

Élelmiszerek toxikus szennyeződéseinek vizsgálata II

Alkaloid szennyeződések kimutatása az élelmiszerekben

GYARMATI LÁSZLÓ, DÁVID GÁBOR ÉS
KOVÁCS JÓZSEF

Magyar Néphadsereg Egészségügyi Szolgálat
és Budapest Főváros Vegyészeti és Élelmiszervizsgáló Intézete

Érkezett: 1962. április 18.

Különböző élelmiszerek szennyeződhetnek véletlenül, vagy szándékos cselekedet következményeként alkaloiddal, vagy más bázisos nitrogént tartalmazó alkaloid jellegű mérgező hatású vegyületekkel. (Továbbiakban: alkaloidok). Leggyakrabban a dúvadak irtására felhasznált *sztrichnin*, *nikotin* fordulhat elő élelmiszereinkben, de véletlen következményeként vagy éppen mérgezés céljából különböző gyógyszerek is szennyezhetik az élelmiszereket.

Az alkaloidok elkülönítésére és azonosítására több módszert találhatunk a legtöbb toxikológiai szakkönyvben, gyógyszerkönyvben és számos közleményben. Ezek a módszerek általában csak akkor alkalmazhatók eredményesen, ha megfelelő mennyiségű és tisztaságú anyag áll rendelkezésre a csapadékos eljárás vagy színreakciók végrehajtására. Erre különösen a toxikológiai analízisben sok esetben nincs lehetőség, azért szükséges volt olyan vizsgálati módszerek tanulmányozása és kipróbálása, amelyek kis mennyiségű mérgező anyag kimutatására megbízhatóan alkalmazhatók.

Az előzetes vizsgálatok alapján a papirkromatográfias módszert találtuk a legmegfelelőbbnek.

Rác és *Kedvessy* (1), *Jatzkevitz* (2), *Vidič* (3) közleményei is arra mutatnak, hogy e mérgező anyagok analízisében elsősorban a papirkromatográfias eljárások vezethetnek eredményre.

Curry (4) monográfiájában kiválóan foglalja össze és értékeli az egyes kimutatási eljárásokat.

A legtöbb ilyen eljárásnak hátránya azonban, hogy viszonylag hosszú időt igényel, ugyanis kielégítő elválasztás csak 6–16 órás futtatási idő után érhető el.

Resplandy (5) ammóniumsulfát oldattal mint oldószerrel sikeresen választott szét 5 alkaloidot, (sztrichnint, heroint, effedrint, atropint és tropint). *Resplandy* munkája nyomán *Häusermann* (6) sósavas ammóniumsulfát oldatot alkalmazott narkotin és papaverin szétválasztására. Egyikünk ennek az elvnek a felhasználásával kidolgozott egy eljárást 20 különböző alkaloidnak vizeletből, szérumból való kimutatására. (7)

Vizsgálataink során célul tűztük ki:

1. a felhasználás és hozzáférhetőség szempontjából – eddigi tapasztalataink alapján – leggyakrabban előforduló és számításba vehető (nikotin, sztrichnin, atropin, kodein és etilmorfin) alkaloidok papirkromatográfias szétválasztását és azonosítását,

2. megfelelő futtató oldószer kiválasztását, amely lehetőleg rövid időn belül kielégítő elválasztást eredményez,

3. a különböző futtatási módszerek összehasonlításával megfelelő futtatási mód kiválasztását,

4. annak tisztázását, hogy a vizsgálathoz felhasznált papír minősége milyen mértékben befolyásolja a kialakuló R_f -értéket,

5. az alkaloid foltok azonosítására számításba vehető fontosabb kémszerek vizsgálatát.

Kísérleti rész

1. A vizsgálathoz 5–25 μg alkaloid mennyiséget találtunk optimálisan megfelelőnek. Ezért a meghatározásokat úgy végeztük, hogy az egyes komponenseket egymás után vittük fel a startpontra. (50 μg -nál nagyobb mennyiséget tartalmazó oldat felhasználása nem célszerű.) Vizsgálatot végeztünk olyan oldat felhasználásával is, amely megfelelő mennyiségben tartalmazta az egyes komponenseket. A futtatás és előhívás után a kétféle módszerrel felvitt vizsgálható oldatnál eltérés nem mutatkozott.

2. A futtató oldószer kiválasztásához különböző sók, (nátriumszulfát, ammóniumszulfát, sósavas ammóniumszulfát, bórax), különböző koncentrációjú oldataival végeztünk vizsgálatot.

1. táblázat

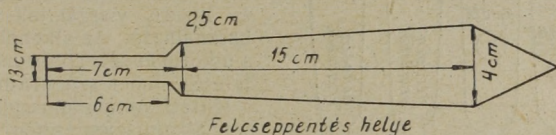
Futtató oldószer	R_f érték				
	etilmorfin	atropin	kodein	nikotin	sztrichnin
10%-os nátriumszulfát	0,84	0,87	0,87	0,88	0,57
Telített nátriumszulfát (20 C°-on)	0,64	–	0,65	0,77	0,24
Telített borax (20 C°-on)	0,86	0,88	0,85	–	0,54
Telített ammónium- szulfát (20 C°-on) ...	0,14	0,28	0,26	0,65	0,03
„Félig telített” ammó- niumszulfát	0,62	0,71	0,65	0,80	0,29
10%-os ammónium- szulfát	0,84	0,90	0,83	0,91	0,58
1 n HCl és telített ammóniumszulfát 1:1 elegye	0,68	0,74	0,71	0,95	0,41

A táblázatban feltüntetett R_f -értékekből látható, hogy a vizsgált alkaloidok esetében a „félig telített” (20 C°-on telített ammóniumszulfát és desztillált víz 1:1 arányú elegye) ammóniumszulfát futtató-szer a legmegfelelőbb. Az etilmorfin és kodein esetében ugyan a két R_f -érték között aránylag kicsi a különbség, ezért ha mindkét komponens jelenléte feltételezhető, kiegészítő vizsgálatra van szükség. Erre a célra telített ammóniumszulfát-oldattal történő futtatás jól alkalmazható. Az 1. táblázatból kitűnik: telített ammóniumszulfát esetében etilmorfinra az R_f -érték 0,14, kodeinre 0,26. A savanyított oldószerben végzett vizsgálatok alapján azt tapasztaltuk, hogy különösen 0,7 R_f -értéken felül a foltok deformáltaká válnak.

Az egyes komponensek azonosításának biztonsága növelhető a különböző futtatószerekkel végzett kromatografáláson kívül megfelelő előhívó reagens kombináció felhasználásával.

3. A futtatás módjának megválasztására a gyors kivitelezés érdekében körkromatográfiával Vámos (9) és Hettler (8) által javasolt körcikk alakú kromatogrammal végeztünk vizsgálatokat.

Megállapítottuk, hogy a nyelvalakú körcikk kromatogrammok horizontális futtatásával aránylag gyorsan (1,5–2 óra) megfelelő elválasztás érhető el. Ugyanakkor ekszikkátorban, vagy más, erre alkalmas edényben egyszerre több (4–10 db) kromatogram futtatható. A vizsgálathoz javasolt papír alakját és méreteit mutatja a következő 1. ábra.



1. ábra

4. A vizsgálat elvégzéséhez – nem speciális laboratóriumokban – gyakran csak közönséges szűrőpapír áll rendelkezésre, ezért kísérleteket végeztünk annak megállapítására, hogy a papír minősége milyen mértékben befolyásolja az elválasztás megbízhatóságát és érzékenységét. „Félig telített” ammóniumsulfát futtatószer felhasználásával, Whatmann N°1 és közönséges (nem kvalifikált) laboratóriumi szűrőpapíron kapott R_f -értékek a következők:

2. táblázat

Papír	R_f értékek				
	etilmorfin	atropin	kodein	nikotin	sztrichnin
Közönséges szűrőpapír	0,62	0,70	0,64	0,80	0,28
Whatmann N°1	0,62	0,71	0,65	0,80	0,29

Kiegészítésül meg kell jegyeznünk, hogy noha az egyes R_f -értékek között nincs nagy eltérés, a foltok alakja a Whatmann-papíron határozottabb és kis mennyiségű alkaloid esetében is jól értékelhető.

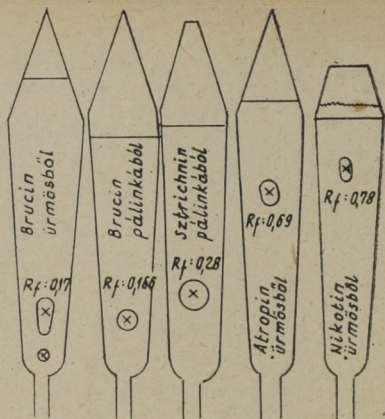
5. Az alkaloid foltok előhívására több reagenst próbáltunk ki. – A fenti körülmények között – a legmegfelelőbb eredményt (5–25 μ g alkaloiddal) a következő reagensekkel értük el:

a) *Módosított Dragendorff reagens* (8): 0,8 g bizmutszubnitrátot jégecetben, oldunk, hozzáadunk 40 ml vizet. Ennek 5 ml-ét 5 ml 40%-os káliumjodid oldattal és 40 ml jégecettel elegyítjük, majd vízzel 100 ml-re egészítjük ki. E reagenssel az alkaloidok sárga alapon *narancsvörös foltokat* adnak.

b) 1%-os *etanolos jódt* oldat (4): *fehér alapon sárga, illetve barnás foltok* keletkeznek.

c) *p-dimetilaminobenzaldehid reagens* (4): 0,05 g p-dimetilaminobenzaldehidet 10 ml abszolút alkoholban oldunk, hozzáadunk 2 ml tömény HCl-t. A reagenst mindig frissen készítjük. Pozitív reakció esetén *halványsárga alapon lila foltokat* észlelünk.

d) *Cerium(IV)sulfát oldat* (10): 1 g cérium (IV) szulfátot 100 ml 2 n



2. ábra

kénsavban oldunk. Sárga alapon narancsvörös foltok keletkeznek.

Mint a 3. táblázatból látható, a Dragendorff reagens mindegyik vizsgált alkaloiddal pozitív reakciót ad, az ismertett körülmények között a p-dimetilaminobenzaldehid pedig negatív eredményt mutat. Így e két reagens kombinációja ellenőrző és kizáró vizsgálatok céljaira jól használható. Az alkoholos jód-oldat a nikotin és sztrichnin megkülönböztetésére jöhet számításba, továbbá, a telített ammóniumsulfát futtatószer alkalmazása esetén, az aránylag hasonló R_f -értéket mutató kodein kimutatására és az atropin kizárására használható.

3. táblázat

Reagens	etil-morfin	atropin	kodein	nikotin	sztrichnin	brucin
Dragendorff	+	+	+	+	+	+
Alkoholos jódoldat	+	*	+	-	+	+
p-dimetil-aminobenzaldehid	-	-	-	-	-	-
Cerium(IV)-szulfát	-	-	-	-	-	-

* Csak nagyobb koncentrációban ad gyengén pozitív reakciót.

Vizsgálataink során előhíváskor a reagenset porlasztással vittük fel a papírra, majd befúvás után elektromos hajszárítóval szárítottuk meg az előhívott kromatogramot.

Jód-oldattal történő befúvás esetén néhány másodperc múlva meleg csapvízzel kimostuk a kromatogramokról a felesleges jódot és nedvesen végeztük el a kiértékelést.

Az előzőek alapján a következő vizsgálati módszert ajánljuk: az alkaloid-sót tartalmazó (0,02–0,1%-os) etanolos vagy vizes oldatból megfelelő mennyiséget (0,05–0,02 ml) pipettával felviszünk a startvonalra és elektromos hajszárítóval beszáritjuk. Ha a bázist vittük fel, akkor a papíron előállítjuk a sót: a foltot 1–2 percig cc. HCl-t tartalmazó üveg nyílása fölé tartjuk. A papírt ekszikkátorban vagy erre a célra szolgáló edényben vízszintesen kifeszítjük. Kromatografáló oldatként 20 C°-on „féligen telített” ammóniumsulfát oldatot használunk. Futtatási idő 1,5–2 óra. A futtatás távolsága 13–15 cm. A papírt futtatás után elektromos hajszárítóval megszáritjuk, majd megfelelő reagenssel a szennyező anyagra jellemző foltokat előhívjuk. Mi esetünkben a vizsgált alkaloidok R_f -értékeit a 2. táblázat tartalmazza.

Ismeretlen töménységű vizsgálandó oldat esetén a kromatografáláshoz felhasználásra kerülő mennyiség megállapításához előkísérletet végzünk. Ehhez 0,05 ml oldatot egy kis szűrőpapírra viszünk, beszáritás után megfelelő reagenssel (általában Dragendorff reagens) előhívjuk. A kapott folt nagyságából és intenzitásából megbecsülhetjük a futtatáshoz szükséges vizsgálandó anyag mennyiségét.

Előző közleményünkben (11) – az alkaloid közvetlen kimutatására leirt – kirázáson alapuló izolálási eljárás felhasználásával, az általunk szennyezett élelmiszerekből sikerült pozitív reakcióval kimutatni a tárgyalt alkaloidokat.

Tapasztalataink szerint az izolálási eljárás nem szükséges olyan esetekben, ha kis szárazanyagtartalmú oldatokban keressük az alkaloidokat. Így pl. pálinkákban, üdítő italokban levő kis alkaloidmennyiségeket izolálhatunk, azonosíthatunk úgy, ha a kérdéses ital megfelelő mennyiségét visszük fel (1–10 ml-t) bepárlunk és 0,02–0,1 ml-t) a papírra. Nagyobb cukortartalmú anyagok pl. ürmös, vagy likőrök vizsgálatakor, – a jól értékelhető foltok esetében – az alkaloidokat lúgosítás után kloroformmal kirázzuk, a kloroformos kivonatot beszárítjuk és a kloroformos oldat megfelelő részletét kromatografáljuk. A 2. ábra a pálinkából közvetlenül és az ürmösből kirázás után kapott kromatogramokat mutatja.

A kimutatás céljaira történő kromatografálás mellett felhasználható még e módszer kis anyagmennyiségek bizonyos mértékű tisztítására is. Ehhez a következő eljárást alkalmazzuk. Egyidejűleg két papíron végünk futtatást egymás mellett. Az egyik kromatogramot előhívjuk, a másikról pedig levágjuk a vizsgálat szempontjából bennünket érdeklő alkaloidnak megfelelő helyet. Ezután az így kapott szűrőpapír darabkákról néhány ml híg (1–5%-os) sósavval vagy ecetsavval rázogatva leoldjuk az alkaloidot, majd a savanyú oldat ammónium-hidroxiddal történő lúgosítása után kloroformmal kirázzuk a meghatározandó vegyületet. A kloroformos oldat bepárlása után kapott anyaggal elvégezhetjük a kívánt meghatározást. Ezt a módszert általában minden alkaloid esetében használhatjuk.

Az izolált alkaloidok mennyiségi meghatározására – a bevezetőben említett csapadékos és színreakciók mellett – újabban több eljárást közöltek (12, 13, 14, 15, 16, 17.) Ezeknek az eljárásoknak a lényege, hogy: néhány sav-bázis indikátorként használt színezék alkaloidokkal vízben nem, de szerves oldószerekben jól oldódó színes komplex vegyületet képez. A kapott színes komplex mennyisége arányos a jelenlevő alkaloid mennyiségével. Közvetlenül a komplex vagy a savval, lúggal felszabadított indikátor színintenzitása alkalmas a vizsgálandó alkaloid mennyiségi meghatározására.

E vizsgálati módszereknek érzékenysége 10–50 μg , ezért főként kis alkaloid mennyiségek meghatározására kiválóan alkalmazhatók. Mennyiségi meghatározásokra való felhasználásuk tapasztalatairól és a reprodukálhatóság feltételeiről későbbiekben fogunk beszámolni.

I R O D A L O M

- (1) Rác I. – Kedvessy Gy.: *Magy. Kém. Folyóirat*, 64, 97, 1958.
- (2) Jaczkiewitz, H.: *Ztschr. f. Physiol.* 292, 94, 1953.
- (3) Vidic, E.: *Arzneimittel Forschung*, 5, 291, 1955.
- (4) Curry, H. S.: *Meth. of biochem. anal.* Vol.: VIII, 39 p. Interscience Publ. N. Y. 1959.
- (5) Resplandy, A.: *Comptes Rendus*, 238, 2527, 1954.
- (6) Hausermann, H.: *Arch. Pharm.* 288, 53, 1955.
- (7) Gyarmati L. – Szendrei K.: *Morph. és Igazságügyi Orvosi Szemle*, 7, 271, 1961.
- (8) Hertler, H.: *J. of Chromatography*, 7, 389, 1958.
- (9) Vámos E.: *Kromatográfia*, 320. p. Műszaki Kiadó, Bpest, 1959.
- (10) Marini-Bettolo, S. B.: *J. of Chromatogr.* 7, 414, 1958.
- (11) Kovács J., Gyarmati L. – Dávid G.: *ÉVIKE* 7, 298, 1961.
- (12) Thomis, G. – Kotionis, A. Z.: *Ztschr. f. anal. Chem.* 154, 47, 1957; 156, 217, 1957; 159, 374, 1957.
- (13) Brodie, B. B. et soc.: *J. biol. chem.* 168, 299. p. és 311. p. 1947.
- (14) Obers, F. W.: *J. pharm. expt. ther.* 79, 10, 1943.
- (15) Daraway, Z. I. – Thompson, G. G.: *Analyst*, 87, 601, 1956.
- (16) Gyarmati L. – Tóth L.: *Kísérletes Orvostudomány*, 73, 350, 1961.
- (17) Axelrod, J.: Stollmann–Stewart: *Toxicology*, Vol. I. b-ől 18. fejezet (Acad. Press, N. Y. 1960)