vortex.  
6 Ultrazvuková lázeň.  
7 Odstředivka laboratorní.  
8 Koncentrátor vzorků - Termovap 10.  
9 Stříkačkové filtry (PTFE, 0,45 µm), injekční stříkačky, 5 ml.  
10 SPE manifold s membránovým čerpadlem.  
11 SPE kolonky Oasis MCX, 3 ml/60 mg.  
12 Filtrační papír střední hustoty.  
13 Automatické pipety s nastavitelným objemem, špičky.  
14 Vialky se šroubovacím uzávěrem, 2 ml.

### **3.4 Pracovní postup**

#### **3.4.1 Příprava vzorku**

Makovina se sklízí většinou ručně, odřezáním příslušné části stonku s makovicí. Mák se vysype, zbylý stonek s makovicí se rozdrtí a odebere se laboratorní vzorek.

Celý laboratorní vzorek makoviny se bez jakékoliv další úpravy pomele na ultraodstředivém mlýnku Retsch ZM 200 rychlostí 1400 ot/min. Pro extrakci kyselinou octovou s následným přečištěním extraktu na SPE kolonkách se volí síto s velikostí ok 0,5 mm a pro extrakci směsí rozpouštědel síto s velikostí ok 1,0 mm. Pomletý materiál se uchovává v uzavíratelné plastové nádobě při laboratorní teplotě.

#### **3.4.2 Extrakce morfinu**

Morfin se extrahuje ze vzorku makoviny jedním z níže uvedených postupů. Po odstranění extrakčního případně elučního činidla se rozpustí v methanolu.

##### **Extrakce za použití extrakční směsi chloroform, isopropanol, ethanol, amoniak**

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

##### **Extrakce kyselinou octovou s následným přečištěním pomocí SPE**

Do 15ml centrifugační zkumavky se naváží 50 mg makoviny. Přidá se 5 ml 5% kyseliny octové (8) a zkumavka se uzavře. Vloží se do ultrazvukové lázně, kde se vzorek extrahuje 30 min. Následně se obsah zkumavky míchá 1 min na minitřepačce. Poté se vzorek odstředí 10 min při 3900 ot/min. Takto připravený extrakt se přečistí na pevné fázi. Na SPE manifold se umístí kolonka Oasis MCX, kondicionuje se 3 ml methanolu (11) a následně ekvilibruje 3 ml vody (1). Poté se na kolonku nanese 3 ml připraveného extraktu. Extrakt se nechá vsáknout, promyje se 2 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (10) a 2 ml methanolu (11). Morfin a další opiové alkaloidy se eluují 2krát 2 ml eluční směsí amoniak + methanol (12). Eluát se jímá do 5ml extrakční vialky. Ta se umístí do koncentrátoru vzorků,

kde se eluát odpaří pod proudem dusíku při 40 °C. K odparku se přidá 1 ml methanolu (11), rozpustí se pomocí ultrazvuku a převede do 2ml vialky.

### 3.4.3 Chromatografické stanovení

K vlastní analýze se použije metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole. Alkaloidy se separují gradientovou elucí na chromatografické koloně s reverzní fází TS gel ODS-120T a detekují při 284 nm. Nastavení chromatografických podmínek, včetně nastavení gradientového programu, je uvedeno v tabulce č. 1 a č. 2. Chromatogram získaný při analýze vzorku makoviny je na obrázku č. 3.

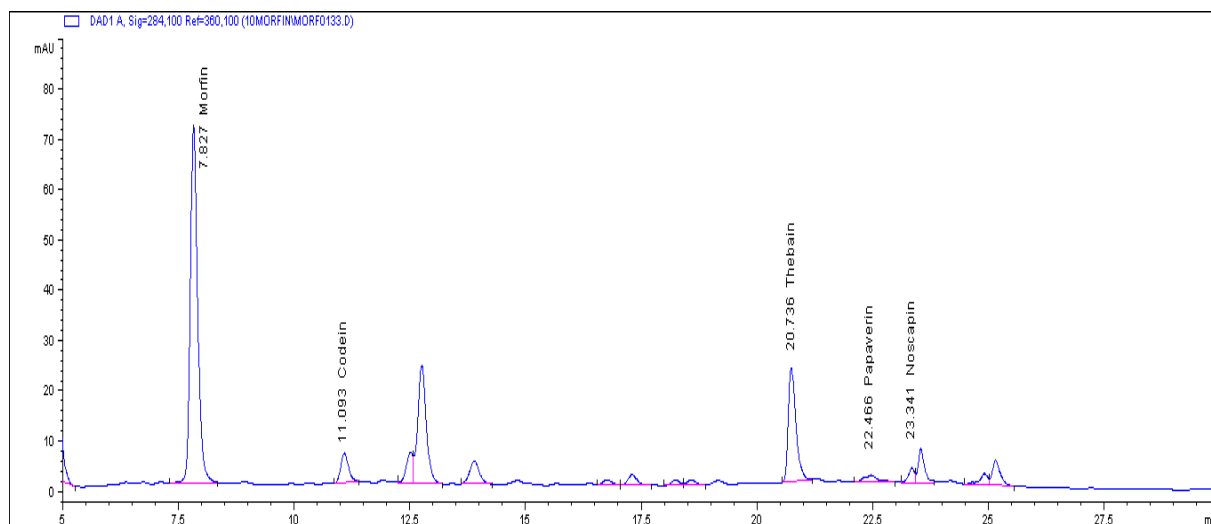
**Tabulka č. 1. Chromatografické podmínky.**

|                     |                                                                                               |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kolona              | TSK gel ODS-120T (25 cm × 4,6 mm ID, 5 µm)                                                    |
| Předkolona          | TSK gel ODS-120T (1,5 cm × 3,2 mm ID)                                                         |
| Mobilní fáze        | mobilní fáze A: acetonitril<br>mobilní fáze B: heptansulfonát sodný, roztok 10 mmol/l, pH 3,5 |
| Průtok mobilní fáze | 1,0 ml/min                                                                                    |
| Teplota kolony      | 40 °C                                                                                         |
| Objem nástřiku      | 10 µl                                                                                         |
| Detekce             | UV 284 nm                                                                                     |

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

| Čas (min) | Mobilní fáze A (%) | Mobilní fáze B (%) |
|-----------|--------------------|--------------------|
| 0         | 20                 | 80                 |
| 15        | 30                 | 70                 |
| 20        | 40                 | 60                 |
| 25        | 40                 | 60                 |
| 30        | 50                 | 50                 |
| 35        | 20                 | 80                 |

Morfin případně další alkaloidy se identifikují srovnáním retenčních časů standardů s retenčními časy píků v analyzovaném vzorku. Pro kvantitativní vyhodnocení se použije metoda vnějšího standardu. Pro stanovení morfinu v makovině se připraví nejméně pětibodová kalibrační přímka v rozsahu 10 µg/ml až 400 µg/ml morfinu v methanolu. Kontroluje se linearita kalibračního grafu.



**Obrázek č. 3. Chromatogram reálného vzorku makoviny.**

**Tabulka č. 3. Retenční časy vybraných opiových alkaloidů.**

| Analyt                   | Morfin | Kodein | Thebain | Papaverin | Noscapin |
|--------------------------|--------|--------|---------|-----------|----------|
| Retenční čas $t_R$ (min) | 7,83   | 11,09  | 20,74   | 22,47     | 23,34    |

### 3.4.4 Výpočet

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

a) extrakce za použití extrakční směsi

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

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

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

kde x je obsah morfinu ve vzorku v %,  
c koncentrace morfinu zjištěná z kalibrační závislosti v µg/ml,  
V celkový objem extraktu v ml,  
V<sub>1</sub> objem extraktu nanesený na SPE kolonku v ml,  
m navážka vzorku v g,  
10<sup>-6</sup> konverzní faktor pro přepočítání z µg na g.

## 4 Výsledky a diskuse

K datu psaní této zprávy neexistuje v České republice ani v zahraničí závazná norma pro stanovení morfinu, případně dalších opiových alkaloidů, ve vzorcích makoviny nebo semeni máku. V literatuře bylo nalezeno několik vhodných extrakčních a čisticích postupů, které umožňují následnou analýzu na HPLC. Jednalo se o extrakce jak v systému kapalina-kapalina, tak s využitím extrakce na pevnou fázi. Po prvotním odzkoušení těchto metod (viz kapitola 4.2), byla pro další práci vybrána extrakce pomocí extrakční směsi chloroform, isopropanol, ethanol, amoniak a extrakce 5% kyselinou octovou s následným čištěním na SPE kolonkách.

Pomocí směsi vybraných standardů opiových alkaloidů (morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin) byly optimalizovány podmínky pro měření na HPLC.

Pro ověření a validaci metody byly použity vzorky makoviny dodané Národním odrůdovým úřadem (NOÚ). Oba výše zmíněné extrakční postupy byly testovány na vybraných vzorcích ze sklizně 2009 a následně byla oběma postupy analyzována celá sklizeň 2010. Získané výsledky byly porovnány a statisticky vyhodnoceny. Při ověřování obou extrakčních postupů se testovalo jednak mletí a následný vliv velikosti částic ve vzorku na průběh extrakce a vliv doby extrakce na výsledný obsah morfinu. V první fázi byla společně s již dvěma popsány extrakčními postupy ověřována i extrakce vzorku citrátovým pufrům s následným čištěním extraktu na SPE kolonkách Oasis HLB s reverzní fází. Čištění extraktu získaného po extrakci vzorku kyselinou octovou bylo testováno na SPE kolonkách Oasis MCX, založených na kationtové výměnném principu. Byly srovnány SPE kolonky různých kapacit. Správnost finálního výběru SPE kolonek byla ověřena testem výtěžnosti.

Byly stanoveny základní validační parametry metody – opakovatelnost a střední opakovatelnost, správnost, linearita, citlivost, meze detekce a nejistota stanovení.

Součástí vývojového úkolu bylo i stanovení stability morfinu v připraveném extraktu a ve vzorku těsně před analýzou na HPLC.

#### **4.1 Mletí vzorku**

Vzorky makoviny se doposud mlely na ultraodstředivém mlýnku Retsch ZM 200 za použití síta s velikostí ok 1,0 mm a pro přípravu vzorků na stanovení metodou GC bylo dostačující. V průběhu ověřování jednotlivých extrakčních postupů bylo zjištěno, že takto připravený vzorek není zcela vhodný, pokud se k extrakci použije kyselina octová. Během extrakce v ultrazvuku nedochází k úplnému smočení všech částic, což se projeví i při následném odstředění. I přes velmi opatrnou manipulaci při odebírání supernatantu dochází ke zvíření a odebraný vzorek obsahuje i pevné částice, což způsobuje problémy při práci s SPE kolonkami. Zjištěné obsahy morfinu v takto připravených vzorcích jsou nepatrně nižší. Z uvedeného důvodu byly vzorky makoviny pomlety jak s použitím síta s velikostí ok 1,0 mm, tak i s velikostí 0,5 mm. Takto pomleté vzorky byly analyzovány oběma postupy. Z uvedeného pokusu vyplynulo, že pomletím vzorku na sítu 0,5 mm dojde při extrakci kyselinou octovou k eliminaci výše uvedených problémů. Výhodou je i větší homogenita vzorku, která je při navážce 50 mg nezbytná. Naopak pro extrakci směsí rozpouštědel je vhodnější použít vzorek pomletý na sítu s velikostí ok 1,0 mm. Jemněji rozemletý vzorek způsobuje problémy během filtrace extraktu. Stanovené obsahy morfinu ve vzorcích byly u obou způsobů mletí v případě extrakce směsí rozpouštědel srovnatelné.

#### **4.2 Extrakce vzorku**

Problematikou stanovení morfinu a dalších opiových alkaloidů metodou HPLC se laboratoř zabývá od roku 2008. Prvotně se vycházelo z práce Ing. Zukalové (ČZU Praha), která provádí analýzy morfinu metodou GC a navrhla extrakci pomocí směsi chloroform, isopropanol, ethanol a amoniak [13]. Druhá práce, z níž se čerpalo, byla diplomová práce (ČZU Praha), která byla publikována v časopise Plant Soil Environ [10]. Tato práce byla zaměřena na stanovení vybraných opiových alkaloidů metodou HPLC. Alkaloidy ze vzorku se extrahují 24 h methanolem. Následuje opakované čištění pomocí extrakcí v systému kapalina-kapalina. Získaný extrakt se po odpaření a převedení do methanolu analyzuje na HPLC s DAD

detektorem při vlnové délce 215 nm. Alkaloidy se separují izokratickou elucí na koloně s reverzní fází Zorbax Extend C18 za použití mobilní fáze (methanol : směsný fosfátový pufr) v poměru (1 : 1).

Tento extrakční postup byl složitý, časově náročný, s velkou spotřebou chemikálií a rozpouštědel. Problémy byly i při vlastní separaci alkaloidů na HPLC. Z výše uvedených důvodů se práce na dalším ověřování tohoto postupu ukončily. V roce 2010 se laboratoř zaměřila na práci publikovanou japonskými autory v časopise Chem. Pharm. Bull [9]. Je v ní popsáno několik extrakčních metod s následným přečištěním na různých typech SPE kolonek. Dva z těchto extrakčních postupů, které byly vyhodnoceny jako nejvhodnější pro účely laboratoře, byly ověřeny na reálných vzorcích. Princip těchto extrakcí a zdůvodnění konečného výběru extrakční metody je popsáno v kapitole 4.2.1. Současně se pokračovalo v ověřování extrakčního postupu dle Ing. Zukalové. Bylo potvrzeno, že takto připravený extrakt lze analyzovat i metodou HPLC.

#### **4.2.1 Extrakce vzorku s následným čištěním pomocí SPE**

Při výběru extrakčních postupů s následným čištěním pomocí SPE se vycházelo z článku japonských autorů [9]. Z výsledků jejich práce vyplynulo, že u morfinu a papaverinu bylo nejlepších výsledků dosaženo při extrakci vzorku 5% kyselinou octovou, zatímco množství kodeinu a thebainu bylo nejvyšší při extrakci s citrátovým pufrem (pH 6,0).

Proto byly tyto dva extrakční postupy srovnány. Takto získané extrakty vyžadovaly rozdílný přístup při následném čištění. U extraktu získaného extrakcí s kyselinou octovou se testovalo čištění pomocí SPE kolonek Oasis MCX pracujících na kationtové výměnném principu a u extrakce citrátovým pufrem byly použity SPE kolonky Oasis HLB s reverzní fází. Oba typy SPE kolonek obsahovaly částice o velikosti 30 µm. V první fázi byly u obou typů zvoleny 6ml kolonky s množstvím sorbentu 150 mg u Oasis MCX a 200 mg u Oasis HLB. Z důvodu snížení ceny stanovení byly v druhé fázi testovány kolonky Oasis MCX s menší kapacitou, o velikosti 3 ml a s 60 mg sorbentu.

Postup práce s kolonkami SPE Oasis MCX je popsán v kapitole 3.4.2. Příprava extraktu a čištění pomocí SPE kolonek Oasis HLB je popsána v poznámce č. 1.

#### **Poznámky**

- 1 *Do 15ml centrifugační zkušavky se naváže 50 mg makoviny. Přidá se 5 ml citrátového pufru (pH 6,0) a zkušavka se uzavře. Vloží se na 30 min do ultrazvukové lázně, kde se vzorek extrahuje. Následně se obsah zkušavky míchá 1 min na minitřepače. Poté se vzorek odstředí 10 min při 3900 ot/min. Takto připravený extrakt se přečistí pomocí extrakce na pevnou fázi. Na SPE manifold se umístí kolonka Oasis HLB, kondicionuje se 3 ml methanolu a následně ekvilibruje 3 ml deionizované vody. Poté se na kolonku nanese 3 ml připraveného extraktu. Extrakt se nechá vsáknout, promyje se 2 ml 5% methanolu. Eluce morfinu a dalších opiových alkaloidů se provede 2krát 2 ml methanolu. Eluát se jímá*

*do 5ml extrakční vialky. Ta se umístí do koncentrátoru vzorků, kde se eluát odpaří pod proudem dusíku při 40 °C. K odparku se přidá 1 ml methanolu, rozpustí se pomocí ultrazvuku a převede do 2ml vialky.*

K ověření a porovnání výše uvedených metod se použily tři vzorky makoviny, které se lišily obsahem morfinu. Vzorky byly extrahovány a následně přečištěny na SPE kolonkách. Získané extrakty byly analyzovány na HPLC. Byly stanoveny obsahy morfinu, kodeinu a thebainu, viz tabulka č. 4. Obsahy papaverinu a noskapinu se ve vzorcích pohybovaly pod mezí stanovitelnosti. Porovnájí-li se získané hodnoty, je možné říci, že oba postupy dávají u kodeinu a thebainu srovnatelné výsledky. Pokud by však vyvstal požadavek na stanovení obsahu těchto alkaloidů, bude nutné ověřit správnost metody a pomocí standardního přídatku zjistit výtěžnost u jednotlivých extrakčních postupů.

**Tabulka č. 4. Srovnání jednotlivých extrakčních postupů s využitím SPE kolonek.**

| Typ extrakce                      | Typ SPE kolonky      | Vzorek č. | Obsah opiových alkaloidů (%) |        |         |
|-----------------------------------|----------------------|-----------|------------------------------|--------|---------|
|                                   |                      |           | Morfin                       | Kodein | Thebain |
| 5% kys.octová<br>+ Oasis MCX      | 6 ml/150 mg<br>30 µm | 6066      | 0,19                         | 0,01   | 0,00    |
|                                   |                      | 6060      | 0,68                         | 0,04   | 0,05    |
|                                   |                      | 6061      | 1,24                         | 0,12   | 0,12    |
| 5% kys.octová<br>+ Oasis MCX      | 3 ml/60 mg<br>30 µm  | 6066      | 0,20                         | 0,01   | 0,01    |
|                                   |                      | 6060      | 0,73                         | 0,05   | 0,05    |
|                                   |                      | 6061      | 1,30                         | 0,12   | 0,13    |
| 1mol/l citrát. pufr<br>+Oasis HLB | 6 ml/200 mg<br>30 µm | 6066      | 0,18                         | 0,01   | 0,01    |
|                                   |                      | 6060      | 0,70                         | 0,05   | 0,04    |
|                                   |                      | 6061      | 1,23                         | 0,11   | 0,12    |

Oba extrakční postupy lze použít i ke stanovení obsahu morfinu v makovině. K dalším experimentům a validaci byla však zvolena extrakce s 5% kyselinou octovou a následným přečištěním na SPE kolonkách Oasis MCX (3 ml/60 mg, 30 µm). Práce s těmito kolonkami byla příjemnější, kolonky lépe protékaly, byly menší rozdíly mezi paralelními stanoveními. Zároveň je nezanedbatelná i vyšší cena citrátového pufru.

#### 4.2.2 Vliv délky trvání extrakce

Na dvou vybraných vzorcích makoviny byl sledován vliv délky trvání extrakce na výsledný obsah morfinu. U extrakce vzorku kyselinou octovou v ultrazvukové lázni byly provedeny extrakce v délce 15 min, 30 min a 45 min. Extrakce pomocí extrakční směsi probíhá na laboratorní třepačce a pro ověření byly zvoleny doby 30 min, 60 min a 90 min. Zároveň byla odzkoušena i extrakce v ultrazvukové lázni po dobu 30 min. Pro každou z variant bylo provedeno 6 opakování. Dále se při přípravě vzorků postupovalo vždy tak, jak je popsáno pro příslušnou extrakční metodu.

Byly stanoveny obsahy morfinu a vypočítány směrodatné odchylky pro jednotlivé doby extrakce viz tabulky č. 5 a č. 6.

Z uvedených výsledků vyplývá, že doporučené doby extrakce, tzn. 30 min pro extrakci kyselinou octovou v ultrazvukové lázni a 60 min při extrakci pomocí extrakční směsi na laboratorní třepačce, jsou dostačující a přesnost stanovení je zcela vyhovující. Současně byla potvrzena možnost provádět extrakci pomocí extrakční směsi v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut.

**Tabulka č. 5. Porovnání vlivu doby extrakce na obsah morfinu - extrakce kyselinou octovou.**

| Vzorek | Doba extrakce | Č. měření/obsah morfinu (%) |       |       |       |       |       | Průměr (%) | Směrodatná odchylka |
|--------|---------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|---------------------|
|        |               | 1.                          | 2.    | 3.    | 4.    | 5.    | 6.    |            |                     |
| 5897   | 15 min.       | 0,807                       | 0,839 | 0,848 | 0,829 | 0,790 | 0,809 | 0,820      | 0,022               |
|        | 30 min.       | 0,846                       | 0,825 | 0,797 | 0,793 | 0,831 | 0,808 | 0,817      | 0,021               |
|        | 45 min.       | 0,793                       | 0,827 | 0,813 | 0,789 | 0,833 | 0,848 | 0,817      | 0,018               |
| 5902   | 15 min.       | 0,372                       | 0,380 | 0,388 | 0,358 | 0,390 | 0,393 | 0,380      | 0,013               |
|        | 30 min.       | 0,370                       | 0,352 | 0,393 | 0,372 | 0,380 | 0,367 | 0,372      | 0,014               |
|        | 45 min.       | 0,361                       | 0,364 | 0,368 | 0,385 | 0,363 | 0,405 | 0,374      | 0,011               |

**Tabulka č. 6. Porovnání vlivu doby extrakce na obsah morfinu - extrakční směs.**

| Vzorek | Doba extrakce | Č. měření/obsah morfinu (%) |       |       |       |       |       | Průměr (%) | Směrodatná odchylka |
|--------|---------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|---------------------|
|        |               | 1.                          | 2.    | 3.    | 4.    | 5.    | 6.    |            |                     |
| 5897   | 30 min.       | 0,789                       | 0,793 | 0,795 | 0,815 | 0,800 | 0,801 | 0,799      | 0,009               |
|        | 60 min.       | 0,827                       | 0,803 | 0,796 | 0,797 | 0,813 | 0,789 | 0,804      | 0,014               |
|        | 90 min.       | 0,776                       | 0,819 | 0,804 | 0,816 | 0,803 | 0,797 | 0,803      | 0,016               |
|        | UZV*          | 0,815                       | 0,793 | 0,784 | 0,815 | 0,787 | 0,801 | 0,799      | 0,014               |
| 5902   | 30 min.       | 0,368                       | 0,340 | 0,360 | 0,351 | 0,354 | 0,354 | 0,355      | 0,009               |
|        | 60 min.       | 0,368                       | 0,373 | 0,360 | 0,364 | 0,353 | 0,375 | 0,365      | 0,008               |
|        | 90 min.       | 0,342                       | 0,345 | 0,365 | 0,363 | 0,351 | 0,365 | 0,355      | 0,010               |
|        | UZV*          | 0,348                       | 0,348 | 0,347 | 0,344 | 0,344 | 0,344 | 0,346      | 0,002               |

\* UZV - extrakce v ultrazvukové lázni po dobu 30 min

### 4.3 Ověření stability

Během ověřování metody byla sledována stabilita morfinu ve vzorku připraveném k analýze na HPLC a u extrakční metody s použitím extrakční směsi také stabilita extraktu, tak aby v případě potřeby mohl být použit k přípravě vzorku bez nutnosti nové extrakce. U vzorku připraveného k analýze byl stanoven obsah morfinu. Poté bylo vyměněno porušené septum, aby nedocházelo k úbytku rozpouštědla ze vzorku. Vzorek byl skladován při teplotě přibližně 4 °C. Analýzy byly opakovány po dvou, šesti a třinácti dnech. Ke sledování stability byly vybrány tři vzorky s rozdílným obsahem morfinu a ty byly připraveny ve dvou opakováních. Obdobně byla sledována i stabilita připraveného extraktu. Vzorek vhodný k analýze na HPLC z něj byl opakovaně připraven po dvou a šesti dnech. V mezidobí byl extrakt skladován při teplotě přibližně 4 °C. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulkách č. 7 a č. 8.

**Tabulka č. 7. Stabilita morfinu ve vzorku připraveném k analýze na HPLC.**

|                        | Obsah morfinu ve vzorku (%) |      |                |      |                |      |
|------------------------|-----------------------------|------|----------------|------|----------------|------|
| Interval mezi měřeními | Vzorek č. 5876              |      | Vzorek č. 5877 |      | Vzorek č. 5883 |      |
|                        | A                           | B    | A              | B    | A              | B    |
|                        | 0,40                        | 0,39 | 0,78           | 0,76 | 0,15           | 0,15 |
| po 2 dnech             | 0,41                        | 0,41 | 0,79           | 0,77 | 0,15           | 0,15 |
| po 6 dnech             | 0,43                        | 0,41 | 0,82           | 0,78 | 0,16           | 0,16 |
| po 13 dnech            | 0,42                        | 0,42 | 0,82           | 0,78 | 0,16           | 0,16 |

**Tabulka č. 8. Stabilita morfinu v extraktu (extrakce s využitím extrakční směsi).**

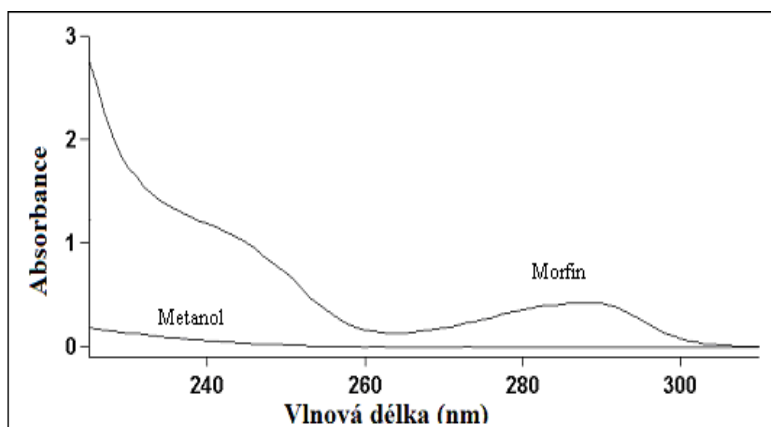
| Interval mezi přípravou vzorku z extraktu | Obsah morfinu ve vzorku (%) |                |                |
|-------------------------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|
|                                           | Vzorek č. 5876              | Vzorek č. 5877 | Vzorek č. 5883 |
|                                           | 0,40                        | 0,77           | 0,15           |
| po 2 dnech                                | 0,40                        | 0,76           | 0,15           |
| po 6 dnech                                | 0,40                        | 0,77           | 0,15           |

Při opakovaném měření jednoho vzorku se stanovený obsah morfinu nepatrně zvyšoval. Lze to vysvětlit tak, že vzorek po nástřiku zůstává určitou dobu stát v autosampleru s porušeným septem a dochází k odpařování rozpouštědla, což vede k zakoncentrování vzorku. Z uvedených výsledků však vyplývá, že ani v případě skladování připraveného vzorku, ani při uchovávání extraktu nedochází k rozkladu morfinu. Extrakt i připravený vzorek lze v případě nutnosti skladovat po dobu jednoho týdne při teplotě přibližně 4 °C.

#### 4.4 Chromatografické podmínky

Pro chromatografické stanovení byla použita analytická kolona s reverzní fází TSK gel ODS-120T (25 cm × 4,6 mm ID, 5 µm) a předkolona TSK gel ODS-120T (1,5 cm × 3,2 mm ID). Stanovení morfinu metodou HPLC se nejčastěji provádí při vlnové délce 284 nm, ale jsou uváděny i vlnové délky 254 nm a 215 nm [10]. Pro odzkoušení byla zvolena vlnová délka 284 nm, kde morfin vykazuje charakteristické absorpční maximum a základní linie je

během analýzy stabilní, viz obrázek č. 4. Tato vlnová délka je dle literatury vhodná i pro analýzu většiny opiových alkaloidů. V průběhu vývoje metody se mimo již zmiňovaných 284 nm provedlo část měření současně i při vlnové délce 245 nm. Stanovení morfinu při této vlnové délce se ukázalo být citlivější, což dokládá tabulka č. 9. Nevýhodou je, že v průběhu chromatografické analýzy dochází k nárůstu základní linie a tím ke zhoršení podmínek pro stanovení ostatních alkaloidů. Měření při vlnové délce 245 nm lze použít v případě nutnosti stanovit velmi nízké koncentrace morfinu v semeni máku.

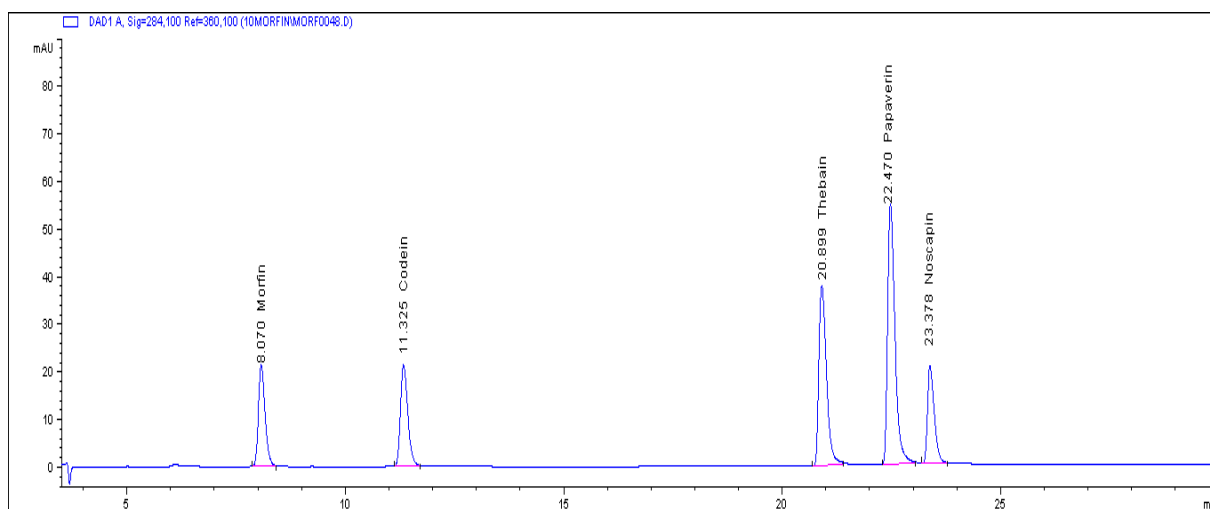


**Obrázek č. 4. Absorpční spektra morfinu a methanolu.**

**Tabulka č. 9. Porovnání citlivosti stanovení morfinu při vlnové délce 245 nm a 284 nm.**

| Analyt        | Citlivost (plocha/ug) |                   |
|---------------|-----------------------|-------------------|
|               | Měření při 245 nm     | Měření při 284 nm |
| <b>Morfin</b> | 10,95                 | 4,57              |

Dále bylo pomocí standardů vybraných opiových alkaloidů potvrzeno, že při použití mobilní fáze a nastavení chromatografických podmínek tak, jak je popsáno v kapitole 3.4.3, dojde k jejich uspokojivému rozdělení, což dokládá obrázek č. 5.



**Obrázek č. 5. Chromatogram standardů vybraných opiových alkaloidů.**

## 4.5 Validační parametry

### 4.5.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla vypočtena pomocí software EffiValidation 3.0 - Opakovatelnost – po úrovních z vícenásobného měření. Opakovatelnost byla stanovena pro oba extrakční postupy na dvou koncentračních hladinách. Tyto hladiny byly zvoleny tak, aby postihovaly oblast s nízkým a vysokým obsahem morfinu v makovině. Pro každou koncentrační hladinu byl vybrán jeden vzorek, který byl minimálně v deseti opakováních vždy extrahován příslušným postupem a následně analyzován na HPLC tak, jak bylo výše popsáno.

Byla vypočítána směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Ze směrodatné odchylky, která charakterizuje přesnost výsledků získaných použitou analytickou metodou, byla vypočítána dovolená difference paralelních stanovení  $R_{\max}$ , tj. maximální rozpětí, které lze ještě vysvětlit přítomností náhodných chyb [14].

$$R_{\max} = a_s \times s,$$

kde  $a_s$  je tabelovaný koeficient pro dvě měření a hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$ , jehož hodnota je 2,77,

$s$  směrodatná odchylka z vícenásobných měření jednoho vzorku.

**Tabulka č. 10. Opakovatelnost měření a maximální difference dvou paralelních stanovení.**

| Extrakce         | Úroveň | Vzorek č. | Počet opakování | Průměr (%) | s      | s <sub>r</sub> (%) | R <sub>max</sub> |
|------------------|--------|-----------|-----------------|------------|--------|--------------------|------------------|
| Kys.octová + SPE | 1.     | 5883      | 10              | 0,180      | 0,0046 | 2,53               | 0,013            |
|                  | 2.     | 5887      | 10              | 0,908      | 0,0208 | 2,29               | 0,058            |
| Extrakční směs   | 1.     | 5883      | 12              | 0,165      | 0,0057 | 3,43               | 0,016            |
|                  | 2.     | 5887      | 12              | 0,865      | 0,0160 | 1,85               | 0,044            |

Z tabulky č. 10 vyplývá, že opakovatelnost stanovení je za použití obou extrakčních postupů srovnatelná a pro daný koncentrační rozsah akceptovatelná.

Povolený rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními byl nastaven na hodnotu 0,04 % abs. u obsahu morfinu < 0,50 % a 0,06 % abs. pro obsahy (0,5 – 1,2) % morfinu ve vzorku.

#### 4.5.2 Střední přesnost

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí software EffiValidation 3.0 - Opakovatelnost - z paralelních měření. Střední přesnost byla stanovena pro oba extrakční postupy. K výpočtu byly použity vzorky makoviny ze sklizně 2010. Obsah morfinu se v daných vzorcích makoviny pohyboval v celém koncentračním rozsahu typickém pro odrůdy potravinářského máku.

Byla vypočítána směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka z paralelních měření a dovolená difference paralelních stanovení R<sub>max</sub>, podle vztahu

$$R_{\max} = b_R \times s$$

kde  $b_R$  je tabelovaný koeficient pro dvě měření a hladinu významnosti  $\alpha = 0,05$ , jehož hodnota je 2,46,

s směrodatná odchylka získaná z paralelních stanovení.

Vyhodnocení je shrnuto v tabulce č. 11.

**Tabulka č. 11. Střední přesnost a maximální difference dvou paralelních stanovení.**

| <b>Extrakce</b>  | <b>Počet vzorků (n)</b> | <b>Průměr měření (%)</b> | <b>s</b> | <b>s<sub>r</sub> (%)</b> | <b>R<sub>max</sub></b> |
|------------------|-------------------------|--------------------------|----------|--------------------------|------------------------|
| Kys.octová + SPE | 42                      | 0,4229                   | 0,0158   | 3,741                    | 0,039                  |
| Extrakční směs   | 45                      | 0,4467                   | 0,0211   | 4,731                    | 0,052                  |

Z tabulky č. 11 vyplývá, že střední přesnost je u dané metody za použití obou extrakčních postupů srovnatelná a pro daný koncentrační rozsah akceptovatelná. Zároveň lze říci, že výsledky korespondují s hodnotami přesnosti získanými za podmínek opakovatelnosti.

#### **4.5.3 Správnost**

V současné době není dostupný žádný CRM makoviny případně máku s deklarovaným obsahem morfinu a zároveň nejsou organizovány žádné mezilaboratorní porovnávací zkoušky na jeho stanovení. Správnost metody na stanovení obsahu morfinu v makovině byla proto ověřena metodou standardního přídatku s použitím testu výtěžnosti. V rámci ověření správnosti byly rovněž všechny vzorky makoviny ze sklizně 2010 analyzovány oběma extrakčními postupy a získané výsledky byly porovnány. Vyhodnocení bylo provedeno v EffiValidation 3.0 - Porovnání 2 metod/laboratoří: t-testem na rozdíl výsledků. Závěry jsou uvedeny v tabulce č. 14.

Při ověřování správnosti metodou standardního přídatku se postupovalo následovně. K přesné navážce vzorku s nízkým obsahem hledaného analytu bylo vždy přidáno definované množství standardu morfinu tak, aby byla připravena řada vzorků na čtyřech koncentračních hladinách, pokrývajících celý požadovaný rozsah. Na každé z hladin byly připraveny vzorky ve 3 opakováních (extrakce extrakční směsí) resp. 4 opakováních (extrakce kyselinou octovou). Takto připravené vzorky byly analyzovány oběma extrakčními postupy a změřeny na HPLC. Získané výsledky stanovení byly vyhodnoceny v programu EffiValidation 3.0 - Správnost - Velký koncentrační rozsah - slepý pokus není k dispozici. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách č. 12 a č. 13.

**Tabulka č. 12. Ověření správnosti metody stanovení morfinu v makovině extrakce kyselinou octovou.**

| Popis                                                                   | Přídavek | Naměřeno | Výtěžnost | Přesnost | Interval spolehlivosti | Hypotéza |
|-------------------------------------------------------------------------|----------|----------|-----------|----------|------------------------|----------|
| Výchozí vz.                                                             | 0        | 0        | 0         | 0,00435  | -0,00753 – 0,00753     | Přijata  |
| Přídavek 1                                                              | 0,1594   | 0,1512   | 94,9      | 0,00988  | 0,13804 – 0,16446      | Přijata  |
| Přídavek 2                                                              | 0,3991   | 0,3848   | 96,4      | 0,01092  | 0,37036 – 0,39914      | Přijata  |
| Přídavek 3                                                              | 0,7986   | 0,7908   | 99,0      | 0,01086  | 0,77643 – 0,80507      | Přijata  |
| Přídavek 4                                                              | 1,2980   | 1,3165   | 101,4     | 0,01599  | 1,29623 – 1,33677      | Přijata  |
| <b>Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.</b> |          |          |           |          |                        |          |

**Tabulka č. 13. Ověření správnosti metody stanovení morfinu v makovině s využitím extrakční směsi.**

| Popis                                                                   | Přídavek | Naměřeno | Výtěžnost | Přesnost | Interval spolehlivosti | Hypotéza |
|-------------------------------------------------------------------------|----------|----------|-----------|----------|------------------------|----------|
| Výchozí vz.                                                             | 0        | 0        | 0         | 0,00032  | -0,00073 – 0,00073     | Přijata  |
| Přídavek 1                                                              | 0,17     | 0,1653   | 97,2      | 0,00556  | 0,15638 – 0,17422      | Přijata  |
| Přídavek 2                                                              | 0,47     | 0,4648   | 98,9      | 0,00527  | 0,45638 – 0,47329      | Přijata  |
| Přídavek 3                                                              | 0,87     | 0,8723   | 100,3     | 0,01208  | 0,85289 – 0,89164      | Přijata  |
| Přídavek 4                                                              | 1,27     | 1,2965   | 102,1     | 0,02261  | 1,26026 – 1,33274      | Přijata  |
| <b>Závěr: Analytická metoda poskytuje statisticky správné výsledky.</b> |          |          |           |          |                        |          |

**Tabulka č. 14. Srovnání dvou extrakčních postupů při stanovení obsahu morfinu.**

| Průměrný rozdíl                                                                   | Přesnost rozdílu | Interval spolehlivosti | Hypotéza |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------------|----------|
| -0,00649                                                                          | 0,0215           | -0,01366 – 0,00068     | Přijata  |
| <b>Závěr: Srovnávané analytické metody poskytují statisticky stejné výsledky.</b> |                  |                        |          |

Z výsledků v tabulkách č. 12 a č. 13 vyplývá, že popsaná analytická metoda jak s využitím extrakce pomocí extrakční směsi, tak s extrakcí kyselinou octovou a následným přečištěním na SPE kolonkách poskytuje správné výsledky. Zároveň bylo potvrzeno, že metoda dává při použití obou extrakčních postupů statisticky stejné výsledky (viz tabulka č. 14). Oba postupy lze tak použít pro extrakci a následnou analýzu morfinu metodou HPLC ze vzorků makoviny.

#### 4.5.4 Linearita

Linearita popisuje míru lineární závislosti mezi validovanou vlastností a měřením. Pro prvotní ověření linearity byl použit standard trihydrát morfin hydrochloridu (Alltech). Byla vytvořena řada kalibračních roztoků o koncentraci 1 µg/ml až 500 µg/ml trihydrát morfin hydrochloridu v methanolu. Tento koncentrační rozsah odpovídá množství morfinu ve vzorku na mezi stanovitelnosti až po obsah 1,3 % morfinu pro metodu s extrakcí kyselinou octovou, resp. 1,9 % morfinu v makovině při použití extrakční směsi. Uvedené koncentrační rozpětí je zcela dostatečné pro makovinu získanou z odrůd potravinářského máku. Dle připravované legislativy by obsah morfinu v makovině získané z těchto odrůd neměl od roku 2013 přesáhnout 0,8 %.

Připravené kalibrační roztoky byly analyzovány na HPLC. Kontrola lineární závislosti byla provedena pomocí software EffiValidation 3.0 - Linearita - korelační a QC koeficient. Hodnota korelačního koeficientu R pro uvedený koncentrační rozsah byla 0,9997 a hodnota koeficientu QC byla 2,58 %, přičemž linearita se obecně považuje za prokázanou, když  $R > 0,99$  a  $QC < 5\%$ .

V průběhu práce na vývoji této metody se podařilo získat standard morfinu-báze (1 mg morfinu v 1 ml methanolu, firma Lipomed). Tento standard byl pak dále využíván pro kalibrace případně stanovení dalších validačních parametrů. Byla připravena řada kalibračních roztoků o koncentraci 5 µg/ml až 300 µg/ml morfinu v methanolu. Tento rozsah odpovídá množství morfinu ve vzorku na mezi stanovitelnosti až po obsah 1,0 % morfinu pro metodu s extrakcí kyselinou octovou resp. 1,5 % morfinu v makovině při použití extrakční směsi. Hodnota korelačního koeficientu R pro daný koncentrační rozsah s použitím standardu morfinu-báze byla 0,9995, hodnota koeficientu QC 3,22 %. Obě uvedené hodnoty jsou v požadovaném limitu pro potvrzení linearity.

#### 4.5.5 Citlivost

Citlivost je dána změnou signálu, vyvolanou jednotkovou změnou validované vlastnosti. Je vyjádřena směrnici kalibrační přímky. Výpočet byl proveden pomocí programu EffiValidation 3.0 - Citlivost - ze směrnice přímky. Pro analýzu morfinu provedenou za výše uvedených podmínek byla stanovena hodnota citlivosti 4,571 (plocha/ $\mu\text{g}$ ).

#### 4.5.6 Meze detekce a stanovitelnosti

Pro stanovení detekčních limitů byl použit program EffiValidation 3.0 - Stanovení ze signálu slepého pokusu v chromatografii.

Byla vytvořena řada kalibračních roztoků o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  až 300  $\mu\text{g/ml}$  morfinu v methanolu. Připravené roztoky byly změřeny na HPLC za podmínek metody a následně byly vyhodnoceny výšky píků morfinu. Z naměřených hodnot byla vypočítána směrnice kalibrační přímky (EffiValidation 3.0 - Kalibrace). Pro každý extrakční postup bylo dále připraveno 5 slepých vzorků, po jejichž změření na HPLC bylo stanoveno maximální kolísání základní linie.

Ze směrnice kalibrační přímky a hodnot maximálního kolísání základní linie byly vypočítány meze detekce a stanovitelnosti, které jsou shrnuty v tabulce č. 15.

**Tabulka č. 15. Meze detekce a stanovitelnosti.**

| Parametr                               |                            | Morfin<br>extrakční směs | Morfin<br>extrakce<br>kyselinou octovou + SPE |
|----------------------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------|
| Směrnice kalibr. přímky                | $b_1$                      | 0,3595                   | 0,3595                                        |
| Korelační koeficient                   | $R^2$                      | 0,9997                   | 0,9997                                        |
| Max. kolísání zákl. linie              | $h_{\max}$ (pA)            | 0,085                    | 0,083                                         |
| Koncentrace na mezi<br>detekce         | $x_D$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 0,7093                   | 0,6926                                        |
|                                        | $x_D$ (%)                  | 0,0035                   | 0,0023                                        |
| Koncentrace na mezi<br>stanovitelnosti | $x_Q$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 2,3644                   | 2,3088                                        |
|                                        | $x_Q$ (%)                  | 0,0118                   | 0,0077                                        |

Za výše popsaných podmínek metody je mez detekce, resp. stanovitelnosti u metody využívající extrakční směs 0,004%, resp. 0,012 % a u metody s extrakcí vzorku kyselinou octovou 0,002 %, resp. 0,008 % morfinu ve vzorku.

Pro zápis výsledků byla použita praktická mez stanovitelnosti 0,02 %.

#### 4.5.7 Nejistota stanovení

Pro oba extrakční postupy byla stanovena relativní standardní nejistota a relativní rozšířená nejistota. K výpočtu byly použity výsledky analýz vzorků makoviny ze sklizně 2010. Obsah morfinu se v daných vzorcích pohyboval v celém koncentračním rozsahu typickém pro odrůdy potravinářského máku. Celkem bylo oběma postupy analyzováno 41 vzorků ve dvou paralelních stanoveních. Výpočet byl proveden v programu EffiValidation 3.0 - Nejistoty z přesnosti - paralelní měření k dispozici. Pro výpočet rozšířené nejistoty byl použit faktor pokrytí 2. Vypočítané nejistoty pro stanovení obsahu morfinu v makovině jsou uvedeny v tabulce č. 16.

**Tabulka č. 16. Nejistoty pro stanovení obsahu morfinu v makovině.**

| Typ extrakce                 | Koncentrační rozsah (%) | Standardní nejistota |               | Rozšířená nejistota (k = 2,0) |               |
|------------------------------|-------------------------|----------------------|---------------|-------------------------------|---------------|
|                              |                         |                      | Relativní (%) |                               | Relativní (%) |
| <b>Extrakční směs</b>        | <b>0,02 – 1,2</b>       | 0,0211               | 4,731         | 0,0423                        | 9,463         |
| <b>Kyselina octová + SPE</b> | <b>0,02 – 1,2</b>       | 0,0158               | 3,741         | 0,0316                        | 7,482         |

Vzhledem k tomu, že nejnižší stanovená hodnota morfinu v dosud analyzovaných vzorcích byla 0,13 %, byla odhadnuta nejistota stanovení pro koncentrační rozsah (0,02 – 0,12) % morfinu na 20 %. Pro interval s koncentračním rozsahem (0,13 – 1,2) % morfinu byla vypočítaná relativní rozšířená nejistota stanovení zaokrouhlena na hodnotu 10 %.

## 5 Závěr

Cílem práce bylo nalézt vhodnou metodu na stanovení morfinu v makovině s využitím HPLC. Z extrakčních postupů popsaných v literatuře byly po odzkoušení vybrány dva, které byly ověřeny na vzorcích makoviny ze sklizně 2009 a 2010. První extrakce využívá extrakční směs chloroform, isopropanol, ethanol, amoniak (v poměru 6 : 2 : 1,5 : 0,5), druhá pak extrakci 5%

kyselinou octovou s následným přečištěním na SPE kolonkách Oasis MCX. Byly optimalizovány podmínky pro měření na HPLC. Alkaloidy se separují gradientovou elucí na chromatografické koloně s reverzní fází TSK gel ODS-120T a detekují v UV oblasti při 284 nm. V průběhu vývoje a ověřování metody bylo zjištěno, že při vlnové délce 245 nm, dochází u morfinu ke zvýšení citlivosti měření, což lze využít v případě nutnosti stanovit velmi nízké koncentrace morfinu v semeni máku. Pro stanovení ostatních alkaloidů vlnová délka 245 nm není vhodná.

Byly optimalizovány podmínky pro přípravu zkušebního vzorku a pro jednotlivé extrakční a čisticí kroky. Bylo zjištěno, že pokud se volí postup s extrakční směsí, je vhodné použít při mletí síto s velikostí ok 1,0 mm. Extrakce kyselinou octovou s následným přečištěním na SPE pak vyžaduje síto s velikostí ok 0,5 mm. Bylo ověřeno, že popsaná délka trvání extrakce je v obou případech dostačující a v případě použití extrakční směsi lze dobu extrakce zkrátit na polovinu použitím ultrazvukové lázně. Zároveň bylo prokázáno, že extrakt získaný při použití extrakční směsi i vzorky připravené k analýze, lze uchovávat po dobu jednoho týdne při teplotě okolo 4 °C, aniž by došlo k rozkladu morfinu.

Po ukončení optimalizace metody byla metoda validována. Byla stanovena opakovatelnost, střední opakovatelnost, linearita, citlivost, meze detekce a stanovitelnosti a nejistota stanovení. Do laboratorního informačního a řídicího systému LIMS byly po zaokrouhlení vloženy následující parametry. Povolený rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními byl nastaven na hodnotu 0,04 % abs. u obsahu morfinu < 0,50 % a 0,06 % abs. pro obsahy (0,5 – 1,2) % morfinu ve vzorku. Pro mez stanovitelnosti byla zadána hodnota 0,02 % a pro rozšířenou nejistotu stanovení hodnota 10 % pro koncentrační rozsah (0,13 – 1,2) % a hodnota 20 % pro koncentrační rozsah (0,02 – 0,12) %.

Metoda, tak jak byla výše popsána, je vhodná pro stanovení morfinu v makovině. Nastavené podmínky pro měření na HPLC zaručují separaci i ostatních významnějších opiových alkaloidů. V případě požadavků na jejich stanovení bude však nutné ověřit vhodnost stávajících extrakčních postupů, případně navrhnout jejich úpravu. Další práce bude nutná i při přípravě extrakčního postupu pro analýzu vzorků semene máku, kde bude nutné vyrovnat se s vysokým obsahem tuku ve vzorku.

## 6 Literatura

1. Vašák, J. a kolektiv autorů: Mák. 1. vydání, Český mák - sdružení právnických a fyzických osob a ČZU Praha, 2010
2. Mištová, T.: Bakalářská práce: Alkaloidy obsažené v rostlinách čeledi *Papaveraceae* Juss., Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně - Fakulta technologická, 2009
3. CFP/EFSA/CONTAM/2008/01 Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants, 2009
4. Popa, D.S., Oprean, R., Curea, E., Preda, N.: TLC-UV densitometric and GC-MSD methods for simultaneous quantification of morphine and codeine in poppy capsules. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, 18(4-5), 645-650
5. Havel, J., Kolovrat, O., Kameníková, L., Bechyně, M.: The Search for Genetic Resources of Opium Poppy (*Papaver somniferum*) with High Thebaine Content and the Development of a Screening Method. *Czech J. Genet. Plant Breed*, 2001, 37(3), 88-92
6. Szabó, B., Lakatos, A., Kőszegi, T., Kátay, G., Botz, L.: Thin-Layer Chromatography-Densitometry and Liquid Chromatography Analysis of Alkaloids in Leaves of *Papaver somniferum* Under Stress Conditions. *Journal of AOAC International*, 2005, 88(5), 1571-1577
7. Martin, G.E., Swinehart, J.S.: Use of Silyl Derivatives in the Quantitative Gas Chromatographic Determination of Morphine and Codeine. *Analytical Chemistry*, 1966, 38(12), 1789-1790
8. Grove, M. D., Spencer, G. F., Wakeman, M. V., Tookey, H. L.: Morphine and Codeine In Poppy Seed. *J. Agric. Food Chem.*, 1976, 24(4), 896-897
9. Yoshimatsu, K., Kiuchi, F., Shimomura, K., Makino, Y.: A Rapid and Reliable Solid-Phase Extraction Method for High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Opium Alkaloids from *Papaver* Plants. *Chem. Pharm. Bull.*, 2005, 53(11), 1446-1450
10. Lachman, J., Hejtmánková, A., Miholová, D., Kolihová, D., Tluka, P.: Relations among alkaloids, cadmium and zinc contents in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Plant Soil Environ*, 2006, 52(6), 282-288
11. Sproll, C., Perz, R.C., Lachenmeier, D.W.: 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. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 5292-5298.
12. Volke, J.: 75 let polarografie léčiv a biologicky aktivních látek. *Chemické listy*, 1997, 91, 1043-1053
13. Zukalová, H., Cihlář, P., Kosek, Z.: Požadavky na kvalitu makoviny, kvantitativní stanovení morfinu v makovině. 4. *Makový občasník. Sborník odborných seminářů „Mák v roce 2005“*, 1. vydání, ČZU Praha, 2005, 59-62
14. Eckschlager, K., Horsák, I.: Dovolenaá difference výsledků paralelních stanovení. *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*, 1. vydání, SNTL Praha, 1980
15. Centner, V.: Uživatelská příručka Effi Validation 3.0

---

**Bulletin Národní referenční laboratoře XVII 2013/1**

Ročník: XVII, č. 1

Vydal: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v roce 2013

Odpovědný redaktor: Ing. Iva Strížová

Počet stran: 51

Texty neprošly jazykovou úpravou.

ISSN 1801-9196