

Příloha č. 1 k protokolu o zkouškách ML 2319/21

Stanovení alkaloidů rostliny *Mitragyna speciosa* metodou U-HPLC-HRMS/MS

Seznam vzorků (rekapitulace)

ML 2319/21 – Kratom All in

Strategie zkoušení

Pro analýzu vzorku kratomu ML 2319/21, konkrétně zjištění přítomnosti a obsahu alkaloidů mitragyninu (CAS 4098-40-2) a 7-hydroxymitragyninu (CAS 174418-82-7) vyskytujících se dle odborné literatury v rostlině *Mitragyna speciosa* [1–3], byla zvolena strategie cíleného screeningu daných látek s následnou kvantifikací pomocí komerčně dostupných standardů. Analýza byla realizována pomocí techniky ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (KM15, systém (E): U-HPLC-HRMS/MS).

Podmínky zkoušek

Analyty byly ze vzorku extrahovány směsí methanol-voda (3x opakovaná extrakce s následným spojením jednotlivých extraktů; výtěžnost ověřena pomocí 6-ti krokové opakované extrakce). Složky extraktu byly separovány pomocí chromatografické kolony s reverzní stacionární fází C18. Detekce jednotlivých látek byla provedena za použití HRMS typu kvadrupól/analyzátor doby letu (Agilent 6560 Ion Mobility QTOF LC/MS System, Agilent Technologies). Kvantifikace mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu byla provedena metodou externí kalibrace, vyhodnocením na kalibrační řadu odpovídajících standardů rozpuštěných v methanolu. Pro vyhodnocení a zpracování získaných dat byl použit software Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 a Agilent MassHunter Workstation software Quantitative Analysis for TOF 10.1. *Standardy mitragyninu (Mitragynine solution 100 µg/mL in methanol, certified reference material, Cerilliant®) a 7-hydroxymitragyninu (7-Hydroxymitragynine solution 100 µg/mL in methanol with 0.1N NH3, certified reference material, Cerilliant®) byly zakoupeny od společnosti SIGMA-ALDRICH spol. s r.o.*

Výsledky zkoušek

Zjištěný obsah alkaloidů mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu ve vzorku ML 2319/21, vyjádřený v různých jednotkách, je uveden v **Tab. I**.

Tabulka I: Obsah mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu ve vzorku ML 2319/21 vyjádřený v různých jednotkách

Analyt	Výsledek	Rozšířená nejistota*	Jednotky
Mitragynin	11772	1177	mg/kg
	12	1,2	mg/g
	1,2	0,12	hmotnostní %
7-Hydroxymitragynin	203	32	mg/kg
	0,20	0,032	mg/g
	0,020	0,0032	hmotnostní %

* Uvedená rozšířená nejistota byla vypočtena s použitím koeficientu rozšíření $k=2$, což odpovídá hladině spolehlivosti přibližně 95 %. Při výpočtu a uvádění nejistot se postupuje podle dokumentu EA-4/16 a příručky Kvalimetrie 11 (EURACHEM CZ). Uváděné nejistoty nezahrnují nejistotu vzorkování. Pro posouzení shody s limitními hodnotami byly vzaty do úvahy nejistoty výsledků zkoušek podle Směrnice ILAC-G8.

Interpretace výsledků zkoušek

Ve zkoumaném vzorku kratomu (ML 2319/21) byla potvrzena přítomnost alkaloidů *Mitragyna speciosa*, konkrétně mitragyninu a 7-hydroxymitragyninu, a byl stanoven jejich obsah. Vzájemné zastoupení těchto alkaloidů ve vzorku je přibližně 60 : 1 (mitragynin : 7-hydroxymitragynin).

Reference

- [1] B. Avula, S. Sagi, Y.-H. Wang, M. Wang, Z. Ali, T.J. Smillie, J. Zweigenbaum, I.A. Khan, Identification and Characterization of Indole and Oxindole Alkaloids from Leaves of *Mitragyna speciosa* Korth Using Liquid Chromatography–Accurate QToF Mass Spectrometry, *J. AOAC Int.* 98 (2015) 13–21. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-110>.
- [2] A. Sharma, S.H. Kamble, F. León, N.J.-Y. Chear, T.I. King, E.C. Berthold, S. Ramanathan, C.R. McCurdy, B.A. Avery, Simultaneous quantification of ten key Kratom alkaloids in *Mitragyna speciosa* leaf extracts and commercial products by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 11 (2019) 1162–1171. <https://doi.org/10.1002/dta.2604>.
- [3] R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, T. Maruyama, M. Kitajima, H. Takayama, Y. Goda, Simultaneous analysis of mitragynine, 7-hydroxymitragynine, and other alkaloids in the psychotropic plant “kratom” (*Mitragyna speciosa*) by LC-ESI-MS, *Forensic Toxicol.* 27 (2009) 67–74. <https://doi.org/10.1007/s11419-009-0070-5>.