

ANALÝZA ALKALOIDŮ V MAKOVINĚ METODOU VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE

ANETA LARYŠOVÁ^{a,*}, LENKA ENDLOVÁ^{a,b,c},
VIKTOR VRBOVSKÝ^{b,c}
a ZUZANA NAVRÁTILOVÁ^a

^a Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Katedra chemie, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, ^b OSEVA VÝVOJ A VÝZKUM s.r.o., Hamerská 698, 756 54 Rožnov-Zubří, ^c OSEVA PRO s.r.o., Purkyňova 10, 747 43 Opava Aneta.la@seznam.cz

Došlo 12.12.14, přijato 29.1.15.

Klíčová slova: mák, makovina, morfin, alkaloidy, extrakce, HPLC, validace

Úvod

Mák setý (*Papaver somniferum* L.) je plodina, která nachází své uplatnění zejména v potravinářském a farmaceutickém průmyslu^{1,2}. Česká republika patří v současnosti společně s Tureckem k nejvýznamnějším evropským pěstitelům máku setého a v oblasti konzumního máku náleží k největším světovým producentům. V ČR se pěstuje výhradně mák setý semenného (olejného) typu. Z agrobiologického hlediska se jedná o jednoletou jarní plodinu. V zanedbatelné míře se u nás pěstuje také ozimá forma^{3,4}.

V ČR pěstované odrůdy máku jsou primárně určeny k produkci semene pro konzumní účely. Semeno se vyznačuje velmi dobrými dietetickými vlastnostmi. Hlavní složkou je olej (46 až 50 % sušiny), ve kterém dominuje kyselina linolová (60–70 %). Dietetické vlastnosti makového oleje se proto podobají oleji slunečnicovému. Semena mimo jiné obsahují tokoferoly, kyselinu pantotenovou, niacin, thyamin a mimořádně vysoký obsah vápníku³ (1400 mg ve 100 g).

Vedlejším produktem výroby makového semene je makovina, která obsahuje opiové alkaloidy. Význam alkaloidů pro rostlinu není jednoznačný, předpokládá se, že vznikly v důsledku obranných mechanismů rostlin proti býložravcům či parazitům nebo mohou být těž odpadními látkami. Biosyntéza alkaloidů je pro rostlinu energeticky náročná a vyžaduje účast specifických enzymů^{5,6}. Tato

biosyntéza není kontinuální a probíhá v metabolicky aktivních pletivech; jednotlivé alkaloidy se tvoří postupně během vývinu rostliny. Nejdříve se tvoří kodein, thebain a noskapin, později pak morfin, narkotolin a papaverin³.

Makovina, jakožto u nás prakticky jediný zdroj morfinu a dalších alkaloidů, je farmaceutickými společnostmi vykupována a dále využívána pro medicínské účely. Obecně je definována jako zralá nadzemní část rostliny máku kromě semen (této definici odpovídá také pojem „maková sláma“), nicméně v pěstitelské praxi je makovina chápána jako směs podrcených vyzrálých tobolek a částí stonků pod tobolkou dlouhých asi 15 cm (cit.^{7–10}). V druhé polovině minulého století byla makovina vykupována bez větších nároků na kvalitu. Postupně však došlo k vytvoření normovaných jakostních ukazatelů pro výkup a hodnocení. Pěstitelé na tyto nároky okamžitě zareagovali a kvalita makoviny tak razantně stoupla. Při výkupu je makovina hodnocena z několika hledisek a musí být zdravá, suchá, bez plísní a škůdců, hnědožluté barvy se světlejším nebo tmavším odstínem, sklizená v období biologické zralosti. Ze současného sortimentu registrovaných odrůd je k produkci makoviny nejvhodnější odrůda Opal a především Orbis^{11–13}.

Obsah morfinu v makovině je nejvíce ovlivněn genetickým základem odrůd, značně pak průběhem počasí za vegetace a dále agronomickými zásahy¹⁴ (výživa, ochrana, technologie sklizně). Nejúčinnějším nástrojem, jak obsah morfinu v makovině cíleně ovlivňovat, je proto šlechtění, tedy tvorba odrůd s definovanou kvalitou. Hodnocení obsahu morfinu v makovině je důležitou součástí registračního řízení v rámci procesu povolování odrůd Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ).

S obsahem morfinu v máku souvisí legislativní opatření, mající zamezit jeho možnému zneužití k výrobě omamných a návykových látek. První z nich je tzv. ohlašovací povinnost (podle zákona č. 167/1998 Sb. o návykových látkách) pro osoby pěstující mák na ploše větší než 100 m² (§ 29) a specifikace při vývozu a dovozu makoviny (§ 25 a § 30). Novým opatřením je stanovení limitního obsahu morfinu, který je definován novelou uvedeného zákona (vstoupila v platnost dne 1. 1. 2014). Podle § 24 písmena c již nebude možné pěstovat odrůdy máku setého, které mohou v sušině z tobolek obsahovat více než 0,8 % morfinu. Tento limit bude promítnut do registračního řízení ÚKZÚZ při povolování nových odrůd^{8,15}. Tímto sledování obsahu morfinu v makovině během šlechtitelského procesu nabývá na ještě větší významnosti.

Na stanovení alkaloidů se používá celá řada metod. Z těch nejvýznamnějších to je tenkovrstvá chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, polarografie, chirální separace, micelární kapalinová chromatografie, hydrofilní interakční chromatografie, iontově výměnná chromatografie, kapilární elektroforéza, plynová chroma-

*Aneta Laryšová získala za tuto práci 2. místo v celostátní soutěži o Cenu firmy Merck 2014 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie v Pardubicích 5. a 6. února 2014.

tografie a Ramanova spektroskopie^{16–21}. Nejčastěji používanou metodou stanovení alkaloidů v makovině je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV nebo MS detekcí. Uvedené metody se liší způsoby extrakce a čistícími kroky^{22–26}. Jako účinný krok přípravy vzorku k analýze se také prokázalo přečištění extraktu pomocí extrakce na tuhou fázi (SPE)^{8,27,28}.

Cílem práce bylo vyvinutí a zavedení metodiky pro extrakci alkaloidů z makoviny a jejich stanovení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV/VIS detekcí. Vyvinutá metodika byla validována pro stanovení obsahu morfinu, jakožto nejvýznamnějšího alkaloidu určujícího kvalitu makoviny⁸. Metodika byla poté využita k hodnocení obsahu alkaloidů při šlechtění máku setého ve firmě OSEVA PRO s.r.o.

Experimentální část

Vzorky

K experimentálním účelům byly použity tobolky máku setého. Rostlinný materiál byl získán od šlechtitelské firmy OSEVA PRO s.r.o., která je současně kurátorem genové kolekce olejnin v rámci Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin a agrobiodiverzity. Bylo vybráno deset odrůd máku setého lišících se koncentracemi alkaloidu morfinu v makovině. Jednalo se o odrůdy modrosemenné a bělosemenné, které jsou rozdílné také geografickým původem, barvou květu, výškou rostliny, vegetační dobou a dalšími agrobiologickými vlastnostmi. Odrůdy máku setého byly pěstovány v polních maloparcelních pokusech realizovaných firmou OSEVA PRO s.r.o., vzorky tobolek pocházely z pokusů sklizených v roce 2013. Pro analýzu bylo použito maximálně 7 tobolek máku z rostlin od každé odrůdy vysušené na 6% vlhkost. Při odběru rostlinného materiálu byla tobolka máku odlomena od stonku v kolénku, dále byla odříznuta blízka a semeno máku bylo vysypáno. Vzorky tobolek včetně blizny (tzv. makovina v užším slova smyslu) byly jemně namlety na laboratorním mlýnku TUBE-MILL control (IKA, Německo) na práškový vzorek a přesety přes síto o velikosti ok 0,5 mm.

Použité chemikálie

Pro přípravu vzorků a SPE izolaci byly použity: octová kyselina 99,8% p.a., amoniak 25% p.a., kyselina chlorovodíková 35–36% p.a., methanol p.a. (Fisher Scientific, ČR). K přípravě mobilní fáze byly použity: acetonitril a methanol pro HPLC, ledová octová kyselina 100% ch.č., triethylamin GC \geq 99,5 % (vše Sigma-Aldrich, Německo). Deionizovaná voda byla připravena systémem Aqua Max – Ultra 370 (Younglin, Korea). Ke stanovení alkaloidů, optimalizaci separace a validaci byly použity standardy pentahydrát sulfidu morfia, sulfát kodeinu, hydrochlorid papaverinu, thebainu a noskapinu (HPLC nebo TLC \geq 98 %; vše Sigma-Aldrich, Německo). Zásobní standardní

roztoky alkaloidů o koncentraci 1 mg ml⁻¹ (morfin, kodein, thebain), 0,125 mg ml⁻¹ (papaverin, noskapin) byly připraveny rozpuštěním v methanolu a uloženy při 4 °C. Z uvedených zásobních roztoků byly připraveny kalibrační roztoky alkaloidů. Rozsahy koncentrací jednotlivých roztoků alkaloidů pro kalibraci v μ g ml⁻¹ byly následující: morfin 4–500, kodein 1–50, thebain 0,1–8, papaverin 0,5–20, noskapin 0,5–10.

Příprava vzorků a SPE izolace

50 mg mletého rostlinného materiálu bylo smícháno s 5 ml 5% octové kyseliny v centrifugační zkumavce, která byla vložena na 30 min do ultrazvukové lázně TESON 10 (Tesla, ČR). Poté se vzorek třepal 1 min v třepačce TE III (Chirana, ČR) při laboratorní teplotě a celý objem vzorku byl centrifugován odstředivkou K 2015 (Centurion Scientific Ltd., Velká Británie) po dobu 10 min při 3900 ot/min. Takto připravený extrakt byl přečištěn extrakcí na pevné fázi (SPE) na vakuovém manifoldu Mediawax-12 (Labicom, ČR). K SPE izolaci byly vybrány na základě dat z literatury^{8,27} 3 typy kolonek CHROMABOND HR-XC 200 mg/3 ml (Macherey-Nagel, Německo), Strata-X-C 100 mg/3 ml (Phenomenex, USA) a Discovery DSC-MCAX SPE tube 300 mg/3 ml (Supelco, USA). Kolonky byly kondicionovány 3 ml methanolu a ekvilibrovány 3 ml ultračisté vody. Na kolonku byly následně naneseny 3 ml extraktu, byly promyty 2 ml 0,1 M HCl a 2 ml methanolu. Eluce byla provedena dvakrát 2 ml směsi (5% amoniak v methanolu). Eluát byl zahuštěn a zbytek rozpouštědel odpařen na rotační vakuové odparce RV 8 (IKA, Německo). Odparky byly rozpuštěny ve 3 ml methanolu a 3 min sonifikovány. Takto připravené vzorky byly použity k chromatografické analýze. Každý vzorek byl připraven dvakrát.

Chromatografické podmínky

Chromatografické analýzy byly provedeny na přístroji Agilent 1200 (Agilent, USA). Systém je vybaven kvarterním gradientovým čerpadlem, vakuovým odplyňovačem, automatickým dávkovačem vzorků s nástřikovým blokem, programovatelným termostatem kolon a dvěma detektory (UV/VIS a fluorescenčním). Ke sběru a vyhodnocení dat byl použit program ChemStation. Analýzy byly provedeny na koloně Ascentis Expres F5 (5 μ m, 150 mm \times 4,6 mm I. D., Supelco, USA), mobilní fáze A obsahovala 5% acetonitrilu a mobilní fáze B pak směs acetonitril : ledová octová kyselina: triethylamin (97,9:2:0,1, v/v), průtok 1 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, objem nástřiku 50 μ l, vlnová délka 284 nm, délka analýzy 30 min a max. tlak 350 bar.

Validace

Byly stanoveny následující parametry: linearita, správnost, opakovatelnost, mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ), citlivost a robustnost metody.

Výsledky a diskuse

Extrakce alkaloidů a čištění vzorku

Při zpracování rostlinné matrice se vycházelo z popsaného postupu^{8,27}. Podle potřeby byly jednotlivé kroky modifikovány pro námi použitou instrumentaci. Při izolaci alkaloidů z makoviny byly testovány různé koncentrace octové kyseliny v koncentračním rozmezí 1–10 %. Dále byl testován vliv délky trvání extrakce octovou kyselinou v ultrazvukové lázni na celkovou výtěžnost alkaloidů. Pro ověření byly zvoleny doby 15, 30 a 60 min. K čištění extraktu byly vybrány SPE kolony se silně kyselým katexem pro výměnu bazických analytů. U všech typů kolonek byla sledována výtěžnost alkaloidu morfinu a také reprodukovatelnost extrakčního procesu. Výtěžnost metody byla zjištěna metodou přidavku externích standardů. Ke vzorku extrakčního činidla bylo přidáno známé množství standardu morfinu (30; 90; 140 μl) o koncentraci 1 mg ml^{-1} . Stanovení výtěžnosti bylo provedeno třikrát. Všechny výše uvedené kolony měly hodnoty výtěžností velmi podobné v rozmezí 96–98 %. Byl studován vliv objemu elučního činidla na výtěžnost morfinu. Nejvyšších výtěžků bylo dosaženo při použití 5% amoniaku v methanolu. Jako nejvhodnější pro další práci byla zvolena kombinace vzorku rozpuštěného v 5% octové kyselině, délka extrakce alkaloidů 30 min v ultrazvukové lázni, kolony Chromabond HR-XC 200 $\text{mg}/3 \text{ ml}$ a 5% roztoku amoniaku jako elučního činidla.

Chromatografické stanovení

Důležitým krokem při vývoji chromatografické separace bylo stanovení nejvhodnějšího složení mobilní fáze při použití kolony Ascentis Expres F5, 5 μm , 150 $\text{mm} \times$

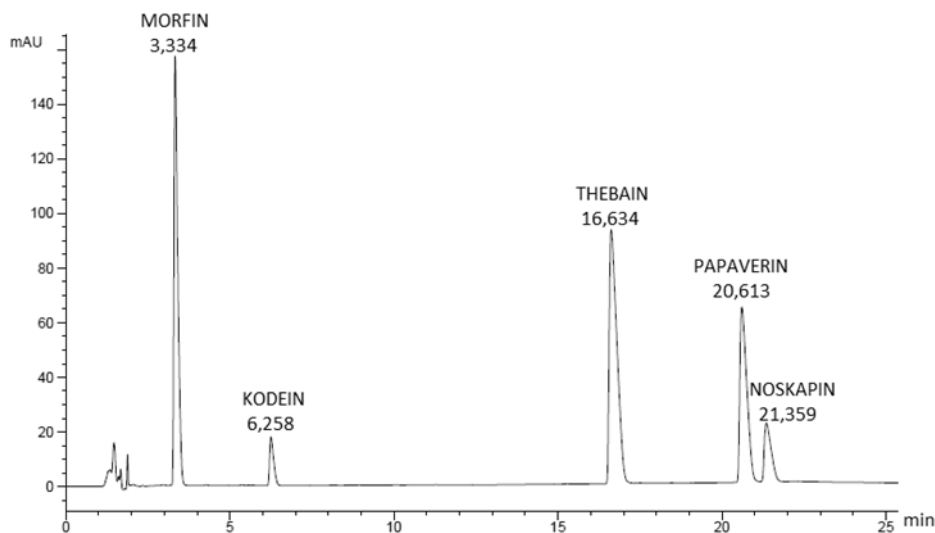
4,6 mm. Byla použita gradientová eluce a byl sledován vliv přidavku triethylaminu, ledové octové kyseliny a rostoucí koncentrace acetonitrilu na separaci alkaloidů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití gradientového programu uvedeného v tab. I. Eluční pořadí jednotlivých alkaloidů bylo v našich experimentálních podmínkách s použitou stacionární fází následující: morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapin (obr. 1).

Validace metody

Byla provedena validace metody pro stanovení obsahu morfinu v makovině a softwarovým programem Effi Validation 3.0 byly stanoveny validační parametry. Získané hodnoty validačních parametrů jsou shrnuty v tab. II. Pro zjištění opakovatelnosti byly vybrány 3 vzorky makoviny obsahující různé množství morfinu, tak aby pokrývaly požadovaný rozsah běžných koncentrací morfinu v makovině. Vybrané vzorky byly v osmi opakováních vždy extrahovány příslušným postupem a analyzovány na HPLC. Opakovatelnost analytické metody je 4,63 %. V současné době neexistuje dostupný CRM makoviny

Tabulka I
Gradientový program pro separaci alkaloidů

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	90	10
5	85	15
10	80	20
20	65	35
30	90	10



Obr. 1. Chromatogram standardu alkaloidů. Standard morfinu, kodeinu, thebainu, papaverinu a noskapinu. Kolona Ascentis Express F5, MF A: 5% acetonitril, MF B: acetonitril : ledová octová kyselina : triethylamin = 97,9 : 2 : 0,1, 1 ml min^{-1} , UV/VIS detekce, 284 nm

Tabulka II

Validační parametry stanovení morfinu v makovině pomocí HPLC s UV/VIS detekcí

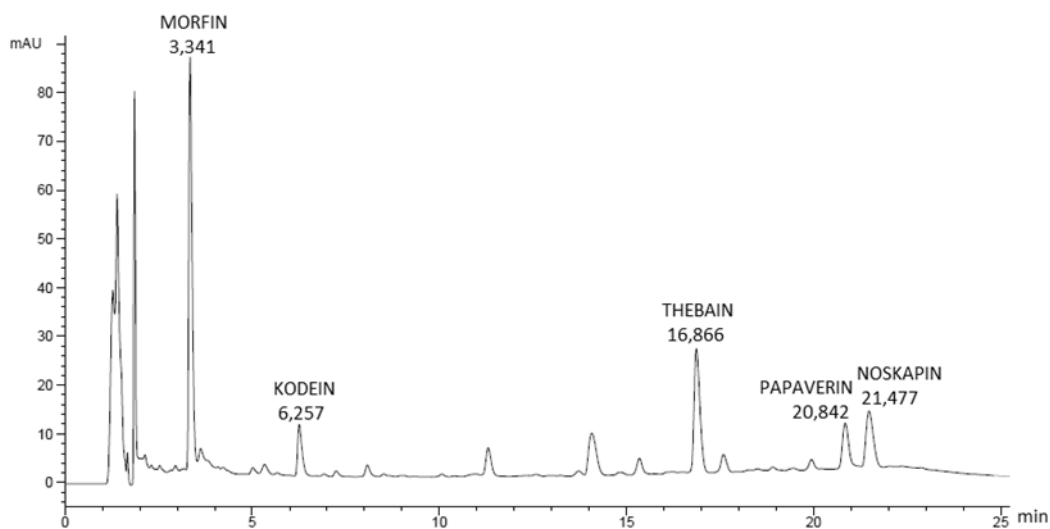
Parametr	Hodnota	
Linearita	korelační koeficient	0,9998
	koeficient QC, %	2,54
Meze	LOD, $\mu\text{g ml}^{-1}$	1,275
	LOQ, $\mu\text{g ml}^{-1}$	4,215
Opakovatelnost, %	4,63	
Citlivost, $\mu\text{g ml}^{-1}$	1,2	
Výtěžnost, %	95,83–101,053	

případně máku s deklarovaným obsahem morfinu. Proto byla správnost metody vyjádřena jako výtěžnost a byl použit standard morfinu, jehož známé množství bylo analyzováno vyvinutou metodou. Analyzovaná řada modelových vzorků byla připravena na třech koncentračních hladinách, pokrývala celý požadovaný rozsah a dané standardy byly analyzovány celkem třikrát. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 95,83–101,05 %. LOD a LOQ byly vyjádřeny jako trojnásobek, resp. desetinásobek šumu základní linie. LOD pro stanovení obsahu morfinu v makovině je $1,28 \mu\text{g ml}^{-1}$ (0,013 %) a LOQ je $4,22 \mu\text{g ml}^{-1}$ (0,043 %). Linearita byla demonstrována korelačním koeficientem a koeficientem QC z lineární regrese závislosti plochy píků standardů morfinu na koncentračních úrovních mezi LOQ a $500 \mu\text{g ml}^{-1}$. Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního koeficientu (0,9998) a koeficientu QC (2,54 %). Ze směrnice kalibrační přímky byla vyhodnocena citlivost metody, která je $1,20 \mu\text{g morfinu ml}^{-1}$. Minimální rozdíl v koncentraci, kterou lze rozlišit, činí $0,194 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Byla testována robustnost metody vůči 4 faktorům. Byl sledován vliv doby extrakce, koncentrace extrakčního činidla, počátečních podmínek gradientu a teploty na kolo-ně. Výsledky ukazují pouze malou změnu retenčních časů a ploch píků a tím prokazují vysokou robustnost prezentované metody vůči všem testovaným faktorům, která je požadována při rutinním využití pro stanovení morfinu ve šlechtitelské praxi.

Výsledky měření

10 vzorků makoviny různých odrůd máku setého bylo analyzováno na obsah alkaloidů. Identifikace alkaloidů ve vzorcích byla provedena porovnáním retenčních časů a spekter se standardy. V chromatogramech vzorků bylo identifikováno celkem pět alkaloidů – morfin, kodein, thebain, papaverin a noskapiin (obr. 2). Kvantifikace alkaloidů byla provedena metodou vnějších standardů s využitím kalibračních křivek. Byly připraveny kalibrační řady jednotlivých stanovovaných alkaloidů tak, aby obsahy alkaloidů v neznámých vzorcích spadaly do rozsahu kalibračních řad. Kalibrační křivka každého alkaloidu byla vynesena jako závislost plochy píku na koncentraci standardu. Vyvinutou metodou bylo stanovení alkaloidů ve vzorcích makoviny provedeno paralelně a interpretované výsledky vyjádřené v hm.% jsou průměrem těchto dvou stanovení (tab. III). U nově vyvinuté metody byla sledována stabilita připravených vzorků v různých časových intervalech (tab. IV). Stabilita byla zjišťována opakovanými analýzami při uchovávání vzorků v temnu a při 4°C . Testováním stability vzorku bylo prokázáno, že je vzorky možné uchovávat po dobu 2 týdnů při 4°C , aniž by docházelo k významným změnám obsahu morfinu.



Obr. 2. Chromatogram vzorku makoviny. Kolona Ascentis Express F5, MF A: 5% acetonitril, MF B: acetonitril : ledová octová kyselina: triethylamin = 97,9 : 2 : 0,1, 1 ml min^{-1} , UV/VIS detekce, 284 nm

Tabulka III
Stanovený obsah opiových alkaloidů ve vzorcích makoviny

Laboratorní číslo vzorku	Obsahy opiových alkaloidů [hm.%]				
	morfin	kodein	thebain	papaverin	noskapin
559	0,04	0,01	pod LOQ	pod LOQ	pod LOQ
3977	0,16	0,03	pod LOQ	pod LOQ	pod LOQ
654	0,28	0,10	0,01	0,02	0,03
591	0,39	0,06	pod LOQ	0,01	0,04
641	0,44	0,08	pod LOQ	0,10	0,03
6087	0,55	0,17	0,01	pod LOQ	0,03
6084	0,66	0,19	0,01	pod LOQ	0,02
628	0,83	0,17	pod LOQ	pod LOQ	0,01
6089	0,95	0,14	0,06	0,01	0,02
551	1,47	0,35	0,05	pod LOQ	0,02

Tabulka IV
Testování stability vzorků makoviny připravených k analýze na HPLC

Laboratorní číslo vzorku	Obsah morfinu [hm.%]				
	1. den	2. den	týden	dva týdny	průměr
591	0,40	0,41	0,41	0,42	0,41
6089	1,01	1,00	0,99	0,97	0,99

Závěr

Byla vyvinuta analytická metoda pro společné stanovení hlavních alkaloidů v makovině metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. K výhodám metody patří zejména jednoduchá izolace alkaloidů z makoviny, relativně krátký čas analýzy a stanovení nejvýznamnějších alkaloidů v máku setém. Byly navrženy a validovány optimální chromatografické podmínky a postup pro přípravu vzorků zahrnující extrakci na pevné fázi. V rámci testovaných validačních parametrů byla pro stanovení obsahu morfinu ověřena opakovatelnost, správnost, linearita, citlivost, mez detekce, mez stanovitelnosti a robustnost. Nalezené limity detekce a kvantifikace jsou srovnatelné s údaji v literatuře⁸. Metoda byla aplikována na reálné vzorky makoviny ze sklizně roku 2013. Výsledky prokázaly, že je možné vyvinoutou metodu využívat jako rutinní, spolehlivou a přesnou metodu pro stanovení kvality makoviny při šlechtění máku setého.

Výsledky byly získány v souvislosti s řešením projektu č. TA01010375 „Využití progresivních biotechnologických metod ve šlechtění máku setého“ (2011–2014), který byl realizován za finanční spolupráce Technologické agentury České republiky.

LITERATURA

- Schulzová V., Hajšlová J.: *Toxické alkaloidy v potravině řetězci člověka*. Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí. Veřejný dokument. Praha 2007.
- Singh D. V., Prajapati S., Bajpai S., Verma R. K., Gupta M. M., Kumar S.: *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 23, 1757 (2000).
- Vašák J.: *Mák*. Powerprint, Praha 2010.
- Baranyk P., Balík J., Hájková M., Havel J., Kazda J., Lošák T., Málek B., Markytán P., Plachká E., Richter R., Soukup J., Stražil Z., Šaroun J., Škeřík J., Šmirous P., Štráns P., Volf M., Vrbovský V., Zehnálek P., Zelený V.: *Olejníny*. Profi Press, Praha 2010.
- Moravcová J.: *Biologicky aktivní přírodní látky*. Interní studijní pomůcka. VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Praha 2006.
- Zenk M. H., Juenger M.: *Phytochemistry* 68, 2757 (2007)
- Prugar J.: *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha 2008.
- Kabátová N., Šulová R.: *Bulletin Národní referenční laboratoře XVII 2013/1*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 2013.
- Bechyně M., Kadlec T., Vašák J. a kol.: *Mák*. Semafor, Praha 2001.

10. Cihlář P., Vašák J., Kosek Z., Zukalová H.: *Konference Řepka a Mák, Praha, 5.2.2004*, Sborník referátů (Brixí J., ed.), str. 121. ČZU, Praha 2004.
11. Zukalová H., Cihlář P., Vašák J.: *Konference Prospeřující olejniny, Větrný Jeníkov, 14.12.2006*, Sborník referátů (Capouchová I., ed.), str. 105. ČZU, Praha 2006.
12. Zehnálek P.: *Úroda* 5, 51 (2014).
13. Lachman J., Hejtmánková A., Miholová D., Kolihová D., Tluka P.: *Plant Soil Environ.* 52, 282 (2006).
14. Zukalová H., Cihlář P., Vašák J.: *Konference Prospeřující olejniny, Větrný Jeníkov, 13.12.2007*, Sborník referátů (Capouchová I., ed.), str. 93. ČZU, Praha 2007.
15. Zehnálek P.: *Seznam doporučených odrůd řepka olejka, sója. Přehled odrůd hořčice bílá, mák setý, len olejný a kmín. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní odrůdový úřad, Brno 2014.*
16. Stöckigt J., Scheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha I., Stöckigt D.: *J. Chromatogr. A* 967, 85 (2002).
17. Terenerry V. C., Wells R. J., Robertson J.: *J. Chromatogr. A* 718, 217(1997).
18. Schulz H., Baranska M., Quilitzsch R., Schütze W.: *Analyst* 129, 917 (2004).
19. Pothier J., Galand N.: *J. Chromatogr. A* 1080, 186 (2005).
20. Popa D. S., Oprean R., Curea E., Freda N.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18, 645 (1998).
21. Jelínek I., Gaš B., Zusková I., Nikličková E., Buben I.: *Chem. Listy* 91, 487 (1997).
22. Verma R. K., Uniyal G. C., Gupta M. M.: *Indian J. Pharm. Sci.* 52, 276 (1990).
23. Krenn L., Glantschinig S., Sorgner U.: *Chromatographia* 47, 21 (1998).
24. Pettitt B. C., Damon C. E.: *J. Chromatogr. A* 242, 189 (1982).
25. Seidi S., Yamini Y., Heydari A., Moradi M., Esrafil A., Rezazadeh M.: *Anal. Chim. Acta* 701, 181 (2011).
26. Gómez-Serranillos P., Carretero E., Villar A.: *Fitoterapia* 2, 156 (1995).
27. Yoshimatsu K., Kiuchi F., Shimomura K., Makino Y.: *Chem. Pharm. Bull.* 53, 1446 (2005).
28. Meng Q., Ch., Cepeda M. S., Kramer T., Zou H., Matoka D. J., Farrar J.: *J. Chromatogr. B* 742, 115 (2000).

A. Laryšová^a, L. Endlová^{a,b,c}, V. Vrbovský^{b,c}, and Z. Navrátilová^a (^a*Department of Chemistry, University of Ostrava*, ^b*OSEVA Development and Research Ltd., Rožnov-Zubří*, ^c*OSEVA PRO Ltd., Opava*): **Analysis of Alkaloids in Poppy Straw by High Performance Liquid Chromatography**

An analytic method was developed for the simultaneous determination of main alkaloids in poppy straw by HPLC. The optimal conditions and sample preparation were proposed and validated. The repeatability, regularity, linearity, sensitivity, limit of detection, limit of quantitation, and robustness of the method were determined. The new method was applied to the real poppy straw samples from the 2013 harvest. The method can be used for a routine evaluation of poppy straw.