

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
3. KONFERENCIE
CENTRA EXCELENTNOSTI

**Aplikácia OMICS nástrojov v štúdiu vzniku chorôb a ich
prevencie**



Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, Bratislava

30. november 2022

Recenzent

RNDr. Jana Bellová, PhD.

chemjbel@savba.sk

Editor

Mgr. Mária Šedivá, PhD.

Ing. Mária Kopáčová

chemsedm@savba.sk

chemmari@savba.sk

ISBN 978 – 80 – 971665 – 4 - 0

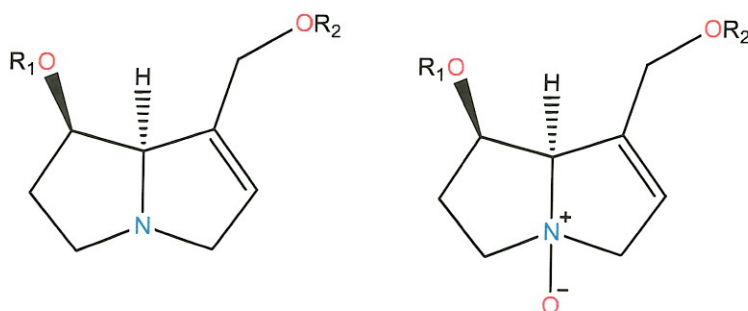
Stanovenie vybraných pyrolizidínových alkaloidov v suchých rastlinných extraktoch pomocou HPLC-MS

Andrej Chyba, Viera Dujnič, Vladimír Pätoprstý

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Úvod

Pyrolizidínové alkaloidy (PA) sú heterocyklické dusík obsahujúce organické zlúčeniny (Obr. 1). V prírode sa vyskytujú vo viac ako 6 000 rastlinách (veľké zastúpenie druhov z čeľadí *Boraginaceae*, *Asteraceae* a *Fabaceae*). Mnohé z týchto rastlín sú bežné buriny, ktoré môžu pri zbere kontaminovať suroviny rastlinného pôvodu používané na výrobu čajov, extraktov, tinktúr alebo liečiv (Prakash et al., 1999). PA sú syntetizované v koreňoch rastlín ako N-oxidy a transportované do zvyšku rastliny, kde sa hromadia v kvetoch, stonkách a listoch. Pôsobia ako veľmi účinné prostriedky na odpudzovanie hmyzu, ale na človeka majú niektoré z nich karcinogénny a hepatotoxický účinok najmä 1,2-nenasýtené necínové bázy, ale aj ich N-oxidové formy (Seremet et al., 2018). Väčšina rastlín produkuje zmesi PA v rôznych koncentráciách v rozmedzí od menej ako 0,001 % do 5 % (až do 19 % suchej hmotnosti) (EFSA 2011). Z dôvodu toxicity PA a zvýšeného rizika ohrozenia zdravia obyvateľov boli vypracované rizikové štúdie a na základe nich vydali európske liekové a potravinové authority nariadenia na kontrolu obsahu PA v rastlinných produktoch (EFSA 2016; EFSA 2017a; EFSA 2017b). Zároveň boli stanovené odporúčané maximálne hodnoty denného príjmu a tiež obsahu týchto alkaloidov v rastlinných a živočíšnych produktoch (EMA 2021). Vznikla tak potreba presného a citlivého stanovenia obsahu PA v rôznych komplexných maticiaciach. Na tento účel sa javí ako veľmi vhodná metóda hmotnostnej detekcie meraním vybraných iónov a ich charakteristických iónových fragmentov v kombinácii s vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.



Obrázok 1 Chemická štruktúra 1,2-nenasýtených pyrolizidínových alkaloidov (vľavo) a ich N-oxidov (vpravo)

Materiál a metódy

Suché extrakty rastlín rumanček, púpava, fenikel, ruža šípová a ibištek boli dodané firmou Calendula, Slovensko. Vybrané štandardy pyrolizidínových alkaloidov boli zakúpené od firmy PhytoLab, Nemecko. Kvapalinová chromatografia sa merala na prístroji Dionex UltiMate 3000 UHPLC system (ThermoFisher Scientific, Nemecko) s degaserom, kvartérnou pumpou, autosamplerom a vyhrievaným kolónovým priestorom. Detekcia sa vykonávala pomocou hmotnostného detektora AB Sciex Qtrap 4500 (Sciex, USA) s trojitým kvadrupólom a

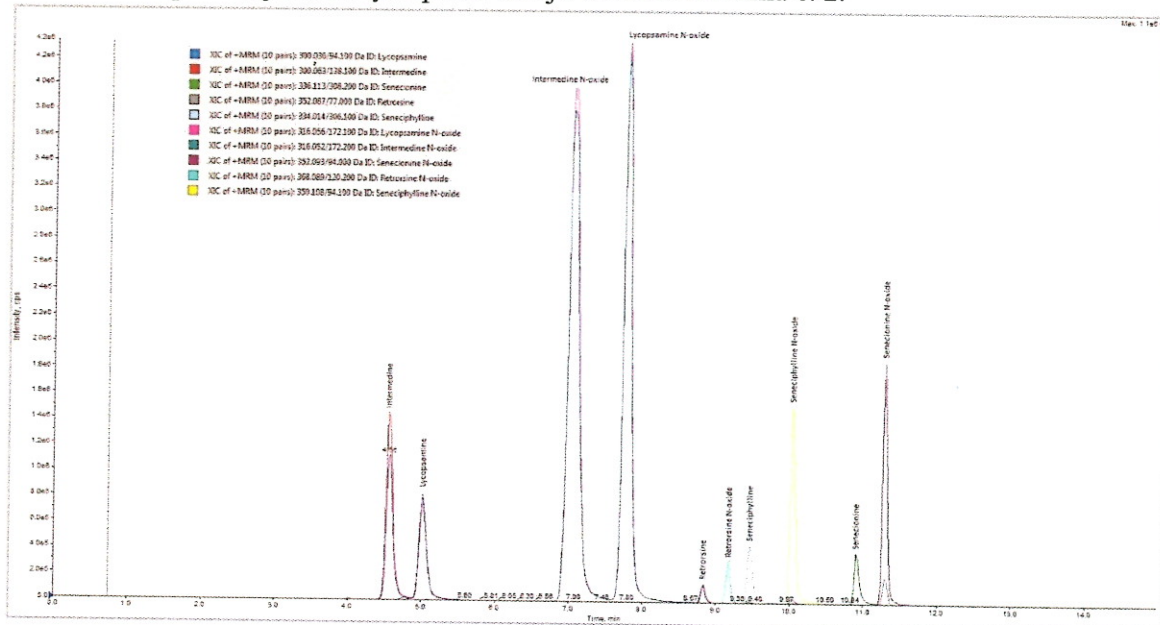
elektrosprejovou ionizačnou hlavicou. Alkaloidy sa zo suchého extraktu extrahovali pomocou 0,5% kyseliny mravčej za stáleho miešania (1500 rpm) a ohrevu (80°C) dva krát po 10 minút. Následne bol roztok ochladený na laboratórnu teplotu a prefiltrovaný cez 25 mm striekačkový filter HPTFE s veľkosťou pórov 0,22 µm. Vzorka bola nastrekovaná v objeme 10 µl a separácia prebiehala na kolóne Phenomenex Luna Omega 3 µm PS C18 100 Å, 150 x 4,6 mm s predkolónou Security Guard PS C18 4 x 3,0 mm. Teplota kolónového priestoru bola nastavená na 35°C a konštantný prietok na 1 ml/min. Elúcia sa dosahovala gradientom dvoch fáz: 0,5% kyseliny mravčej a metanolu. Ich vzájomný percentuálny pomer je popísaný v tabuľke č. 1. Detektor meral v pozitívnom móde a parametre iónového zdroja boli nastavené nasledovne CUR: 25.00, IS: 5500.00, TEM: 600.00, GS1: 60.00, GS2: 60.00, CAD: Medium, EP: 10.00.

Tabuľka 1 Časový rozpis elučného gradientu

Čas (min)	0,5% Kyselina mravčia	Metanol
0	91%	9%
5	91%	9%
15	50%	50%
18	0%	100%
20	0%	100%
22	91%	9%
25	91%	9%

Výsledky a diskusia

Vybrané štandardy pyrolizidínových alkaloidov sa presne navázili a rozpustili v metanole. Následne sa pripravil zmesný 10-zložkový štandard, ktorý sa ďalej podľa potreby riedil. Optimalizáciou chromatografických podmienok, hlavne elučného gradientu, sa dosiahla dostatočná separácia jednotlivých píkovo ako je vidieť na obrázku č. 2.



Obrázok 2 Chromatografický záznam zmesného 10-zložkového štandardu pyrolizidínových alkaloidov

Kvôli komplexnosti matrice rastlinných extraktov a jej možnému negatívne mu vplyvu na kvantitatívne stanovenie PA bola použitá metóda prídavku štandardu v dvoch rôznych koncentráciách. Pomocou lineárnej regresie sa potom vypočítala koncentrácia jednotlivých pyrolizidínových alkaloidov v suchých rastlinných extraktoch. Hodnoty sú uvedené v tabuľke č. 2.

Tabuľka 2 Hodnoty jednotlivých pyrolizidínových alkaloidov v suchých rastlinných extraktoch

Názov PA	Suchý extrakt, koncentrácia PA v µg/kg (ppb)				
	Rumanček	Púpava	Fenikel	Ruža šípová	Ibištek
Intermedine	2,77	172,55	0,8	0,91	3,07
Lycopsamine	4,56	68,75	1,99	0,69	0,74
Retrorsine	40,99	>0,6	>1,38	0	>1,35
Seneciphylline	>0,5	2,5	0,75	0,81	0
Senecionine	>0,4	>0,3	0	0	0
Intermedine N-oxide	>0,2	0	0	0	0
Lycopsamine N-oxide	>0,2	0	0	0	0,48
Retrorsine N-oxide	69,93	14,72	>1,14	11,39	>1,11
Seneciphylline N-oxide	>0,3	>0,3	0	>0,68	6,34
Senecionine N-oxide	14,17	>0,3	5,91	>0,70	11,77
Spolu	>134,0	>260,0	>12,0	>15,2	>25,0

Najnižšiu koncentráciu (12,0 µg/kg) desiatich vybraných PA obsahoval suchý extrakt feniklu a naopak najvyššiu koncentráciu (260,0 µg/kg) obsahoval extrakt púpavy. Podľa vykonávacieho nariadenia Európskej komisie z 11. decembra 2020 sa stanovila maximálna hodnota sumy 21 pyrolizidínových alkaloidov obsiahnutých v bylenných nálevoch (sušený produkt) na 200 µg/kg (Komisia EÚ, 2020). Aj keď analýza neobsahuje hodnoty ostatných PA, v prípade púpavového extraktu stanovená koncentrácia 10 vybraných alkaloidov už prekračuje maximálnu povolenú hodnotu.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj produktov modifikáciou prírodných látok a štúdium ich multimodálnych účinkov na COVID-19, ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA. (Grant č. 2/0096/20)

Literatúra

Prakash A.S., Pereira T.N., Reilly P.E., Seawright A.A.: Pyrrolizidine alkaloids in human diet. Mutation Research 1999, 443, pp. 53-67

Seremet O., Olaru O., Gutu C., Nitulescu G., Ilie M., Negres S., Zbarcea C., Purdel C., Spandidos D., Tsatsakis A., Coleman M., Margina D.: Toxicity of plant extracts containing pyrrolizidine alkaloids using alternative invertebrate models. Molecular Medicine Reports 2018, 17, pp. 7757-7763

EFSA 2011. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). EFSA Journal 9 (11): 2406, 134. Dostupné na: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2406>

EFSA 2016. Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population. EFSA Journal 14(8):4572, 50. Dostupné na: <https://doi.org/10.2903/j.EFSA.2016.4572>

EFSA 2017a. Update: Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. EFSA Scientific Committee. EFSA Journal, 15(1):4658, 41. Dostupné na: <https://doi.org/10.2903/j.EFSA.2017.4658>

EFSA 2017b. Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. EFSA EFSA CONTAM Panel (Panel on Contaminants in the Food Chain). EFSA Journal, 15(7):4908, 34. Dostupné na: <https://doi.org/10.2903/j.EFSA.2017.4908>

EMA 2021. Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic, unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) including recommendations regarding contamination of herbal medicinal products with PAs. EMA/HMPC/893108/2011. Dostupné na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-use-herbal-medicinal-products-containing-toxic-unsaturated-pyrrolizidine-alkaloids_en-0.pdf

Komisia EÚ 2020. Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) 2020/2040 z 11. decembra 2020, ktorým sa mení nariadenie (ES) č. 1881/2006, pokiaľ ide o maximálne hodnoty pyrrolizidínových alkaloidov v určitých potravinách. C/2020/8665, Ú. v. EÚ L 420, 14.12.2020, s. 1 – 4. Dostupné na: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2020.420.01.0001.01.SLK&toc=OJ%3AL%3A2020%3A420%3ATOC