

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Michaela Gállová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Mak siaty ako prírodný zdroj ópiových alkaloidov

Michaela Gállová

Bakalárska práca

2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela Gállová**
Osobní číslo: **C15207**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Mak siaty ako prírodný zdroj ópiových alkaloidov**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Urobte literárnu rešerš zaoberajúcou sa alkaloidmi obsiahnutými v Maku siatom, ich chemickým zložením, vlastnosťami a využitím v praxi. Zamerajte sa aj na možnosti extrakcie týchto alkaloidov. Následne venujte pozornosť kvantitatívnej stanoveniu daného materiálu.
2. Závěry kriticky zhodnoťte

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Tomáš Bajer, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, predovšetkým so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzavretie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že ak dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorení diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smerníc Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práca zverejnená v Univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

Súhlasím s prezenčným sprístupnením svojej práce v Univerzitnej knižnici.

V Pardubiciach dňa 4. 7. 2018

.....

Michaela Gállová

Pod'akovanie:

Rada by som sa poďakovala vedúcej tejto bakalárskej práce doc. Ing. Petre Bajerovej, Ph.D., za ochotu, cenné rady, ktoré mi boli veľkým prínosom pri vypracovávaní tejto práce a najmä za trpezlivosť a vždy láskavý prístup.

ANOTÁCIA

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo štúdium ópiových alkaloidov obsiahnutých v maku siatom (*Papaver somniferum*). Práca je zameraná na ich chemické a fyzikálne vlastnosti, biosyntézu či metabolizmus. Uvedené sú tiež rôzne typy extrakčných techník týchto alkaloidov z rastlinných aj biologických materiálov. Nakoniec, v poslednej časti sú vyhodnotené možnosti kvantitatívnej analýzy.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Ópiový mak, benzylizochinolínové alkaloidy, opioidy, extrakčné techniky, kvantitatívna analýza

TITLE

Opium poppy as a natural source of opium alkaloids

ANNOTATION

The aim of this bachelor thesis was the study of opium alkaloids contained in opium poppy (*Papaver somniferum*). The thesis is focused on their chemical and physical characteristic, biosynthesis and metabolism. Various types of extraction techniques of these alkaloids from plant and biological materials are also mentioned. Finally, the possibilities of quantitative analysis are evaluated in the last part.

KEYWORDS

Opium poppy, benzyloisoquinoline alkaloids, opioids, extraction techniques, quantitative analysis

Obsah

0	ÚVOD.....	14
1	MAK SIATY	15
1.1	Ópium získavané z maku siateho.....	15
1.1.1	História ópia vo svete	15
1.2	Morfologická charakteristika	17
1.2.1	Koreň	17
1.2.2	Hypokotyl	17
1.2.3	Listová ružica.....	18
1.2.4	Stonka	18
1.2.5	Listy	18
1.2.6	Púčik	18
1.2.7	Kvet.....	18
1.2.8	Plod	18
1.2.9	Semená.....	19
1.3	Biologická charakteristika.....	19
1.3.1	Pestovanie maku na Slovensku a vo svete.....	20
2	ALKALOIDY	21
2.1	Sekundárne metabolity u rastlín.....	21
2.2	Biologická charakteristika a vlastnosti alkaloidov.....	21
2.3	Klasifikácia alkaloidov.....	22
2.3.1	Pravé alkaloidy	23
2.3.2	Protoalkaloidy	24
2.3.3	Pseudoalkaloidy	24
3	BENZYLIZOCHINOLÍNOVÉ ALKALOIDY OBSIAHNUTÉ V MAKU SIATOM....	25
3.1	Základná charakteristika	25
3.2	Biosyntéza BIAS.....	25
3.2.1	Využitie iných zdrojov pre syntézu kodeínu a morfínu.....	28
3.3	Opioidy.....	29
3.3.1	Distribúcia opioidov	29
3.3.2	Mechanizmus účinku prostredníctvom receptorov.....	29
3.3.3	Eliminácia opioidov z organizmu	30
3.3.4	Farmakokinetická interakcia liečiv opioidnej povahy.....	31
3.4	Chemické vlastnosti ópiových alkaloidov v maku siatom.....	31
3.5	Morfín	32

3.5.1	Chemické a fyzikálne vlastnosti	32
3.5.2	Biotransformácia.....	33
3.5.3	Eliminácia	33
3.5.4	Analgetický účinok	33
3.5.5	Negatívny vplyv na hepatálny a renálny systém	34
3.5.6	Negatívny vplyv na imunitu hostiteľa	34
3.6	Kodéin.....	35
3.6.1	Chemické a fyzikálne vlastnosti	35
3.6.2	Biotransformácia.....	35
3.6.3	Eliminácia	35
3.6.4	Antitusický účinok.....	36
3.6.5	Využitie v liečbe bolesti	36
3.6.6	Negatívne pôsobenie na renálny a hepatálny systém.....	36
3.7	Papaverín.....	37
3.7.1	Chemické a fyzikálne vlastnosti	37
3.7.2	Využitie vazodilatačných schopností.....	37
3.8	Thebaín.....	38
3.8.1	Chemické a fyzikálne vlastnosti	38
3.8.2	Úloha markeru pri nelegálnom užívaní opiátov	38
3.9	Noscapín.....	38
3.9.1	Chemické a fyzikálne vlastnosti	38
3.9.2	Využitie ako charakteru antitumorovej látky.....	39
4	KVANTITATÍVNA ANALÝZA BIAS V BIOLOGICKÝCH A RASTLINNÝCH MATERIÁLOCH	40
4.1	Extrakcia	40
4.1.1	Extrakcia kvapalina-kvapalina.....	40
4.1.2	Mikroextrakcia kvapalnou fázou	40
4.1.3	Disperzná kvapalinová mikroextrakcia	41
4.1.4	Elektromembránová extrakcia	42
4.1.5	Extrakcia tuhou fázou	42
4.1.6	Ultrazvuková extrakcia	43
4.1.7	QuEChERS extrakcia	44
4.2	Derivatizácia	45
4.3	Chromatografické metódy.....	45
4.3.1	Plynová chromatografia.....	46

4.3.2	Kvapalinová chromatografia.....	46
4.3.3	Hmotnostná spektrometria v spojení s chromatografickými metodami	48
5	SÚHRNNÉ TABULKY	49
6	ZÁVER	51
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	52

Zoznam tabuliek a obrázkov

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Biosyntéza BIAs v maku siatom [24]	28
Obrázok 2: Aktivácia receptorov vplyvom príslušného opioidu [33]	30
Obrázok 3: Princíp prevedenia DLLME [73]	41
Obrázok 4: Scéma vybavenia pre EME [68]	42
Obrázok 5: Typy prevedenia SPE [76]	43

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Klasifikácia Alkaloidov na základe prekursorov [17]	22
Tabuľka 2: Štruktúra a popis jednotlivých alkaloidov v maku siatom	32
Tabuľka 3: Izolácia a detekcia BIAs v biologickom materiále	49
Tabuľka 4: Izolácia a detekcia BIAs v rastlinnom materiále	50

Zoznam skratiek a značiek

BIAs	benzylizochinolínové alkaloidy
AK	aminokyselina
MW	molekulová hmotnosť
Mf	molekulový vzorec
CAS	registračné číslo; Chemical Abstracts Service
EDTA	etyléndiaminotetraoctová kyselina
DDI	interakcia liečivo-liečivo
ADRs	nepriaznivé reakcie medzi liekmi
cAMP	cyklický adenzínmonofosfát
cGMP	cyklický guanzínmonofosfát
TNF	tumornekrotizujúci faktor
IL	interleukín
NK	prirodzené zabíjačské bunky; natural killers
LLE	extrakcia kvapalina – kvapalina
UAE	asistovaná ultrazvuková extrakcia
SPE	extrakcia tuhou fázou
EME	elektromembránová extrakcia
DLLME	disperzná kvapalinová mikroextrakcia
QuEChERS	rýchla, jednoduchá, lacná, efektívna, robustná a bezpečná
MF	mobilná fáza
SF	stacionárna fáza
LC	kvapalinová chromatografia
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HPLC-UV/VIS	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s detekciou v ultrafialovej a viditeľnej oblasti
UPLC	ultra účinná kvapalinová chromatografia
RPLC	kvapalinová chromatografia s reverznými fázami
TLC	tenkovrstvová kvapalinová chromatografia
PC	papierová chromatografia

GC	plynová chromatografia
GC-MS	plynová chromatografia s hmotnostnou detekciou
MS	hmotnostná spektrometria
m/z	pomer hmotnosti k náboju iónu
LC-MS/MS	kvapalinová chromatografia s hmotnostnou detekciou v tandemovom usporiadaní
CE	kapilárna elektroforéza
LOQ	limit stanoviteľnosti
LOD	limit detekcie

0 ÚVOD

Táto práca je zameraná na päť základných alkaloidov, ktorých najvýznamnejším zdrojom je mak siaty (*P. somniferum*). Dozretím tejto rastliny sa získava ópium, surová zmes mnohých rôznych chemických látok obsiahnutých v šľave makovice ópiového maku. Používanie maku ako zdroja ópia je ľudstvu známe už odnepamäti, ako to dokazujú aj mnohé archeologické nálezy z doby 3000 rokov p. n. l. [1]. Pôvod ópia dodnes nie presne známy, no každá krajina má svoju legendu. Táto látka sa kedysi používala na navodenie spánku a tlmenie bolesti. No od prelomu 20. storočia slúži už len ako východisková zlúčenina pre ďalšiu izoláciu a spracovanie týchto farmaceuticky významných alkaloidov. Za introdukciou maku do Európy stoja obchodníci z arabských krajín [2].

Pestovanie maku má už dlhodobú tradíciu. V krajinách akými sú Slovensko alebo Česko, má mak uplatnenie najmä pre cukrárenské a potravinárske účely, vďaka svojmu vysokému obsahu oleja v semenách. Potom sú krajiny, ktoré preferujú pestovanie maku pre už spomínané farmaceutické účinky. No dlhodobé užívanie ópia spôsobuje závislosť a rôzne nepriaznivé účinky, z tohto dôvodu je v mnohých krajinách pestovanie maku považované za nelegálne.

Cieľom tejto práce bolo poukázať na využitie hlavných alkaloidov obsiahnutých v maku siatom najmä vo farmaceutickom priemysle. V jednotlivých podkapitolách sú podrobne rozobrané ich chemické a fyzikálne vlastnosti, biosyntéza v maku siatom ale aj ich priaznivé a negatívne účinky na organizmus. Pri opioidných alkaloidoch je popísaný aj ich metabolizmus prebiehajúci prednostne v pečeni a nakoniec eliminácia z organizmu. Účinok týchto alkaloidov sa prejaví aktiváciou príslušného opioidného receptora. Posledná kapitola poukazuje na možnosti izolácie týchto alkaloidov z biologických materiálov aj z rastlinných preparátov rôznymi extrakčnými technikami. Na záver sú spomenuté možnosti ich detekcie pomocou chromatografických separačných metód.

1 MAK SIATY

Mak siaty je jednoročná rastlina vysoká 1 – 1,5 m s modro-zelenými listami a okvetnými lístkami, ktoré môžu nadobúdať bielu, fialovú alebo ružovú farbu v závislosti na odrode. Mak siaty je predovšetkým významná priemyselná plodina, ktorá samozrejme nachádza využitie nielen v potravinárskom, kozmetickom, ale aj vo farmaceutickom odvetví. Vo všeobecnosti má pestovanie maku už dlhoročnú tradíciu, najmä kvôli prirodzenej tvorbe ópia [3, 4].

1.1 Ópium získavané z maku siateho

Ópium je surová zmes mnohých rôznych chemických látok obsiahnutých v šťave makovice maku siateho. Keď je táto makovica zrelá, vytvoria sa v nej zárezy, z ktorých vyteká mliečna šťava alebo "latex". Pri nahromadení latexu a uschnutí na vzduchu, vytvára tmavú, lepkavú hmotu hnedej farby, ktorá je známa ako surové ópium [5].

Opiáty môžu byť zaradené do troch nasledujúcich kategórii. Prvá je tvorená makovými alkaloidmi, vrátane morfinu, kodeínu, thebaínu, noskapínu a papaverínu, ktoré budú ďalej podrobne rozobrané. Druhá zahŕňa najmä polo-syntetické alebo syntetické deriváty morfinu, napríklad folkodín, ethylmorfin, ktoré sa používajú pri liečbe ako antitusiká a analgetiká. Do poslednej kategórie sa radia omamné látky, akými sú diacetylmorfin (heroín) a metadón, zvyčajne používaný ako substituent pri liečbe závislosti [6].

Na lekárske účely sa toto surové ópium ďalej suší pri 60 °C, v práškovej forme sa chemicky testuje, aby sa zabezpečil obsah najmenej 10 % morfinu z celkovej hmotnosti. Čo sa týka nelekárskeho účelu, tak je ópium najčastejšie iba východiskovým materiálom, z ktorého sa extrahuje a prečisťuje (purifikuje) morfin, kodeín a iné alkaloidy. Na nelekárske použitie, či už sa jedná o konzumáciu alebo fajčenie, je surové ópium varené vo vode niekoľko hodín kvôli odstráneniu nerozpustných materiálov a potom sa nechá odpariť, čím vznikne lepkavá forma známa ako „pripravené ópium“ [5].

1.1.1 História ópia vo svete

Jedným z najstarších a pravdepodobne najsilnejších analgetík je bezpochyby ópium. Používanie maku ako zdroja ópia je ľudstvu známe už odnepamäti, čo dokazujú najmä archeologické nálezy z doby 3000 rokov p. n. l. alebo zmienky o *gil hul* (rastlina radosti) vyryté na starosumerských hlinených tabuľkách [2, 1]. Za najstarší písomný záznam o zbere ópia za včasného rána do hlinených nádob pomocou malých kovových nožíkov, sa považujú záznamy datované do obdobia približne 2000 rokov p. n. l. pôvodom zo starovekej Asýrie. Účinky tejto látky poznali aj v starovekom Egypte; tam je ale tento objav pripisovaný Thovtovi,

bohu múdrosti, písma a mesiaca. Pôvodne ako zdroj ópia slúžil mak vlčí (*Papaver rhoeas* L.), lenže obsah morfinu v latexe je omnoho menší než v maku siatom. Od doby panovania vtedajšieho faraóna Thutmose IV. (1397 – 1388 p. n. l.) Egypťania v meste Théby po celé storočia produkovali *Opium thebaicum*, slávne práve pre svoj vysoký obsah morfinu [1].

Antický Rím a Grécko majú taktiež svoje miesto v histórii pestovania a kultivácie maku. Každá civilizácia si vytvárala svoj vlastný mýtus spojený s ópiom. Predpokladá sa, že toto pomenovanie pochádza z gréckeho slova „opos“ (šťa) a „opion“ (makový odvar). Za rozvojom ópia v antickom svete stoja rôzne mytologické postavy zobrazované s makovicami; ako príklad možno uviesť sošku minojskej bohyně spánku, ktorá má na hlave korunu z makovic (1300 p. n. l.). Grécki bohovia akými sú Hypnos, boh spánku, či boh smrti Thanatos, sú pravidelne zobrazovaní so zväzkom makovic. Podobne nachádzame zmienky o ópiu aj v Homérových eposoch, kde je opisované ako omamná a bolesť utlmujúca substancia [1]. Arabská medicína pravdaže využívala ópium na svoje účely. Avicenna (980 – 1037) ópium taktiež uvádza vo svojom diele *Kánon medicíny*, ako liečivo slúžiace na všetky druhy bolesti. Práve arabskí obchodníci sú spájaní s príchodom maku do Indie, Číny a Európy [2].

Európa v čase stredoveku využívala ópium len na základe znalostí z predchádzajúcich storočí. Napriek tomu aj stredovek prispel k rozsahu využitia, a to najmä ako hypnotický, či analgetický prostriedok. Malo to prednostný význam hlavne v lekárstve pri chirurgických zákrokoch. V neskoršom období renesancie poskytol Paracelsus nový poznatok, že ópium sa omnoho ľahšie rozpúšťa v alkohole ako v dovtedy zaužívanom procese rozpúšťania vo vode. Samozrejme aj v období baroka ostalo ópium veľmi užitočným liečivom. Svedčí o tom aj publikácia nemeckého lekára Georga Wolfganga Wedela (1645 – 1721) s názvom *Opiológia*, v ktorej sa zaoberá spôsobom výroby ópia aj jeho farmaceutickým využitím [2].

Na prelome 18. a 19. storočia boli objavené rôzne problémy v súvislosti s ópiom. Najvýznamnejším bolo zneužívanie ópia ako drogy najmä v Anglicku. Samotnú kapitolu histórie ópia vytvára aj vtedajší masívny dovoz tejto látky do Číny, čo spôsobilo rapidný nárast počtu prípadov závislostí. Čína samozrejme chcela zredukovať množstvo ópia dovážaného do krajiny, čo viedlo k ópiovým vojnám a následnému podrobeniu Číny. Celkovo, v priebehu 19. storočia sa postupne od používania tejto látky na liečbu upúšťalo, jednak kvôli už spomínanej závislosti, ale aj vďaka novým technickým možnostiam pre izoláciu morfinu. Určitú úlohu tu samozrejme zohrali legislatívne zásahy. Napokon od začiatku 20. stor. ópium oficiálne ostalo len surovinou pre ďalšie spracovanie [2].

1.2 Morfológická charakteristika

Každá rastlina má stovky znakov morfológickej, histologickej, embryologickej, sérologickej, chemickej a genetickej povahy, ktoré sú potenciálne k dispozícii na vytvorenie klasifikácie rastlinnej ríše [7]. U rodu maku (*Papaver* L.) možno nájsť viac ako 100 popísaných druhov, ktoré boli ďalej roztriedené do viacerých kategórií. Podkladom pre členenie sú najmä morfológické znaky. S postupným rozvojom analytických technológií sa mak člení podľa spektra i množstva alkaloidov obsiahnutých v tobolkách [4].

Taxonomické zatriedenie maku siateho:

Ríša rastlín – *Regnum vegetabile (Plantae)*

Podríša: Telómové rastliny (Vyššie rastliny) – *Telomophyta*

Oddelenie: Rastliny semenné – *Spermatophyta*

Pododdelenie: Krytosemenné – *Angiospermatophytina*

Trieda: Magnóliokveté – *Magnoliopsida*

Rad: Makotvárne – *Papaverales*

Čeľaď: Makovité – *Papaveraceae*

Rod: Mak – *Papaver*

Rod maku sa ešte rozdeľuje do sekcií nasledovne: *Rhoeadium*, *Argemonidium*, *Papaver*, *Glauca*, *Meconidium*, *Pilosa*, *Macrantha*, *Meconella*, *Californicum*, *Carinatae*, *Horrida*

Druh: Mak siaty – *Papaver somniferum* L.

Názov druhu je odvodený od latinského slova „*somnus*“, čo znamená spánok. Toto pomenovanie veľmi dobre vystihuje pôsobenie prítomných alkaloidov [8]. V rámci tohto druhu ešte nachádzame členenie na dve podskupiny: mak olejný (*Papaver somniferum* L. subsp. *hortense*.) a mak ópiový (*Papaver somniferum* L. subsp. *somniferum*) [4].

1.2.1 Koreň

Mak vytvára koreň kolovitého tvaru, ktorý za priaznivých podmienok môže prenikať do väčších hĺbok. Tento kolovitý koreň vytvára veľké množstvo bočných koreňov, od ktorých ešte ďalej odstupujú vlásoknicové koreničky [4].

1.2.2 Hypokotyl

Je to časť medzi koreňovou a stonkovou časťou. Jeho charakteristickou vlastnosťou je sfarbenie, v prípade maku môže tvoriť škálu od bezfarebnej cez svetlo až po tmavofialovú

farbu. Počas hodnotenia 26 genotypov bolo pozorované, že prevládajúce sfarbenie je svetlofialové [4].

1.2.3 Listová ružica

Rozvoj začína už od počiatočného vytvorenia pravých listov. Doba trvania tejto fázy je taktiež ovplyvnená faktormi vonkajšieho prostredia. Je to približne 45 – 60 dní [4].

1.2.4 Stonka

Je pomerne mohutná a vo vnútri vyplnená dreňou. Pri stredoeurópskych odrodách sa jej dĺžka pohybuje v rozmedzí 1 – 1,8 metra. Časť stonky pod makovicou môže mať hladký povrch ako aj pokrytý chlpkami, čo je znakom pre posúdenie druhovej odlišnosti a registráciu nových odrôd [4].

1.2.5 Listy

Pri makovitých rastlinách sú listy rozdeľované na spodné, stredné a vrchné. Spodné vyrastajú na hlavnej stonke, stredné z bočných vetviacich sa stoniek a horné na bočných vetvách. Listy sa líšia tvarom, okrajmi, členením, sfarbením a aj intenzitou voskovej vrstvy [4].

1.2.6 Púčik

Púčiky maku siateho sa odlišujú nielen tvarom, veľkosťou, ale aj farbou. Najčastejšie sa jedná o zelené sfarbenie kališných lístkov, a to buď po celom povrchu alebo len v bazálnej časti [4].

1.2.7 Kvet

Pozostáva z dvoch opadavých kališných lístkov, štyroch korunných lupienkov, jedného piestika a veľkého množstva tyčiniek [8; 4]. Počet tyčiniek sa pohybuje v rozmedzí 100 – 250 [9]. Na počet vyskytujúcich sa tyčiniek má vplyv okrem iného aj termín sejby. Okraje lupienkov môžu byť hladké, zvlnené až rozstrapkané. V bazálnej časti lupeňov pri väčšine druhov možno pozorovať škrvny rozličnej veľkosti, tvaru a farby [4].

1.2.8 Plod

Plodom je tobolka, iným názvom makovica, ktorá môže nadobúdať rôzny tvar a veľkosť v závislosti od odrody a podmienok prostredia [8]. Najmä tvar makovice (guľatý, kužeľovitý hruškovitý alebo mierne sploštený) závisí od podmienok prostredia, v ktorom sa vyskytuje. Tvar plodu je zároveň považovaný za jeden z dedičných znakov. Pokusmi bolo zistené, že tvar tobolky pri sejbe v máji bol guľatý a čím neskôr bola uskutočnená sejba, tým viac mal pretiahnutú podobu. Množstvo toboliek závisí od vetvenia rastliny, čo koreluje s počtom rastlín

na jednotku plochy. Z pohľadu na produkciu semena je omnoho výhodnejší guľovitý tvar. Najvyšší obsah morfinu bol zaznamenaný v makoviciach hruškovitého tvaru [4].

1.2.9 Semená

Semená maku siateho majú ľadvinový tvar a zvrásnený povrch. Čo sa týka farby, môže byť rôzna. Prevažuje biela, hnedá, sivá, ružová, okrová a najmä šedo až tmavomodrá, preto je často nazývaný aj „mak modrý“ [8]. Farba patrí k variabilným znakom, a preto býva odlišná jednak v rámci jedného genotypu ako aj v rámci jednej makovice. Základná farba je dedičným znakom, ale odtieň značne závisí od vonkajších faktorov daného prostredia. Množstvo semien v jednej makovici sa pohybuje v rozmedzí od 1000 – 12 000. Hodnotením semien rôznych genotypov v štúdií Fejér bola zistená hmotnosť semien v jednej makovici v rozmedzí 2,23 – 4,24 g [10]. Semená ako jediná časť rastliny nemajú latexový systém žliazok [11], teda by nemali obsahovať alkaloidy. Avšak sú náchylné na mechanické poškodenie, kedy sa prachové častice makovice môžu usádzať na povrchu semien a tak pravdepodobne dochádza ku ich kontaminácii alkaloidmi [12]. Okrem určitého podielu alkaloidov majú najmä vysokú nutričnú hodnotu a využívajú sa na priamy konzum v potravinárstve, v pekárskom a cukrárenskom priemysle, no taktiež ako zdroj konzumného oleja [4].

1.3 Biologická charakteristika

Uplatnenie maku je naozaj široké, ale v našich končinách má najväčšie využitie práve v cukrárenskej a potravinárskej výrobe, pretože slovenské odrody maku siateho majú síce nižší obsah morfinu ale vyššiu kvalitu semena ako olejninu. Čo sa týka chemického zloženia semien a makového oleja tieto parametre mierne kolíšu vzhľadom na lokalitu a podmienky pestovania [3].

Hlavnou zložkou semien je olej, kde jeho obsah sa pohybuje v rozmedzí 45 – 50 %. Ďalšími zložkami v semenách sú proteíny, ktorých výskyt je približne 18 – 25 %, sacharidov 16 – 24 %, hrubej vlákniny 5 – 8 % a nakoniec 5 – 10 % minerálnych prvkov, z ktorých najväčšie zastúpenie majú Ca, P, K, Fe a Cu. Zo zložiek v minoritnom množstve tu ešte nachádzame kyselinu listovú a vitamíny C, B1 a B2 [3].

Nutričná hodnota je daná predovšetkým značným zastúpením mono- a poly-nenasýtených mastných kyselín, obsiahnutých v olejnej zložke, kde hlavnými predstaviteľmi sú kyselina olejová, linolová, palmitová, linolénová a stearová. Semená maku sú taktiež zdrojom tokoferolov (prednostne α - a γ -tokoferol), fytosterolov a skvalénu, ktoré majú pozitívny protizápalový, antikarcinogénny a antioxidantný účinok [3, 13].

1.3.1 Pestovanie maku na Slovensku a vo svete

Na území Slovenskej či Českej republiky ale aj vo svete má pestovane maku už dlhoročnú tradíciu. V závislosti od využitia tejto rastliny sa diferencujú smery šľachtenia nových odrôd, ktoré môžu byť rozdelené na tri základné kategórie [14].

S vysokým obsahom alkaloidov: s ohľadom najmä na morfín, kodeín, papaverín, noskapín a thebaín či už v nezrelých alebo usušených makoviciach. Krajiny zameriavajúce sa na pestovanie tohto typu sú India, Turecko, Rusko, Austrália a Čína, ale patria sem aj európske krajiny Maďarsko, Francúzsko, Španielsko ako hlavné legálne producentské krajiny na získanie ópia a opiových alkaloidov na liečivé účely vo svete pod dohľadom Organizácie Spojených národov [14, 13, 11, 15].

Nízkomorfínové semenné typy: sem zaradíme odrody s veľmi nízkym až nulovým obsahom morfinu v makoviciach. Tieto odrody sa pestujú v Rakúsku a Poľsku [14].

Vysoko úrodné semenné typy: s bielou, okrovou, šedou a modrou farbou semena, kde u odrôd tohto typu nachádzame obsah morfinu v stredných až nízkych hladinách. Typickými krajinami pestujúcimi túto kategóriu maku siateho sú práve Slovensko a Česko, ktoré má dominantné miesto v pestovaní maku na potravinárske účely [14].

2 ALKALOIDY

2.1 Sekundárne metabolity u rastlín

Sú to prírodné produkty odvodené od primárnych metabolitov rastlín s rozdielnou fyziologickou aktivitou. Majú rovnako dôležitú úlohu v životaschopnosti rastlín ako primárne metabolity. Na základe biosyntetickej dráhy sa tieto metabolity klasifikujú do troch hlavných skupín: terpény (alebo izoprenoidy), fenolové zlúčeniny (flavonoidy) a zlúčeniny obsahujúce dusík (alkaloidy) [16].

Po mnohé roky bol výskyt prírodných alkaloidov veľkou záhadou. V dnešnej dobe je už známe, že tieto sekundárne metabolity zohrávajú úlohu pri prežití daného organizmu [17]. V rastlinách sa tieto zlúčeniny správajú ako atraktanty, napr. pri zabezpečení opelenia alebo pri vzájomnej interakcii medzi rastlinami a živočíchmi, či inými vyššími a nižšími rastlinami. Vo všeobecnosti sú alkaloidy považované za súčasť komplikovaného systému chemickej obrany v rastlinách, no v skutočnosti to isté platí aj u stavovcov, bezstavovcov a mikroorganizmov. Dôležitou úlohou alkaloidov v chemickej obrane je umiestnenie alkaloidov v rastline. Na ochranu musia byť však lokalizované na chránenom mieste a samozrejme mať dostatočnú koncentráciu na to, aby mali potrebný ochranný účinok. Mnohé z nich majú distribučný efekt na nervový systém [18].

2.2 Biologická charakteristika a vlastnosti alkaloidov

Sú to prírodne sa vyskytujúce zložky s nízkou molekulovou hmotnosťou a majú vo svojej rodine viac ako 12 000 zlúčenín obsahujúcich dusík [16], priťahujúce pozornosť chemikov, biochemikov a farmakológov už stovky rokov. Alkaloidy sú látky veľmi dobre známe pre svoju biologickú aktivitu už od počiatku svetovej civilizácie. Mali využitie v šamanizme, bylinnej liečbe chorôb, ale boli aj zneužívané ako prídavné toxíny v zbraniach pri love divej zveri, či v klanových vojnách. Bývajú taktiež charakterizované ako najúčinnnejšie a zároveň najnebezpečnejšie prírodné látky [19].

Znalosť rozdielov rozpustnosti medzi alkaloidmi a ich soľami má značný farmaceutický význam a poskytuje metódy pre izoláciu alkaloidov z rastlín a ich oddelenie od nealkaloidných látok z roztoku [7]. Prudký rozvoj chromatografických metód za posledné desaťročia uviedol chromatografiu ako extrémne užitočný nástroj vo výskume alkaloidov. Extrakty čerstvých rastlín boli úspešne a rýchlo separované na individuálne zložky použitím týchto metód [17, 20].

2.3 Klasifikácia alkaloidov

Triviálne názvy alkaloidov sú charakteristicky zakončené koncovkou -ín. Podľa staršej definície, takmer všetky alkaloidy výlučne vyskytujúce sa v rastlinách obsahujú prinajmenšom jeden atóm dusíka v molekule, ktorá má zásadný charakter a zvyčajne tvorí súčasť heterocyklického systému. V najširšom zmysle, môžu mať primárny (meskalín), sekundárny (efedrín), terciárny (atropín) alebo kvartérny atóm dusíka. Novšia definícia je jednoduchšia. Podľa nej je alkaloid cyklická organická zlúčenina obsahujúca dusík v negatívnom oxidačnom stave, čo je limitované distribúciou medzi živými organizmami. Táto definícia môže byť nahradená tvrdením, že takmer všetky alkaloidy sú toxické a väčšina z nich vykazuje farmakologickú aktivitu. Klasifikácia je ťažká úloha aj pre špecialistov v obore. V literatúrach možno nájsť zaradenie alkaloidov do rôzneho počtu tried [21, 7]. Jedným z najjednoduchších spôsobov ako roztriediť tieto zložky je na základe ich štruktúra a pôvodu. Takto ich možno klasifikovať do troch základných skupín podľa ich bežných molekulových prekursorov, ktoré sú substrátmi pre molekulu alkaloidu, rovnako ako zdrojom dusíka a kostry pre daný typ alkaloidu. Existujú tri hlavné typy: pravé alkaloidy, protoalkaloidy a pseudoalkaloidy, ktoré sú uvedené v Tabuľke 1 [17, 18].

Tabuľka 1: Klasifikácia Alkaloidov na základe prekursorov [17]

Typ alkaloidov	Prekursor	Chemická skupina alkaloidov	Základné zložky štruktúry	Príklady
Pravé alkaloidy	L-ornitín	Pyrolínové	Pyrolidín	Hygrín
				Kuskohygrinín
		Tropánové	Tropán	Atropín
				Kokaín
		Pyrolizidínové	Pyrolizidín	Acetyl-lykopsamín
				Europín
	L-lyzín	Piperidínové	Piperidín	Piperidín
				Piperín
		Chinolizidínové	Chinolizidín	Cytisín
				Lupamín
		Indolizidínové	Indolizidín	Kastanospermín
				Swanosín
	L-tyrozín	Fenyletylamínové	Fenyletylamín	Adrenalín
Dopamín				
Noradrenalín				
Tetrahydro-izochinolínové		Benzyltetrahydro-izochinolín	Kodeín	
		Morfín		
		Norkoklaurín		

Typ alkaloidov	Prekurzor	Chemická skupina alkaloidov	Základné zložky štruktúry	Príklady		
Pravé alkaloidy	L-tyrozín	Tetrahydro-izochinolíkové	Benzyltetrahydro-izochinolín	Papaverín		
				Thebaín		
	L-tryptofan	Indolové	Indol	Arundacín		
				Katarantín		
				Serotonín		
				Triptamín		
				Chinolíkové	Chinolín	Chinidín
				Chinín		
	Pyroloindolové	Indol	A Yohimbín			
			Korynantín			
	Ergotové	Indol	Ergotamín			
L-histidín	Imidazolové	Imidazol	Histamín			
			Pilokarpín			
L-arginín	Marinové	β -Kربولín	Saxitoxín			
			Tetrodotoxín			
Kyselina nikotínová	Pyridínové	Pyridín/Pyrolidín	Nikotín			
			Anabasín			
Proto-alkaloidy	L-Ornitín	Pyrolizidínové	Pyrolizidín	Stachydrín		
	L-tyrozín	Fenyletylamínové	Fenyletylamín	Meskalín		
	L-tryptofan	Terpenoid-indolové	Indol	Yohimbín		
Pseudo-alkaloidy	Acetát	Piperidínové	Piperidín	Koniín		
				Pinidín		
		Seskviterpénové	Seskviterpén	Evonín		
	Kyselina pyrohroznová	Efedrínové	Fenyl C	Efedrín		
				Norefedrín		
	Kyselina ferulová	Aromatické	Fenyl	Kapsacín		
	Geraniol	Terpenoidné	Terpenoid	Akonitín		
	Saponíny	Steroidné	Terpenoid	Pregnenolon		
				Tomatidín		
	Adenín/guanín	Purínové	Purín	Kofeín		
Teofylín						

2.3.1 Pravé alkaloidy

Sú odvodené od aminokyseliny (AK) a zdieľajú heterocyklický kruh s dusíkom. V rôznych literatúrach ich možno nájsť aj pod pojmom heterocyklické [7]. Tieto alkaloidy sú vysoko reaktívne látky s biologickou aktivitou už v malých dávkach. Všetky pravé alkaloidy majú

horkú chuť a objavujú sa ako biela tuhá látka s výnimkou nikotínu, čo je hnedá kvapalina. Právé alkaloidy tvoria vo vode rozpustné soli a môžu sa vyskytovať v rastlinách vo voľnom stave, alebo ako soli, či N-oxidy [17]. Primárnymi prekuzormi týchto zlúčenín sú AK: L-ornitín, L-lyzín, L-fenylalanín, L-tyrozín, L-tryptofán a L-histidín. Právé alkaloidy môžu byť ako prírodné, biomimické, bionické a syntetické alkaloidy. Je to najpočetnejšia skupina [18].

2.3.2 Protoalkaloidy

Patria sem zlúčeniny, v ktorých atóm dusíka pochádza z AK, no nie je súčasťou heterocyklického kruhu. Často sú označované ako non-heterocyklické, prípadne biogénne amíny [7]. Takéto alkaloidy zahŕňajú zlúčeniny odvodené od L-tyrozínu a L-tryptofánu s jednoduchou štruktúrou. Tvoria najmenší podiel všetkých alkaloidov, môžu byť ako prírodné, biomimické, bionické a syntetické [22, 18].

2.3.3 Pseudoalkaloidy

Sú to zlúčeniny, ktorých uhlíková kostra nepochádza od žiadnej AK. V skutočnosti sú pseudoalkaloidy spojené s dráhami aminokyselín a bývajú odvodené od prekuzorov alebo z postkuzorov AK. Atóm dusíka je začlenený do molekuly v relatívne neskorom štádiu, ale samozrejme môže tiež pochádzať z AK cez transaminačnú reakciu, ak je prítomný vhodný aldehyd, alternatívne ketón. Podobne ako predchádzajúce skupiny taktiež môžu mať pôvod prírodný, biomimický, bionický a syntetický [17, 18].

3 BENZYLIZOCHINOLÍNOVÉ ALKALOIDY OBSIAHNUTÉ V MAKU SIATOM

3.1 Základná charakteristika

Benzylizochinolínové alkaloidy (BIAs) sú podskupinou izochinolínových pravých alkaloidov. Tieto alkaloidy sa vyskytujú okrem čeľade *Papaveraceae* aj v čeľadi *Berberidaceae* (dráčovité), *Ranunculaceae* (iskerníkovité). Táto skupina zlúčenín obsahuje približne 2500 zložiek s rôznymi farmakologickými vlastnosťami, akými sú napr. analgetiká (morfín), antitusiká (kodeín), svalové relaxanty (papaverín), či antimikrobiálne činidlá (sanguinarín a berberín) [16].

3.2 Biosyntéza BIAs

Ich biosyntéza, ktorá je zobrazená na Obrázku 1, začína kondenzáciou dvoch derivátov aminokyseliny L-tyrosínu, 4-hydroxyphenylacetaldehydu (4HPAA) a dopamínu prostredníctvom dekarboxylácie, meta-hydroxylácie a transaminácie. Enzýmy, ktoré sa zapájajú do biosyntézy tejto skupiny látok majú prevažne proteínový charakter. Kaskádou týchto reakcií vzniká (S)-norkoklaurín, ktorý je prekursorom všetkých BIAs. Jednou z možností je transaminácia L-tyrosínu vo forme HPAA za prítomnosti enzýmu L-tyrosín aminotransferázy (TyrAT) a následná dekarboxylácia za katalýzy 4-hydroxyfenylpyruvát dekarboxylázy (4HPPDC). Druhá alternatíva spočíva v premene L-tyrosínu na tyramín prostredníctvom tyrosín dekarboxylázy (TYDC). Na tento krok nadväzuje reakcia za vzniku dopamínu. Kondenzáciou týchto dvoch molekúl vzniká (S)-norkoklaurín za prítomnosti norkoklaurín syntázy. Z daného prekursoru je syntetizovaný (S)-koklaurín, konvertovaný najprv enzýmom norkoklaurín-6-O-methyltransferáza (6OMT) a v druhom kroku koklaurín N-methyltransferázou (CNMT) za tvorby (S)-N-methylkoklaurínu. Ďalej nasleduje hydroxylácia pomocou (S)-N-methylklaurín 3-hydroxylázou (NMCH) na 3-hydroxy-N-methylkoklaurín, ktorý je potom konvertovaný enzýmom 3-hydroxy-N-methylkoklaurín 4-O-methyltransferázou (4OMT) na (S)-retikulín [23, 24].

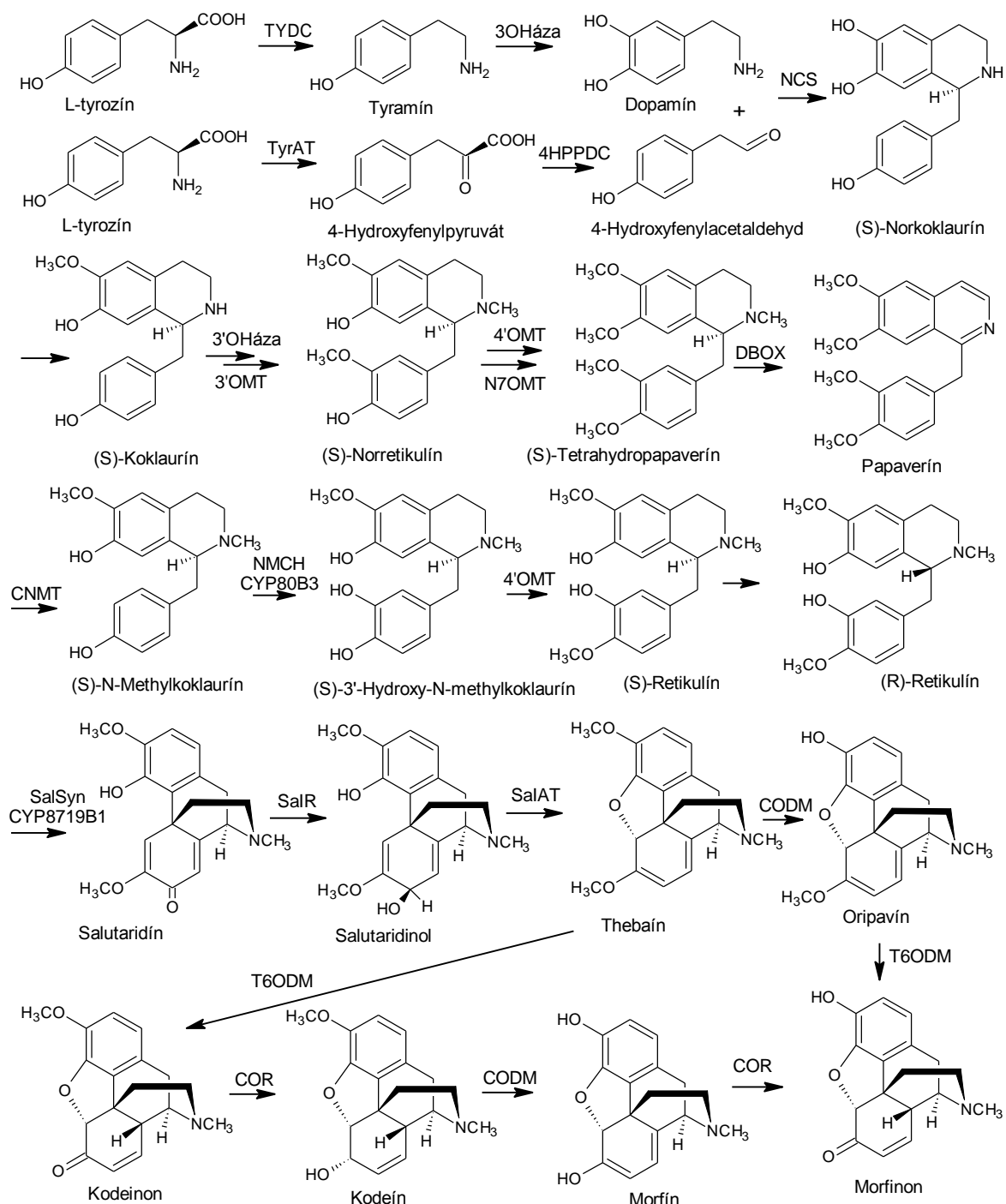
K syntéze papaverínu dochádza dvoma dráhami. Prvá sa nazýva N-metylová a zahŕňa (S)-retikulín a N-demethyláciu nešpecifického intermediátoru. Druhá dráha, N-demetylová, ktorej zásadná zložka je (S)-norkoklaurín. Výhodou tejto druhej cesty je, že nie je nutná demethylácia. Finálnym krokom biosyntézy papaverínu je oxidácia O-metylovanej a N-desmetylovanej zložky tetrahydropapaverínu za katalýzy dihydrobenzofenantridín oxidázou (DBOX) [24].

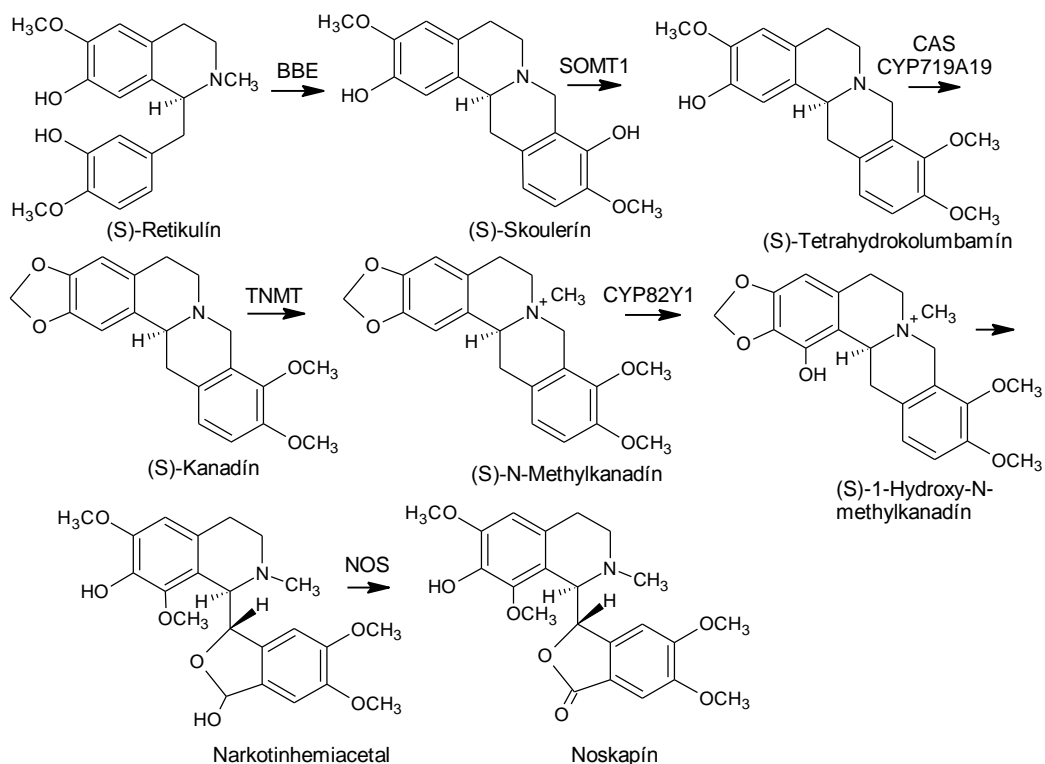
Syntéza morfinu, kodeínu a thebaínu má spoločnú cestu. Prekurzorom pre ich syntézu je (S)-retikulín, ktorý podlieha epimerizácii za vzniku (R)-retikulínu. Táto molekula je následne konvertovaná pomocou CYP salutaridín syntázy (CYP719B1) na salutaridín, ktorý následne podlieha dehydrogenáze za prítomnosti salutaridín reduktázy (SalR).). Ďalším krokom je acetylácia solutaridinolu enzýmom salutaridinol 7-*O*-acetyltransferáza (SalAT). Ako možno vidieť na Obrázku 1 tak salutaridinol-7-*O*-acetát spontánne podstupuje cyklizáciu. Touto spontánnou reakciou vzniká thebaín pri pH v rozmedzí 7 až 9. Existujú dve paralelné dráhy na konverziu thebaínu na morfin, v ktorých sa vyskytujú O3- a O6-demetylačné reakcie, potenciálne v oboch poradiach. Obe tieto cesty sú pravdepodobné, pretože thebaín, kodeín a oripavín sú prítomné u cicavcov ale aj v rastline maku [25]. Pri tvorbe kodeínu sa do reakcie, ktorá má spontánny priebeh, zapája enzým thebaín-6-*O*-demetyláza (T6ODM). Výslednou molekulou je kodeinon, ktorý je napokon redukovaný kodeinon reduktázou (COR). Biosyntéza morfinu bola popísaná len v pár rastlinných druhoch obmedzená na rod *Papaver*. Tvorba morfinu môže prebiehať premenou kodeínu pomocou kodeín-*O*-demetylázou (CODM), ktorý zároveň má schopnosť katalyzovať reakciu za vzniku oripavínu. Posledným krokom je redukcia enzýmom COR [24].

Bola preukázaná aj endogénna tvorba morfinu v ľudských bunkách. Fyziologická úloha endogénneho morfinu je v súčasnosti neznáma. Endogénne hladiny, ktoré boli kvantifikované, sú nižšie ako plazmatické koncentrácie dosiahnuté počas terapeutického použitia. Mnohé hypotézy boli predložené s ohľadom na účel endogénneho morfinu, ktorý naznačuje úlohu pri infekcii, sepe alebo zápale, ako aj neurologických patológiách [25].

Na rozdiel od morfinových alkaloidov biosyntéza noskapínu nebola spočiatku tak podrobne študovaná. Noskapín, patrí medzi ftalidizochinolinové alkaloidy, podskupina BIAs, je syntetizovaný z molekuly (S)-retikulínu ako aj BIAs. Obrázok 1, ktorý to znázorňuje, zahŕňa postupnú hydroxyláciu izochinolínového kruhu, oxidačné štiepenie berberínového mostíka a dve následné oxidácie na charakteristickú formu ftalidizochinolín-laktónového kruhu. Nedávno izolované enzýmy ako kanadín syntáza (CAS), *N*-methylkanadín 1-hydroxyláza (CYP82Y1) a noskapín syntáza (NOS), boli charakterizované ako NAD⁺ dependentné dehydrogenázy [24]. Cytochróm P450, CYP82Y1, bol izolovaný a charakterizovaný ako katalyzátor, aby hydroxyloval *N*-methylkanadín na 1-hydroxy-*N*-methylkanadín. Je to prvý závažný krok pri tvorbe noskapínu v maku siatom. Ďalší cytochróm P450, CYP719A21, konvertuje (S)-tetrahydrokolumbamín na (S)-kanadín. Dva cytochrómy P450 katalyzujú hydroxyláciu na uhlíkoch C13 a C8 na protoberberínovom skelete, pričom hydroxylácia C8

otvára kruh a tvorí aldehydickú skupinu. Pri biosyntéze noskapínu sa acetyláciou na C13 pred C8 hydroxyláciou vytvára ochranná skupina, ktorá je následne hydrolyzovaná karboxylesterázou, čím sa spúšťa prešmyk na cyklický hemiacetal. Zistilo sa, že konečný enzým v biosyntéze noskapínu je reduktáza, nazývaný noskapínsyntáza (NOS), ktorá katalyzuje dehydrogenáciu narkontinhemiacetálu na noskapín [26].





Obrázok 1: Biosyntéza BIAs v maku siatom [24]

3.2.1 Využitie iných zdrojov pre syntézu kodeínu a morfínu

Do nedávna bol ópiový mak jediným zdrojom pre produkciu morfínu a jeho derivátov. Svetová správa o drogách z roku 2015 o omamných látkach uvádza, že celosvetová produkcia ópia dosiahla v roku 2014 až 7554 ton a celosvetová spotreba sa stále zvyšuje. Z tohto dôvodu ako aj kvôli nelegálnemu pestovaniu maku v niektorých krajinách je nutné nájsť aj iný zdroj pre výrobu týchto alkaloidov. Najnovšie prichádza do úvahy thebaín, získavaný najmä z *P. bracteatum*, ktorý sa ukázal byť výborným východiskovým materiálom pre syntézu rôznych agonistov a antagonistov morfínu. V posledných rokoch je veľký záujem o mikrobiálnu alternatívnu výrobu sekundárnych rastlinných metabolitov. Výber mikrobiálnych reakcií nasmerovaných na hostiteľské rastliny ako alternatíva k chemickej syntéze používanej v tradičných metódach, ponúka výhody akými sú rýchla akumulácia biomasy, či samostatná výroba hlavných medziproduktov. Mnohé štúdie skúmali mikrobiálnu transformáciu morfinových alkaloidov pomocou biokatalyzátora, akým je napr. gram-pozitívny bakteriálny kmeň *Bacillus* sp. FAR, ktorý má schopnosť konvertovať thebaín na morfin a kodeín. Samozrejme tento proces prebieha za optimálnych podmienok pri pH 7,7, teplote 36°C, potrebnom čase 30 hod a iných faktoroch, na ktorých sa naďalej pracuje. Napriek tomu, že jeho výnos ani zďaleka nedosahuje množstvá ako u maku siateho, sa ponúka ako bezpečný zdroj pre produkciu morfínu a kodeínu [27].

3.3 Opioidy

Pod pojmom opioidy možno súhrne označiť všetky látky so schopnosťou naviazať sa na opioidné receptory s následným prejavom analgetického účinku. Farmakologický účinok týchto látok určujú najmä faktory, ktorými sú afinita opioidov k receptorom, farmakokinetické vlastnosti či genetický polymorfizmus. Za vysokou individuálnou vnímavosťou k opioidom stojí práve spomínaný genetický polymorfizmus. Týka sa najmä génov kódujúcich príslušné informácie o jednotlivých opioidných receptoroch, izoforomách cytochrómu P 450 (CYP2D6, CYP 3A4) a uridín-glukuronyl transferázy [28].

3.3.1 Distribúcia opioidov

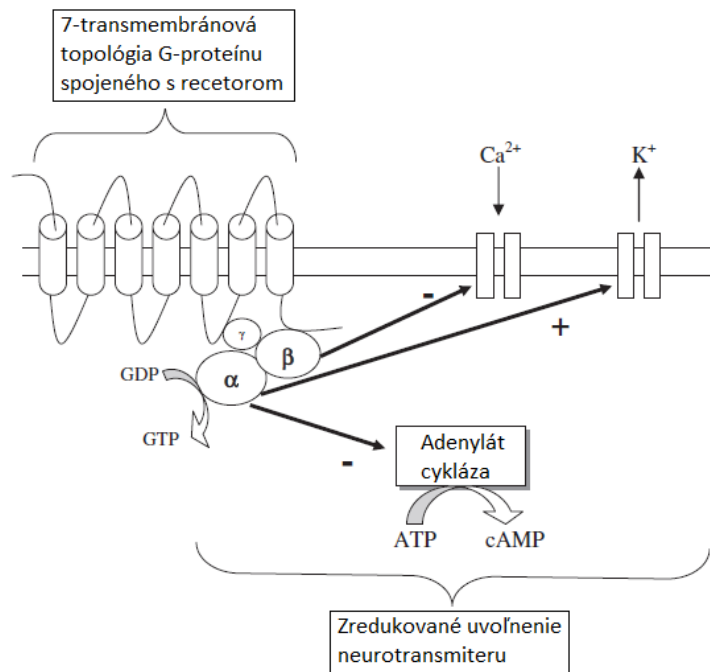
Distribúcia opioidov rôznymi orgánmi ako aj inými tkanivami je závislá od fyziologických aj chemických faktorov. Aj keď sa opioidy viažu na plazmatické proteíny s rozdielnou afinitou, rýchlo sa premiestňujú z krvného riečiska do príslušných tkanív v najvyššej koncentrácii. Väčšina opioidov sa lepšie vstrebáva po subkutánnom a intramuskulárnom podaní ako po perorálnom. Napriek faktu, že absorpcia z tráviaceho traktu je rýchla, niektoré opioidy môžu po perorálnom podaní podliehať prvotnému, tzv. first-pass metabolizmu v pečeni [29].

3.3.2 Mechanizmus účinku prostredníctvom receptorov

Viacere systémy sa podieľajú na modulácii vnímania bolesti vrátane endogénneho opioidného systému [30]. Podľa daného farmakologického pôsobenia jednotlivých alkaloidov boli príslušné receptory rozdelené na tri základné typy: mí (μ), ktoré sú citlivé na morfin, kapa (κ) senzitivne na ketocyklazocín a sigma (σ) na nallylnormetazocín. Objavenie endogénnych opioidov (Hans Kosterlitz a kol.) prispelo k rozšíreniu typov o delta (δ) receptory [31]. Neskôr bola objavená aj existencia subtypov týchto základných receptorov μ_1 , μ_2 , κ_1 , κ_2 , κ_3 , δ_1 a δ_2 [29]. Endogénne opioidy sú produkované mozgom a slúžia ako neurotransmitery, pôsobiace cez tieto príslušné receptory najmä typu δ a čiastočne μ [31]. Prírodné endogénne opioidy zahŕňajú endogénne peptidy, ako sú β -endorfiny, enkefalíny a dynorfiny [30]. Endogénne opioidy odlišujeme od seba na základe dĺžky peptidového reťazca a obsahu aminokyselín [32, 31].

Všetky štyri receptory spájané s G-proteínom, majú podobnú sedem člennú štruktúru v podobe transmembránového komplexu, umiestneného na presynaptických a postsynaptických membránach v CNS a periférnych tkanivách [30]. G-proteínom viazané receptory, ako napríklad receptory pre opiáty, nemajú žiadnu priamu väzbu s efektorovými proteínmi; namiesto toho sa informácia prenesie cez G-proteín. Aktivácia opioidných receptorov v bunke, napríklad μ s morfinom, vedie jednak k uzavretiu napätovo riadených vápenatých kanálov,

potom k stimulácii draslíkového efluxu vedúceho k hyperpolarizácii a nakoniec k redukcii produkcie cyklického adenosínmonofosfátu (cAMP) prostredníctvom inhibície adenylát cyklázy. Celkovo to má za následok úbytok dráždivosti neurónových buniek, čo vedie k zníženiu prenosu nervových impulzov spolu s uvoľňovaním neurotransmitterov [33]. Princíp aktivácie opioidných receptorov je znázornený na Obrázku 2.



Obrázok 2: Aktivácia receptorov vplyvom príslušného opioidu [33]

3.3.3 Eliminácia opioidov z organizmu

Koncepcia eliminácie liečiv sa dá rozdeliť na dve hlavné fyziologické zložky, ktorými sú metabolizmus a vylučovanie. Vylučovanie sa vzťahuje na odstránenie liečiva z tela bežne cez obličky alebo biliárnou sekréciu. Clearance popisuje účinnosť ireverzibilnej eliminácie lieku z tela metabolizmom alebo vylučovaním [34].

Väčšina opioidov podstupuje rozsiahly prvotný metabolizmus predtým, než prejdú do obehovej cirkulácie. Prvotným metabolizmom sa znižuje biologická aktivita týchto alkaloidov. Opioidy majú typický lipofilný charakter, čo im umožňuje prechod cez membrány buniek. Podstatou odbúravania týchto látok ako aj iných liečiv je premena na hydrofilné zlúčeniny, ktoré môžu byť následne vylúčené do moču. Hlavným miestom biotransformácie opioidných alkaloidov je pečeň. Pozmenený metabolizmus u jedinca, či populácie môže mať za následok, že opioidy alebo ich metabolity sú vylučované rapídne z tela. V takomto prípade nedosahujú terapeutický účinok. Opakom tejto situácie je stav, kedy zotrávajú v organizme nadmernú dobu, ale za takýchto okolností môžu mať toxické vplyvy. Na základe potrebných enzýmov na tento

proces sa metabolizmus týchto látok delí na dve fázy: prvú-modifikačnú a druhú-konjugáčnú [35].

Modifikačná fáza zvyčajne vystavuje látky oxidácii alebo hydrolýze. Zahŕňa enzýmy cytochrómy P450 (CYP), ktoré uľahčujú reakcie a zahŕňajú *N*-, *O*- a *S*-dealkyláciu; aromatickú, alifatickú alebo *N*-hydroxyláciu; *N*-oxidáciu; sulfoxidáciu; deamináciu; a dehalogenáciu. Úlohou druhej fázy je konjugácia, za účelom premeny hydrofóbných látok na hydrofilnejšie, akými sú kyselina glukurónová, glycín, sulfáty alebo glutathion. Najpodstatnejšou časťou konjugáčnej fázy je glukuronidácia, za ktorú zodpovedá enzým uridín difosfát glukuronosyltransferáza (UGTs). Je najviac obsiahnutý v endoplazmatickom retikule buniek [36, 35].

Všetky opiody sú teda metabolizované pomocou dvoch hlavných enzymatických systémov, CYP450 a v menšej miere UGTs, ktoré majú hlavnú úlohu v odbúravaní napr. morfinu, hydromorfonu. CYP450 je naopak významným systémom metabolizmu kodeínu, oxykodónu a je prítomný v mnohých tkanivách ľudského tela ako aj v endoplazmatickom retikule, hepatocytoch, mozgu, pľúcach, obličkách a v črevnej sliznici. Zásadný význam má aj pre tvorbu cholesterolu, tromboxanu A₂, prostacyklínov, kde všetky tieto zložky sa podieľajú na 75 % biotransformácii väčšiny liekov ako aj týchto opioidov [37].

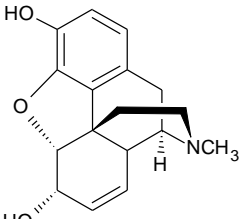
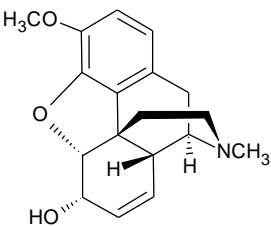
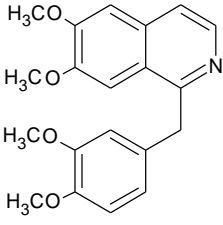
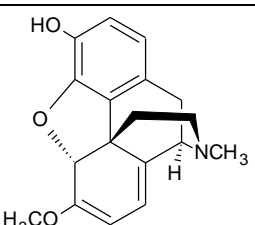
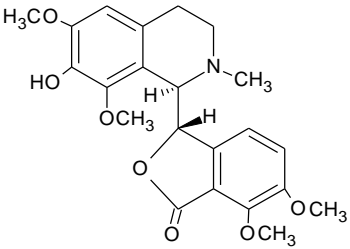
3.3.4 Farmakokinetická interakcia liečiv opioidnej povahy.

Nepriaznivé reakcie medzi liekmi (Adverse Drug Reactions, ADRs), vytvárajú závažný problém zapríčiňujúci značnú mortalitu. Interakcie liečivo-liečivo (Drug-Drug Interactions, DDIs), sú dôležitým a potenciálne zbytočným zdrojom ADRs. DDIs môžu byť vo všeobecnosti kategorizované na farmakokinetické či farmakodynamické. K DDIs dochádza hlavne v prípade, keď jedno liečivo spôsobí zmenu v absorpcii, distribúcii, metabolizme, prípadne eliminácii inej liečebnej látky. Tento typ interakcie často vedie k strate účinnosti alebo zapríčiňuje toxicitu. Farmakodynamické DDIs je výsledkom reakcie dvoch látok, ktoré sú podávané súčasne. [34]

3.4 Chemické vlastnosti ópiových alkaloidov v maku siatom

V maku siatom bolo objavených vyše štyridsať rôznych alkaloidov, ale najpočetnejšie zastúpené sú zo skupiny BIAs uvedených spolu s ich štruktúrou, molekulárnym vzorcom (Molecular formula, Mf), molekulovou hmotnosťou (Molecular Weight, MW) a ich registračným číslom (CAS) v nasledujúcej Tabuľke 2.

Tabuľka 2: Štruktúra a popis jednotlivých alkaloidov v maku siatom

Štruktúra	Mf	MW (g/mol)	CAS	Zdroje
 <p>Morfín</p>	$C_{17}H_{19}NO_3$	285,34	57-27-2	[38]
 <p>Kodeín</p>	$C_{18}H_{21}NO_3$	299,36	76-57-3	[39]
 <p>Papaverín</p>	$C_{20}H_{21}NO_4$	339,38	58-74-2	[40]
 <p>Thebain</p>	$C_{19}H_{21}NO_3$	311,37	115-37-7	[41]
 <p>Noskapín</p>	$C_{22}H_{23}NO_7$	413,42	128-62-1	[42]

3.5 Morfín

3.5.1 Chemické a fyzikálne vlastnosti

Je to ľavotočivý zásaditý komplex stereochemickej štruktúry (Tabuľka 2), chemickým názvom (5 α ,6 α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorfinan-3,6-diol [38], ktorý má vo svojej molekule päť chirálnych uhlíkov a topí sa v teplotnom rozmedzí 253 – 254 °C [20]. Vytvára

malé kosoštvorcové hranolové útvary alebo nadobúda podobu ihličiek vo forme monohydrátu. Čo sa týka rozpustnosti, 1 g sa rozpustí približne v 6250 ml éteru, 1220 ml chloroformu, 210 ml alkoholu ale aj 5000 ml vody a 1100 ml vriacej vody [38]. Substitúcia na hydroxylových skupinách uhlíkov C₃ a C₆ má významný vplyv na farmakokinetické vlastnosti tejto látky [29]. Prvý raz bol izolovaný v roku 1803, táto zásluha je pripisovaná hlavne nemeckému lekárnikovi Friedrichovi W. Sertürnerovi [8]. Od roku 1933 je zdrojom pre tento alkaloid aj slama zrelých makovic. Tam bol zaznamenaný obsah v rozmedzí 0,2 – 0,3 % [21].

3.5.2 Biotransformácia

Hlavným predstaviteľom UGTs je UGT 2B7 metabolická dráha, ktorá podporuje tvorbu glukuronidov pri odbúravaní morfinu. Najpočetnejšie metabolity pri metabolizme morfinu sú morfin-3-glukuronid (M3G), ktorý reprezentuje 50-60% a morfin-6-glukuronid (M6G) ktorý predstavuje okolo 10% z celkového množstva metabolitov [37, 34]. M6G je aktívnou formou morfinu, ktorý je μ - a δ -agonistom a vykazuje až 50 krát vyššiu analgetickú účinnosť než jeho pôvodná molekula [30]. Morfín môže podstupovať aj drobnejšie metabolické cesty vrátane *N*-demethylácie na normorfín alebo M6G či diglukuronidácie na morfin-3,6-diglukuronid. Každé liečivo podávané v biologicky neaktívnej forme a je biotransformované na aktívny metabolit, sa nazýva proliečivo [34]. Ako príklad možno uviesť hydromorfón, ktorý taktiež tvorí malú časť metabolitov morfinu. Jeho veľkou prednosťou je hydrofilnejší charakter a taktiež slúži ako analgetikum [43, 44, 35].

3.5.3 Eliminácia

V poradí zvyšujúcich sa koncentrácií boli v plazme identifikované morfín, morfin-6-glukuronid a morfin-3-glukuronid. Plazmatický polčas je typický 2 až 4,5 hodiny pre morfín. V moči sa dávka morfinu vylučuje primárne v konjugovanej forme so 75% morfin-3-glukuronidom, 10% voľným morfinom, 4% konjugovaným normorfínom, 1% voľným normorfínom a stopovými množstvami hydromorfónu, morfin-6-glukuronidu, morfin-3-sulfátu a morfin-3,6-diglukuronidu [45].

3.5.4 Analgetický účinok

Morfín je štandardné analgetikum, s ktorým sa porovnávajú mnohé iné opioidy. Je dostupný v rôznych dávkových formách vrátane kapsúl s okamžitým a postupným uvoľňovaním, perorálnych roztokov, čípkov a roztokov pre subkutánne, intramuskulárne, intravenózne, epidurálne alebo intratekálne injekcie [45]. Vzhľadom na svoju hydrofilnú povahu vykazuje oneskorený transport cez hematoencefalickú bariéru, čo oddiaľuje nástup účinku. Naopak, má dlhšie trvanie účinku, 4 až 5 hodín, ako jeho polčas rozpadu v plazme [30]. Jeho účinok je

sprostredkovaný cez μ -opioidné receptory, ktoré sú rozmiestnené po celom mozgu, vrátane amygdaly. Aktivácia týchto receptorov je spojená s analgéziou, sedáciou, eufóriou, no zároveň s nevoľnosťou, zvracaním, fyzickou závislosťou a respiračnou depresiou [25, 46]. Jedným z najväznejších problémov a obávanými komplikáciami pri užívaní opioidov je respiračná depresia. Základnou príčinou vzniku tohto problému je μ -receptor indukovaná depresia vytváraná na centrálnej mozgového kmeňa, ktoré majú za úlohu stimuláciu dýchania [47].

3.5.5 Negatívny vplyv na hepatálny a renálny systém

Hoci sú v pečeni tvorené menej aktívne metabolity, za určitých okolností majú tieto metabolity lepší účinok na dané tkanivo než pôvodné zlúčeniny, alebo práve naopak spôsobujú nepriaznivé vplyvy [47]. Metabolické cesty liekov na úľavu od bolesti vrátane opioidov prechádzajú pečeňou, kde podliehajú oxidácii, dealkylácii, konverzii a pod. Preto u pacientov so zníženou funkciou pečene sú ovplyvnené metabolické cesty a zvyšuje sa pravdepodobnosť toxicity týchto liekov. Pri ťažších ochoreniach pečene, kedy sú narušené metabolické dráhy, premena liekov je podstatne slabšia a zároveň sa akumulujú v plazme. To znamená, že počas života lieku sa v tele zvyšuje a nežiadúce reakcie tejto skupiny liekov môžu byť závažnejšie. U pacientov s nealkoholickou steatohepatitídou liek zvyšuje hladinu žlčových kyselín nalačno. Hoci metabolizmus morfinu sa u týchto pacientov nemení, nakoniec sa jeho množstvo v krvi nahromadí a vedie to k otravám morfinom. Hepatálna exkrécia morfinu sa ale podstatne mení u pacientov s cirhózou pečene. Konečný polčas života nezmetabolizovaného morfinu je tiež dlhší u pacientov s touto chorobou [48]. Metabolity môžu prechádzať hydroxyláciou v čreve a potom vstúpiť do hepatálneho obehu ešte predtým, ako sa úplne vylúčia. U starších pacientov klesá pečenný krvný obeh a zmeny súvisiace s vekom môžu samozrejme zvýšiť riziko toxicity a DDIs [49].

3.5.6 Negatívny vplyv na imunitu hostiteľa

Bolo preukázané, že morfin má aj určité vplyvy na mechanizmy vrodenej aj získanej imunity. Pri pokusoch na myšiach sa skúmali makrofágy, zložky vrodenej imunity, ktoré boli napadnuté morfinom. V týchto bunkách sa preukázala značnejšia apoptóza než v nenapadnutých. Z toho vyplýva, že poškodenie makrofága koreluje s degradáciou obrannej bariéry hostiteľa. Morfin taktiež môže inhibovať sekréciu rôznych cytokínov, ktoré patria do humorálnych zložiek vrodenej imunity, akými sú napr. TNF- α , IL-1 a 2. Nedávne štúdie ďalej ukázali, že morfin môže inhibovať fagocytárnu aktivitu makrofágov a neutrofilov. Ďalším obranným mechanizmom vrodenej imunity sú NK bunky, u ktorých morfin môže spôsobiť potlačenie ich aktivity. Tomuto možno zabrániť podaním opiového antagonistu naloxonu a tým zablokovať

nežiadúci účinok morfinu. Čo sa týka získanej imunity, zodpovedajú za ňu najmä T a B-lymfocyty. Účinok morfinu zapríčiňuje redukciiu B lymfocyty a inhibuje tak produkciu ľudských imunoglobulínov IgA a IgG [50].

3.6 Kodeín

3.6.1 Chemické a fyzikálne vlastnosti

Vzhľadom je to bezfarebná až biela kryštalická pevná látka alebo biely prášok, s chemickým názvom (5 α ,6 α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-3-methoxy-17-methylmorfinan-6-ol [51]. Jedná sa teda o metyléter morfinu (Tabuľka 2), s bodom topenia pri teplote 157.5 °C, vyskytujúci sa v maku siatom. Je veľmi dobre rozpustný v ethanole, benzéne, chloroforme a toluéne ale aj vo vode, kde sa 9 g rozpustí v 1 litre vody pri teplote 20 °C [39]. Synteticky sa môže pripraviť metyláciou morfinu [20].

3.6.2 Biotransformácia

V prípade analgetického účinku na organizmus sa označuje ako pre-liečivo, pretože sa musí v pečeni metabolizovať na morfín za prítomnosti CYP2D6 v konjugačnej fáze. Tento enzým katalyzuje *O*-demethyláciu nielen kodeínu, ale aj iných opioidov ako oxykodón či hydrokodón [37, 34]. Pri nedostatku tohto enzýmu alebo u rýchlych metabolizátorov pôsobí kodeín toxicky, vzhľadom na zvýšenú tvorbu morfinu. Kodeín podlieha z 10 až 14 % aj *N*-demethylácii prostredníctvom CYP3A4 na norkodeín. Okrem toho prechádza z 50 až 70 % metabolizmom druhej fázy na kodeín-6-glukuronid (C6G) pomocou enzýmu UGT2B7 [52]. Menšia metabolická dráha generuje hydrokodón po požití kodeínu, hoci enzým, ktorý sa podieľa na tomto procese ešte nebol identifikovaný [45]. Hydrokodón dosahuje až 11 % koncentrácie celkového kodeínu analyzovaného v moči. Klinický účinok hydrokodónového metabolitu kodeínu nie je zatiaľ známy [35, 34]. V porovnaní s morfinom a M6G má kodeín a jeho hlavné metabolity C6G a norkodeín nízku afinitu k opioidným μ -receptorom [53].

3.6.3 Eliminácia

V plazme boli izolované kodeín a početné metabolity vrátane kodeín-6-glukuronidu, norkodeínu, norkodeín-glukuronidu, morfín-3-glukuronidu, morfín-6-glukuronidu, morfinu a normorfinu. Kodeín má polčas v plazme približne 1,4 až 3,5 hodiny. Približne 85 – 95 % látky z jednej dávky podaného kodeínu možno detekovať v moči. Vzhľadom na genetický polymorfizmus CYP2D6 sa frakcia vylučovania metabolitu morfinu môže meniť; avšak približne 70 až 90 % analytov v moči je voľný a konjugovaný kodeín a norkodeín, pričom zvyšok existuje ako voľný a konjugovaný morfín, morfinové metabolity a hydrokodón [52].

3.6.4 Antitusický účinok

Antitusívne mechanizmy narkotických antitusík nie sú úplne pochopené. Doterajšie zistenia jasne ukazujú, že narkotické antitusiká pôsobia na opioidné receptory [53]. Centrálne pôsobiace antitusiká sú určené na zníženie frekvencie výskytu a / alebo intenzity kašľa, ktoré vyplývajú z patologických stavov. Tieto antitusiká môžu nielen znížiť počet záchvatov kašľa, ale môžu tiež znížiť veľkosť motorického pohonu na výdychové (expiračné) svaly [54]. Kodeín pôsobí antitusívne v mozgovom kmeni, kde sú umiestnené nervové obvody, základná komplexná sieť dýchacích neurónov zodpovedných za kašeľ [55, 56].

3.6.5 Využitie v liečbe bolesti

Kodeín, primárny agonista μ -opioidných receptorov, patrí síce medzi antitusiká, ale môže mať aj analgetický účinok s menším sedatívnym účinkom ako morfín [55, 37]. Vo forme lieku je teda dostupný ako samostatný prípravok, antitusikum alebo analgetikum v kombináciách s paracetamolom. Aktívne zlúčeniny zodpovedné za analgetické účinky kodeínu zahŕňajú morfín a kodeín-6-glukuronid. Účinnosť kodeínu je ovplyvnená farmakogenetikou CYP2D6, ktorá sa môže líšiť medzi rôznymi etnikami. Inhibítory tohto enzýmu (ako je fluoxetín a citalopram) môžu znížiť alebo dokonca zrušiť účinok kodeínu. Okrem toho existujú agonistické interakcie medzi kodeínom a mnohými inými liekmi, ktoré sa musia brať do úvahy pri predpisovaní tohto liečiva. Tento jav je typický pre DDIs [57]. Genotyp slabého metabolizátoru CYP2D6 obmedzuje produkciu morfinu, zatiaľ čo ultra rýchly metabolizátori môžu niesť extragénové kópie CYP2D6 a vykazujú tým zvýšený metabolizmus kodeínu na morfín. Chudobní metabolizátori nevykazujú účinnú analgetickú odpoveď po požití kodeínu, zatiaľ čo ultra-rýchli metabolizátori môžu trpieť toxicitou v dôsledku zvýšených koncentrácií morfinu. V dôsledku toho sa kodeín neodporúča podávať pacientom s ultra-rapidnými alebo chudobnými metabolizačnými genotypmi [45].

3.6.6 Negatívne pôsobenie na renálny a hepatálny systém

Čo sa týka negatívneho pôsobenia kodeínu na hepatálny systém najmä u pacientov s poškodením pečene princíp aj dôsledky sú rovnaké, ako boli popísané u morfinu.

Väčšina metabolitov sa vylučuje renálne. Avšak glukuronidové konjugáty sa môžu stále vylučovať žľčovým systémom. Kodeín podstupuje filtráciu v glomerule a následne tubulárnu sekréciu a pasívnu reabsorpciu. Zatiaľ čo kodeín-6-glukuronid podstupuje len filtráciu a reabsorpciu, no nie však pasívnou formou kvôli jeho vyššej polarite. Poškodenie funkcie obličiek je časté u starších pacientov a zvyšuje riziko toxicity lieku. Faktory, ktoré môžu tiež

ovplyvniť farmakokinetiku, najmä viazanie liečiva, pri renálnom zlyhaní zahŕňajú hypoalbuminémiu, abnormálnu konfiguráciu albumínu, hyperlipoproteinémiu a vytesnenie akumulovanými endogénnymi a exogénnymi zlúčeninami vrátane metabolitov liekov [47]. Chronické užívanie opioidov vedie k väčšiemu výskytu toxicity spôsobenej nahromadením metabolitov, čo môže spôsobiť nežiaduce vedľajšie účinky. Jedným z dôvodov je to, že sa dosiahne rovnovážny stav lieku medzi distribúciou a akumuláciou v rôznych častiach tela. Predávkovanie opioidmi, akým je aj morfin môže spôsobiť akútne poškodenie obličiek v dôsledku dehydratácie, hypotenzie a zadržania moču [49]. Akumulácia kodeínu bola popísaná napr. u pacientov s hemodialýzou [47].

3.7 Papaverín

3.7.1 Chemické a fyzikálne vlastnosti

Je to opticky neaktívny alkaloid (Tabuľka 2) z dôvodu neprítomnosti chirálneho centra, s chemickým názvom 1-[(3,4-dimethoxyfenyl)methyl]-6,7-dimethoxyizochinolín [40]. Papaverín sa topí pri teplote 147 °C, je takmer nerozpustný vo vode, ťažko rozpustný v studenom ethanole, rozpustný v chloroforme, acetóne, horúcom ethanole a benzéne [58]. Prvýkrát bol izolovaný z maku siateho. Obsah kulminuje hlavne pred dobou zrenia, čo je najvhodnejšia doba na jeho izoláciu z prirodzeného zdroja, ópia, kde sa jeho množstvo pohybuje okolo 1 % [21, 20].

3.7.2 Využitie vazodilatačných schopností

Je dobre známe, že tento ópiový alkaloid, ktorý sa primárne používa na liečbu vazospazmu, indukuje relaxáciu ciev, kde pôsobí ako neselektívny inhibítor fosfodiesterázy a tým zvyšuje hladinu intracelulárnych cyklických AMP, ktoré následne indukujú relaxáciu ciev hladkého svalstva a vazodilatáciu [59, 60]. Okrem iného zvyšuje aj prietok krvi obličkami, tvorbu moču a klírens kreatinínu. Ľudský sérový albumín je hlavným nosičom papaverínu v krvnom riečisku [59]. Ukázalo sa, že zvyšuje hladinu druhých poslov cyklického cGMP a cAMP v hladkej svalovine, pričom obidva spôsobujú vazodilatáciu. Cyklický GMP aktivuje cGMP dependentnú proteinkinázu a sprostredkováva relaxáciu svalov redukciou Ca^{2+} [60].

Na základe jeho vazodilatačných schopností sa robila štúdia u pacientov so septickým šokom, ktorí mali komplikáciu v podobe zmien mikrocirkulačného krvného toku. Predložená štúdia preukázala, že jednorázová dávka papaverínu zlepšuje mikrovaskulárny prietok krvi pri septickom šoku bez nežiadúcich účinkov. Z toho vyplýva, že do budúcnosti sa papaverín javí ako sľubné vazodilatačné činidlo, ktoré dočasne zlepšuje mikrocirkuláciu po primárnej

tekutinovej resuscitácii v kombinácii s vazopresorovou liečbou (napr. dopamín) pri septickom šoku [61].

3.8 Thebaín

3.8.1 Chemické a fyzikálne vlastnosti

Chemickým názvom (5 α)-6,7,8,14-tetrahydro-4,5-epoxy-3,6-dimethoxy-17 methyl-morfinan, uvádza sa aj pôvodný názov paramorfin [62], prípadne synonymum 3-O-methyl-oripavín [41]. Je podobný svojou štruktúrou dimethyléteri morfia, ale na rozdiel od neho má dve dvojité konjugované väzby vo svojej molekule (Tabuľka 2). Sublimáciou pri teplote okolo 170 °C vytvára drobné ortorombické obdĺžnikové pláty, topí sa pri teplote 193 °C. Je pomerne solubilný, 1 g sa rozpustí v 1460 ml vody, asi v 15 ml horúceho alkoholu alebo 13 ml chloroformu, 200 ml éteru, 25 ml benzénu a 12 ml pyridínu [62]. Okrem maku siateho (*Papaver somniferum*) sa nachádza v maku listenatom (*Papaver bracteatum*), kde je hlavným alkaloidom [27], ale zároveň sa nachádza aj v maku východnom (*Papaver orientale*). No v tomto druhu len v skorom štádiu rastu tejto rastliny, pretože postupom času vzniká jeho derivát izothebaín. V roku 1853 bol prvý krát izolovaný z ópia, získaného práve z maku siateho [21].

3.8.2 Úloha markeru pri nelegálnom užívaní opiátov

Hlavné opioidné alkaloidy, akými sú kodeín a morfin, bývajú často prítomné v tele ako následok klinickej liečby. Na druhej strane je aj možnosť ilegálneho užívania ópia. Práve preto je detekcia týchto látok a ich metabolitov v z krvi prípadne moču problematická. Medzi ďalšie alkaloidy patria papaverín a noscapín, ktoré sú taktiež dostupné ako farmaceutické preparáty, ale thebaín nie je. Preto boli vykonané štúdie o detekcii thebaínu ako markera na rozlíšenie medzi legálnym a nelegálnym užívaním opiátových preparátov. Vlasy sú užitočnou vzorkou na poskytnutie dôkazov o predchádzajúcom užívaní drog v právnych prípadoch. Je však potrebné rozlišovať používanie ilegálnych opiátov z maku a farmaceutických výrobkov. Na tento účel bol thebaín zahrnutý do rutinej analytickej praxe na súčasnú kvantifikáciu kodeínu, morfinu, norkodeínu, normorfinu a 6-acetylmorfinu vo vlasoch [63].

3.9 Noscapín

3.9.1 Chemické a fyzikálne vlastnosti

Veľmi slabá zásada, vytvárajúca nestabilné soli s kyselinami a silnými zásadami, ktorá sa topí sa pri teplote 176 °C. Prakticky je nerozpustný v rastlinných olejoch a vo vode, dobre rozpustný je v acetóne, benzéne a slabšie v alkohole a étere [42]. Chemickým názvom (3S)-6,7-dimethoxy-3-[(5R)-5,6,7,8-tetrahydro-4-methoxy-6-methyl-1,3-dioxolo[4,5-g]-izochinolín-5-

yl]-1(3H)-izobenzofuranon (Tabuľka 2) [64]. Jedná sa o prírodný ftalidizochinolínový alkaloid, synonymom aj α -narkotín bol prvý krát izolovaný z ópia už v roku 1804, sa svojou koncentráciou v maku siatom pohybuje od 0,008 až po 0,276 % [20, 65]. Hlavnou surovinou pre jeho zisk je najmä ópium, kde dosahuje približne 0,74 %, avšak u niektorých druhov perského ópia stúpa až na hodnotu 11 %. Obsah noskapínu klesá sušením ópia, fajčením ópia výrazne sublimuje, no možno ho z 15 % z dymu regenerovať. Extrakciou ópia horúcou vodou, ostáva najväčší podiel nerozpustený v zbytku, z tadiaľ sa následne izoluje [21].

3.9.2 Využitie ako charakteru antitumorovej látky

V porovnaní s ostatnými hlavnými alkaloidmi obsiahnutými v maku siatom noskapín nevykazuje návykovosť. Okrem toho histologické štúdie preukázali, že nie je toxický pre normálne tkanivá. Noskapín má vynikajúce farmakologické vlastnosti, a preto čistý výťažok tohto alkaloidu z prírodných rastlín je veľmi dôležitý [65]. Noskapín sa po perorálnom podaní rýchlo absorbuje a po jednej hodine dosiahne v plazme maximálnu koncentráciu. Zistenie, že noskapín je silným protinádorovým činidlom, vzbudilo u lekárov značnú pozornosť. Tento objav bol veľmi prekvapivý, pretože noskapín sa u ľudí a pokusných zvierat používal ako liečebný prostriedok na potlačenie kašľa s veľmi malým množstvom vedľajších účinkov a bez tendencie spôsobovať závislosť. Ako protinádorové činidlo indukuje apoptózu v rôznych bunkových líniách a zastavuje delenie buniek v priebehu metafázy. Pri testoch na myšiach bolo navyše preukázané, že noskapín je účinný pri znižovaní rastu lymfómu a zvyšovaní doby prežitia myší s týmto typom nádora. Je pozoruhodné, že noskapín vykazoval malú alebo až žiadnu toxicitu pre obličky, pečeň, srdce, kostnú dreň, slezinu či tenké črevo v tumor-supresívnych dávkach. Navyše neinhiboval primárnu imunitnú odpoveď, ktorá je kriticky závislá od proliferácie lymfoidných buniek. Takže tieto výsledky naznačujú, že noskapín má v budúcnosti potenciál byť účinnou chemoterapeutickou látkou [66].

4 KVANTITATÍVNA ANALÝZA BIAS V BIOLOGICKÝCH A RASTLINNÝCH MATERIÁLOCH

4.1 Extrakcia

Ide o separačný proces, pri ktorom dochádza k prevedeniu zložky danej zmesi fázovým rozhraním z jednej fázy (kvapalnej, plynnej alebo tuhej) do druhej (kvapalnej, tuhej) [67]. Analýza liekov v biologických tekutinách predstavuje mnoho analytických problémov. Často sú lieky silne viazané na proteíny a existujú v komplexnej matrici. Rovnako rastlinné materiály papaveru narúšajú separáciu a kvantifikáciu ópiových alkaloidov. Preto je potrebný krok prípravy vzorky pred analýzou všetkých biologických a rastlinných vzoriek. Najčastejšie uvádzané metódy na prípravu vzoriek obsahujúce ópium sú extrakcia kvapalina-kvapalina a extrakcia tuhou fázou [68]. Zhrňujúce informácie o type matrice, príprave vzoriek, druhu použitej extrakcie či výsledná detekcia analytov sú z dôvodu prehľadnosti uvedené v kapitole 5 pod názvom Súhrnné tabuľky.

4.1.1 Extrakcia kvapalina-kvapalina

Extrakcia kvapalina-kvapalina (Liquid – Liquid Extraction, LLE) patrí k najstarším a najjednoduchším technikám izolácie zlúčenín z kvapalných vzoriek v analytickej chémii [69]. LLE má stále svoje uplatnenie najmä vo farmaceutickom priemysle, kde slúži často na odstránenie nečistôt zo vzorky. Základným princípom je tendencia analytu uprednostňovať jedno rozpúšťadlo pred iným nemiešateľným rozpúšťadlom. Čo sa týka typu použitého rozpúšťadla, platí základné pravidlo „podobné sa rozpúšťa v podobnom“ [70]. Hydrofilné zlúčeniny preferujú polárnu vodnú fázu [71], zatiaľ čo hydrofóbne zlúčeniny preferujú organické rozpúšťadlo (kyselina octová, ethanol, citrát sodný) [72]. Podstatnou nevýhodou tejto metódy je zdĺhavý a časovo náročný postup, pri ktorom sa používa veľké množstvo finančne nákladných a nebezpečných organických rozpúšťadiel [69]. Táto metóda bola použitá v štúdiu Kayo Yoshimatsu a kol., kde ako extrakčnú zmes pre izoláciu alkaloidov z papaveru použili ako organickú fázu chloroform a izopropanol v pomere 3 : 1 a vodná fáza bola alkalizovaná pomocou 28% amoniaku (Tabuľka 4) [72].

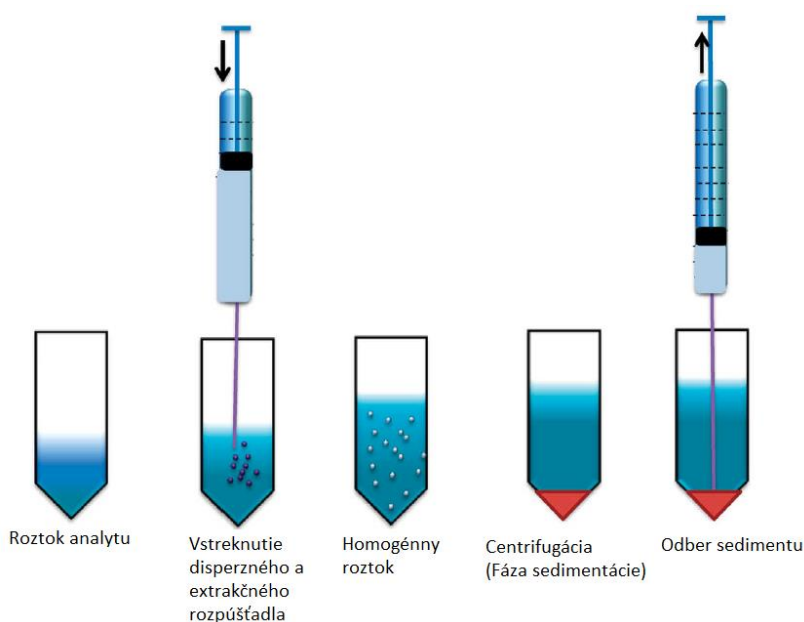
4.1.2 Mikroextrakcia kvapalnou fázou

LLE má mnoho nevýhod, ako je nutnosť väčšieho množstva organického rozpúšťadla, či nižšia citlivosť v porovnaní s novšími metódami. Z tohto dôvodu prešla táto technika rôznymi modifikáciami. Príkladom takejto modifikácie je práve mikroextrakcia kvapalnou fázou (Liquid – Phase Microextraction, LPME), ktorá má mnoho výhod: nižšia cena, nevyžaduje také

množstvo toxických organických rozpúšťadiel, kratší čas a vyššia účinnosť [73]. V súčasnosti sa technika LPME používa k odstráneniu interferencií, pri obohacovaní analytov prítomných vo vzorkách a na zjednodušenie zloženia ich matrice. Ďalšou modifikáciou je aj mikroextrakcia jednou kvapkou (Single – Drop Microextraction, SDME), v tomto prípade je organické rozpúšťadlo minimalizované na objem jednej kvapky, približne 1 až 8 μl [69].

4.1.3 Disperzná kvapalinová mikroextrakcia

Disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina (Dispersive Liquid – Liquid Microextraction, DLLME) je podskupinou LPME [69], ktorá zahŕňa použitie trojzložkového systému rozpúšťadiel. Analyty sú typicky súčasťou vodného rozpúšťadla [73]. K tomuto systému sa rýchlo vstrekuje zmes veľmi malého objemu extrakčného (chloroform) a disperzného rozpúšťadla (methanol, acetón), ktoré tiež použili vo svojej štúdiu na dôkaz ópiových alkaloidov v moči aj Mojtaba Shamsipur a kol. [6]. Extrakčné rozpúšťadlo má vyššiu hustotu ako voda a disperzné rozpúšťadlo je miešateľné s extrakčným rozpúšťadlom a vodným rozpúšťadlom vzorky. Po vstreknutí zmesi sa vytvorí zakalená zlúčenina kvôli malým kvapôčkam nemiešateľného extrakčného rozpúšťadla rozptýleného vo vodnom prostredí vzorky. Analyty vo vodnom roztoku vzorky sa veľmi rýchlo extrahujú do organického rozpúšťadla v dôsledku disperzie jemných kvapôčok v roztoku vzorky. Vďaka veľmi veľkému povrchu fázového rozhrani zabezpečeného extrakčnými kvapôčkami rozpúšťadla je extrakcia analytu vysoko účinná a extrémne rýchla. Finálny krok zahŕňa stočenie (centrifugácia), čím dochádza k sedimentácii extraktu na dno vzorkovacej nádoby, ktorý sa ďalej analyzuje [73].

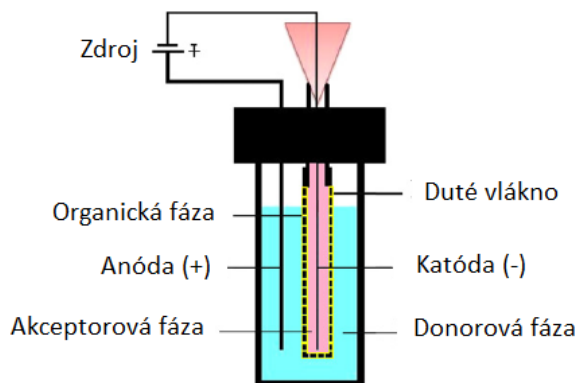


Obrázok 3: Princíp prevedenia DLLME [73]

Potrebná príprava vzorky a metóda kvantitatívnej analýzy po nasledovnej extrakcii sú uvedené v Tabuľke 3.

4.1.4 Elektromembránová extrakcia

Elektromembránová extrakcia (Electromembrane Extraction, EME) je založená na princípe LPME, konkrétne kvapalinovej mikroextrakcie s dutým vláknom (Hollow Fiber Liquid – Phase Microextraction, HF – LPME) [68]. Ide o citlivú jednokrokovú miniaturizovanú metódu extrakcie zložiek s nábojom z vodného roztoku, pri ktorom sa aplikuje elektrické napätie. Toto napätie umožňuje separáciu zložiek cez membránu dutého vlákna. Nabité analyty obsiahnuté vo vzorke putujú k opačne nabitej elektróde lokalizovanej v akceptorovom roztoku, kde sú napokon zachytené aj separované analyty [74].



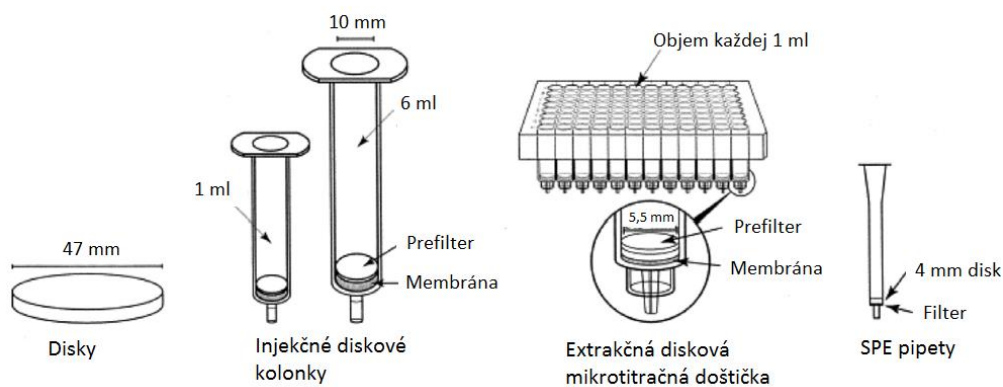
Obrázok 4: Scéma vybavenia pre EME [68]

V porovnaní s pasívnou HF – LPME je EME efektívnejšia a doba potrebná na extrahovanie látok je podstatne kratšia, priemerne trvá 15 minút. Shahram Seidi a kol. extrahovali a následne detekovali thebaín vo vzorkách moču a v toboľkách *P. bracteatum* pomocou tejto metódy. Použitá membrána bola na báze polymérneho polypropylénu s poróznosťou 2 μm a elektródy boli tvorené platinovými drôťmi. Ako akceptorová fáza slúžila 100 mM HCl, roztok vzorky (donorová fáza) ale obsahoval 1 mM HCl. Počas extrakcie bola EME jednotka neustále miešaná pomocou magnetického miešadla [68]. Príprava vzoriek pred extrakciou a detekcia ako v biologickej tak aj rastlinnej vzorke sú uvedené v Tabuľkách 3 a 4.

4.1.5 Extrakcia tuhou fázou

U extrakcie tuhou fázou (Solid Phase Extraction, SPE) je princípom zachytenie molekúl vzorky na tuhú fázu (sorbent), cez ktorú preteká vzorka [67]. Analyty musia mať väčšiu afinitu k tuhej fáze ako k matici vzorky. Výber sorbentu, umiestneného v kolónke je kľúčovým faktorom v SPE, pretože na základe toho sa odvíja selektivita. Výber závisí od analytov a ich fyzikálno-

chemických vlastností, typu matrice vzorky a interakcií so sorbentom a analytom [75]. Najčastejší typ sorbentu je na báze modifikovaných častíc silikagélu. Na povrchu týchto častíc sú vystavené silanolové voľné funkčné skupiny, na ktoré väzbou iných skupín sa menia aj chemické vlastnosti sorbentu a tým sa zvyšuje citlivosť metódy [67]. Sorbenty SPE sa pripravujú v rôznych podobách. Najobľúbenejšie formy SPE sú uvedené na Obrázku 6. Typ injekčnej kolónky je najpopulárnejší formát pre postupy SPE pri biologických aj rastlinných vzorkách [76]. Takéto kolónky boli použité na extrakciu morfinu, M3G a M6G ako metabolity heroínu z biologických vzoriek aj v štúdiu Susanne Lott a kol., kde vnútro kolóniek bolo kondicionované redestilovanou vodou, amónnym tlmivým roztokom (pufer) a methanolom, analyty boli následne eluované v zmesi methanolu a kyseliny octovej [77]. V štúdiu Chu-An Yang a kol., na extrakciu rôznych opiátov post mortem, použili na kondicionáciu sorbentov fosfátový pufer a analyty boli eluované zmesou methanolu, ethyl acetátu a hydroxidu amónneho [78]. Pri extrakcii thebaínu vo vzorkách vlasov v štúdiu Sooyeon Lee a kol. boli sorbenty taktiež upravené fosfátovým pufrom a skúmané zložky boli eluované zmesou dichlórmetánu, izopropanolu a hydroxidu amónneho, podobným spôsobom boli eluované aj látky morfin, kodeín a papaverín z ópia maku siateho zmesou dichlórmetánu a 2-propanolu v štúdiu Andres Meos a kol. [79]. Podrobnejšie informácie sú uvedené v Tabuľkách 3 a 4.



Obrázok 5: Typy prevedenia SPE [76]

SPE rieši niekoľko problémov spojených s LLE, ako sú neúplné oddelenia fáz, likvidácia veľkého množstva organických rozpúšťadiel. Vo všeobecnosti je účinnejšia ako LLE, čo prináša kvantitatívne extrakcie, ktoré sa dajú rýchlo a ľahko uskutočniť, umožňujú automatizáciu [71].

4.1.6 Ultrazvuková extrakcia

Asistovaná ultrazvuková extrakcia (Ultrasound Assisted Extraction, UAE) sa považuje za vyhovujúcu požiadavkám „zelenej analytickej metódy“, pretože znižuje spotrebu energie kvôli

nízkej dobe extrakcie a tiež preto, že minimalizuje množstvo rozpúšťadla [80]. Postup zahŕňa použitie ultrazvuku s frekvenciami od 20 kHz do 2000 kHz; to narúša steny tkanív a tým zvyšuje ich priepustnosť pre rozpúšťadlo [81]. Ultrazvukové účinky na kvapalné systémy súvisia hlavne s fenoménom kavitácie. Sú dva režimy na vykonanie UAE: priama aplikácia ultrazvukov na vzorku použitím sonikačnej sondy alebo nepriamo použitím ultrazvukovej vane, kde je vzorka umiestnená. Výhodou použitia sondy je najmä 100 násobne vyšší výkon a skrátenie doby extrakcie, nevyžaduje viac ako 5 minút. No jej nevýhodou je, že je pomerne agresívna v spojení so vzorkou, čo môže spôsobiť poškodenie matrice, či rozklad labilných analytov. Ultrazvukový kúpeľ sa v každom prípade používa najčastejšie, hlavne z dôvodu nižšej ceny v porovnaní so sondou [80]. V štúdií Ali R. Fakhari a kol., sa zaoberali optimálnymi podmienkami UAE pre extrakciu morfinu, kodeínu a thebaínu z rastlín rodu *Papaver*. Výsledkom štúdie bol záver, že dokonalá extrakcia sa dosiahla za optimálnych podmienok a to pri výkone 30 W s frekvenciou 60 kHz, pri teplote 40 °C a po dobu 60 minút. Pre porovnanie im slúžila macerácia, ktorá dosiahla rovnakú výťažnosť ale za 16 krát dlhší čas [82]. Prípravy vzoriek aj detekcia stanovovaných analytov sú uvedené v Tabuľke 4.

4.1.7 QuEChERS extrakcia

Patrí medzi novšie metódy, býva označovaná ako rýchla, jednoduchá, lacná, efektívna, robustná a bezpečná (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, QuEChERS). Primárne slúži na analýzu pesticídov v zelenine a ovocí. Jej výhodou je rýchlosť, ľahšia manipulácia, použitie nízkych objemov rozpúšťadiel a nízke náklady v porovnaní s inými extrakčnými metódami. Tento proces zahŕňa extrakciu vzorky použitím acetonitrilu a následne pridaním bezvodého síranu horečnatého a chloridu sodného na zníženie rozpustnosti organických liečiv vo vodnej fáze a na redukciu množstva vody v organickej fáze. Pri použití zložitejších biologických vzoriek ako je napr. plná krv sa vyžaduje ešte jeden krok pred extrakciou s primárnym a sekundárnym amínom (PSA). PSA je účinným sorbentom na odstránenie rôznych látok, ktoré by mohli proces ovplyvniť a tým výrazne znižuje matricový efekt. Povrch PSA obsahuje mnoho primárnych sekundárnych aminoskupín, ktoré môžu selektívne adsorbovať mastné kyseliny, dôležité interferencie vzoriek plnej krvi [83].

Prevedenie u vzorky plnej krvi:

V štúdií Emanuele A. Alves a kol., na extrakciu použili 300 µl plnej krvi, odobratej do nádoby a roztokom EDTA, ktorú v prvom kroku alkalizovali s jednou kvapkou 0,1 M NaOH, čím pH upravili na hodnotu 10. Následne vzorku scentrifugovali, odobrali supernatant a ďalej prebehla

sonikácia. V druhom kroku takto predpripravenú vzorku preniesli do skúmavky s práškovou zmesou 50 mg NaCl a 100 mg MgSO₄ (pomer 1:2), 500 µl ethylacetátu a nechali to scentrifugovať. Následne preniesli organickú fázu do ďalšej skúmavky. Tento proces je dobré opakovať niekoľko krát, z dôvodu maximalizovania účinnosti extrakcie. Všetky vzorky takto extrahované boli vysušené pod prúdom dusíka pri izbovej teplote [83]. Poslednými krokmi sú derivatizácia a následne analýza pomocou plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou (Tabuľka 4).

4.2 Derivatizácia

Derivatizácia materiálu po extrakcii sa väčšinou používa na zvýšenie prchavosti analytu. Prchavosť látky je väčšinou spojená s polaritou. Polárne rozpustené látky interagujú silnejšie, preto je potrebná väčšia tepelná energia na oddelenie polárnych molekúl, ktoré sú slabo prchavé. Pri podobných molekulových hmotnostiach majú polárne zlúčeniny oveľa vyššie teploty varu ako menej polárne zlúčeniny. Preto sa na zníženie polaritu rozpustených látok použijú derivatizačné reakcie, čo súvisí s poklesom teploty varu, čo umožní separáciu látok pomocou plynovej chromatografie (GC) [73].

Nároky na kvalitu najlepšieho derivatizačného činidla sú selektivita a rýchlosť reagovania s príslušným analytom. Získané deriváty musia byť prchavé, ale mali by tiež mať priaznivé chromatografické vlastnosti, to znamená tepelnú stabilitu, prijateľné retenčné časy, dobré oddelenie od matricovej interferencie alebo iných zlúčenín vzorky a dobrú odozvu detektora. Zároveň derivatizačné činidlo musí byť relatívne stabilné, ľahko a cenovo dostupné. Alkylsilylové a najmä trialkylsilylové činidlá sú najuniverzálnejšie derivatizačné činidlá v GC [73]. V prípade detekcie morfinu, kodeínu a papaverínu v štúdiu E. A. Alves a kol. sa ku vzorke plnej krvi pridal N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid (MSTFA) [83], Sooyeon Lee a kol. u detekcie thebaínu metódou GC vo vzorkách vlasov použili bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamid (BSTFA) [63].

4.3 Chromatografické metódy

Je to súbor fyzikálne separačných metód, v ktorých sú zložky, ktoré sa majú oddeliť, distribuované medzi dve fázy, z ktorých jedna je stacionárna (SF), zatiaľ čo druhá je mobilná fáza (MF). Oddelenie je možné z dôvodu, že rôzne zlúčeniny majú rôzne afinity pre mobilnú a stacionárnu fázu, čo ovplyvňuje ich rozdelenie medzi obe fázy a aj ich výsledné správanie v systéme [84]. Mobilnou fázou môže byť kvapalina alebo plyn. Zložky danej vzorky, ktoré

majú vyššiu afinitu k stacionárnej fáze sa v systéme zadržujú, tie s menšou afinitou prechádzajú systémom rýchlejšie [67].

Podľa skupenstva MF sa tieto metódy delia na: kvapalinovú (Liquid Chromatography, LC), kde MF je kvapalina a plynovú (Gas Chromatography, GC), v tomto prípade je MF plyn. Na základe usporiadania stacionárnej fázy sú ďalej členené na kolónové, kde SF je umiestnená vo vnútri chromatografickej kolóny a plošné techniky, kde SF je súčasťou pevného podkladu. Medzi plošné techniky sú radené papierová (Paper Chromatography, PC) a tenkovrstvová chromatografia (Thin Layer Chromatography, TLC) [67].

Okrem chromatografických metód sa v menšej miere používajú aj novšie metódy akými je napr. kapilárna elektroforéza (Capillary Electrophoresis, CE), ktorá prebieha za konštantného prúdu s UV detekciou [82].

4.3.1 Plynová chromatografia

U plynovej chromatografie (Gas Chromatography, GC) ako MF slúži nosný plyn, ktorý po nadávkovaní vzorky ju unáša kolónou [67]. V prípade analýzy BIAs ako nosný plyn slúži hélium s prietokom kolónou 1,0 ml/min. Používajú sa kapilárne kolóny s dĺžkou 30 m a vnútorným priemerom 0,25 mm [63]. Vnútorná stena kapiláry býva vystlaná vrstvou SF 5% difenylu a 95% dimethyl polysiloxanu o hrúbke 0,25 μm . Vzorka v kvapalnom stave o objeme 1 μl sa vstrekuje priamo do plynového chromatografu [83]. Následne v kolóne dochádza k separácii zložiek na základe rôznej afinity k SF [84]. Miernou nevýhodou tejto metódy je nutnosť derivatizácie vzorky, ktorá bola nutná aj pri detekcii ópiových alkaloidov pomocou GC-MS v plnej krvi po QuEChERS extrakcii [83].

Detektory používané v GC pri analýze sú prevažne s hmotnostnou detekciou (Mass Spectrometry, MS), kde ide o spojenie plynového chromatografu s hmotnostným spektrometrom (GC-MS). Toto spojenie má veľký význam najmä pri identifikácii neznámych látok. Ióny sú v hmotnostnom spektrometri analyzované rôznymi typmi analyzátorov [67]. U BIAs sa jedná hlavne o iónovú pascu [83]. GC-MS slúži aj ako referenčná metóda napr. pri detekcii opioidov a ich metabolitov s použitím LC-MS [85].

4.3.2 Kvapalinová chromatografia

V prípade kvapalinovej chromatografie (Liquid Chromatography, LC) sa na rozdiel od GC slúži ako MF kvapalina, ktorá okrem SF taktiež rozhoduje o separácii zložiek analytu. Tento proces závisí od afinity vzorky k jednej aj druhej fáze. Jednou z výhod LC je možnosť pracovať za laboratórnej teploty a nie je potrebné prevádzať vzorku do plynného skupenstva.

V porovnaní s GC však nemá dostatočnú účinnosť [67]. Na analýzu ópiových alkaloidov v rutinej praxi slúžia najmä vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) a GC, ktorá je síce účinnejšia ale je potrebná derivatizácia vzoriek, čo je podstatná nevýhoda oproti HPLC [6].

Pri vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) sa na rozdiel od LC ako náplň kolón používajú častice s oveľa menším priemerom v rozsahu 3 až 5 μm [86]. Keďže tieto častice kladú odpor voči pretekajúcej kvapaline, je treba pracovať za vyššieho tlaku. V súčasnej praxi najpoužívanejším typom prevedenia HPLC je chromatografia s obrátenými fázami (Reversed Phase Liquid Chromatography, RPLC). Pri RPLC sa na rozdiel od klasickej LC s normálnymi fázami používa hydrofóbna SF (alkyly viazané na silikagél) a MF je polárna. MF býva často tvorená zmesou troch rozpúšťadiel, čo umožní separovať široké rozmedzie analytov s rozdielnou polaritou. Hlavnými rozpúšťadlami sú voda, metanol, acetonitril a tetrahydrofurán, niekedy sa pridáva ešte malý podiel pufru na udržanie stálej hodnoty pH [67].

Novou kategóriou analytickej separácie je Ultra výkonná kvapalinová chromatografia (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC), ktorá pracuje na podobných princípoch HPLC pri súčasnom zvyšovaní celkových atribútov na rýchlosť, selektivitu, citlivosť a rozlíšenie. Pri analýze opioidov a ich metabolitov sa ako náplň kolón (2.1 \times 50 mm) s prietokom 0,3 – 0,5 ml/min používajú jemné častice s priemerom najmä 1,8 μm [78]. Týmto spôsobom sa šetrí čas, znižuje sa spotreba rozpúšťadiel a celkových nákladov [87, 86]. Ako MF sa používa zmes metanolu a destilovanej vody s obsahom kyseliny mravčej a mravčanu amónneho [78].

Najviac zastúpené detektory v oblasti LC, konkrétne HPLC v analýze BIAs v rastlinných vzorkách sú v ultrafialovej a viditeľnej oblasti (HPLC-UV/VIS) [68, 79, 88], často v kombinácii s fotodiódovým polom (Photodiode array detector, PD) [72]. Ešte častejšia je pri analýze biologického materiálu hmotnostná detekcia, či už základné prevedenie (LC-MS) alebo modifikácia v podobe tandemovej hmotnostnej spektrometrie (LC-MS/MS), ktorá dodáva analyzátoru schopnosť separovať rôzne ióny a zároveň generovať fragmenty z vybraných iónov a následne určiť ich hmotnosť. Fragmentované ióny slúžia na štruktúrne určenie pôvodných molekulárnych iónov [89, 77]. Typicky sa MS/MS experimenty uskutočňujú kolíziou vybraného iónu s molekulami inertného plynu napr. hélium alebo argón a výsledné fragmenty sa podrobia hmotnostnej analýze [90, 89, 77].

Vzhľadom na to, že vzorky z biologických matric zvyčajne nie sú priamo vhodné pre analýzu BIAs metódou LC-MS/MS, príprava vzoriek je nevyhnutná a tradične sa vykonáva s použitím

precipitácie proteínov (PPT), LLE alebo SPE. Príprava vzoriek s PPT sa široko využíva pri bioanalýze vzoriek plazmy ale aj plnej krvi [90]. Ako precipitačné činidlo prevažne slúži acetonitril. Vzorka sa následne ešte scentrifuguje a výsledný supernatant sa vysuší pod prúdom dusíka [78].

4.3.3 Hmotnostná spektrometria v spojení s chromatografickými metódami

Pri hmotnostnej spektrometrii (Mass Spectrometry, MS) sa neurčuje hmotnosť priamo, ale určuje hmotnosť molekuly na základe pomeru hmotnosť/náboj (m/z) jej iónov s využitím elektrických alebo magnetických síl. Znalosť m/z iónov umožňuje určiť, čo je vo vzorke analytu prítomné, zatiaľ čo intenzita odpovedá na otázku v akom množstve [90].

Základná zostava prevedenia hmotnostnej spektrometrie pozostáva zo zavedenia vzorky, či už v kvapalnej, plynnej alebo pevnej forme; ionizácie, kedy sú komponenty vzorky ionizované vhodným zdrojom, v prípade BIAs v spojení s LC je to najčastejšie ionizačným elektrosprejom (Electrospray Ionization, ESI) v pozitívnom móde alebo chemickou ionizáciou za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI); nasleduje separácia pomocou analyzátora, kde ióny sú triedené podľa ich m/z použitím elektromagnetických polí. Prevažne sa používa kvadrupólový (Q), trojitý kvadrupólový analyzátor (Triple Quadrupole, TQ) alebo iónová pasca (Ion Trap), prípadne ich kombinácia (Quadrupole Ion Trap, QIT). Poslednou súčasťou je detektor, v ktorom sa iónový tok mení na elektrický prúd a tým sa získa výsledné hmotnostné spektrum [90, 78].

5 SÚHRNNÉ TABUĽKY

Tabuľka 3: Izolácia a detekcia BIAs v biologickom materiále

Stanovované látky	Typ vzorky	Príprava vzorky	Extrakcia	Detekcia	LOQ	LOD	Zdroj
Morfín, Kodeín, Noskapín, Papaverín, Thebain	moč	centrifugácia, 2 ml moču zriedený na 5 ml, 0,5 ml Na ₂ CO ₃	DLLME	HPLC -UV/VIS (20 µl)	-	7,0 µg/l	[6]
						0,2 µg/l	
						10,0 µg/l	
						0,5 µg/l	
						10,0 µg/l	
Morfín, M6G, M3G (metaboly heroínu)	sérum	1 ml séra, vnútorný štandard, 2 ml pufru octanu amónneho	SPE (Chromabond C18ec- SPE kolonka)	LC-(ESI-TQ)- MS/MS	10,2 ng/ml	1,7 ng/ml	[77]
					8,0 ng/ml	4,1 ng/ml	
					9,0 ng/ml	0,7 ng/ml	
plazma / moč	50 µl moču, 200 µl MF s vnútorným štandardom, centrifugácia	Precipitácia vzorky plazmy (acetonitril)	UPLC-(ESI-TQ)- MS/MS (10 µl)	0,5 / 2,0 ng/ml	-	[78]	
				2,0 / 20,0 ng/ml			
				0,5 / 4,0 ng/ml			
Morfín, Kodeín, Papaverín,	plná krv	300 µl krvi (EDTA), 1 kvapka NaOH, vnútorný štandard	QuEChERS, derivatizácia (MSTFA)	GC-IT/MS	46,3 ng/ml	31,8 ng/ml	[83]
					73,4 ng/ml	63,6 ng/ml	
					109,1 ng/ml	32,7 ng/ml	
Morfín, Kodeín	moč	1 ml moču, 50 µl vnútorného štandardu, 1,0 ml fosfátový pufer,	SPE	LC-(TQ)-MS/MS (5 µl)	1,0 - 5,0 ng/ml	1,0 - 5,0 ng/ml	[89]
Thebain	moč	-	EME	HPLC-UV/VIS (15 µl)	-	0,015 µg/ml	[68]
	vlasý	10 - 50 mg umytých vlasov, 2 ml HCl, 50 µl vnútorného štandardu	SPE, derivatizácia (MSTFA)	GC-MS	5,0 ng	2,5 ng	[63]

Tabuľka 4: Izolácia a detekcia BIAs v rastlinnom materiále

Stanovované látky	Typ vzorky	Príprava vzorky	Extrakcia	Detekcia	LOQ	LOD	Zdroj
Morfin, Kodeín, Noskapín, Papaverín, Thebáin	surové listy <i>P.somniferum</i>	150 mg vysušenej vzorky, 1,5 ml vodného roztoku kyseliny octovej, centrifugácia, sonikácia	LLE (chloroform a izopropanol, 3 : 1; 28% amoniak), SPE (voda, kyselina octová a citrát sodný)	HPLC-(PD)- UV/VIS (20 µl)	-	-	[72]
Morfin,	tobolky <i>P. somniferum</i>	-	UAE	HPLC- UV/VIS (20 µl)	5,4 mg/500 mg	1,8 mg/500 mg	[88]
Morfin, Kodeín, Papaverín	ópium z <i>P. somniferum</i>	20 ml ethanolu, sonikácia, 25 ml ethanol	SPE	HPLC- UV/VIS (20 µl)	-	-	[79]
Thebáin	tobolky <i>P. bracteatum</i>	500 mg vysušenej vzorky, 10 ml zmesi methanol, voda (4 : 1), sonikácia, centrifugácia	EME	HPLC- UV/VIS (15 µl)	-	5 – 15 µg/l	[68]

- Znamená, že v danej štúdii nebolo uvedené

6 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo vypracovať literárnu rešerš so zameraním na päť hlavných alkaloidov obsiahnutých v maku siatom (*Papaver somniferum*), ktorými sú morfín, kodeín, papaverín, thebaín a noskapín. Sú to prírodne sa vyskytujúce sekundárne metabolity rastlín z rodu *Papaver*, patriace do triedy pravých alkaloidov, konkrétne do skupiny benzylochinolínových. Majú významné medicínske a farmaceutické vlastnosti, u opioidov sú to najmä analgetické a antitusické, alebo u noskapínu antikarcinogénny s nádejným uplatnením v budúcnosti. Mnohé z nich za určitých podmienok ako je predávkovanie, či poruchou ich metabolizmu môžu zapríčiniť toxicitu. Z tohto dôvodu je potrebné pri podávaní týchto liečiv monitorovať ich hladinu. Napriek mnohým nepriaznivým účinkom, či už na renálny systém alebo hepatálny majú opioidy stále svoje zastúpenie v medicíne. Pri jednotlivých rastlinných druhoch sa taktiež robí kontrola hladín týchto alkaloidov z hľadiska ich ďalšieho využitia.

Na kvantitatívnu analýzu ópiových alkaloidov a ich derivátov sa ako biologický materiál používa moč, plazma, sérum, prípadne plná krv a vlasy. Pred analýzou vzorka prechádza určitou úpravou ako napr. sonikácia či centrifugácia a prídavok vnútorného štandardu. Po tomto kroku nasleduje už izolácia príslušnými extrakčnými metódami. Prednostne sa používa extrakcia tuhou fázou s kolónkami naplnenými sorbentom na báze silikagélu. jej prednosťami je šetrenie množstva rozpúšťadiel ale doba extrakcie v porovnaní s typom kvapalina- kvapalina. V niektorých štúdiách sa priklonili aj novším metódam ako elektromembránová, ultrazvuková, či QuEChERS, ktoré podstatne znižujú náklady za energiu, redukujú množstvo rozpúšťadla a taktiež skracujú čas potrebný na extrakciu. Pri vzorkách plazmy sa väčšinou používa precipitačná metóda pomocou acetonitrilu.

Pri kvantitatívnej analýze týchto alkaloidov v rastlinných vzorkách maku sateho, prípadne iných druhov s obsahom tejto skupiny látok sa používa prednostne vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s reverznými fázami s detekciou vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti. Najnovšie sa postupne do popredia dostávajú aj elektroforetické metódy, konkrétne kapilárna elektroforéza. Čo sa týka analýz v biologickom materiáli, tu majú uplatnenie prevažne klasická kvapalinová, ale aj plynová chromatografia s hmotnostnou detekciou často v tandemovom usporiadaní. Pri plynovej je značnou nevýhodou, či už sa jedná o vzorky krvi alebo moču, potreba derivatizácie po predchádzajúcej extrakcii, ale napriek tomu má vyššiu účinnosť ako kvapalinová chromatografia.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] SCHIFF, Paul. Opium and its alkaloids. *American journal of pharmaceutical education*. 2002, **66**(2), s. 186-194.
- [2] NESMĚRÁK, Karel. Historie analgetik [History of analgesics]. *Bolest*. 2016, **19**(3), s. 103-112.
- [3] DEÁKOVÁ, Ľubomíra. Chemické zloženie a oxidačná stabilita semien a oleja maku siateho (*Papaver somniferum* L.). In: *Mak siaty pre Slovensko*. Piešťany: Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav rastlinnej výroby, 2016, s. 28-29. ISBN 978-80-89417-70-4.
- [4] FÉJER, Jaroslav. *Morfologicko – biologická diverzita druhu mak siaty (Papaver somniferum L.) a jej hodnotenie* [online]. Prešov: Prešovská univerzita v Prešove Fakulta humanitných a prírodných vied, 2015. 101 s. [cit. 2017-11-21]. ISBN 978-80-555-1334-8. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/282664981_Morfologicko_-_biologicka_diverzita_druhu_mak_siaty_Papaver_somniferum_L_a_jej_hodnotenie_Morphological_and_biological_diversity_of_opium_poppy_species_Papaver_somniferum_L_and_its_evaluation.
- [5] KALANT, H. Opium revisited: a brief review of its nature, composition, non-medical use and relative risks. *Society for the Study of Addiction to Alcohol and Other Drugs*. 1997, **92**(2), s. 267-277.
- [6] SHAMSIPUR, Mojtaba a Nazir FATTAHI. Extraction and determination of opium alkaloids in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. © 2011 Elsevier B.V., 2011, **879**(28), s. 2978–2983. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.08.033.
- [7] EWANS, William, Daphne EWANS a George TREASE. *Trease and Evans' pharmacognosy*. 15. vyd. Edinburgh: WB Saunders, 2002, s. 333-362. ISBN 0702026174.
- [8] REMŽA, Jaroslav. *Mak siaty - podmienky pestovania v SR, umiestňovanie na trh, výskyt alkaloidov a analýza rizika* [online]. ŠVPS SR: Copyright © 1998 - 2017 Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR, 2008 [cit. 2017-11-18]. Dostupné z: <http://www.mpsr.sk/index.php?navID=525&navID2=525&sID=111&id=1224>.
- [9] BECHYNĚ, M., T. KADLEC a J. VAŠÁK. *Mák*. 1. Praha: Semafor, 2001, 127 s.
- [10] FEJÉR, J. Nové trendy a perspektívy šľachtenia maku siateho (*Papaver somniferum* L.). In: *Osivo a sadba: VIII. odborný a vedecký seminár*. Praha: ČZU, 2007, s. 122-128. ISBN 978-80-213-1610-2.
- [11] SANDBERG, Finn a Desmond CORRIGAN. *Natural remedies: Their Origins and Uses*. 1. vyd. London: © Taylor & Francis, 2001, 169 s. ISBN ISBN 0-203-34653-X.

- [12] MATYÁŠOVÁ, Elena. *Variabilita genových zdrojů máku (Papaver somniferum L.)* [online]. 2010, 203 s. [cit. 2018-06-11]. Dostupné z: <http://www.agrobiologie.cz/pds/dp/matyasova.pdf>. Disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Vedoucí práce Doc. Ing. Václav Hejtník, Ph.D.
- [13] HAVRLETOVÁ, Michaela. Projekt popylisis: rostliny máku siateho produkujúce semeno s lepšími vlastnosťami pre potravinársky priemysel. In: *Mak pre Slovensko*. Piešťany: Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, 2012, s. 22-24. ISBN 978-80-89417-43-8.
- [14] MUCHOVÁ, Darina, Mária LICHVÁROVÁ a Stanislava VELIČKOVÁ. Odroda – dôležitý intenzifikačný faktor pri pestovaní máku. In: *Mak pre Slovensko*. Piešťany: Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany, 2012, s. 16-21. ISBN 978-80-89417-43-8.
- [15] YAZICI, Levent a Güngör YILMAZ. Determination of alkaloids and oil rates of some poppy (*papaver somniferum L.*) varieties cultivated as winter and summer. *International Journal of Secondary Metabolite*. 2017, **4**(3-2), s. 359-362. DOI: 10.21448/ijsm.373906. ISSN 2148-6905 online.
- [16] VERMA, Nidhi a Sudhir SHUKLA. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2015, **4**(2), s. 105-113. DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.09.002.
- [17] ANISZEWSKI, Tadeusz. *Alkaloids- Secret of life: Aklaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. 1. vyd. Amsterdam: Elsevier B.V., 2007, s. 61-92. ISBN 978-0-444-52736-3.
- [18] ANISZEWSKI, Tadeusz. *Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications*. 2. vyd. Waltham, MA: Elsevier, 2015, s. 2-28. ISBN 9780444594334.
- [19] WINK, Michael a Margaret ROBERTS. *Alkaloids : biochemistry, ecology, and medicinal applications*. 1. vyd. New York: Plenum Press, 1998. s. 1-8. ISBN 0-306-45465-3. Dostupné také z: https://books.google.cz/books?id=bMCzyrAtrvYC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ViewAPI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.
- [20] POPL, Milan, Jan FÄHNRIK a Vlastimil TATAR. *Chromatographic analysis of alkaloids*. 1. New York: Marcel Dekker, 1990, s. 10-31. ISBN 0-8247-8140-6.
- [21] STANĚK, Jaroslav. *Alkaloidy*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1957, s. 172-288.
- [22] HEGNAUER, R. Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. *Phytochemistry*. 1998, **27**(8), s. 2423-2427. DOI: 10.1016/0031-9422(88)87006-7.
- [23] LARKIN, Philip, James MILLER a Robert ALLEN. Increasing morphinan alkaloid production by over-expressing codeinone reductase in transgenic *Papaver somniferum*. *Plant Biotechnology Journal*. 2006, (5), s. 26–37. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2006.00212.x.

- [24] FACCHINI, Peter a Guillaume BEAUDOIN. Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy. *Planta*. Springer Berlin Heidelberg, 2014, **240**(1), s. 19–32. DOI: 0.1007/s00425-014-2056-8. ISSN 1432-2048.
- [25] KRAMLINGER, Valerie, M. ROJAS, Tatsuyuki KANAMORI a F. GUENGERICH. Cytochrome P450 3A Enzymes Catalyze the O6-Demethylation of Thebaine, a Key Step in Endogenous Mammalian Morphine Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015, **290**(33), s. 20200–20210. DOI: 10.1074/jbc.M115.665331.
- [26] RIDA, Padmashree, Dillon LIVECCHIE, Angela OGDEN, Jun ZHOU a Ritu ANEJA. The Noscaine Chronicle: A Pharmacologic-Historic Biography of the Opiate Alkaloid Family and its Clinical Applications. *Med Res Rev*. 2015, **35**(5), s. 1-30. DOI: 10.1002/med.21357.
- [27] ATAEE, Nazanin, Jamshid FOOLADI, Mohammad NAMAIE a Fateme MIRZAJANI. Response Surface Methodology Optimization of Thebaine Biotransformation into Codeine and Morphine Using *Bacillus* sp. FAR. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2017, **51**(4), s. 684-691. DOI: 10.5530/ijper.51.4.101.
- [28] LEJČKO, Jan. Silné Opioidy v léčbě chronické bolesti. *NEUROLOGIE PRO PRAXI*. 2006, (3), s. 141-144.
- [29] KATZUNG, Bertram. *Základní a klinická farmakologie*. Vyd. v ČR 2., V H&H 2. Jinočany: H & H, 2006, s. 489-495. ISBN 80-7319-056-7.
- [30] BENZON, Honorio, James RATHMELL, Christopher WU, Dennis TURK, Charles ARGOFF a Robert HURLEY. *Practical management of pain*. Fifth edition. Philadelphia, PA: Elsevier-Mosby, 2014, s. 495-507. ISBN 978-0-323-08340-9.
- [31] GHELARDINI, Carla, Lorenzo MANNELLI a Enrica BIANCHI. The pharmacological basis of opioids. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 2015, **12**(3), s. 219-221. DOI: 10.11138/ccmbm/2015.12.3.219.
- [32] ŠLAMBEROVÁ, R. Opioidní receptory CNS: funkce, struktura a distribuce. *Československá fyziologie*. 2004, **53**(4), s. 159-166.
- [33] MCDONALD, John a DG LAMBERT. Opioid receptors. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 2005, (5), s. 22-25. DOI: 10.1093/bjaceaccp/mki004.
- [34] OVERHOLSER, Brian a David FOSTER. Opioid Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions. *The American Journal of Managed Care*. 2011, **11**(17), s. 276-287.
- [35] SMITH, Howard. Opioid Metabolism. *Mayo Clinic Proceedings*. 2009, **84**(7), s. 613-624. DOI: 10.1016/S0025-6196(11)60750-7.
- [36] MEECH, Robyn a Peter MACKENZIE. Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1997, (24), s. 907-915.

- [37] HOLMQUIST, Gregory. Opioid Metabolism and Effects of Cytochrome P450. *Pain Medicine*. 2009, (10), s. 20-29. DOI: 10.1111/j.1526-4637.2009.00596.x.
- [38] Morphine. *THE MERCK INDEX* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): © Royal Society of Chemistry 2018, b.r., 2013 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m7631/morphine?q=authorize>.
- [39] Codeine. *PubChem Substance and Compound databases.: National Center for Biotechnology Information* [online]. Rockville Pike (Bethesda): U.S. National Library of Medicine, 1993, 21. Februára 2017 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/codeine#section=Information-Sources>.
- [40] Papaverine. *THE MERCK INDEX* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): © Royal Society of Chemistry 2018, b.r. [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m8392/papaverine?q=authorize>.
- [41] Thebaine. *PubChem Substance and Compound databases.* [online]. Rockville Pike (Bethesda): U.S. National Library of Medicine, 1993, 21. Februára 2017 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5324289#section=Top>.
- [42] Noscapine. *PubChem Substance and Compound databases.: National Center for Biotechnology Information* [online]. Rockville Pike (Bethesda): U.S. National Library of Medicine, 1993, 21. Februára 2017 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/275196#section=Solubility>.
- [43] URBÁNEK, Karel. Hydromorfon v lékové formě s prodlouženým uvolňováním aktivním osmotickým systémem OROS. *Remedia*. 2007, (5), s. 502-503.
- [44] KULICHOVÁ, Marta. Hydromorfón a jeho miesto v liečbe bolesti. *Remedia*. 2010, **3**(1), s. 25-27.
- [45] DEPRIEST, A., B. PUET, A. HOLT, A. ROBERTS a E. CONE. Metabolism and Disposition of Prescription Opioids: Review. *Forensic science*. Copyright© 2015 Central Police University Press, 2015, **27**(2), s. 115-145. ISSN 1042-7201.
- [46] SILBERGNAGL, Stefan a Florian LANG. *Atlas patofyziologie*. 2. vyd. Grada Publishing a.s., 2012, s. 152-154. ISBN 978-80-247-3555-9.
- [47] MERCADANTE, Sebastiano a Edoardo ARCURI. Opioids and Renal Function. *The Journal of Pain*. 2004, **5**(1), s. 2-19. DOI: 10.1016/j.jpain.2003.09.007.
- [48] SOLEIMANPOUR, Hassan, Saeid SAFARI, Kavous NIA, Sarvin SANAIE a Seyed ALAVIAN. Opioid Drugs in Patients With Liver Disease: A Systematic Review. *Hepat Mon*. 2016, **16**(4), s. 1-12. DOI: 10.5812/hepatmon.32636.
- [49] FRIEDMAN, Eli a Mary MALLAPPALLIL. What Do We Know about Opioids and the Kidney?: Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(1), s. 1-17. DOI: 10.3390/ijms18010223.

- [50] CHANG, Ming-Cheng, Shou-Zen FAN, Po-Ni HSIAO, Wen-Fang CHENG a Wei-Zen SUN. Influence of morphine on host immunity. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica*. 2011, **49**, s. 105-108. DOI: 10.1016/j.aat.2011.08.003.
- [51] Codeine. *THE MERCK INDEX* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): © Royal Society of Chemistry 2018, b.r., 2013 [cit. 2018-03-24]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m3718/codeine?q=authorize>.
- [52] FROST, Joachim, Trine LØKKEN, Arne HELLAND, Ivar NORDRUMAC a Lars SLØRDAL. Post-mortem levels and tissue distribution of codeine, codeine-6-glucuronide, norcodeine, morphine and morphine glucuronides in a series of codeine-related deaths. *Forensic Science International*. 2016, **262**, s. 138-137. DOI: 10.1016/j.forsciint.2016.02.051.
- [53] TAKAHAMA, Kazuo a Tetsuya SHIRASAKI. Central and peripheral mechanisms of narcotic antitussives: codeine-sensitive and -resistant coughs. *BioMed Central*. 2007, **3**(8), s. 1-8. DOI: 10.1186/1745-9974-3-8.
- [54] BOLSER, Donald. Current and future centrally acting antitussives. *Respir Physiol Neurobiol*. 2006, **152**(3), s. 349–355. DOI: 10.1016/j.resp.2006.01.015.
- [55] SIMERA, M., I. POLIACEK a J. JAKUS. Central antitussive effect of codeine in the anesthetized rabbit. *European journal of medical research*. 2010, **15**(2), s 184-188. DOI: 10.1186/2047-783X-15-S2-184.
- [56] BOLSER, Donald a Paul DAVENPORT. Codeine and cough: an ineffective gold standard. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007, **7**(1), s. 32-36. DOI: 10.1097/ACI.0b013e3280115145.
- [57] MALM, Heli a Cornelia BORISCH. Analgesics, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), muscle relaxants, and antigout medications. *Drugs During Pregnancy and Lactation*. 3. vyd. Copyright © Elsevier B.V., 2015, s. 27–58. DOI: 10.1016/B978-0-12-408078-2.00002-0. ISBN: 978-0-12-408078-2.
- [58] HIFNAWY, Mohamed a Farid MUHTADI. Analytical Profile of Papaverine Hydrochloride. *Analytical Profiles of Drug Substances*. 1988, **17**(1), s. 367-447. DOI: 10.1016/S0099-5428(08)60223-3.
- [59] AHMADZADEH, Alireza. Papaverine increases human serum albumin glycation. *J Biol Phys*. 2014, **40**(1), s. 97–107. DOI: 10.1007/s10867-013-9337-5.
- [60] HOCKING, Kyle, Gowthami PUTUMBAKA, Eric WISE, Joyce CHEUNG-FLYNN, Colleen BROPHY a Padmini KOMALAVILAS. Papaverine Prevents Vasospasm by Regulation of Myosin Light Chain Phosphorylation and Actin Polymerization in Human Saphenous Vein. *PLOS ONE*. 2016, **11**(5), s. 1-18. DOI: 10.1371/journal.pone.0154460.
- [61] LI, Hongliang, Xi ZHU, Gaiqi YAO a Zongyu WANG. Papaverine improves sublingual blood flow in patients with septic shock. *Journal of surgical research*. 2015, **195**(1), s. 271-276. DOI: 10.1016/j.jss.2015.01.016.

- [62] Thebaine. *THE MERCK INDEX* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): © Royal Society of Chemistry 2018, b.r., 2013 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m10697/thebaine?q=authorize>.
- [63] LEE, Sooyeon. Thebaine in hair as a marker for chronic use of illegal opium poppy substances. *Forensic Science International*. 2010, **204**(1-3), s. 115–118. DOI: 10.1016/j.forsciint.2010.05.013.
- [64] Noscapine. *THE MERCK INDEX* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): © Royal Society of Chemistry 2018, b.r. [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m8077/noscapine?q=authorize>.
- [65] BULDUK, Ibrahim a Fulya TAKTAK. Isolation and Characterization of Antitumor Alkaloid from Poppy Capsules (*Papaver somniferum*). *Journal of Chemistry*. 2013, **2013**, s. 1-4. DOI: 10.1155/2013/493870.
- [66] MAHMOUDIAN, Massoud a Parvaneh RAHIMI-MOGHADDAM. The Anti-Cancer Activity of Noscapine: A Review. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. © Bentham Science Publishers Ltd., 2009, **4**(1), s. 92-97. DOI: 10.2174/157489209787002524.
- [67] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [68] SEIDIA, Shahram. Determination of thebaine in water samples, biological fluids, poppy capsule, and narcotic drugs, using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography analysis. *Analytica Chimica Acta*. © 2011 Elsevier B.V., 2011, **701**(2), s. 181–188. DOI: 10.1016/j.aca.2011.05.042.
- [69] RUTKOWSKA, Małgorzata, Kinga DUBALSKA a Piotr KONIECZKA. Microextraction Techniques Used in the Procedures for Determining Organomercury and Organotin Compounds in Environmental Samples. *Molecules*. 2014, **19**(6), s. 7581-7609. DOI: 10.3390/molecules19067581. ISSN 1420-3049.
- [70] STANBURY, Peter, Allan WHITAKER a Stephen HALL. *Principles of Fermentation Technology (3rd Edition)* [online]. 3. vyd. Elsevier, 2017, s. 653-675 [cit. 2018-06-06]. ISBN 978-0-444-63408-5.
- [71] FEILDEN, Andrew. *Update on undertaking extractable and leachable testing* [online]. 1. vyd. Shrewsbury [England]: Smithers Rapra Technology, 2010, 180 s. [cit. 2018-06-22]. ISBN 978-1-61344-283-8. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpUUELT001/update-undertaking-extractable/update-undertaking-extractable>.
- [72] YOSHIMATSU, Kayo, Fumiyuki KIUCHI, Koichiro SHIMOMURA a Yukiko MAKINO. A Rapid and Reliable Solid-Phase Extraction Method for High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Opium Alkaloids from Papaver Plants. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. © 2005 Pharmaceutical Society of Japan, 2005, **53**(11), s. 1446-1450. DOI: 10.1248/cpb.53.1446.

- [73] Liquid-Phase Extraction. ANDERSON, Jared, Alain BERTHOD, Verónica PINO a Apryll STALCUP. *Analytical Separation Science: 5 Volume Set* [online]. 1. vyd. John Wiley & Sons, 2015, s. 1625-1647 [cit. 2018-06-19]. ISBN 978-1-5231-1058-2.
- [74] HUANG, Chuixiu, Zhiliang CHEN, Astrid GJELSTAD, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Xiantao SHEN. Electromembrane extraction. *Trends in Analytical Chemistry*. © 2017 Elsevier B.V., 2017, **95**, s. 47-56. DOI: 10.1016/j.trac.2017.07.027.
- [75] PEAKE, Barrie, Rhiannon BRAUND, Alfred TONG a Louis TREMBLAY. *The life-cycle of pharmaceuticals in the environment*. 1. vyd. Amsterdam: Elsevier/Woodhead Publishing, 2015, s. 84-87. Woodhead Publishing series in biomedicine, Number 51. ISBN 978-1-907568-25-1.
- [76] Solide-Phase Extraction. ANDERSON, Jared, Alain BERTHOD, Verónica PINO a Apryll STALCUP. *Analytical Separation Science: 5 Volume Set* [online]. 1. vyd. John Wiley & Sons, 2015, s. 1571-1588 [cit. 2018-04-13]. ISBN 978-1-5231-1058-2.
- [77] LOTT, Susanne, Frank MUSSHOF a Burkhard MADEA. LC/MS/MS method of 6-MAM, morphine, morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G) for quantitative analysis in serum. *Toxichem Krimtech*. 2013, **80**(1), s. 363-366.
- [78] XU, Wen et al. Simultaneous determination of morphine-6-D-glucuronide, morphine-3-D-glucuronide and morphine in human plasma and urine by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to M6G injection pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. Copyright © 2017 John Wiley & Sons, 2017, **32**(2), s. 1-9. DOI: 10.1002/bmc.4066.
- [79] MEOS, Andres, Liis SAKS a Ain RAAL. Content of alkaloids in ornamental Papaver somniferum L. cultivars growing in Estonia. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. 2017, **66**(1), s. 34-39. DOI: 10.3176/proc.2017.1.04.
- [80] Ultrasound Assisted Extraction. ANDERSON, Jared, Alain BERTHOD, Verónica PINO a Apryll STALCUP. *Analytical Separation Science: 5 Volume Set* [online]. 1. vyd. John Wiley & Sons, 2015, s. 1476-1480 [cit. 2018-04-13]. ISBN 978-1-5231-1058-2.
- [81] HANDA, Suckdev, Suman KHANUJA, Gennaro LONGO a Dev RAKESH. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* [online]. 1. vyd. Trieste (Italy): ©2008 Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies, 2008, 260 s. [cit. 2018-04-23]. Dostupné z: https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf.
- [82] FAKHARI, Ali, Saeed NOJAVAN, Samad EBRAHIMI a Christopher EVENHUIS. Optimized ultrasound-assisted extraction procedure for the analysis of opium alkaloids in papaver plants by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *Journal of separation science*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2010, **33**(14), s. 2153–2159. DOI: 10.1002/jssc.201000135.
- [83] ALVES, Emanuele. GC-MS Method for the Analysis of Thirteen Opioids, Cocaine and Cocaethylene in Whole Blood Based on a Modified Quechers Extraction. *Current*

- Pharmaceutical Analysis*. 2017, **13**, s. 215-223. DOI: 10.2174/1573412912666160502163846.
- [84] Gas Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. STAUFFER, Eric, Julia DOLAN a Reta NEWMAN. *Fire Debris Analysis* [online]. 1. vyd. Copyright © 2008, Elsevier, 2008, s. 235-270 [cit. 2018-04-27]. ISBN 978-0-08-055626-0.
- [85] SVENSSON, J., M. ANDERSSON, E. GUSTAVSSON a O. BECK. Electrospray LC-MS Method with Solid-Phase Extraction for Accurate Determination of Morphine-, Codeine-, and Ethylmorphine-Glucuronides and 6-Acetylmorphine in Urine. *Journal of Analytical Toxicology*. 2007, **31**(2), s. 81-86.
- [86] SHELIYA, K. a K. SHAH. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): A modern chromatography technique. *Pharma Science Monitor an International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, **4**(3), s. 78-99. ISSN 0976-7908.
- [87] TALEUZZAMAN, M., S. ALI a S.J. GILANI. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*. 2015, **2**(6), s. 1-5. ISSN 2381-8913.
- [88] BULDUK, Ibrahim, Bahdisen GEZER a Mustafa CENGIZ. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Morphine from Capsules of Papaver somniferum by Response Surface Methodology. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015, s. 1-8. DOI: 10.1155/2015/796349.
- [89] YANG, Chu-An. Simultaneous Quantitation of Methamphetamine, Ketamine, Opiates and their Metabolites in Urine by SPE and LC–MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2017, **41**(8), s. 679–687. DOI: 10.1093/jat/bkx057.
- [90] PRASAIN, Jeevan. *Tandem mass spectrometry: applications and principles*. 1. vyd. Rijek: INTECH, 2012, s. 531-550. ISBN 978-953-51-0141-3. Dostupné také z: <https://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-applications-and-principles>.