

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Alkaloidy v semenech máku**

**Diplomová práce**

**Bc. Radka Jand'ourková**

**Výživa a potraviny**

**doc. Ing. Petr Kačer, Ph. D.**

**© 2021 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Alkaloidy v semenech máku" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 4. 2021

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu doc. Ing. Petrovi Kačerovi, Ph.D., Ing. Matyášovi Orsákovi, Ph.D. a také Ing. Vlastimilovi Mikšíkovi, Ph.D. za cenné rady, odbornou pomoc, ochotu a věnovaný čas.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu, která mi při vzniku této práce velmi pomohla.

# Alkaloidy v semenech máku

## Souhrn

Tato práce je věnována vývoji metodiky stanovení majoritních morfinanů – morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin – v semenech máku setého. V teoretické části byla pozornost věnována alkaloidům obsaženým v máku setém (*Papaver somniferum*) a jejich využití, případným vedlejším účinkům.

V praktické části pak byla pozornost věnována vývoji metodiky stanovení majoritních alkaloidů metodikou kombinující přípravu vzorků pro vlastní analýzu vysoko citlivou a selektivní metodou kombinující separační techniku vysoko účinnou kapalinovou chromatografií s detekční metodou pracující na bázi hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS). Metodika zahrnovala dvě metody přípravy vzorků, které spočívaly v extrakci semen primárně rozemletých a extrakci semen bez namletí („oplach“). Tyto metodiky byly porovnány, přičemž bylo nalezeno, že tento krok není statisticky významný, jelikož vlastní semena neobsahují morfinany, ale jsou jimi pouze povrchově znečištěna, jelikož alkaloidy jsou obsaženy pouze v makovině. Pro stanovení jednotlivých morfinanů byla vyvinuta vlastní HPLC-MS metoda, která byla validována. Takto vyvinutá metodika byla následně využita pro stanovení morfinanů v semenech máku setého 18 různých odrůd českých malopěstitelů. Bylo zjištěno, že jednotlivé odrůdy se výrazně liší co do zastoupení a obsahu jednotlivých morfinanů, nicméně veškeré odrůdy splnily vyhlášku č. 399/2013 Sb., kterou je stanoven nejvyšší přípustný limit obsahu morfinanů na 25 mg/kg pro potravinářský mák. Nejvyšší obsah alkaloidů byl stanoven v odrůdě Orel, na druhém místě co do obsahu morfinanů byla odrůda Major a třetí nejvyšší obsah měla odrůda Aplaus.

**Klíčová slova:** Kodein, LC-MS, makovina, morfin, opium, *Papaver somniferum*

# Alcaloids in Poppy seeds

## Summary

This work is devoted to the development of a methodology for the determination of major morphinan - morphine, codeine, thebaine, papaverine and noscapine - in the seeds of the sown poppy. In the theoretical part, attention was paid to the alkaloids contained in poppy seeds (*Papaver somniferum*) and their use, possible side effects.

In the practical part, attention was paid to the development of methodology for the determination of major alkaloids by a method combining sample preparation for the analysis by highly sensitive and selective method combining separation technique by high performance liquid chromatography with detection method based on mass spektrometry (HPLC-MS). The methodology included two methods of sample preparation, which consisted in extraction of s primarily ground seeds and in extraction of seeds without grinding („rinsing“). These methodologies were compared, and it was found that this step is not statistically significant, as the seeds themselves do not contain morphinates, but are only surface contaminated with them, as alkaloids are contained only in poppy seeds. For the determination of individual morphinanes, a proprietary HPLC-MS method was developed and validated. The methodology developed in this way was subsequently used for the determination of morphinan in poppy seeds of 18 different varieties of Czech small growers. It was found that individual varieties differ significantly in terms of representation and content of individual morphinan, however, all varieties complied with Decree No. 399/2013 Coll., which sets the maximum allowable limit of morphinan content at 25 mg / kg for food poppy. The highest content of alkaloids was determined in the variety Orel, in second place in terms of morphinan content was the variety Major and the third highest content was in the variety Aplaus.

**Keywords:** Codeine, LC-MS, poppy, morphine, opium, *Papaver somniferum*

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Mák</b> .....	<b>10</b>
3.1.1 Rod <i>Papaver</i> .....	10
3.1.2 Mák setý.....	10
3.1.3 Pěstování máku v České republice .....	11
3.1.4 Kvalitativní požadavky potravinářského máku .....	11
<b>3.2 Opiáty</b> .....	<b>12</b>
3.2.1 Historie opiátů .....	12
3.2.2 Heroin .....	14
3.2.2.1 Nepříznivé účinky heroinu .....	14
<b>3.3 Alkaloidy</b> .....	<b>15</b>
3.3.1 Opiové alkaloidy.....	16
3.3.1.1 Morfin.....	17
3.3.1.2 Kodein .....	17
3.3.1.3 Papaverin .....	18
3.3.1.4 Thebain .....	19
3.3.1.5 Noskapin.....	19
<b>3.4 Působení opiových alkaloidů v lidském těle</b> .....	<b>20</b>
3.4.1 Antagonisté opioidů.....	20
3.4.2 Působení morfinu.....	20
3.4.2.1 Vedlejší účinky morfinu .....	21
3.4.3 Působení kodeinu.....	22
3.4.3.1 Vedlejší účinky kodeinu .....	22
3.4.4 Působení thebainu.....	23
3.4.4.1 Toxicita thebainu .....	23
3.4.5 Působení papaverinu.....	23
3.4.5.1 Použití.....	24
3.4.6 Působení noskapinu .....	24
3.4.6.1 Použití.....	24
<b>4 Metodika</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1 Chemikálie</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2 Použité aparáty k přípravě vzorků</b> .....	<b>25</b>
<b>4.3 Příprava vzorků</b> .....	<b>25</b>

<b>4.4</b>	<b>Stanovení alkaloidů HPLC-MS analýzou .....</b>	<b>26</b>
<b>4.5</b>	<b>Vzorky .....</b>	<b>31</b>
4.5.1	Odrůda Major.....	31
4.5.2	Odrůda Diospegi Elit .....	31
4.5.3	Odrůda MS Harlekýn.....	31
4.5.4	Odrůda Orel .....	31
4.5.5	Odrůda Malsar .....	32
4.5.6	Odrůda Lazur .....	32
4.5.7	Odrůda Albín .....	32
4.5.8	Odrůda Opal.....	32
4.5.9	Odrůda Gerlach.....	32
4.5.10	Odrůda Onyx.....	33
4.5.11	Odrůda Opex.....	33
4.5.12	Odrůda Borowski bílý.....	33
4.5.13	Odrůda Bergam.....	33
4.5.14	Odrůda Zeno .....	33
4.5.15	Odrůda Agat.....	33
4.5.16	Odrůda Redy .....	33
4.5.17	Odrůda Maraton.....	33
4.5.18	Odrůda Aplaus .....	34
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>Porovnání přípravy semen k analytickému zpracování.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2</b>	<b>Porovnání obsahu alkaloidů v semenech máku .....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>49</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>52</b>

# 1 Úvod

Mák setý (*Papaver somniferum*) patří mezi nejstarší léčivé rostliny. Tato rostlina je pěstována pro potravinářský, ale také pro farmaceutický průmysl. Semena máku se získávají z máku setého a používají se nejen v potravinářství, ale pokud z nich vyrobíme olej, dá se mimo potravinářství využívat např. v kosmetice. Mák setý můžeme rozdělit dle požitelnosti na 4 druhy: potravinářský, průmyslový, opiový a okrasný mák.

Farmaceutický průmysl využívá makovinu. Mák setý obsahuje přibližně 30 různých alkaloidů. Mezi hlavní alkaloidy patří morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin. Semena máku neobsahují opiové alkaloidy, ale mohou jimi být kontaminována v důsledku poškození škůdci a během sklizně. Morfin a kodein jsou účinná analgetika, papaverin má vazodilatační funkci a noskapin je dobrý k potlačení kašle (= antitusikum). Jejich užívání může vést k vedlejším účinkům, jako je například nevolnost nebo bolest hlavy a dochází k vyvolání závislosti fyzické i psychické.

Práce se zabývá stanovením obsahu alkaloidů (morfinanů) v různých odrůdách máku setého od malovýrobců z České republiky. Také obsahuje ověření, zda odrůdy splňují limit maximálního povoleného obsahu morfinanů. Česká republika je jedním z hlavních producentů potravinářského máku. Proto je práce věnována vývoji metodiky na přípravu vzorků a jejich stanovení a následně využití tohoto nástroje pro porovnání obsahu ve zkoumaných odrůdách jednotlivých morfinanů – morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin. Takto připravená metodika bude poté využitelná pro kvalitativní a kvantitativní kontrolu máku setého.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

H1: Mák obsahuje morfin, kodein, papaverin, thebain a noskapin.

C1: Stanovit obsahy alkaloidů v semenech máku různých typů (potravinářský, případně průmyslový).

H2: Odrůda (typ) máku má vliv na obsah alkaloidů.

C2: Zjistit, zda odrůda (typ) máku má vliv na obsah alkaloidů.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Mák

#### 3.1.1 Rod *Papaver*

Rod *Papaver* pojímá 50 až 120 druhů, které můžeme roztrždit do jedenácti sekcí: *Argemoneorhoades*, *Californicum*, *Carinatae*, *Horrida*, *Macrantha*, *Meconella*, *Mecodium*, *Papaver*, *Pilosa*, *Pseudopilosa* a *Rhoeadium* (Kadereit 1988).

Významným znakem tohoto rodu je produkce latexu, který obsahuje alkaloidy specifické pro danou sekci. Alkaloidy rodu *Papaver* patří mezi isochinolinové alkaloidy a od nich odvozené varianty (Novák & Preininger 1981).

#### 3.1.2 Mák setý

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je jednoletá robustní rostlina, která patří do čeledi makovitých (*Papaveraceae*) (Hejný & Slavík 1997). Patří mezi nejstarší léčivé rostliny (Roayaei et al. 2020). Maková rostlina produkuje jednu plodinu, to znamená 5–8 tobolek, po dobu 3 až 5 měsíců ve slunných, vlhkých oblastech bez mrazu (Barceloux 2012). Tato rostlina pochází ze Sumeru, oblast ve starověké Mezopotámii (současný Irák a Kuvajt) (Carlin et al. 2020).

Často se pěstuje pro potravinářské užití, ale také se využívá pro svá olejnatá semena k lisování oleje. Olej ze semen je základem pro výrobu laků a barev (Hejný & Slavík 1997). Semena máku se používají převážně ve střední Evropě v potravinách, jako jsou pekařské výrobky, polevy do pokrmů, do náplní koláčů a dezertů (López et al. 2018). Latex se z máku získává nejdříve za deset dní po odkvětu. Když se latex vysuší, mluvíme o opiu. Pokud se však mák nechá plně vyžrát, rostlina tvoří semena, která pak lze ručně či mechanicky sklízet. Ukázalo se, že metody sklizně výrazně ovlivňují hladinu alkaloidů v konečném produktu – opiu. Pokud je opium sklizeno příliš brzy, tak je opium vodnaté, pokud je sklizeno příliš pozdě, tak obsahuje výrazně nižší hladiny alkaloidů (Carlin et al. 2020). Surové opium obsahuje více než 30 různých alkaloidů, z nichž je nejhojnější morfium, kodein, noskapiin, papaverin a thebaine (Reid et al. 2007). Alkaloidy, získané extrakcí z tobolek máku (tzv. makoviny), se užívají ve farmaceutickém průmyslu. Pro tyto účely se extrahuje morfin, paramorfin, oripavin a kodein (Quesada-Moraga et al. 2009). Opioidy mají celosvětově nejvyšší míru konzumace nelegálních drog po konopí. Je pozoruhodné, že opium je po tabáku stále nejčastěji zneužívanou látkou na Středním východě. Jedním z důvodů vysokého užívání opia v tomto regionu může být snadný přístup a také umístění, které je v hlavní cestě přepravy opia hlavních zemí produkujících opium, jako je Afghánistán (Roayaei et al. 2020).

Makovina, která obsahuje opiové alkaloidy, je vedlejším produktem výroby makového semene. Předpokládá se, že alkaloidy vznikly v důsledku obranných mechanismů rostlin proti býložravcům či parazitům nebo mohou být odpadními látkami. Jednotlivé alkaloidy se vytváří postupně během vývinu rostliny. Jako první se vytvoří kodein, thebain a noskapiin, později morfin a papaverin. Makovina je definována jako zralá nadzemní část rostliny máku, přesněji tobolka bez semen a přibližně 10 cm dlouhý stonek pod tobolkou. Pěstitelé makovinu chápou

jako směs podrcených vyzrálých tobolek a částí stonků pod tobolkou, dlouhých asi 15 cm. Nároků na kvalitu pro výkup makoviny je hned několik. Makovina musí být zdravá, suchá, bez plísní a škůdců, hnědožluté barvy se světlejším nebo tmavším odstínem, sklizená v období biologické zralosti (Laryšová et al. 2015).

Největším producentem máku na světě je Turecko (90000 ha), poté Česká republika (70000 ha) a Ukrajina (14930 ha) (Quesada-Moraga et al. 2009).

Mák můžeme rozdělit dle požitelnosti na 4 druhy: potravinářský, průmyslový, opiový a okrasný mák. Máky potravinářské (odrůdy olejnatého, semenného typu máku) neprodukují ve větší míře latex a mají nízkou koncentraci alkaloidů. U máků průmyslových (šedo-černo a modrosemenných) je produktem pěstování pro farmaceutický průmysl makovina, která se užívá pro extrakci alkaloidů (hlavně morfinu). Semeno průmyslového máku nemůžeme využít pro potravinářské účely, protože má vyšší obsah alkaloidů a nepříjemnou chuť a vůni. Máky opiové se pěstují v Asii (Afghánistán). Díky tomu, že mléčnice tvoří latex s vysokým obsahem alkaloidů, se jedná o nelegální produkci opia (“Typy máku – Český modrý mák” 2020).

Po sedmi letech výzkumu vědci oznámili, že objevili první mák bez opia na světě. Vědci z Ústředního ústavu léčivých a aromatických rostlin (CIMAP) dokázali vyvinout odrůdu máku bez opia a bez alkaloidů, a tím je odrůda Sujata. Byla vyvinuta pomocí mutagenizace. Výsledkem odrůdy může být nenarkotická verze semenných plodin s vysokým obsahem mastných kyselin (Stokes 2001).

### **3.1.3 Pěstování máku v České republice**

Podle dat z Českého statistického úřadu se sklizená plocha máku od roku 2012 zvětšila přibližně o dvojnásobek (r. 2012: 18363 ha; r. 2020: 40255 ha). Hektarový výnos semen z roku 2012 činil 0,7 t/ha a v letošním roce to bylo 0,73 t/ha. Dvacetiletý průměr výnosu z hektaru je 0,69 t/ha, takže letošní výnosy jsou srovnatelné (“Český statistický úřad” 2020).

Česká republika společně s Tureckem v současnosti náleží k nejvýznamnějším evropským pěstitelům máku setého a v oblasti konzumního máku patří k největším světovým producentům (Laryšová et al. 2015).

### **3.1.4 Kvalitativní požadavky potravinářského máku**

Dle vyhlášky č. 399/2013 Sb. je dodržování senzorických vlastností zboží považováno za samozřejmost. V dnešní době je pozornost věnována především zdravotní nezávadnosti potravin.

Alkaloidy v rostlinách máku, které jsou často označovány jako alkaloidy opia, jsou obsaženy především v perikarpu makových tobolek. Morfin je jedním z těchto alkaloidů, mezi další patří například kodein, thebain, papaverin, oripavin, noscapin a další. Tyto alkaloidy společně tvoří látku, kterou nazýváme opium. Od 1. 1. 2014 je stanoven maximální povolený limit obsahu morfinových alkaloidů na 25 mg/kg na povrchu makového semene podle vyhlášky č. 399/2013 Sb. Zda je tento limit dodržován, dnes kontroluje Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). SZPI prováděla kontroly máku dodávaného do maloobchodní sítě i před plat-

ností vyhlášky. Ode dne platnosti vyhlášky SZPI provádí kontrolu i dovozů máku, protože dovozci mají povinnosti hlásit SZPI importy vybraných komodit (Ministerstvo zemědělství 2013; Havel et al. 2018).

Český mák ve srovnání s máky z jiných zemí obsahuje podstatně méně morfinu. Obsah morfinu v tuzemském máku bývá obvykle v rozmezí 1 – 22 mg/kg makového semene. Z toho důvodu se český mák považuje za bezpečnou potravinu. Tato nízká hodnota opiového alkaloidu morfinu v českém máku společně s charakteristickými smyslovými vlastnostmi semen odrůd, které jsou povolené a pěstované v České republice, je základní výhodou proti konkurenci, která produkuje máky s vyšším obsahem morfinu a zároveň nižší kvalitou. V dnešní době pravděpodobně dochází k falšování. Mák dovezený ze třetích zemí se míchá s českým mákem a tyto dávky jdou do zahraničí i na tuzemský trh, a poškozují tak zájmy českých pěstitelů. Takový mák může být označen státními orgány příslušné země jako zdravotně závadný, proto musí být následně zlikvidován, a vytváří tak nepříznivý dojem o kvalitě českého máku u spotřebitele (Havel et al. 2018).

## 3.2 Opiáty

Opium je produkt z máku setého. Spotřeba opia a jeho léčivá aplikace sahá až do neolitu a starověku. Užívání opia zůstává důležité ze zdravotních a kulturních důvodů v Thajsku, Vietnamu a Laosu. Je také součástí místních ekonomik domorodého obyvatelstva v Kolumbii, Guatemale a Mexiku (Martínez & Ballesteros 2019).

Od počátku 20. století podléhá opium a jeho deriváty mezinárodní kontrole drog. Oblastmi nedovolené výroby jsou Írán, Indie, tzv. „Zlatý půlměsíc“ (Afghánistán a Pákistán), dále „Zlatý trojúhelník“ (Myanmar, Laos a Thajsko), Kolumbie, Mexiko a Guatemala. Afghánistán je předním světovým producentem nezákonného opia a hlavním dodavatelem pro Evropu, ačkoliv největší množství opia zachyceného na světě pochází z Íránu (Martínez & Ballesteros 2019).

První a nejdůležitější nebezpečí užívání opioidů je útlum centrálního nervového systému, jehož příznaky zahrnují problémy s dýcháním, srdeční selhání, mrtvice a dokonce i smrt. Užívání jiných látek tlumících CNS (např. alkohol, benzodiazepiny) spolu s opioidy dramaticky zvyšuje pravděpodobnost vzniku útlumu CNS (Green & Doe-Simkins 2016).

### 3.2.1 Historie opiátů

Jednou z prvních knih, která se konkrétně a velmi podrobně zabývala akutními a chronickými účinky opia, je „The Mysteries of Opium Revealed“ od doktora Johna Jonese. V roce 2020 uplynulo od vzniku této knihy 320 let. V době, kdy Jones psal zmíněnou knihu, se opium často míchalo s vínem a řadou dalších ingrediencí, aby se zakryla jeho hořká chuť. Jeho hlavní hypotéza mechanismu působení opia spočívala v tom, že navozoval příjemný pocit, který vedl k uvolnění všech citlivých částí těla (Miller & Tran 2000).

Malá Asie byla kolébkou užívání opia. V Sumersku (5000 př. n. l.) se objevují první zmínky o pěstování máku, o „pěstování štěstí“ a těžbě opia. V papyru z Eberu (Tebas 1550 př. n. l.) se píše o použití opia a dalších látek pro úlevu od bolesti a uklidnění dětského pláče.

Používali ho také ke zmírnění bolesti střev, které měli od červů. Egypťané opium pěstovali a obchodovali s ním po celém Středním východě a až do Evropy (Aragón-Poce et al. 2002; Dasgupta 2020).

V Řecku byly známé příjemné a léčivé síly opia. V mytologii existují odkazy, jak opium používá Demeter ke zmírnění bolesti své dcery Persefony. Kolem roku 850 př.n.l. už Homer považoval opium za omamnou látku, která má za účinky úlevu od bolesti a vlastnosti, které vyvolávají spánek. První, kdo se zmínil o užívání opia, byl Theophrastos (300 př. n. l.). V té době se používalo opium jako antikonvulzivum, na očistu a jako narkotikum. V prvním století př. n. l. Dioscórides zkoumal mnoho rostlin, které obsahovaly výtažky a měly lékařské vlastnosti. Napsal pojednání s názvem „Of Medical Matter“, které popisuje použití mandragory smíchané s vínem k léčbě bolesti při amputacích končetin (Aragón-Poce et al. 2002; Dasgupta 2020).

Římská civilizace pohltila znalosti měst, která si podmanila, a tímto způsobem znalost řecké kultury pokračovala v Římě. Tam mimo jiné i nadále užívali alkohol a opium. Opium se také objevuje v textech básníků Ovidia a Vergílie. Na konci druhého století př. n. l. popularizoval opium Galenos, a to především pro jeho lékařské použití. Bylo tak nakonec distribuováno v cestovních obchodech. Aulus C. Celsus navrhl jeho použití k přípravě pacienta před chirurgickým zákrokem a k odstranění bolesti. Plinius stanovil rozdíly mezi účinky, které opium vyvolalo, na základě různých přípravků získaných z opia.

Po úpadku římské civilizace a po dlouhé době omezeného lékařského pokroku se arabská kultura stala dalším velkým kulturním centrem, které využívalo opium. Arabové shromáždili existující znalosti a pozoruhodně je rozvinuli, takže nakonec popsali více než 2000 různých drog. Souhrn těchto látek tvoří řády, přičemž Avicena je jednou z nejznámějších osobností, které se na tvorbě řádu účastnily. Doporučil použití opia k léčbě průjmů a očních dysfunkcí. Arabové užívali opium velmi rozsáhle a často k již zmíněné léčbě průjmů. Prostřednictvím obchodních cest ho rozšířili nejdříve do Persie a odtud do orientálních kultur, jako je Indie a Čína.

V západní kultuře v devátém století používali uspávací houbu, jejímž základem je opium, jako analgetikum při určitých chirurgických zákrocích. Během renesance Paracelsus obnovil používání opia v chirurgii a odkazoval na něj jako na kámen nesmrtelnosti. Od této doby (renesance) se setkávali s laudanem nebo s barvivem opia, což byly směsi různých látek, mezi které patřilo opium a alkohol (whisky, rum), které dostávali pacienti jako přípravu na operaci. Laudanum bylo vytvořeno v 17. století anglickým lékařem Thomasem Sydenhamem. Laudanum se široce používalo v Evropě a Severní Americe do počátku 20. století. Jedním z nejznámějších je Sydenhamovo laudanum, které obsahuje šafrán, skořici a další látky. Zjistili, že cokoliv je více efektivní ke zmírnění bolesti než opium. Sydenhamské laudanum bylo používáno v Evropě a Severní Americe až do začátku dvacátého století. T. Dover vyvinul další směs pro úlevu od bolesti, nazvanou Doverův prášek, který kromě opia obsahoval alkohol a ipecahuanu (hlavěnku dávivou). Anglický chirurg J. Moore byl první, kdo navrhl, praktikoval použití opia jako léčby bolesti, jakmile byl chirurgický zákrok ukončen, takže jako pooperační léčbu (Aragón-Poce et al. 2002; Dasgupta 2020).

Během průmyslové revoluce bylo opium využíváno dělnickou třídou. V německy mluvících zemích se extrakty z máku přidávaly do polévek a dudlíků. V anglicky mluvících zemích

léky s opiem byly uváděny na trh pod názvy, jako jsou anodyna, ochranné léky a prodávány byly pomocí podomního prodeje nebo v obchodech se smíšeným zbožím (Dasgupta 2020).

Ve Spojených státech v 19. století bylo dost lidí závislých na opiu. Bylo to hlavně v období občanské války, kdy byl nejmocnějším lékem proti bolesti známý morfin. Ten šel pomocí injekční stříkačky snadno dostat do těla. Nebo kavkavské ženy legálně koupily sirup, který obsahoval morfin, nebo získaly laudanum. Tato léčba zraněných vojáků během občanské války produkovala mnoho závislých (Dasgupta 2020).

### 3.2.2 Heroin

Heroin byl syntetizován jako první navržený lék britským lékárníkem Alderem Wrightem z morfinu v roce 1874.

Po chemické stránce je heroin diacetylmorfin, což je acetylovaná forma morfinu. Motivací pro syntézu heroinu bylo objevit novou sloučeninu se stejnými analgetickými vlastnostmi jako morfin, ale bez jakéhokoliv zneužívacího potenciálu. Alder Wright produkt pojmenoval „heroin“ díky jeho hrdinským vlastnostem jako analgetikum.

Heroin byl poprvé uveden na trh jako antitusikum pro pacienty s astmatem a tuberkulózou v roce 1898. Nicméně po téměř 12 letech jeho lékařského používání dospěli k závěru, že jeho další užívání je nebezpečné z hlediska možného zneužití a návyku, protože heroin je asi dvakrát silnější než morfin, a později zjistili, že je i vysoce návykový. Heroin je v současné době klasifikován jako droga podle Plánu I. bez lékařského použití, ale s velmi vysokým potenciálem zneužívání.

Ačkoliv byl heroin zneužíván více než 100 let, v letech 2002 až 2013 se úmrtnost na předávkování heroinem zvýšila ve Spojených státech amerických téměř čtyřnásobně (Dasgupta 2020).

#### 3.2.2.1 Nepříznivé účinky heroinu

Heroin může změnit normální strukturu mozku a jeho funkce. Chronické zneužívání heroinu má za následek dlouhotrvající poškození kognitivních funkcí a alterací v normálních funkcích centrálního nervového systému. Studium prokázalo, že chronické použití heroinu má nepříznivé účinky na prefrontální kůru, temporální lalok, thalamus, bazální ganglia koncového mozku a na senzomotorické struktury mozku. Přílišné užívání heroinu je spojeno s poklesem hustoty šedé hmoty v prefrontální a temporální kortikální oblasti mozku. Šedá hmota je spojená s ovládním svalů, smyslovým vnímáním, emocemi, pamětí, řečí a rozhodováním. Proto snížení šedé hmoty zhoršuje tyto mozkové funkce.

Dalšími nepříjemnostmi při užívání heroinu jsou bakteriální infekce, například endokarditida a osteomyelitida. Infekční endokarditida je životu ohrožující stav, který má vysokou míru úmrtnosti. Toto se může stát při intravenózním užívání drogy.

Botulismus je vzácná, léčitelná, ale potenciálně smrtelná porucha, která je způsobena toxiny produkovanými některými bakteriemi. Výskyt botulismu je spojen s intramuskulárním a subkutánním podáním injekce s drogami, zejména heroinu (Dasgupta 2020).

### 3.3 Alkaloidy

Termín alkaloid byl poprvé zmíněn v roce 1819 německým lékárníkem Carlem Friedrichem Wilhemem Meißnerem. Poznamenal totiž, že tyto sloučeniny vypadaly jako alkalické, a tak je pojmenoval alkaloidy (Aniszewski 2007). Výtažky a směsi z rostlin se používají už od pradávna jak pro léčebné účely, tak i pro rekreační použití. Je známo, že v Mezopotámii využívali léčivé rostliny již kolem roku 2000 let před naším letopočtem (Koskinen 2012).

Z biologického hlediska je alkaloid jakákoli biologicky aktivní a heterocyklická chemická sloučenina, která obsahuje dusík a může mít určitou farmakologickou aktivitu a v mnoha případech i léčebné nebo ekologické použití (Aniszewski 2007). Podílejí se na biologických procesech rostlin, zvířat a mikroorganismů (Xu et al. 2011). Alkaloidy v rostlinách vznikají metabolickou cestou (Kries & O'Connor 2016). Základní charakteristikou chemické struktury těchto sloučenin je heterocyklický dusík – je spojen s alespoň dvěma atomy uhlíku a v molekule se vyskytuje alespoň jeden kruh, který ale nemusí být nutně heterocyklický (Xu et al. 2011). Mezi další vlastnosti alkaloidů patří např. větší či menší míra toxicity, která působí primárně na centrální nervový systém (CNS), syntéza z aminokyselin nebo z jejich bezprostředních derivátů a omezená distribuce v přírodě (Aniszewski 2007).

Pro lékaře jsou alkaloidy jakákoliv skupina dusíkatých látek rostlinného původu, které mají často složitou strukturu a vysokou molekulovou hmotnost. Jsou to heterocykly, které mohou mít primární, sekundární nebo terciární báze nebo mohou obsahovat kvartérní amoniové skupiny. Pro lékaře je také důležité, že alkaloidy jsou jen mírně rozpustné ve vodě, ale úplně rozpustné v ethanolu, benzenu, etheru a chloroformu. Medicína upozorňuje na fakt, že alkaloidy mají intenzivní fyziologický účinek. V lékařských oborech se používají jako léčivé látky (Aniszewski 2007). Některé alkaloidy mohou být silně toxické a to už i ve velmi malých dávkách (Xu et al. 2011). Bez alkaloidů by nebylo možné dosáhnout úžasných úspěchů v boji proti malárii, leukémii, rakovině a Parkinsonově nemoci. Ve farmaceutickém průmyslu používají přírodní rostlinné alkaloidy na vývoj antimalarických činidel (chinin a chlorchinin), protinádorových činidel (taxol, vinblastin a vinkristin) a činidel podporujících krevní oběh v mozku (vincamine) (Aniszewski 2007).

V současné době existuje více než 10000 přírodních sloučenin a jejich derivátů, které jsou uznávány jako alkaloidy. Vědci z celého světa objevují každý rok nejméně 100 nových molekul. Často se vyskytují jako kyselé soli, některé se vyskytují také v kombinaci s cukry a jiné se objevují jako amidy nebo estery (Koskinen 2012).

Alkaloidy lze klasifikovat podle biologické a ekologické aktivity, chemické struktury a biosyntetické cesty. Z hlediska biologické aktivity je možné rozdělit alkaloidy na neutrální nebo slabě bazické molekuly (např. laktamy, jako je ricinin, určité N-oxidy, jako je indicin), alkaloidy získané ze zvířat (např. anuranové, savčí a alkaloidy z členovců), mořské alkaloidy, mechové alkaloidy, plísňové a bakteriální alkaloidy a nepřírodní alkaloidy (strukturálně modifikované nebo analogické). Ze strukturálního hlediska se alkaloidy dělí podle svého tvaru a původu (Aniszewski 2007).

Pravé alkaloidy pocházejí z aminokyselin a sdílí heterocyklický kruh s dusíkem. Tyto látky jsou velmi reaktivní s biologickou aktivitou i v nízkých dávkách. Všechny tyto alkaloidy mají

hořkou chuť, vypadají jako bílá pevná látka s výjimkou nikotinu, který je hnědá tekutina. Ve vodě tvoří rozpustné soli. Většina z nich jsou krystalické látky, které se spojují s kyselinami za vzniku solí. Tyto látky se mohou vyskytovat v rostlinách ve volném stavu ve formě soli nebo jako aminoroxidy.

Primárními prekurzory pravých alkaloidů jsou aminokyseliny, jako např. L-ornitin, L-lysin, L-fenylalanin, L-tyrosin, L-tryptofan a L-histidin. Mezi pravé alkaloidy patří např. kokain, chinin, dopamin, morfin a usambaresin (Aniszewski 2007).

Protoalkaloidy jsou sloučeniny, ve kterých je atom dusíku odvozený od aminokyseliny a není součástí heterocyklu. Tyto sloučeniny jsou odvozené od L-tyrosinu a od L-tryptofanu. Mají uzavřený kruh, a tak jsou to dokonalé látky s jednoduchou strukturou.

Tato skupina tvoří menšinu všech alkaloidů, patří sem např. hordein, meskalin, johimbin a stachydrin (Aniszewski 2007).

Pseudoalkaloidy jsou sloučeniny s uhlíkovou kostrou, která není odvozena od aminokyselin. Tyto látky jsou deriváty prekurzorů nebo postkurzorů (derivátů procesů degradace) aminokyselin. Mohou vzniknout jako výsledek aminačních nebo transaminačních reakcí s prekurzory nebo postkurzory aminokyselin nebo z prekurzorů neaminokyselin.

Tyto alkaloidy mohou být acetátové, fenylalaninové nebo terpenoidní, stejně jako steroidové. Mezi pseudoalkaloidy patří např. coniin, kapsaicin, efedrin, solanidin, kofein, teobromin a pinidin (Aniszewski 2007).

### 3.3.1 Opiové alkaloidy

Německý lékárník Sertürner v roce 1806 vylíčil izolaci čistého krystalického morfinu jako první odborně popsanou organickou látku získanou z rostliny. V roce 1832 Robiquet pokračoval, vzhledem k předchozímu objevu, a izoloval kodein. V roce 1835 Pelletier izoloval thebain. Následující léta skoro všechny izolace morfinu a kodeinu probíhaly Gregoryho postupem, který byl popsán poprvé v roce 1833. Vysvětlení struktury morfinových alkaloidů dále postupovalo pomalu popsáním správného vzorce morfinu Laureátem (1847) a vysvětlením jednoduchých transformací Wrightem v roce 1847, jako je acethylace morfinu na heroin, a Grimmauxem v roce 1881 methylace morfinu na kodein (Phillipson et al. 1985). V roce 1923 Gulland a Robinson zveřejnili strukturní vzorec morfinu, ovšem neměli nástroje k jeho potvrzení. To bylo provedeno až v roce 1955 MacKayem a Hodgkingem za použití rentgenové strukturní analýzy (Guguta et al. 2008).

Důležitost máku jako léčivé rostliny je odvozena od jeho pěti hlavních alkaloidů – morfinu, kodeinu, thebainu, noskapinu a papaverinu. Tyto alkaloidy jsou ve velké míře vyráběny a konzumovány farmaceutickým průmyslem. Jsou používány přímo i nepřímo pomocí polosyntézy jako cenné léky díky svým silným farmakologickým aktivitám. Mezi tyto aktivity patří například analgetické vlastnosti kodeinu a morfinu, koronární vazodilatační funkce papaverinu a vlastnosti noskapinu, který potlačuje kašel (Bagheri et al. 2017).

Morfin, kodein a thebain jsou nejtoxičtějšími opiovými alkaloidy (López et al. 2018). Evropský úřad pro bezpečnost potravin provedl v roce 2011 posouzení rizik opiových alkaloidů z máku určených k lidské spotřebě a stanovil akutní referenční dávku 10 µg morfinu/kg živé

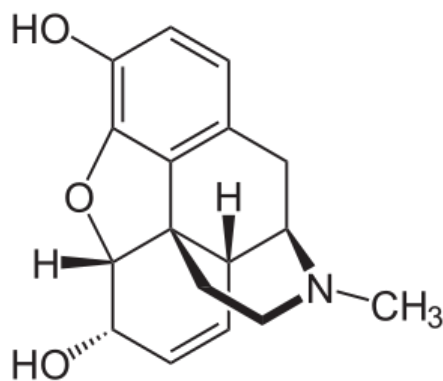


hmotnosti (EFSA 2011). Namáčení, tepelné zpracování a mletí semen byly neúčinnější metody ke snížení koncentrací opiových alkaloidů (López et al. 2018).

### 3.3.1.1 Morfin

Nejdůležitějším alkaloidem máku setého je morfin. Jeho hlavním zdrojem spolu s kodeinem je právě mák setý (Guguta et al. 2008).

Morfin má jádro podle L-tyrosinu, a proto je to biologicky velmi silná přírodní sloučenina (Aniszewski 2007). Chemická struktura morfinu je struktura fenanthrenového alkaloidu (viz. Obrázek 1), který se skládá z pěti kondenzovaných kruhů a dvou hydroxylových skupin (fenolové a alkoholové) na C3 a C6. Morfin je slabá báze, která má sílu kyseliny ( $pK_a$ ) 7,9. Díky dvěma -OH skupinám na C3 a C6 je to látka relativně rozpustná ve vodě a špatně rozpustná v tucích. Morfin je k dispozici pro terapeutické použití jako hydrochloridové, síranové a vinanové soli v široké škále použití (Davis et al. 2009).



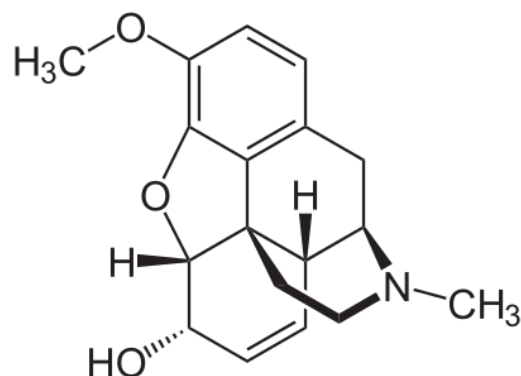
**Obrázek 1** Strukturální vzorec morfinu

Morfin je nejvíc znám pro své silné analgetické vlastnosti. Už pouhých 10 mg morfinu, který je podán orálně, sníží práh bolesti o 50 %, 30 mg dokáže bolest snížit až o 90 %. Vyšší dávky účinkují jako narkotikum a sedativum. Analgetické účinky kodeinu dosahují jedné desítiny účinků morfia (Bentley 1954).

### 3.3.1.2 Kodein

Kodein byl objeven v roce 1832 Robiquetem (Kavina 1940). V rostlině ho najdeme třicet dní po vyklíčení semene. V pořadí je to druhý vytvořený alkaloid (Bentley 1954).

Kodein, stejně jako morfin, obsahuje v molekule tři atomy kyslíku. Jeden kyslík je ve formě hydroxylové skupiny a druhý ve formě methoxy skupiny (Doležal 2013).



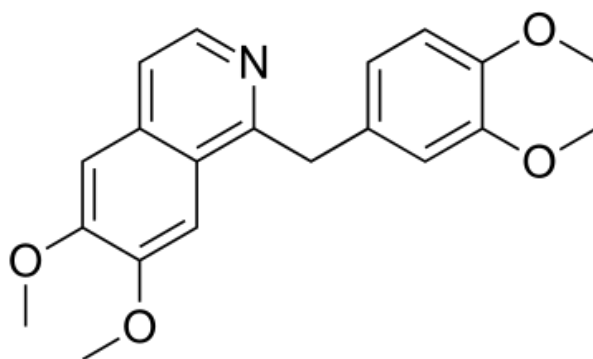
Obrázek 2 Strukturální vzorec kodeinu

Je omezeně rozpustný ve studené vodě, ale lépe rozpustný v horké vodě. Dobře rozpustný je také v alkoholu, etheru a chloroformu. Jeho roztoky jsou příliš hořké a reagují zásaditě (Kavina 1940).

Účinky kodeinu jsou velmi podobné těm morfinu, ovšem kodein je méně jedovatý. Pomáhá k větší sekreci průdušek a zklidňuje dráždivost kašle. Proto se v lékařství používá jako hypnotikum a sedativum při kašli, zánětech průdušek a podobných onemocněních (Kavina 1940). Je to relativně slabé analgetikum, které se nejčastěji používá při mírné až středně silné bolesti, a to samostatně nebo v kombinaci s léky neopioidové povahy, jako je aspirin a paracetamol (Davis et al. 2009). Dříve byl kodein obsažen v sirupu proti kašli, ale poté byl nahrazen dexromethorfanem (Howard & Howard 2014).

### 3.3.1.3 Papaverin

V máku setém je papaverin obsažen především před dobou zrání. Proto se těží z opia, pokud ho chceme získat z přírodního materiálu (Staněk 1957).



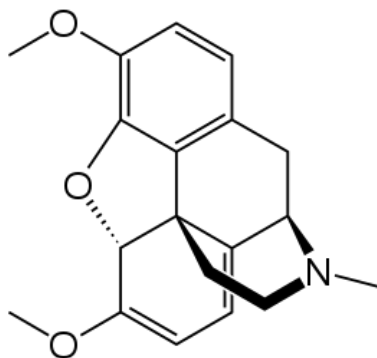
Obrázek 3 Strukturální vzorec papaverinu

Papaverin patří mezi nejjednodušší benzylisochinolinové alkaloidy. V roce 1910 byl poprvé biosyntetizován Pictetem a Gamsem. Jeho příprava je velmi jednoduchá, a proto se pro farmaceutické účely nezískává z přírodního materiálu (Bhat et al. 2005).

Účinek papaverinu spočívá v uvolnění hladkého svalstva, a tím ke zmírnění lidského utrpení (Cao et al. 2007). Okamžitě vyvolává uvolnění mozkových tepen, využívá se toho při operacích ke zvrácení vzniku vazospazmu (Pennings et al. 2009).

#### 3.3.1.4 Thebain

Thebain, nebo také můžeme říct paramorfin, je farmakologicky aktivní alkaloid, který je přítomný v máku setém. S dalšími alkaloidy je důležitou aktivní složkou opia neboli sušeného latexu nezralých makových tobolek. Stejně jako morfin a kodein patří do skupiny fenantrenových alkaloidů. Thebain vykazuje srovnatelné strukturní vlastnosti jako morfin a kodein. Ovšem při pohledu na trojrozměrnou molekulární strukturu je thebain díky další dvojné vazbě na uhlíkovém kruhu morfinanu rovnější než morfin a kodein (Eisenreich et al. 2020).

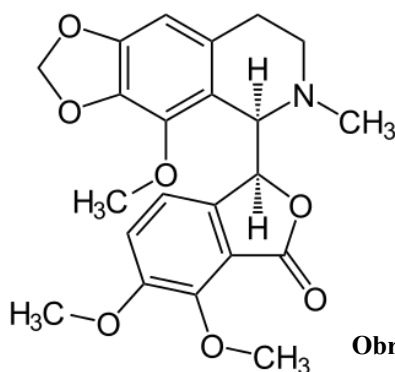


Obrázek 4 Strukturní vzorec thebainu

Thebain je klíčovou složkou biosyntézy narkotinových analgetik, jako je morfin a kodein. Také může být použit jako povinný prekurzor při chemické syntéze při výrobě terapeutických opiátů, jako je oxykodon, oxymorfon, buprenorfin a naloxon. Je to alkaloid, který není návykový (Chen et al. 2020). Thebain má spíše stimulační než depresivní účinky. Při vysokých dávkách může způsobit křeče (Howard & Howard 2014).

#### 3.3.1.5 Noskapin

Vedle morfinu je noskapin druhým nejvíce zastoupeným alkaloidem v opiu. Málo se podobá ostatním alkaloidům po chemické i farmakologické stránce. Noskapin, dříve známý jako narkotin, je derivát isocholinu, a je tedy příbuzný s papaverinem (Segal et al. 1957). Spolu s narcotolinem je klasifikován jako typický ftalideisochinolin, protože mají neporušený tet-



Obrázek 5 Strukturní vzorec noskapinu

racyklický skelet (Chen et al. 2015). Jeho molekula zahrnuje tři methoxy-, jednu methyloxy- a jednu N-methyl skupinu. Je označován jako nejméně toxický z opiových alkaloidů (Segal et al. 1957).

Poprvé byl izolován z opia v roce 1803 francouzským výrobním chemikem Charlesem Derosnem. Produkty hydrolýzy noskapinu, hydrokotarninu a kyseliny opiánové byly později použity ke konstrukci strukturního vzorce pro alkaloid, který byl později potvrzen syntézou noskapinu z mekoninu a kotarninu nebo syntézou isonoskapinu z kyseliny opianové a hydrokortaninu (Chen et al. 2015).

Je snadno absorbovatelný po perorálním nebo po parentálním podání a rychle zmizí z krevního oběhu, v moči se ukazují pouze stopy. Zpomaluje peristaltiku žaludku a střev. Má stejné účinky proti kašli jako kodein, při velkých dávkách může způsobit paralýzu nervového centra dýchání. Také má spasmolytické účinky na hladkou svalovinu (Segal et al. 1957).

### **3.4 Působení opiových alkaloidů v lidském těle**

Opiové alkaloidy mají dlouhou a bohatou historii ve farmakologii. Jsou široce používány ve většině oborů medicíny, a jsou proto neocenitelné. Bohužel s nimi přicházejí i problémy včetně vedlejších účinků, jako je zácpa, dechová deprese a sedace, stejně jako jejich potenciální zneužití. Vztahy mezi strukturou a aktivitou u velkého počtu látek tak vedly k závěru, že pro tyto léky musí existovat specifická rozpoznávací místa nebo receptory. Studie naznačují specifické molekulární interakce mezi ligandem a jeho vazebným místem. Tato vazebná místa jsou vysoce selektivní pro opioidní analgetika a jejich antagonisty (Davis et al. 2009).

Chronická bolest je rozšířený problém, který postihuje přibližně 20 % dospělých a vyžaduje dlouhodobou léčbu. Opioidy jsou široce předepisovány a běžně se používají při chronické bolesti. Jsou považovány za jedno z nejúčinnějších analgetik pro léčbu akutní středně silné až silné bolesti. Jejich dlouhodobé užívání je však komplikováno rozvojem tolerance, která vyžaduje zvyšování dávek, a zvyšuje tak riziko závislosti a nežádoucích vedlejších účinků (Rodgers et al. 2020).

#### **3.4.1 Antagonisté opioidů**

Antagonisté jsou nesmírně cenní, a to jak klinicky, tak ve studiích opioidních mechanismů. Antagonisté, jako je naloxon, účinně potlačují působení tradičních opioidů. Čím více je subjekt fyzicky závislý na opioidech, tím více se zvyšuje citlivost vůči jejich antagonistům. Přestože se naloxon klinicky používá, jeho trvání je relativně krátké a působení agonistů trvá déle (Davis et al. 2009).

#### **3.4.2 Působení morfinu**

Po požití se morfin relativně rychle absorbuje v gastrointestinálním traktu, hlavně v horní části tenkého střeva, a v menší míře se absorbuje v žaludku. Maximálního účinku morfinu je dosaženo po 30 minutách po požití. Účinek jedné dávky trvá přibližně 4 až 6 hodin (Zentai et

al. 2012). Morfin je metabolizován hlavně v játrech, kde se podrobí konjugaci s glukoronovou kyselinou na 3-hydroxylové skupině (Zentai et al. 2012). Metabolismus se také vyskytuje v jiných orgánech, zejména v CNS (Davis et al. 2009). Morfin je vylučován močí převážně jako morfin-3-glukuronid. Kromě 3,6-diglukuronidu byly identifikovány další vedlejší metabolity zahrnující normorfin a 3-etherový síran. K sekundární konjugaci dochází také na 6-hydroxylové skupině za vzniku 6-glukuronidu, který je farmakologicky aktivní, a v omezené míře 3,6-diglukuronidu (Zentai et al. 2012). Metabolity morfin-3-glukuronid a morfin-6-glukuronid tvoří asi 50–60 % dávky (Davis et al. 2009).

Opium může být také kouřeno po přímém zahřátí spalováním dřevěného uhlí ve specializovaných zařízeních, jako je opiová trubka (Vafour). V případě kouření opia se morfin dostane do mozku během několika sekund díky rychlé absorpci jeho páry přes plicní kapiláry do krevního řečiště. Nástup účinku je tedy po kouření mnohem rychlejší a intenzivnější, ale doba účinku je po perorálním podání delší, protože absorpce ze střeva, i když je pomalejší, trvá delší dobu (Roayaei et al. 2020).

Trvání účinku morfinu se snižuje s rozvojem tolerance k jeho antinociceptivním vlastnostem (Taskiran & Avci 2020). Protože je morfin účinné analgetikum, využívá se při rakovinných bolestech. Jeho dlouhodobé používání však může vést ke stavu tolerance na něj. Morfin je zapojen do receptorů v centrálním a periferním nervovém systému a gastrointestinálním traktu, které jsou odpovědné za jeho blahodárné účinky úlevy od bolesti, ale také za toleranci k morfinu (Tu et al. 2020).

Nízká biologická dostupnost (20–40 %) v případě orálního podávání morfinu může být přičítána eliminaci prostřednictvím metabolismu ve střevní sliznici a v játrech (Zentai et al. 2012).

Podle několika studií správné čištění, mytí, mletí a pečení by mohlo výrazně snížit obsah alkaloidů v máku. Zentai et al. (2012) zjistili, že optimální léčba redukce spočívá v praní, sušení a mletí. Pouze studenou vodou bylo odstraněno asi 60 % morfinu. Při teplotách nad 60 °C může být odstraněno až 90 % morfinu (Zentai et al. 2012).

Systematické studie ukázaly, že lze tolerovat řadu modifikací morfinové struktury, aniž by došlo ke ztrátě analgetického účinku, včetně eliminace významných částí molekuly. Například eliminace uhlíkového kruhu poskytla skelet pro benzomorfiny, jako je ketocyklazocin, ethylketocyklazocin a pentazocin. Další zjednodušení struktury vedlo k dalším opioidům s podobnějšími účinky jako má morfin, včetně metadonu, pethidinu (meperidinu), a k opioidům fentanylové řady (Davis et al. 2009).

#### 3.4.2.1 Vedlejší účinky morfinu

Podle dostupných informací ze stránky Státního ústavu pro kontrolu léčiv mezi možné vedlejší nežádoucí účinky morfinu patří: nejdůležitější je závažná alergická reakce, která způsobuje potíže s dýcháním nebo závratě, poté zvýšená citlivost na bolest, pocení, sucho v ústech, abstinenci příznaky nebo závislost. V ojedinělých případech (7 %) se může objevit nevolnost, zvracení, zácpa (3–4 %), útlum dechu, ospalost, zmatenost (2 %), méně pak nízký krevní tlak

(0,5 %), zadržování moče, zčervenání v obličeji, závratě, snížení nebo zvýšení dechové frekvence, bušení na srdci, snížení tělesné teploty, změny nálady, tělesná slabost, bolest hlavy, poruchy spánku, zastřené vidění, zúžení zornice, poruchy chuti, snížení chuti k jídlu, alergická reakce v místě vpichu (jako svědění a kopřivka) i celková reakce (zúžení průdušek) a bronchospasmus u astmatiků (“Státní ústav pro kontrolu léčiv” 2020).

Morfin se běžně používá u pacientů se srdečním selháním k léčbě dušnosti a bolesti na hrudi. Ovšem studiemi bylo zjištěno, že při jeho podávání se objevila zvýšená reaktivita krevních destiček, snížená spontánní reperfuze myokardu a větší velikost infarktů (Gaweda et al. 2020).

Studie Rogerse et al. (2020) dokázala, že při chronické bolesti je dobré při podávání morfinu podávat také buď antagonistu receptoru dopaminu D1, nebo agonistu receptoru D3. Tato kombinace zabrání toleranci vůči morfinu a zkrátí dobu trvání abstinčních příznaků při ukončení léčby. Modulátory dopaminových receptorů tak mohou představovat životaschopný doplněk k dlouhodobé léčbě morfinem chronické bolesti (Rodgers et al. 2020).

### 3.4.3 Působení kodeinu

Kodein patří mezi slabé analgetikum, které působí centrálně. Jeho analgetický účinek je možný po přeměně na morfin, kvůli jeho slabé afinitě k opiátovým receptorům. Bylo dokázáno, že při kombinaci s jinými analgetiky (paracetamol) působí při léčbě akutní nociceptivní bolesti (“Státní ústav pro kontrolu léčiv” 2020).

Kodein se po podání ústy dobře vstřebává z trávicí soustavy. Obvykle se podává orálně a jeho biologická dostupnost je podobná té morfinu. Jeho účinek trvá 1,5 – 4,5 hodin (Davis et al. 2009). Po perorálním podání je jeho relativní biologická dostupnost na základě výrazného efektu v játrech přibližně 54 %. Váže se na bílkoviny plasmy ve 25–30 %. Kodein přechází do krevního oběhu, takže i případně do plodu (“Státní ústav pro kontrolu léčiv” 2020).

Metabolismus kodeinu probíhá v játrech. Primární cesta metabolismu kodeinu je na kodein-6-glukuronid. Vedlejší metabolické cesty vedou O-demethylací na morfin a N-demethylací na narkodein. Kodein má 6 hlavních metabolitů: kodein-6-glukuronid (81 %), narkodein (2 %), morfin (0,6 %), morfin-3-glukuronid (2 %), morfin-6-glukuronid (0,8 %) a normorfin (2,4 %) (Davis et al. 2009). Kodein a jeho metabolity jsou vylučovány močí přibližně do 48 hodin (“Státní ústav pro kontrolu léčiv” 2020).

#### 3.4.3.1 Vedlejší účinky kodeinu

Podle dostupných informací ze stránky Státního ústavu pro kontrolu léčiv mezi nejčastější vedlejší účinky kodeinu patří: závratě (vertigo), bolest hlavy, nauzea, zvracení a zácpa. Mezi méně časté vedlejší účinky se řadí poruchy spánku, vyrážka, kopřivka a mezi vzácné vedlejší účinky zařadili trombocytopenii, euforii, útlum dechového centra (na tento vedlejší účinek jsou citlivější především děti), poruchy zraku, miózu, poruchy sluchu a sucho v ústech (“Státní ústav pro kontrolu léčiv” 2020).

Vedlejší účinky chronického dávkování jsou podobné jako u ostatních opioidů a patří mezi ně zácpa, útlum (sedace), závratě, nevolnost, zúžení zorniček (mióza), sucho v ústech

a svědění. Nežádoucí účinky se zdají být závislé na dávce, takže jejich počet roste s rostoucí dávkou kodeinu. Orální podávání kodeinu v dávce do 90 mg vedl k žádnému až mírnému kognitivnímu nebo psychomotorickému poškození a mírnému snížení koordinace očí a rukou, zrakové ostrosti a schopnosti řídit (Davis et al. 2009).

#### **3.4.4 Působení thebainu**

Biologická dostupnost thebainu je snížena extenzivním presystémovým metabolismem, za prvé demethylací a nebo za druhé glukuronidací v gastrointestinálním traktu a v játrech.

Thebain zprostředkovává převážně stimulační účinky na centrální nervový systém, jako je zvýšená podrážděnost a reflexní dráždivost (excitabilita) a stejně tak zvýšená motorická aktivita (Eisenreich et al. 2020).

Distribuce thebainu v tkáních byla charakterizována *in vivo* u potkanů. Bylo to prokázáno radioaktivně označených thebainem, který byl distribuován krví potkanů a byl detekován v plazmě a mozku (zejména ve středním mozku a hypotalamu) až po dobu 16 hodin. Dále bylo zjištěno, že je thebain začleněn do jiných tkání, jako je žaludek, tlusté střevo, mícha a prostata. Studie na potkanech a opicích ukázaly, že subkutánní injekce thebainu je intenzivně metabolizována v játrech. To vedlo ke generování různých metabolitů, jako hlavní metabolit je oripavin a další metabolity jsou norkodein, kodein a v nižších množstvích morfin. Oripavin vzniká enzymatickou O-demethylací thebainu (Eisenreich et al. 2020).

Podle studií *in vivo* na různých druzích bylo prozkoumáno vylučování thebainu z těla. U potkanů byl thebain vylučován hlavně močí, ale také stolicí do 48–96 hodin po podání subkutánní injekce. Kromě thebainu byly v moči a stolici detekovány také metabolity, jako je oripavin, a také glukuronidové konjugáty normorfinu a norkodeinu. U opic prokázali renální exkreci thebainu a metabolitů (např. oripavin) po 24–48 hodinách. Thebain a jeho metabolity jsou vylučovány z těla hlavně močí savců (Eisenreich et al. 2020).

##### **3.4.4.1 Toxicita thebainu**

Ze studií na zvířatech bylo zjištěno, že thebain vykazuje vyšší akutní toxický potenciál než morfin. Aplikace vysokých dávek vede ke zvýšenému výskytu malformací plodu. Výsledky studií naznačují, že jeho podávání může vyvolat teratogenní účinky *in vivo* (Eisenreich et al. 2020).

#### **3.4.5 Působení papaverinu**

Papaverin se předněji podává parentálně nebo rektálně, a to z důvodu, protože z trávicího traktu se absorbuje špatně (Doležal 2013). Po orálním podání totiž efektu prvního průchodu, a to znamená, že jeho koncentrace je velmi snížena, než se dostane do systémového oběhu. Při vstřebávání je metabolizován v játrech. V těle je tráven pomocí demethylace a poté je konjugován. Jeho metabolity jsou vylučovány močí během 48 hodin, a to jako 6-hydroxypapaverin a 4-hydroxypapaverin. Malinký zbytek je vyloučen jako čistý papaverin (<1 %) (Moffat et al. 2011).

### 3.4.5.1 Použití

Papaverin je už více než 70 let používán jako vazodilatační látka k léčbě vazospasmu mozkových a koronárních tepen. Může tak zvýšit intracelulární hladinu cyklického adenosinmohofosfátu (cAMP) a cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) inhibicí odpovídajících fosfodiesteráz v hladkém svalu. Také může blokovat iontové kanály vápníku a inhibovat tak jeho uvolňování (Guan et al. 2020).

Díky své relaxační aktivitě hladkého svalstva se jako vazodilatátor používal ke zmírnění renálních kolik a impotence mužů (Fusi et al. 2016). Jeho vazodilatační účinek také způsobuje pokles krevního tlaku a to je nežádoucím efektem, jestliže ho použijeme jako spasmolytikum (Doležal 2013). Dnes je schválen k léčbě křečí gastrointestinálního traktu, žlučových a močového (Fusi et al. 2016).

Bylo dokázáno, že papaverin snižuje rozměr infarktu u ischemického mozkového infarktu. Také může působit jako účinné pluripotentní protizánětlivé činidlo proti mozkovému ischemicko-reperfučnímu poškození se zaměřením na vícero imunomodulačních procesů neurovaskulárního zánětu (Guan et al. 2020).

### 3.4.6 Působení noskapinu

Noskapin je druhý nejhojnější opiový alkaloid, který z nich má nejnižší toxicitu. Na rozdíl od morfinu není noskapin návykový ani narkotický. V padesátých letech objevili jeho vlastnost proti kašli a od té doby se používal jako nízkotoxický antitusický lék (Nemati et al. 2020).

#### 3.4.6.1 Použití

V současné době je ve fázi 1. a 2. klinických studií. Přitahuje pozornost vědeckých komunit po celém světě kvůli svým prominentním protirakovinným vlastnostem, které jsou spojeny s nízkou toxicitou. Je dokázáno, že noskapin a jeho deriváty jsou účinné proti lékovým rezistentním buněčným liniím. Noskapin interferuje s polymerací tubulinu, a to ovlivňuje dynamiku mikrotubulů. Léky zaměřené na mikrotubuly mohou inhibovat buněčnou proliferaci, a zastavit tak buněčný cyklus ve stádiu mitózy. Studie dělaná Nematinem et al. (2020) odhalila, že deriváty noskapinu na bázi triazolu mohou představovat cenné cytotoxické látky a jsou zajímavé v oblasti objevování nových protirakovinných sloučenin, které jsou zaměřené na  $\beta$ -tubulin (Nemati et al. 2020).



## 4 Metodika

V předkládané diplomové práci bylo řešeno několik na sebe navazujících úkolů, kterým se budou věnovat následující podkapitoly. A to vývoj metodiky a vlastní stanovení alkaloidů v semenech máku setého od vybraných producentů v České republice. Vyvíjená metodika se skládala ze dvou kroků - přípravy vzorku pro analytické stanovení a vlastní HPLC-MS metodu.

Příprava vzorků pro vyhodnocení se sestávala z logicky navržených kroků, které respektovaly charakter vzorku a zároveň vlastnosti stanovovaných látek. Cílem bylo stanovit alkaloidy ze skupiny morfinanů, které jsou v semenech máku setého kontrolovány legislativními orgány – Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí – a jsou regulovány na hladiny nejvyšších přípustných limitů pro vybrané morfinany: morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin.

### 4.1 Chemikálie

Pro analýzu obsahu alkaloidů v semenech máku pomocí metody LC-MS jsem použila tyto chemikálie ve vypsanych koncentracích a čistotě:

Methanol p.a.	CH <sub>3</sub> OH
Kyselina sírová p.a. 3 %	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Diethylether p.a.	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Chloroform p.a.	CHCl <sub>3</sub>
Hydroxid amonný	NH <sub>4</sub> OH
Síran horečnatý	MgSO <sub>4</sub>

Výrobce chemikálií je Lach-Ner s.r.o., jediný síran hořečnatý je od výrobce Lab-Honeywell.com.

### 4.2 Použité aparáty k přípravě vzorků

Ultrazvuková lázeň

Vakuová odparka

Dělicí aparát: dělicí nálevka, kruh, stojan, kádinka

Filtrační aparát: fritra, odsávací baňka, pojistná lahev, vodní vývěva, gumové propojení

Elektrický mlýnek na mák

### 4.3 Příprava vzorků

Použili jsme dvě přípravy semen ke stanovení. První typ přípravy – oplachem byl, že jsme pouze navázili 1 g semen vzorku do plastové zkumavky o objemu 50 ml s uzávěrem. Druhý typ přípravy byl, že semena jsme rozemleli v elektrickém mlýnku na mák a ze vzniklé kaše jsme navázili 1 g do plastové zkumavky o objemu 50 ml s uzávěrem.

Poté jsme do zkumavky přidali 25 ml methanolu, zkumavku jsme uzavřeli a dali do ultrazvukové lázně na 20 minut. Methanolvý podíl jsme přefiltrovali pomocí odsávací baňky s fritou. Přefiltrovaný podíl jsme přelili do čisté kádinky. Dále jsme ke vzorku znovu přidali 25 ml methanolu a dali opět na 20 minut do ultrazvukové lázně. Filtraci jsme opakovali stejným způsobem. Poté jsme znovu k vzorku přidali 25 ml methanolu a celý postup jsme naposledy opakovali. Vzniklé tři podíly jsme spojili, přefiltrovali pomocí odsávací baňky s fritou. V další fázi jsme extrakt přelili do 250 ml baňky a dali odpařovat do sucha do vakuové rotační odparky.

Po odpaření jsme destilační zbytek 3x vytřepali 10 ml kyseliny sírové 3 %. Vzniklé podíly jsme spojili. Při tomto kroku alkaloidy přešly ve formě solí do kyselého roztoku. Tento kyselý roztok jsme přelili do dělicí nálevky, do které jsme přidali 15 ml diethyletheru, roztok jsme protřepali a oddělili podíly. Vodnou vrstvu jsme vrátili do dělicí nálevky a znovu přidali 15 ml diethyletheru, protřepali a znovu oddělili vodný podíl. Tento krok jsme učinili kvůli odstranění tuků ze vzorku. Vzniklou vodnou vrstvu jsme alkalizovali přidáváním hydroxidu amonného. Aciditu/alkalitu roztoku jsme kontrolovali pomocí pH papírků do zeleného zbarvení, které odpovídá pH 8. Zalkalizováním došlo k převedení alkaloidů z jejich solí na volné báze, které jsou rozpustné v chlorovaných organických rozpouštědlech. K odstranění vody obsahující vodorozpustné nečistoty ve vzorku jsme extrakt 2x protřepali 15 ml chloroformu v dělicí nálevce. Chloroformové podíly jsme oddělili a oba spojili dohromady.

K chloroformovému podílu jsme přidali síran hořečnatý za účelem vysušení. Dále jsme extrakt přefiltrovali, přelili do 250 ml baňky a dali do vakuové rotační odparky, kde jsme ho nechali odpařit do sucha. Poté jsme destilační zbytek rozpustili 3x 1 ml methanolu.

#### 4.4 Stanovení alkaloidů HPLC-MS analýzou

Kvalitativní a kvantitativní stanovení morfinanů – morfinu, kodeinu, papaverinu, thebainu a noskapinu – bylo realizováno metodou kombinující separační metodu – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s vysoce citlivou detekční metodou – hmotnostní spektrometrií.

##### **Analytické podmínky HPLC-MS systému:**

Instrument:	Hmotnostní spektrometr - 3200 Q-Trap (Applied Bio-systems, Kanada).
	Chromatografický systém HPLC – Ultimate 3000 (Di-onex, USA).
	Analytická HPLC kolona - Synergi Fusion-RP 10, 100 x 2,0 mm, 2,5 µm (Phenomenex, USA).
Ionizace:	ESI + - pozitivní ionizační mód
Skenovací režim:	Full scan – 100-2000 Da
Průtok kolonou:	200µl/min
Přímá infúze:	10µl/min roztoku vzorku o koncentraci 100 µg/ml

(optimalizace MRM přechodů)

Teplota kolony:	40°C
Objem nástřiku:	5 µl
Doba analýzy:	25 min
Ion Spray Voltage:	IS = 5500V
Curtain gas:	CUR = 25 psi
Collision gas:	CAD = medium
Temperature:	TEM = 600°C
Ion source gas 1:	GS1 = 50 psi
Ion source gas 2:	GS2 = 50 psi

Parametry MRM přechodů:

---

Morfin

Přechod 1 – kvantifikační	286,2 → 152,3
Přechod 2 – potvrzující („konfirmační“)	286,2 → 165,4
“Declustering potential” DP (V)	53V
“Entrance Potential” EP (V)	12V
Cell Entrance Potential (CEP)	15V
Collision Energy (CE); přechod 1	75V
Collision Energy (CE); přechod 2	50V
Cell Exit Potential (CXP)	4V

---

Kodein

Přechod 1 – kvantifikační	300,2 → 152,3
Přechod 2 – potvrzující („konfirmační“)	300,2 → 215,2
“Declustering potential” DP (V)	45V
“Entrance Potential” EP (V)	10V

Cell Entrance Potential (CEP)	25V
Collision Energy (CE); přechod 1	80V
Collision Energy (CE); přechod 2	40V
Cell Exit Potential (CXP)	4V

---

#### Noskapin

Přechod 1 – kvantifikační	414,2 → 220,3
Přechod 2 – potvrzující („konfirmační“)	414,2 → 253,3

“Declustering potential” DP (V)	45V
“Entrance Potential” EP (V)	5V
Cell Entrance Potential (CEP)	20V
Collision Energy (CE); přechod 1	26V
Collision Energy (CE); přechod 2	25V
Cell Exit Potential (CEP)	4V

---

#### Papaverin

Přechod 1 – kvantifikační	340,1 → 202,3
Přechod 2 – potvrzující („konfirmační“)	340,32 → 308,2

“Declustering potential” DP (V)	60V
“Entrance Potential” EP (V)	5V
Cell Entrance Potential (CEP)	30V
Collision Energy (CE); přechod 1	35V
Collision Energy (CE); přechod 2	55V
Cell Exit Potential (CEP)	4V

---

#### Thebain

Přechod 1 – kvantifikační	312,3 → 152,3
---------------------------	---------------

Přechod 2 – potvrzující („konfirmační“) 312,3 → 251,4

“Declustering potential” DP (V) 110V

“Entrance Potential” EP (V) 2V

Cell Entrance Potential (CEP) 25V

Collision Energy (CE); přechod 1 80V

Collision Energy (CE); přechod 2 35V

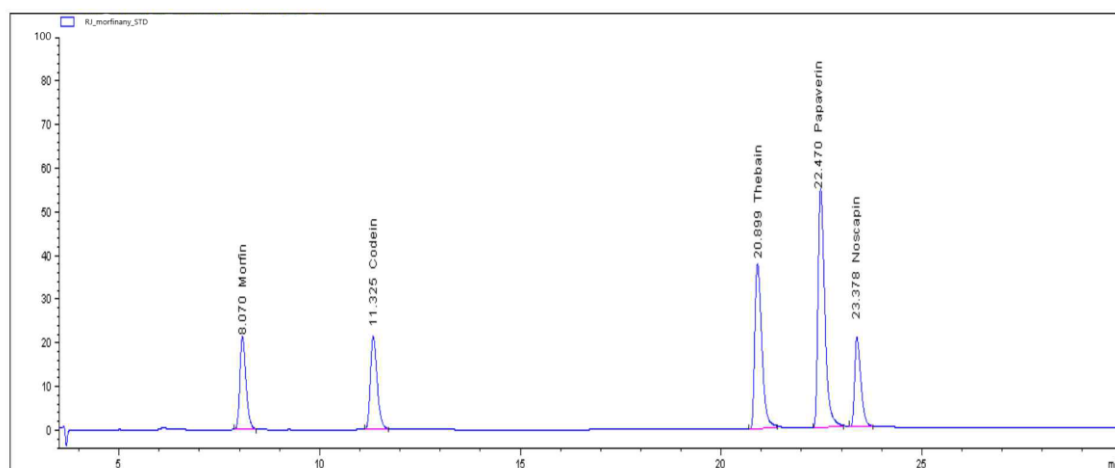
Cell Exit Potential (CXP) 4V

## Typický chromatogram HPLC-MS

### Chromatografická kolona

Na obrázku je uveden chromatogram, který byl získán optimalizací analytické metody s cílem zajistit separaci jednotlivých komponent, které byly monitorovány v semenech máku setého: morfin, kodein, papaverin, thebain a noscapine.

Byla vyvinuta HPLC-MS metoda, která splňovala první uvedený požadavek na ideální separaci, nicméně doba analýzy se pohybovala kolem 25 minut. Úpravou podmínek se příliš nedařilo zkrátit celkový čas analýzy při zachování úplné separace všech komponent. Podmínky analýzy byly následující a separace je zachycena na následujícím chromatogramu (Obrázek 6).



Obrázek 6 Chromatogram separace

Analyt	Retenční čas
Morfin	8.07 min.
Kodein	11.33 min
Thebain	20.89 min
Papaverin	22.47 min
Noscapin	23.37 min

### **Optimalizované analytické podmínky:**

Chromatografický systém: HPLC Ultimate 300 RS, Dionex, USA

Hmotnostní spektrometr: 3200 QTRAP, AB-Sciex, Kanada

### **Chromatografická kolona a podmínky:**

Kolona: ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm)

Předkolona: ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm x 2,1 mm x 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)

### **Validační parametry HPLC-MS:**

Byla provedena validace metody a nalezeny důležité validační parametry:

#### **Morfin**

Limit detekce (LOD) 1,2 ng/ml extraktu

Limit kvantifikace (LOQ) 3,6 ng/ml extraktu

Linearita 5 ng – 500 µg

#### **Kodein**

Limit detekce (LOD) 0,1 ng/ml extraktu

Limit kvantifikace (LOQ) 0,3 ng/ml extraktu

Linearita 1 ng – 500 µg

#### **Papaverin**

Limit detekce (LOD) 0,03 ng/ml extraktu

Limit kvantifikace (LOQ) 0,09 ng/ml extraktu

Linearita 0,1 ng – 500 µg

#### **Thebain**

Limit detekce (LOD)	2,5 ng/ml extraktu
Limit kvantifikace (LOQ)	7,5 ng/ml extraktu
Linearita	10 ng – 500 µg

### **Noskapin**

Limit detekce (LOD)	0,03 ng/ml extraktu
Limit kvantifikace (LOQ)	0,09 ng/ml extraktu
Linearita	0,1 ng – 500 µg

Interference: Volbou selektivních MRM přechodů a jejich testováním se spikovanými reálnými vzorky a spikovanými „blanky“, bylo ověřeno, že k interferencím nedochází.

## **4.5 Vzorky**

Vzorky semen máku zkoumaných odrůd dodal Ing. Vlastimil Mikšík, Ph. D. Mnohé jsou potravinářské a vyhovují cechovní normě Český modrý mák, druhou skupinou jsou máky potravinářské kvality, ale s jinou barvou semen než modrou a nakonec vysokomorfinová odrůda Lazur, která se dříve u nás pěstovala i za účelem získání makoviny.

### **4.5.1 Odrůda Major**

Tato odrůda pochází ze Slovenské republiky. Barva semen je modrá. Je to středněmorfinová odrůda (pro potravinářský a dříve se makovina využívala i pro farmaceutický průmysl), která má vysoký výnosový potenciál a je středně raná. Značí se vysokou odolností proti helmintosporióze a plísni makové. Tato odrůda je dosud nejvíce pěstovaná. Barva květu je bílá (Brant et al. 2010; “Odrůdy MÁKU SETÉHO” 2021; “Mák setý - ELITA semenářská, a.s.” n.d.).

### **4.5.2 Odrůda Diospegi Elit**

Odrůda je maďarského původu, avšak nikdy nebyla registrována. Má výrazné šedé zbarvení semen. Kvete fialově a květ je velmi podobný odrůdám typu Zeno (Mikšík, osobní sdělení).

### **4.5.3 Odrůda MS Harlekýn**

Původ této středněmorfinové odrůdy je ze Slovenské republiky. Barva semen je modrá. Kvete bíle. Odrůda je středně raná, středně vysoká rostlina a má vysoký výnos semen (Brant et al. 2010; “Odrůdy MÁKU SETÉHO” 2021).

### **4.5.4 Odrůda Orel**

Odrůda je původem z České republiky. Barva semen je bílá. Jde o středně ranou odrůdu. Rostliny jsou středně vysoké až vysoké. Značí se střední odolností proti helmintosporióze

a proti plísni makové. Jde o typ slepák, což znamená, že nemá otvůrky pod korunkou, a tudíž z něj nemohou semena vypadávat. Obsah oleje v semeni je středně vysoký. Tato odrůda se pěstuje pro potravinářský průmysl, vyniká, podobně jako všechny bělosemenné odrůdy, oříškovou chutí semen (Brant et al. 2010).

#### **4.5.5 Odrůda Malsar**

Barva semen je modrá. Tato středněmorfinová odrůda je vhodná do všech výrobních oblastí, nejvhodnější jsou humidnější půdy. Značí se vysokou odolností k herbicidům. Semena mají vynikající chuťové vlastnosti (Brant et al. 2010; “Typy máku – Český modrý mák” 2020).

#### **4.5.6 Odrůda Lazur**

Tato odrůda pochází z Polska. Barva semen je modrá. Jde o středně ranou odrůdu, kde jsou rostliny středně vysoké až vysoké a jsou středně odolné proti helmintosporioze a plísni makové. Jde o typ slepák. Obsah oleje v semeni je středně vysoký. Převážně se pěstovala k produkci makoviny pro farmaceutický průmysl kvůli vyššímu obsahu morfinu (“Odrůdy máku a jejich výsledky” 2001; Brant et al. 2010). V současné době se tato odrůda u nás nepěstuje, neboť poztravnářské využití této odrůdy je zakázáno – viz vyhláška č. 399/2013 Sb. (Ministerstvo zemědělství 2013).

#### **4.5.7 Odrůda Albín**

Původ této odrůdy je ze Slovenské republiky. Barva semen je bílá. Barva květu je růžová. Tato odrůda se pěstuje v omezeném rozsahu, protože má nižší výnosy, je více citlivá na herbicidy. Její předností je ovšem oříšková příchuť semen (“Odrůdy máku a jejich výsledky” 2001).

#### **4.5.8 Odrůda Opal**

Tato odrůda pochází ze Slovenské republiky. Barva semen je modrá. Tato odrůda je velmi plastická. Je vhodná do všech výrobních oblastí, nemá výrazná pěstitelská rizika. Jde o středně ranou odrůdu. Rostliny jsou středně vysoké. Je dobře odolná vůči helmintosporioze a plísni makové. Odrůda je silně rezistentní proti účinkům herbicidů. Jde o typ slepák. Obsah oleje v semenech je středně vysoký. V České republice je tato odrůda značně rozšířená (“Odrůdy máku a jejich výsledky” 2001; “Odrůdy MÁKU SETÉHO” 2021).

#### **4.5.9 Odrůda Gerlach**

Odrůda původem ze Slovenské republiky. Barva semen je modrá. Je to středně raná odrůda se středně vysokými rostlinami, která se hodí do všech pěstitelských oblastí. Jde o typ slepák. Obsah oleje v semeni je středně vysoký. Jedná se o kombinovanou odrůdu, tedy potravinářskou s využitím makoviny pro farmaceutický průmysl (“Odrůdy máku a jejich výsledky” 2001; Brant et al. 2010).



#### **4.5.10 Odrůda Onyx**

Tato odrůda pochází z České republiky. Barva semen je modrá a má bílé květy. Jde o jarní odrůdu, která má vysokou odolnost proti chorobám a polehání. Jde o typ slepák. Semena se využívají v potravinářském průmyslu (Brant et al. 2010; “Mák setý – ONYX - Osiva - PRO SEEDS s.r.o. - ryze česká osivářská společnost” n.d.).

#### **4.5.11 Odrůda Opex**

Odrůda je původem z České republiky. Barva semen je modrá. Vykazuje se velmi dobrou odolností proti helmintosporiíze. Semena jsou využívána potravinářským průmyslem (Brant et al. 2010; “Typy máku – Český modrý mák” 2020).

#### **4.5.12 Odrůda Borowski bílý**

Tato odrůda pochází z Polska. Barva semen je bílá. Jde o nízkomorfinovou odrůdu (Mikšík, osobní sdělení).

#### **4.5.13 Odrůda Bergam**

Původ této odrůdy je ze Slovenské republiky. Barva semen je modrá. Jde o adaptabilní odrůdu, která dozrává jednotně. Má dobré výnosy semen (Brant et al. 2010).

#### **4.5.14 Odrůda Zeno**

Barva semen není vyrovnaná, ale převážně je modrosemenná. Rakouská nízkomorfinová ozimá odrůda s fialovou barvou květu, s dobrou odolností k několikahodinovým mrazům a s vysokým výnosem semen. Je tolerantní vůči herbicidům a má dobrou odolnost proti helmintosporiíze (Brant et al. 2010).

#### **4.5.15 Odrůda Agat**

Tato odrůda pochází z Polska. Barva semen je modrá. Jde o nízkomorfinovou odrůdu (Mikšík, osobní sdělení).

#### **4.5.16 Odrůda Redy**

Původem pochází z České republiky. Barva semen je okrová. Je to raná odrůda se středně vysokými až vysokými rostlinami, které jsou středně odolné proti helmintosporiíze a proti plísni makové. Jde o typ slepák. Obsah oleje v semenech je vysoký. Semena jsou využívána v potravinářském průmyslu kvůli jiné chuti semen (oříšková příchut') (Brant et al. 2010).

#### **4.5.17 Odrůda Maraton**

Původ této odrůdy je ze Slovenské republiky. Barva semen je modrá. Jde o druhou nejvíce pěstovanou odrůdu. Tato odrůda je vhodná do všech výrobních oblastí. Má dobré vlastnosti, které se dají dobře využít v málo příznivých pěstitelských podmínkách. Je to středně raná

odrůda. Vyznačuje se vysokou odolností proti helmintosporiíze a vůči herbicidům (Brant et al. 2010; “Odrůdy MÁKU SETÉHO” 2021; “Mák setý - ELITA semenářská, a.s.” n.d.).

#### **4.5.18 Odrůda Aplaus**

Tato odrůda pochází z České republiky. Barva semen je modrá. Jde o středně ranou odrůdu se středně vysokým výnosem semen a s bílou barvou květů. Je méně až středně odolná proti helmintosporiíze a plísni makové. Semena jsou využita v potravinářském průmyslu a makovina ve farmaceutickém průmyslu (Brant et al. 2010; “Mák setý - ELITA semenářská, a.s.” n.d.).

## 5 Výsledky

Byla provedena příprava vzorků k HPLC-MS analýze a následně stanovení obsahů vybraných morfinanů s cílem jejich kvantitativního stanovení.

Výsledky stanovení pomocí metody HPLC-MS ve formě obsahu morfinu, kodeinu, thebainu, papaverinu a noskapinu semen, která byla připravena oplachem jsou uvedeny v tabulce číslo 1 a výsledky semen, která byla připravena rozemletím semen jsou uvedeny v tabulce číslo 2.

**Tabulka 1** Výsledky stanovení obsahu vzorků odrůd - oplach semen

Odrůda	Morfin (mg/kg)	Kodein (mg/kg)	Thebain (mg/kg)	Papaverin (mg/kg)	Noskapin (mg/kg)	Celkový obsah alkaloidů (mg/kg)
Major	0,32	0,34	0,044	0,01	0,44	1,16
Diospegi Elit	0,001	0,01	0,358	0,001	0,04	0,41
MS Harlekýn	0,02	0,37	0,171	0,001	0,01	0,57
Orel	0,36	0,32	0,352	0,91	1,85	3,79
Malsar	0,06	0,04	0,062	0,12	0,41	0,69
Lazur	0,02	0,01	0,016	0,02	0,22	0,29
Albín	0,01	0,03	0,015	0,25	0,71	1,01
Opal	0,04	0,10	0,261	0,03	0,10	0,53
Gerlach	0,01	0,03	0,061	0,004	0,04	0,15
Onyx	0,002	0,01	0,086	0,003	0,01	0,10
Opex	0,01	0,04	0,244	0,003	0,003	0,30
Borowski bílý	0,002	0,005	0,035	0,004	0,002	0,05
Bergam	0,01	0,03	0,043	0,001	0,01	0,08
Zeno	0,02	0,01	0,033	0,14	0,02	0,23
Agat	0,002	0,02	0,094	0,01	0,01	0,14
Redy	0,01	0,02	0,024	0,003	0,05	0,11
Maraton	0,002	0,002	0,024	0,003	0,01	0,04
Aplaus	0,17	0,08	0,81	0,001	0,005	1,07

**Tabulka 2** Výsledky stanovení obsahu vzorků odrůd - rozemletím semen

Odrůda	Morfin (mg/kg)	Kodein (mg/kg)	Thebain (mg/kg)	Papaverin (mg/kg)	Noskapin (mg/kg)	Celkový obsah alkaloidů (mg/kg)
Major	0,47	0,47	0,04	0,002	0,542	1,53
Diospegi Elit	0,001	0,01	0,42	0,001	0,035	0,46
MS Harlekýn	0,03	0,29	0,14	0,001	0,007	0,46
Orel	0,81	0,55	0,39	0,94	1,605	4,28
Malsar	0,15	0,06	0,03	0,10	0,383	0,72
Lazur	0,07	0,01	0,01	0,01	0,195	0,29
Albín	0,03	0,05	0,01	0,26	0,839	1,19
Opal	0,12	0,17	0,17	0,02	0,093	0,58
Gerlach	0,01	0,04	0,03	0,001	0,029	0,11
Onyx	0,002	0,00	0,05	0,001	0,003	0,06
Opex	0,01	0,02	0,17	0,001	0,001	0,21
Borowski bílý	0,002	0,003	0,02	0,001	0,001	0,02
Bergam	0,01	0,04	0,02	0,001	0,006	0,09
Zeno	0,06	0,02	0,02	0,12	0,012	0,23
Agat	0,01	0,01	0,05	0,01	0,004	0,08
Redy	0,04	0,01	0,01	0,002	0,055	0,12
Maraton	0,004	0,003	0,01	0,001	0,004	0,03
Aplaus	0,57	0,04	0,65	0,00	0,002	1,27

## 5.1 Porovnání přípravy semen k analytickému zpracování

K tomuto hodnocení jsem použila analýzu rozptylu Anovu v programu STATISTICA 12, dostupném díky ČZU. Podstatou tohoto testu je zhodnotit vliv faktoru na výsledný znak. Porovnávám dvě možné přípravy semen k samotnému vyhodnocení. První způsob je oplachem ze semen. Druhý způsob je rozemletím semen.

**Tabulka 3** Výstup z programu statistika, Anova - morfin

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro obsah morfinu (Výsledky DP) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	337842	1	337842,5	10,09398	0,003160
způsob přípravy semene	49494	1	49494,3	1,47878	0,232341
Chyba	1137970	34	33469,7		

**Tabulka 4** Výstup z programu statistika, Anova, Scheffeho test - morfin

Č. buňky	Scheffeho test; proměnná obsah morfinu (Výsledky DP) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 33470,, sv = 34,000		
	způsob přípravy semene	1	2
1	oplach	59,795	133,95
2	rozemletí	0,232341	0,232341

Podle výsledků testu Anova můžeme říct, že u obsahu morfinu ve vzorcích v přípravě vzorků, zda semena rozemeleme nebo uděláme pouhý oplach z nich, není statisticky významný rozdíl.

**Tabulka 5** Výstup z programu statistika, Anova - kodein

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro obsah kodeinu (Výsledky DP) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	295955,0	1	295955,0	13,85061	0,000713
způsob přípravy semene	3097,9	1	3097,9	0,14498	0,705746
Chyba	726500,1	34	21367,6		

**Tabulka 6** Výstup z programu statistika, Anova, Scheffeho test - kodein

Č. buňky	Scheffeho test; proměnná obsah kodeinu (Výsledky DP) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 21368,, sv = 34,000		
	způsob přípravy semene	1	2
1	oplach	81,393	99,946
2	rozemletí	0,705746	0,705746

Podle výsledků testu Anova můžeme říct, že mezi přípravou semen k vyhodnocení není statisticky významný rozdíl u obsahu kodeinu ve vzorcích.

**Tabulka 7** Výstup z programu statistika, Anova - thebain

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro obsah thebainu (Výsledky DP) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	687945	1	687945,0	18,87924	0,000119
způsob přípravy semene	6507	1	6507,5	0,17858	0,675254
Chyba	1238934	34	36439,2		

**Tabulka 8** Výstup z programu statistika, Anova, Scheffeho test - thebain

Č. buňky	Scheffeho test; proměnná obsah thebainu (Výsledky DP) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 36439,, sv = 34,000		
	způsob přípravy semene	1	2
1	oplach	151,68	124,79
2	rozemletí	0,675254	0,675254

Podle výsledků testu Anova můžeme říct, že mezi přípravou vzorků není statisticky významný rozdíl u obsahu thebainu ve vzorcích.

**Tabulka 9** Výstup z programu statistika, Anova - papaverin

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro obsah papaverinu (Výsledky DP) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	247924	1	247924,3	5,112101	0,030273
způsob přípravy semene	69	1	69,0	0,001422	0,970135
Chyba	1648916	34	48497,5		

**Tabulka 10** Výstup z programu statistika, Anova, Scheffeho test - papaverin

Č. buňky	Scheffeho test; proměnná obsah papaverinu (Výsledky DP) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 48498,, sv = 34,000		
	způsob přípravy semene	1	2
1	oplach	84,371	81,602
2	rozemletí	0,970135	0,970135

Podle výsledků testu Anova můžeme říct, že není statisticky významný rozdíl v přípravě semen k vyhodnocení obsahu papaverinu ve vzorcích.

**Tabulka 11** Výstup z programu statistika, Anova - noskapin

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro obsah noskapin (Výsledky DP) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	1664367	1	1664367	8,768891	0,005554
způsob přípravy semen	327	1	327	0,001725	0,967110
Chyba	6453322	34	189804		

**Tabulka 12** Výstup z programu statistika, Anova, Scheffeho test - noskapin

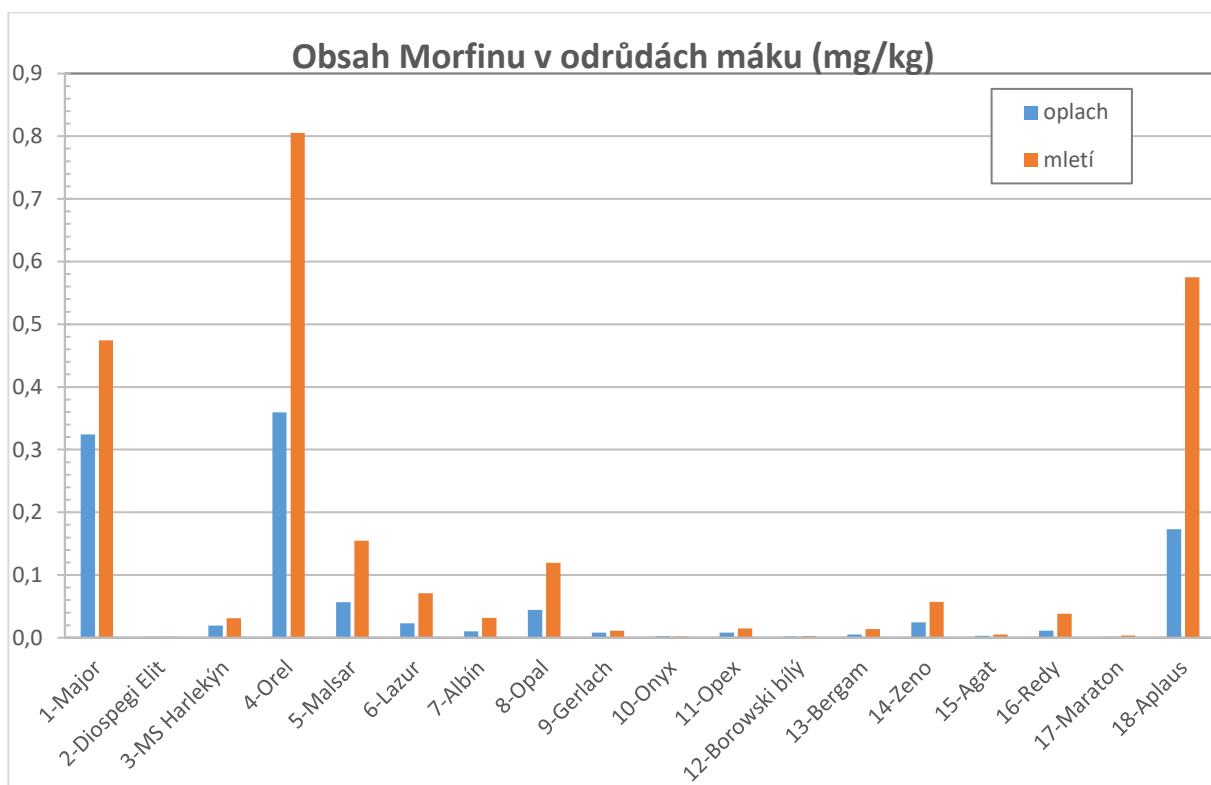
Č. buňky	Scheffeho test; proměnná obsah noskapin (Výsledky DP) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 1898E2, sv = 34,000		
	způsob přípravy semen	1	2
1	oplach	218,03	212,00
2	rozemletí	0,967110	0,967110

Podle výsledků testu Anova můžeme říct, že mezi přípravou semen oplachem nebo rozemletím není statisticky významný rozdíl u obsahu noskapinu ve vzorcích.

Celkově tedy můžeme říct, že mezi způsoby přípravy semen oplachem a rozemletím k vyhodnocení alkaloidů není statisticky významný rozdíl. A to z důvodu, že samotná semena alkaloidy neobsahují, ale semena jsou pokryta vrstvou opia v důsledku sklizení máku, ve kterém jsou alkaloidy obsaženy. V našem případě veškeré vzorky byly sklizeny ručně (nikoliv stroje), proto jsou obsahy makoviny, a tudíž i alkaloidů minimální.

## 5.2 Porovnání obsahu alkaloidů v semenech máku

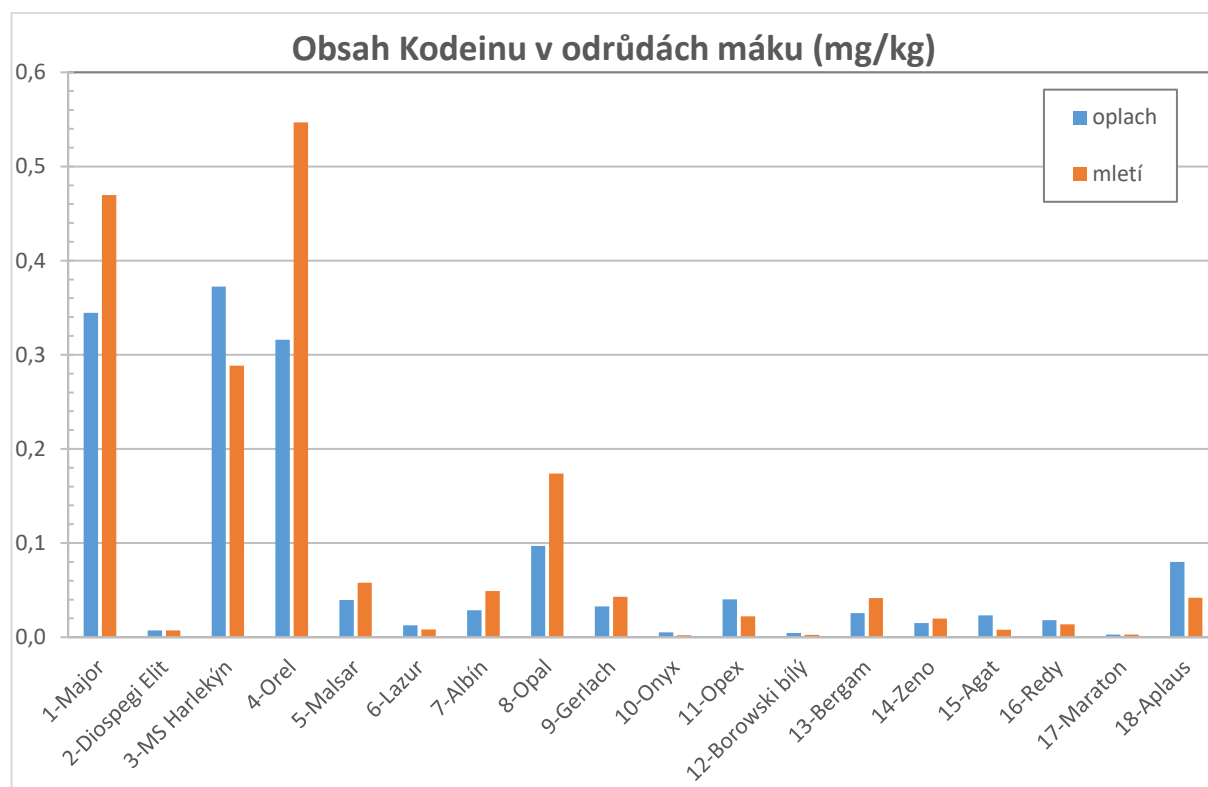
K porovnání obsahů jednotlivých alkaloidů (morfin, kodein, thebain, papaverin, noskapin) jsem použila grafické znázornění.



**Obrázek 7** Graf zobrazující obsah morfinu v odrůdách máku

Na obrázku číslo 7 můžeme vidět obsahy morfinu v mg/kg máku v jednotlivých zkoumaných odrůdách. Hodnoty jsou dvě pro každou odrůdu, protože jsme použili dva typy přípravy semen – oplach a rozemletí. Mezi způsoby přípravy semen není statisticky významný rozdíl podle testu Anova.

Nejvíce morfinu je v odrůdě Orel, poté v odrůdě Aplaus a odrůda s třetím největším množstvím morfinu je Major. Nejméně morfinu je v odrůdách: Borowski bílý, Diospegi Elit, Onyx, Maraton, Agat.

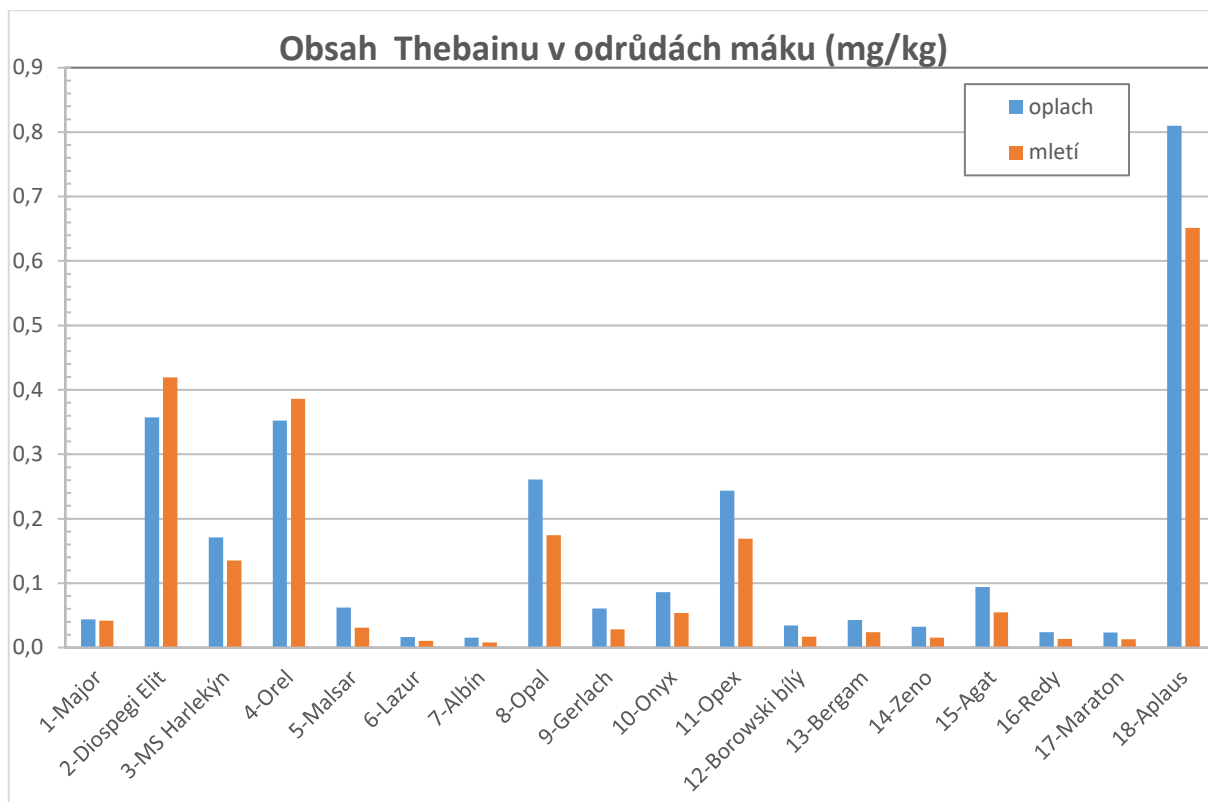


**Obrázek 8** Graf zobrazující obsah kodeinu v odrůdách máku

Na obrázku číslo 8 je zobrazen obsah kodeinu v mg/kg máku v jednotlivých zkoumaných odrůdách. Hodnoty jsou zobrazeny dvě, protože k přípravě vzorků jsme použili dva typy přípravy semen – oplach a rozemletí semene. Mezi způsobem přípravy semen není statisticky významný rozdíl podle testu Anova.

Nejvíce kodeinu je obsaženo v odrůdě Orel (mletá semena), druhý největší obsah má odrůda Major (mletá semena) a třetí největší obsah má odrůda MS Harlekýn. Nejméně kodeinu je v odrůdách: Onyx, Maraton, Diospegi Elit a Borowski bílý.

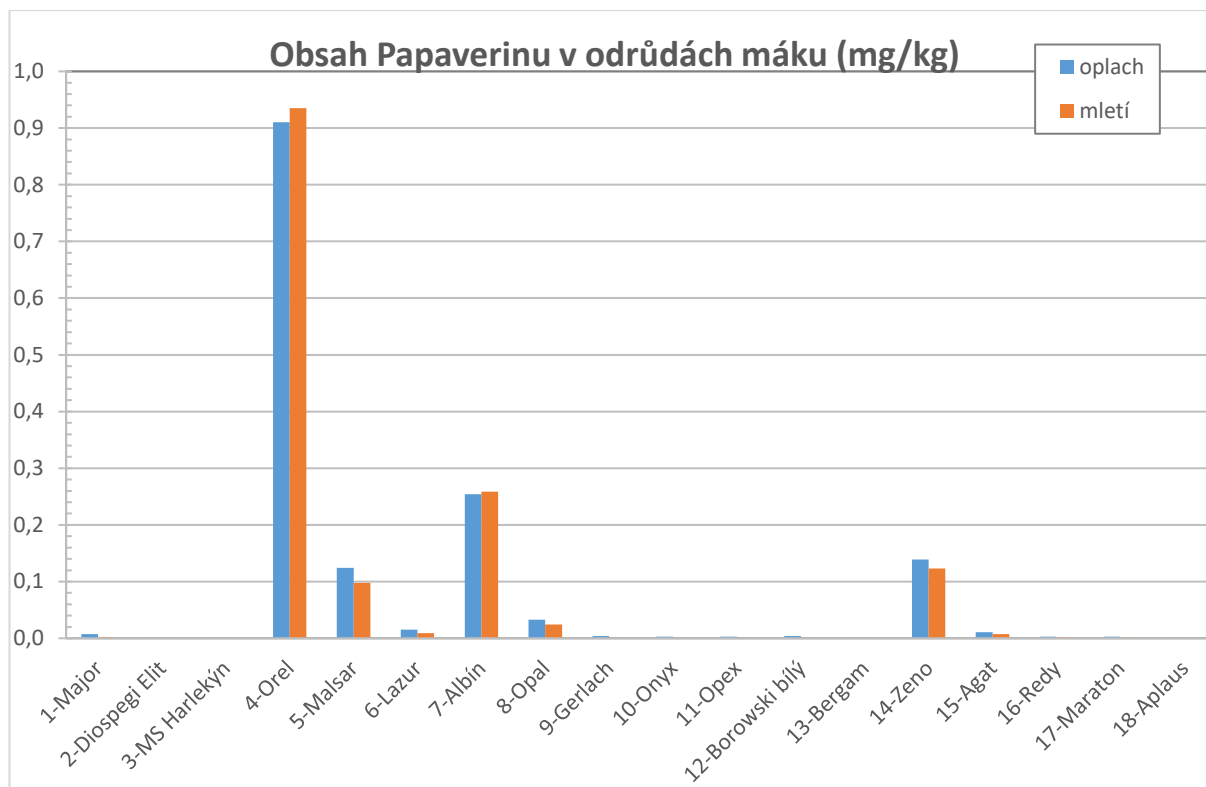




**Obrázek 9** Graf zobrazující obsah thebainu v odrůdách máku

Na obrázku číslo 9 jsou zobrazeny obsahy thebainu v mg/kg jednotlivých odrůd máku. Obsah je zobrazen v semenech, která byla zpracována oplachem a rozemletím semen. Mezi těmito dvěma způsoby přípravy semen podle testu Anova není statisticky významný rozdíl.

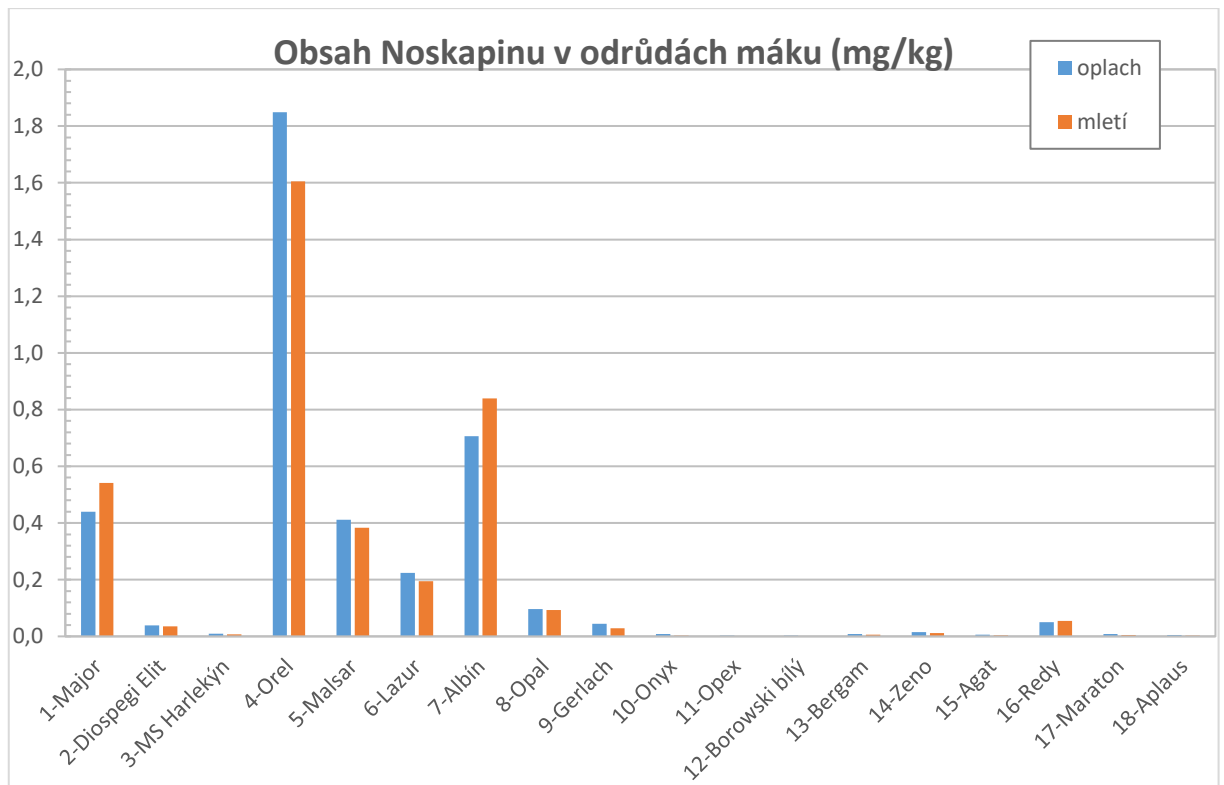
Nejvíce thebainu je v odrůdě Aplaus. Druhý největší obsah thebainu má odrůda Diospegi Elit a třetí největší obsah má odrůda Orel. Nejméně thebainu je v odrůdách: Lazur, Albín, Redy a Maraton.



**Obrázek 10** Graf zobrazující obsah papaverinu v odrůdách máku

Obrázek číslo 10 zobrazuje obsah papaverinu v mg/ kg máku v jednotlivých zkoumaných odrůdách máku. Hodnoty zobrazují obsah papaverinu při použití dvou způsobů přípravy semen. U první přípravy jde o oplach ze semen a u druhé přípravy se semena rozemlela elektrickým mlýnkem na mák. Podle testu Anova mezi jednotlivými přípravami semen není statisticky významný rozdíl.

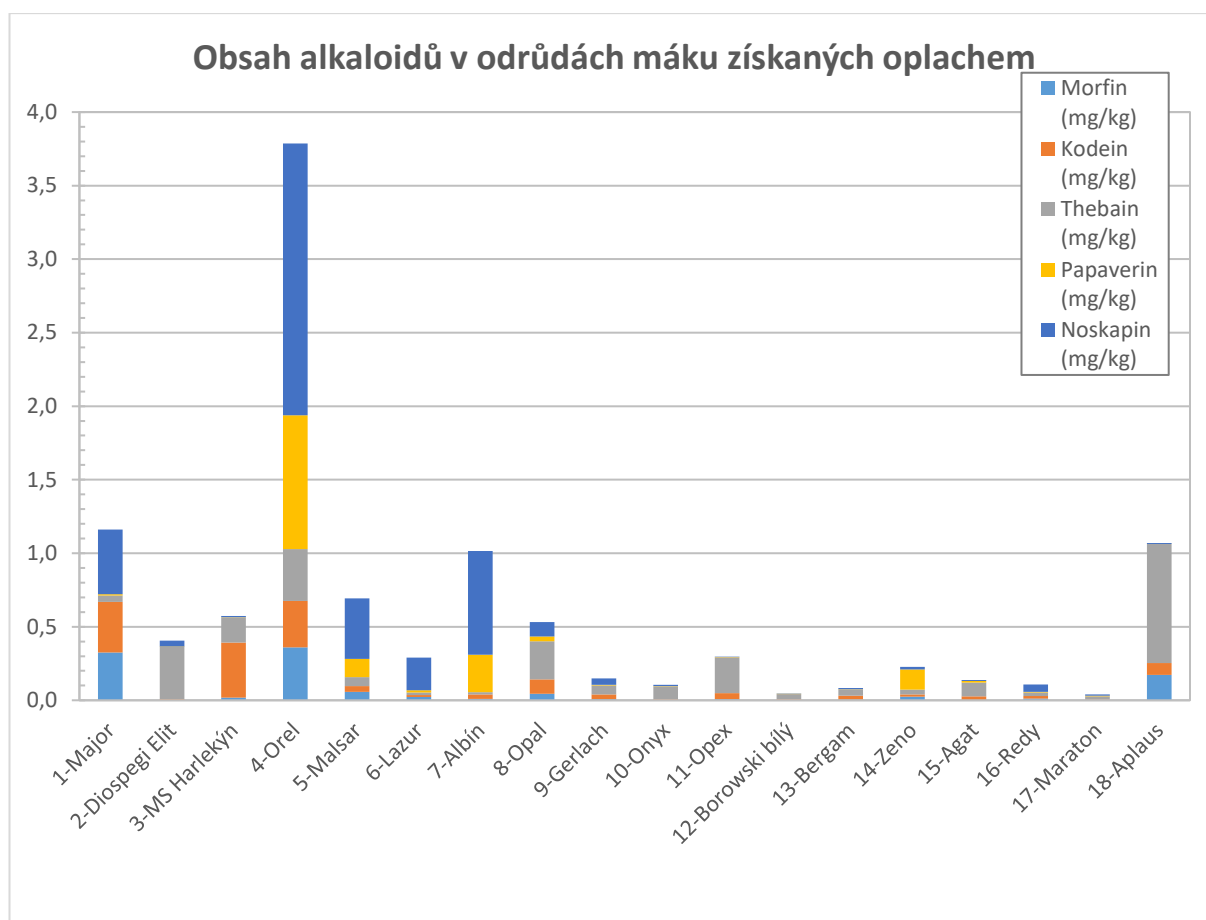
Nejvíce papaverinu je obsaženo v odrůdě Orel. Druhý největší obsah má odrůda Albín, třetí největší obsah má odrůda Zeno a čtvrtý největší obsah má odrůda Malsar. Ostatní odrůdy mají stopové množství papaverinu.



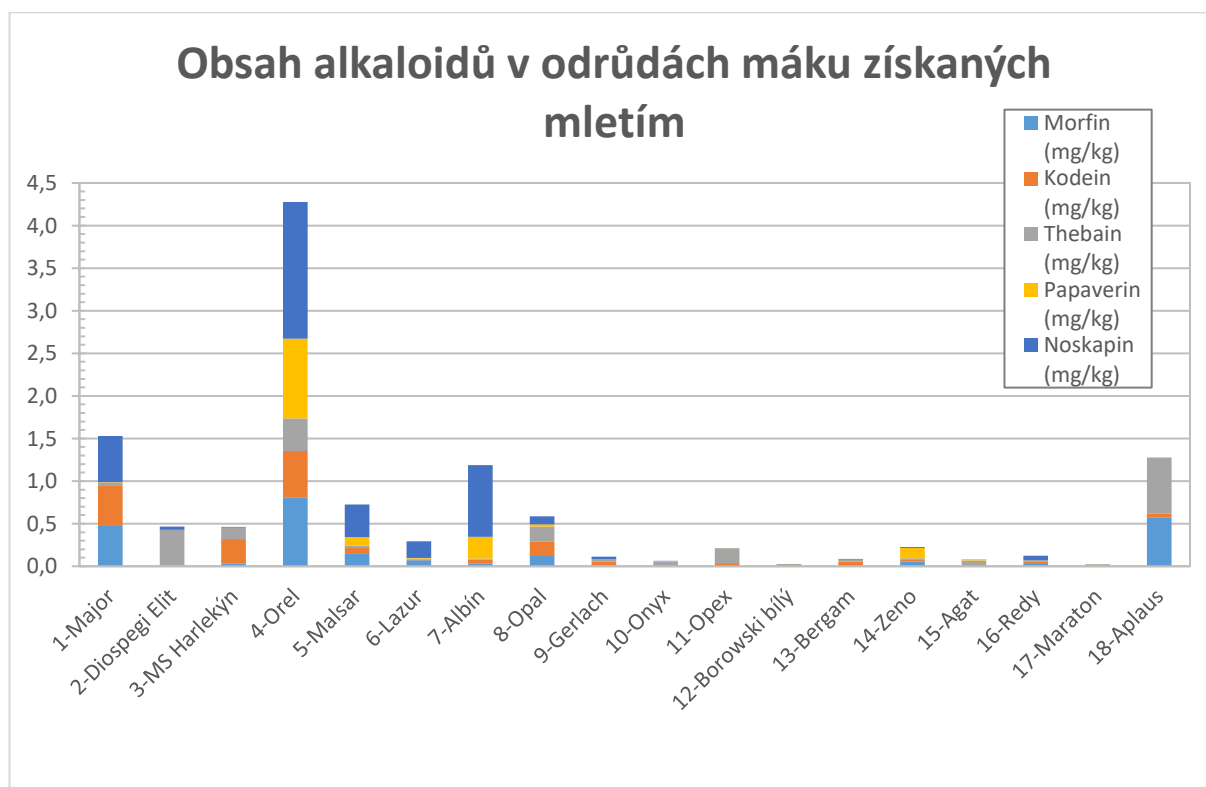
**Obrázek 11** Graf zobrazující obsah noskapinu v odrůdách máku

Na obrázku číslo 11 vidíme obsah noskapinu v mg/kg máku v jednotlivých zkoumaných odrůdách. Hodnoty zobrazují oba způsoby přípravy semen k vyhodnocení. První způsob přípravy byl oplachem ze semen a druhý způsob zahrnoval rozemletí semen elektrickým mlýnkem. Podle testu Anova mezi těmito dvěma způsoby přípravy není statisticky významný rozdíl.

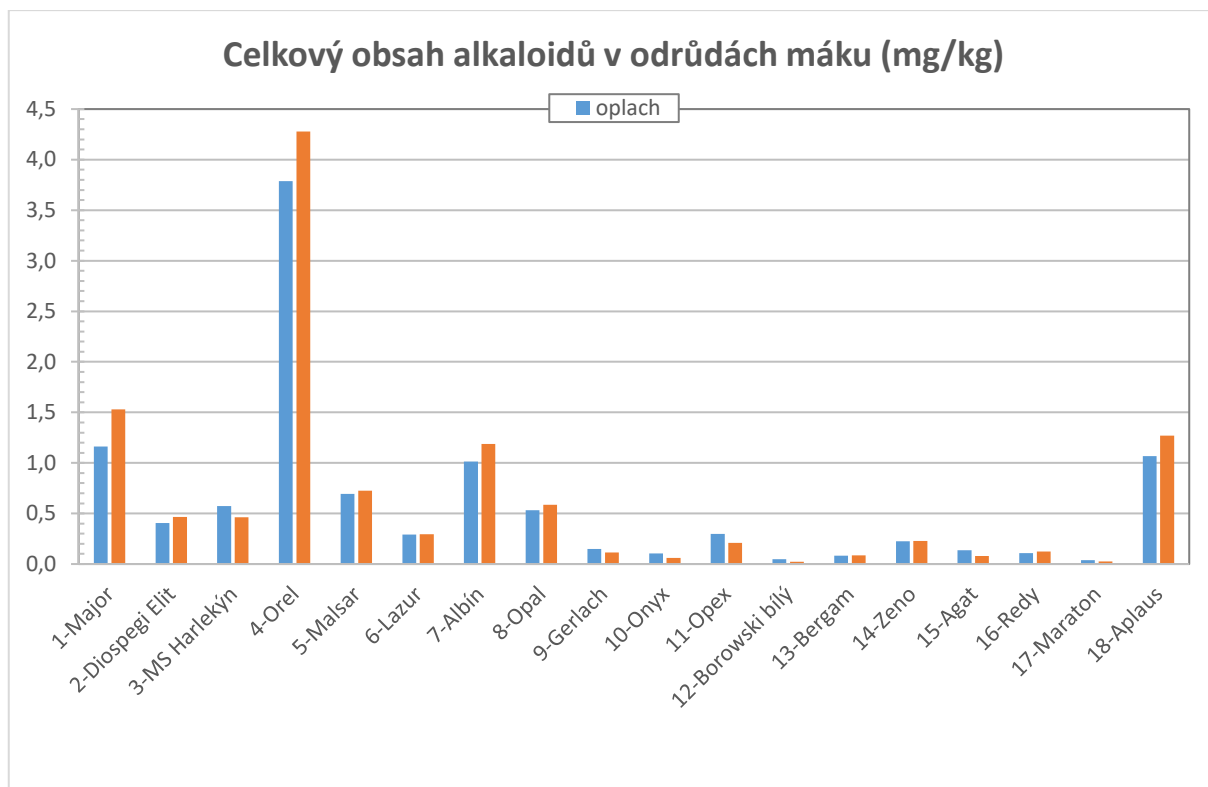
Největší obsah noskapinu je v odrůdě Orel. Druhý největší obsah noskapinu má odrůda Albín, třetí největší obsah má odrůda Major. Stopový obsah noskapinu je v odrůdách: Aplaus, Borowski bílý, Opex, Bergam, Agat, Maraton, Onyx a MS Harlekýn.



**Obrázek 12** Graf zobrazující obsah všech alkaloidů v odrůdách máku získaných oplachem



**Obrázek 13** Graf zobrazující obsah všech alkaloidů v odrůdách máku získaných mletím semen



**Obrázek 14** Graf zobrazující celkový obsah alkaloidů v odrůdách máku

Na obrázku 12 a 13 jsou zobrazena zastoupení jednotlivých alkaloidů v odrůdách máku. Obrázek 12 zobrazuje hodnoty, které byly získány oplachem ze semen. Obrázek 13 ukazuje hodnoty, které byly získány po rozemletí semen máku. Každá odrůda má jiné obsahy jednotlivých alkaloidů a i celkový obsah všech těchto alkaloidů (morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapiin). Ačkoliv mezi způsoby přípravy vzorků (oplach/ rozemletí) není statisticky významný rozdíl, tak se ukázalo, že po rozemletí jsou výsledky většinou větší, někdy stejné, protože každý vzorek odrůdy je originál a je nehomogenní. Semena mohou být různě kontaminována, někde byly kousky makoviny a záleží tedy na odběru vzorku k vyhodnocení.

Obrázek číslo 14 zobrazuje celkový obsah alkaloidů v jednotlivých odrůdách u obou typů přípravy vzorků. Z tohoto obrázku můžeme vidět, že největší obsah alkaloidů má odrůda Orel, která při mletí semen má obsah 4,28 mg/kg a po oplachu ze semen obsahuje 3,79 mg/kg. Druhý největší obsah alkaloidů má odrůda Major, která po oplachu obsahuje 1,16 mg/kg a při rozemletí semen obsahuje 1,53 mg/kg. Třetí největší obsah alkaloidů má odrůda Aplaus, která po oplachu ze semen obsahuje 1,07 mg/kg a po rozemletí semen obsahuje 1,27 mg/kg. Nejmenší obsah alkaloidů mají tyto odrůdy: Gerlach, Onyx, Opex, Borowski bílý, Bergam, Zeno, Agat, Redy a Maraton.

Zajímavostí je, že odrůda Orel vyniká v obsahu všech alkaloidů kromě thebainu, kde má největší obsah odrůda Aplaus.

Všechny zkoumané odrůdy patří mezi mák, který se používá k potravinářským účelům, a proto jsou jejich obsahy alkaloidů nízké. Všechny tyto odrůdy splňují maximální limit, který je 25 mg/kg daný vyhláškou č. 399/2013 Sb.

## 6 Diskuze

V předchozí kapitole (kapitola 5 výsledky) můžeme v tabulkách 1 a 2 a na obrázcích číslo 7 až 14 vidět obsah jednotlivých alkaloidů v jednotlivých konkrétních odrůdách máku a také celkový obsah alkaloidů v odrůdách. Podle literatury mezi vysokoobsahové (nad 1 mg/kg) odrůdy patří: Orel, Major, Aplaus, Albín. Mezi nízkoobsahové (pod 1 mg/kg) odrůdy patří: Diospegi Elit, MS Harlekýn, Malsar, Lazur, Albín, Opal, Gerlach, Onyx, Opex, Borowski bílý, Bergam, Zeno, Agat, Redy a Maraton.

Dle naměřených výsledků má největší obsah alkaloidů odrůda Orel, která po oplachu semen obsahuje 3,79 mg/kg a po rozemletí semen obsahuje 4,28 mg/kg. Druhý největší obsah má odrůda Major, a to po oplachu 1,16 mg/kg a po rozemletí má 1,53 mg/kg. Třetí největší obsah alkaloidů má odrůda Aplaus, která po oplachu obsahuje 1,07 mg/kg a po rozemletí má 1,27 mg/kg. Čtvrtý největší obsah má odrůda Albín s obsahem 1,01 mg/kg po oplachu semen a po rozemletí má 1,19 mg/kg. Podle těchto hodnot můžeme říct, že všechny naše zkoumané odrůdy splňují vyhlášku č. 399/2013 Sb., která stanovuje nejvyšší přípustný obsah morfinanů potravinářského máku na povrchu semen na 25 mg/kg.

Podle tabulek číslo 1 a 2 a obrázků 7 až 14 můžeme vidět, že obsah jednotlivých alkaloidů se v odrůdách liší. Z výsledků je patrné, že odrůdy máku se liší na obsah alkaloidů. Podle statistického zhodnocení způsobu přípravy semen není statisticky významný rozdíl mezi oplachem semen a rozemletím. To je způsobeno tím, že alkaloidy nejsou obsaženy v semenech máku, ale semena jsou pokryta opiem z makoviny, ve kterém jsou alkaloidy obsaženy. U 18 zkoumaných odrůd jsme naměřili nejvyšší obsah alkaloidu thebainu. Nejméně zastoupeným alkaloidem napříč všemi odrůdami byl papaverin.

Morfin se ve zkoumaných odrůdách pohybuje po oplachu semen v rozmezí od 0,001 mg/kg (Diospegi Elit) do 0,36 mg/kg (Orel). Po rozemletí se pohybuje od 0,002 mg/kg (Diospegi Elit) do 0,81 mg/kg (Orel). Kodein ve zkoumaných vzorcích po oplachu semen se pohybuje v rozmezí od 0,002 mg/kg (Maraton) do 0,37 mg/kg (MS Harlekýn). Po rozemletí semen se množství kodeinu pohybuje mezi 0,002 mg/kg (Borowski bílý) a 0,55 mg/kg (Orel). Množství thebainu po oplachu semen je v rozmezí 0,015 mg/kg (Albín) až 0,81 mg/kg (Aplaus). Množství thebainu po rozemletí semen se pohybuje v rozmezí 0,01 mg/kg (Albín) do 0,65 mg/kg (Aplaus). Papaverin je ve vzorcích obsažen v množství od 0,001 mg/kg (Bergam) do 0,91 mg/kg (Orel) po oplachu semen. Po rozemletí semen se obsah papaverinu pohybuje mezi 0,0004 mg/kg (Aplaus) a 0,94 mg/kg (Orel). Množství noskapinu ve vzorcích je v rozmezí 0,0025 mg/kg (Borowski bílý) do 1,85 mg/kg (Orel) po oplachu semen. Po rozemletí semen je množství noskapinu od 0,0007 mg/kg (Borowski bílý) do 1,6 mg/kg (Orel).

Časopis Výživa a potraviny uvádí, že Státní zemědělská a potravinářská inspekce provedla výzkum, kde stanovili průměrný obsah alkaloidů v máku pěstovaném v České republice a prodávaném v tržní síti. Výsledky analytických měření říkají, že průměrný obsah morfinu byl 6,0 mg/kg, průměrný obsah kodeinu byl 0,67 mg/kg, průměrný obsah papaverinu byl 0,18 mg/kg a průměrný obsah noskapinu byl 0,3 mg/kg (Kubík & Cuhra 2015). Z toho můžeme vidět, že naše hodnoty se velmi odlišují. Naše maximální naměřená hodnota morfinu je desetkrát menší než jejich průměrná hodnota. Naše maximální hodnota obsahu kodeinu je o polovinu

menší než jejich průměrná hodnota. Námi naměřený nejvyšší obsah papaverinu je skoro desetkrát větší než jejich průměrná hodnota. U noskapinu je naše největší naměřená hodnota šestkrát větší než jejich průměrná hodnota. Od roku 2015 se úprava a čištění máku mohlo změnit. U našich vzorků mohlo dojít k tomu, že semínka se analyzovala také s částí makoviny, což mohlo způsobit vyšší hodnoty. Vzhledem k tomu, že v článku nebyly zmíněny konkrétní zkoumané odrůdy máku, není možné přímo porovnat naše naměřené hodnoty alkaloidů, jelikož autoři mohli využít ke studii vysokoobsahové odrůdy máku, a proto oproti nám mají tak vysoké průměrné hodnoty. Naše nízké průměrné hodnoty mohly být také způsobeny složitou přípravou vzorků, kde nemusela být část množství alkaloidů vyizolována, ale vzhledem k tomu, že množství alkaloidů po oplachu a rozemletí se výrazně neliší, tak to není moc pravděpodobné.

## 7 Závěr

Cílem práce bylo vyvinout metodu HPLC-MS ke stanovení obsahu alkaloidů v semech máku. Tuto metodu jsme zvalidovali a určili hodnoty meze detekce a kvantifikace. Odezva detektoru (kalibrace metody) je lineární. U přípravy vzorků semen k samotnému stanovení jsme použili dva způsoby. První způsob byl oplachem, to znamená, že semena zůstala celá. Jako druhý způsob jsme použili rozemletí semen na elektrickém mlýnku. Porovnáním naměřeného množství alkaloidů jsme zjistili, že mezi těmito dvěma způsoby přípravy vzorků není statisticky významný rozdíl. Je to způsobeno tím, že samotná semena alkaloidy neobsahují, ale jsou potřísněna opiem a znečištěna zbytkovou makovinou, která alkaloidy obsahuje.

K analýze obsahu alkaloidů v semenech máku bylo použito 18 vzorků odrůd potravinářského máku, který pochází od malovýrobců z České republiky.

Podle naměřených hodnot alkaloidů zkoumaných vzorků můžeme potvrdit hypotézu, že odrůda má vliv na obsah alkaloidů. Každá odrůda se lišila v jednotlivém zastoupení morfinu, kodeinu, thebainu, noskapinu a papaverinu. I když semena alkaloidy neobsahují, tak jejich množství po rozemletí semen bylo v některých případech vyšší. To mohlo být způsobeno zanesením makoviny do vzorků semen při odběru, nebo je to otázka toho, jak moc byla semena potřísněná opiem makoviny v celém vzorku.

Celkově nejvyšší množství alkaloidů měla odrůda Orel (3,79 mg/kg po oplachu a 4,28 mg/kg při rozemletí). Odrůda s druhým nejvyšší hodnotou alkaloidů byla Major (1,16 mg/kg po oplachu a 1,53 mg/kg po rozemletí). Třetí nejvyšší množství jsme naměřili v odrůdě Aplaus (1,07 mg/kg po oplachu a 1,27 mg/kg po rozemletí). Ostatní odrůdy měly i méně než 1 mg/kg alkaloidů. Proto můžeme říci, že všechny zkoumané odrůdy splnily limit daný vyhláškou č. 399/2013 Sb. Kdyby došlo ke zpřísnění této maximální hodnoty, ostatní zkoumané odrůdy by byly schopny splnit i limit 1 mg/kg.

Touto prací jsme také ověřili, že je možné tuto vyvinutou metodu použít pro kvalitativní a kvantitativní kontrolu máku setého.



## 8 Literatura

- Aniszewski T. 2007. Alkaloids - Secrets of Life: Elsevier Science & Technology, Amsterdam, The NETHERLANDS. Available from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=291689> (accessed August 25, 2020).
- Aragón-Poce F, Martínez-Fernández E, Márquez-Espinós C, Pérez A, Mora R, Torres LM. 2002. History of opium. *International Congress Series* **1242**:19–21.
- Bagheri M, Taheri M, Farhadpour M, Rezadoost H, Ghassempour A, Aboul-Enein HY. 2017. Evaluation of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases for analysis of opium alkaloids. *Journal of Chromatography A* **1511**:77–84.
- Barceloux DG. 2012. *Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants*, 1st edition. John Wiley & Sons, Incorporated, New York, UNITED STATES. Available from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=693572> (accessed August 26, 2020).
- Bentley KW. 1954. *The Chemistry of the Morphine Alkaloids*. Clarendon Press Oxford.
- Bhat SV, Nagasampagi BA, Sivakumar M. 2005. *Chemistry of Natural Products*. Springer Verlag, Berlin.
- Brant V, Šmöger J, Čejka J, Kroulík M, Ryčl D, Kunte J. 2010. Mák. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Cao Q, Li S, He C, Li K, Liu F. 2007. Extraction and determination of papaverin in pericarpium papaveris using aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol)–(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **590**:187–194.
- Carlin MG, Dean JR, Ames JM. 2020. Opium Alkaloids in Harvested and Thermally Processed Poppy Seeds. *Frontiers in Chemistry* **8**. Frontiers. Available from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00737/full> (accessed November 26, 2020).
- Český statistický úřad. 2020, November 1. Available from <https://www.czso.cz/> (accessed November 1, 2020).
- Chen C-C et al. 2020. Structural insights into thebaine synthase 2 catalysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **529**:156–161.
- Chen X, Dang T-TT, Facchini PJ. 2015. Noscapine comes of age. *Phytochemistry* **111**:7–13. Pergamon.
- Dasgupta A. 2020. Chapter 1 - Crude Opium, Morphine, Codeine, and Heroin: Past and Present. Pages 1–15 in A. Dasgupta, editor. *Fighting the Opioid Epidemic*. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128200759000016> (accessed February 6, 2021).
- Davis MP, Glare PA, Hardy J, Quigley C. 2009. *Opioids in Cancer Pain*. Oxford University Press, Oxford, UNITED KINGDOM. Available from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=975667> (accessed November 8, 2020).
- Doležal M. 2013. *Farmaceutická Chemie Léčiv Působících Na Centrální Nervový Systém*. Karolinum Press, Prague, CZECH REPUBLIC. Available from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=1996709> (accessed November 10, 2020).
- EFSA. 2011. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal* **9**:2197.
- Eisenreich A, Sachse B, Gürtler R, Dusemund B, Lindtner O, Schäfer B. 2020. What do we know about health risks related to thebaine in food? *Food Chemistry* **309**:125564.
- Fusi F, Manetti F, Durante M, Sgaragli G, Saponara S. 2016. The vasodilator papaverine stimulates L-type Ca<sup>2+</sup> current in rat tail artery myocytes via a PKA-dependent mechanism. *Vascular Pharmacology* **76**:53–61.

- Gaweda G, Iyer RP, Shaver PR, Grilo GA, Dinkins M-L, Stoffel HJ, Clemens S, de Castro Brás LE. 2020. Dopamine receptor D3 agonist (Pramipexole) reduces morphine-induced cardiac fibrosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **529**:1080–1085.
- Green TC, Doe-Simkins M. 2016. Opioid overdose and naloxone: The antidote to an epidemic? *Drug and Alcohol Dependence* **163**:265–271. Elsevier.
- Guan S, Liu Q, Gu H, Zhang Y, Wei P, Qi Y, Liu J, Wang Z. 2020. Pluripotent anti-inflammatory immunomodulatory effects of papaverine against cerebral ischemic-reperfusion injury. *Journal of Pharmacological Sciences* **144**:69–75.
- Guguta C, Peters ThPJ, de Gelder R. 2008. Structural Investigations of Hydrate, Anhydrate, Free Base, and Hydrochloride Forms of Morphine and Naloxone. *Crystal Growth & Design* **8**:4150–4158. American Chemical Society.
- Havel J et al. 2018. Pěstitelská technologie máku pro snížení rizikovosti pěstování: certifikovaná metodika1. Zubří.
- Hejny S, Slavík B. 1997. Květena České republiky 1, 1997th edition. Academia, Praha.
- Howard S, Howard SG. 2014. *Drugs of Abuse: Pharmacology and Molecular Mechanisms*, 1st edition. John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken, UNITED STATES. Available from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=1638687> (accessed November 20, 2020).
- Kadereit JW. 1988. Sectional affinities and geographical distribution in the genus *Papaver* L. (*Papaveraceae*). *Beitrage zur Biologie der Pflanzen*:139–156.
- Kavina K. 1940. *Naučný slovník přírodních věd pro školu a dům*. Slovenské nakladatelství Josef Elstner, Praha.
- Koskinen AMP. 2012. *Asymmetric Synthesis of Natural Products*, 2nd edition. John Wiley & Sons, Incorporated, Lincolnshire, UNITED KINGDOM. Available from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=945111> (accessed August 26, 2020).
- Kries H, O'Connor SE. 2016. Biocatalysts from alkaloid producing plants. *Current Opinion in Chemical Biology* **31**:22–30. Elsevier Current Trends.
- Kubík M, Cuhra P. 2015. Mák a opiáty - zkušenosti SZPI s kontrolou máku:2.
- Laryšová A, Endlová L, Vrbovský V, Navrátilová Z. 2015. ANALÝZA ALKALOIDŮ V MAKOVINĚ METODOU VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE. *Chem. Listy*:6.
- López P, Pereboom-de Fauw DPKH, Mulder PPJ, Spanjer M, de Stoppelaar J, Mol HGJ, de Nijs M. 2018. Straightforward analytical method to determine opium alkaloids in poppy seeds and bakery products. *Food Chemistry* **242**:443–450.
- Mák setý - ELITA semenářská, a.s. (n.d.). Available from <http://www.elita.cz/mak-sety-22> (accessed March 13, 2021).
- Mák setý – ONYX - Osiva - PRO SEEDS s.r.o. - ryze česká osivářská společnost. (n.d.). Available from <http://www.proseeds.cz/onyx/> (accessed March 13, 2021).
- Martínez MA, Ballesteros S. 2019. Opium poisoning in modern times. An overview. *Forensic Science International* **302**:109848. Elsevier.
- Miller RJ, Tran PB. 2000. More mysteries of opium reveal'd: 300 years of opiates. *Trends in Pharmacological Sciences* **21**:299–304.
- Ministerstvo zemědělství. 2013. Vyhláška č. 399/2013 Sb., kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 329/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro škrob a výrobky ze škrobu, luštěniny a olejnatá semena, ve znění vyhlášky č. 418/2000 Sb. Pages 6838–6843 *Sbírka zákonů České republiky*.
- Moffat AC, Osselton DM, Widdop B, Watts J. 2011. *Clarke's analysis of drugs and poisons*4. Pharmaceutical Press, London.

- Nemati F, Salehi P, Bararjanian M, Hadian N, Mohebby M, Lauro G, Ruggiero D, Terracciano S, Bifulco G, Bruno I. 2020. Discovery of noscapine derivatives as potential  $\beta$ -tubulin inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **30**:127489.
- Novák J, Preininger V. 1981. Taxonomické a fytochemické hodnocení rodu *Papaver* (Papaveraceae). Vysoká škola zemědělská, Praha.
- Odrůdy máku a jejich výsledky. 2001. Available from <https://www.uroda.cz/odrudy-maku-a-jejich-vysledky/> (accessed March 13, 2021).
- Odrůdy MÁKU SETÉHO. 2021. Available from <http://www.labris.cz/odrudy-maku-seteho> (accessed March 13, 2021).
- Pennings FA, Albrecht KW, Muizelaar JP, Schuurman PR, Bouma GJ. 2009. Abnormal Responses of the Human Cerebral Microcirculation to Papaverin During Aneurysm Surgery. *Stroke* **40**:317–320.
- Phillipson JD, Roberts MF, Zenk MH, editors. 1985. *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Available from <https://www.springer.com/gp/book/9783642701306> (accessed November 7, 2020).
- Quesada-Moraga E, Muñoz-Ledesma FJ, Santiago-Álvarez C. 2009. Systemic Protection of *Papaver somniferum* L. Against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an Endophytic Strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Environmental Entomology* **38**:723–730.
- Reid RG, Durham DG, Boyle SP, Low AS, Wangboonskul J. 2007. Differentiation of opium and poppy straw using capillary electrophoresis and pattern recognition techniques. *Analytica Chimica Acta* **605**:20–27. Elsevier.
- Roayaei P, Aminorroaya A, Vasheghani-Farahani A, Oraili A, Sadeghian S, Poorhosseini H, Masoudkabar F. 2020. Opium and cardiovascular health: A devil or an angel? *Indian Heart Journal*. Elsevier. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001948322030256X> (accessed November 22, 2020).
- Rodgers HM, Lim S-A, Yow J, Dinkins M-L, Patton R, Clemens S, Brewer KL. 2020. Dopamine D1 or D3 receptor modulators prevent morphine tolerance and reduce opioid withdrawal symptoms. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **194**:172935.
- Segal MS, Goldstein MM, Attinger EO. 1957. The Use of Noscapine (Narcotine) as an Antitussive Agent. *Diseases of the Chest* **32**:305–309.
- Staněk J. 1957. *Alkaloidy* Praha. Nakladatelství Československé akademie věd.
- Státní ústav pro kontrolu léčiv. 2020, November 17. Available from <http://www.sukl.cz/> (accessed November 17, 2020).
- Stokes T. 2001. Opium-free poppy. *Trends in Plant Science* **6**:1 strana.
- Taskiran AS, Avci O. 2020. Effect of captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, on morphine analgesia and tolerance in rats, and elucidating the inflammation and endoplasmic reticulum stress pathway in this effect. *Neuroscience Letters*:135504.
- Tu H, Chu H, Guan S, Hao F, Xu N, Zhao Z, Liang Y. 2020. The role of the M1/M2 microglia in the process from cancer pain to morphine tolerance. *Tissue and Cell*:101438.
- Typy máku – Český modrý mák. 2020, November 1. Available from <https://ceskymodry-mak.cz/cs/mak/druhy-maku> (accessed November 1, 2020).
- Xu R, Ye Y, Zhao W. 2011. *Introduction to Natural Products Chemistry*, 1st edition. Taylor & Francis Group, Baton Rouge, UNITED STATES. Available from <http://ebookcentral.proquest.com/lib/czup/detail.action?docID=1446287> (accessed August 26, 2020).
- Zentai A, Sali J, Szeitzné-Szabó M, Szabó IJ, Ambrus Á. 2012. Exposure of consumers to morphine from poppy seeds in Hungary. *Food Additives & Contaminants: Part A* **29**:403–414. Taylor & Francis.

## 9 Seznam použitých zkratk a symbolů

C	uhlík
CIMAP	Central Institute of Medical and Aromatic Plants (Ústřední ústav léčivých a aromatických rostlin)
CNS	Centrální nervový systém
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotností detekcí
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce