



وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

دستورالعمل فنی

استخراج و اندازه‌گیری بنزیل ایزو کینولین آلکالوئیدهای اقتصادی
از گیاهان جنس پاپاور بومی ایران

نگارش:

مهدی یحیی‌زاده، نجمه هادی، مهشید رحیمی‌فرد، راضیه عظیمی
اعضای هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

عنوان طرح منتج به دستورالعمل فنی	شماره مصوب طرح
اندازه‌گیری مقدار آلکالوئید تبائین موجود در گرز و ساقه گیاه شقایق ایرانی (<i>Papaver bracteatum</i>) از رویشگاه‌های مختلف کشور به منظور دستیابی به ژنوتیپ برتر با حداکثر مقدار تبائین	۹۹۰۵۹۶-۲-۰۹-۰۹-۰۳۳



عنوان دستورالعمل: استخراج و اندازه‌گیری بنزیل ایزوکلینولین آلکالوئیدهای اقتصادی از گیاهان

جنس پاپاور بومی ایران

نویسندگان:

مهدی یحیی‌زاده، نویسنده مسئول، استادیار، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

نجمه هادی، استادیار، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مهشید رحیمی فرد، استادیار، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

راضیه عظیمی، استادیار، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور / اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی / بخش تحقیقات گیاهان دارویی

مدیر داخلی: فاطمه عباسپور

ویراستار ادبی: اصغر احمدی

نشانی: بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۵.

تلفن: ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ **وبسایت:** www.rifr-ac.ir

نوبت و سال انتشار: اول - ۱۴۰۳

این نشریه به شماره ۶۵۸۴۷ در تاریخ ۱۴۰۳/۰۵/۰۸ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی

کشاورزی به ثبت رسیده است.

ISBN : 978-964-473-543-1



9 789644 735431

فهرست

چکیده.....	۱
مقدمه.....	۱
آلکالوئیدها.....	۲
آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکینولین.....	۳
آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکینولین اقتصادی موجود در گیاه تیره خشخاش.....	۵
دستورالعمل.....	۷
آماده‌سازی نمونه‌ها.....	۷
روش عصاره‌گیری از اندام گیاهی پودر شده.....	۷
روش آنالیز نمونه‌ها با دستگاه HPLC.....	۸
نتایج مربوط به آنالیز نمونه‌ها.....	۹
منابع.....	۱۱

مخاطبان

مخاطبان این دستورالعمل فنی کارشناسان، مروجان، دانشگاهیان، شرکت‌های خصوصی و مراکز تحقیقاتی هستند.

شما با مطالعه این دستورالعمل با موارد زیر آشنا می‌شوید

- این دستورالعمل، روشی ساده است که توسط آن با حداقل مواد شیمیایی می‌توان بنزیل ایزوکلینولین آلکالوئیدهای اقتصادی موجود در گیاهان پاپاور را که مصارف دارویی دارند استخراج حداکثری نموده و توسط دستگاه HPLC آنها را آنالیز نمود.
 - هدف از ارائه این دستورالعمل، شناخت و توسعه تکنیک استخراج و اندازه‌گیری بنزیل ایزوکلینولین آلکالوئیدهای جنس پاپاور در زمینه‌های آموزشی، پژوهشی و تجاری می‌باشد.
-

چکیده

در صنایع دارویی، آلکالوئیدهای استخراج شده از گیاهان خانواده خشخاش اهمیت فوق‌العاده‌ای به عنوان ترکیبات ضد درد، ضدسرفه و مواد ضدعفونی‌کننده دارند، علاوه بر مصارف دارویی، بذر این گیاهان در صنایع غذایی دارای اهمیت بالقوه‌ای است. در سال ۲۰۱۹، میزان مصرف سالیانه ترکیبات خالص مورفین، کدئین و تبائین به ترتیب ۴۲۰، ۳۰۸ و ۲۳۰ تن در دنیا بود که اهمیت این ترکیبات دارویی و جایگاه ویژه آنها را نشان می‌دهد. در حال حاضر، صنایع دارویی ایران مواد اولیه داروهای مورد استفاده خود را که شامل مورفین، کدئین، تبائین، پاپاورین و ناسکاپین است از شیر ترپاک مکشوفه توسط ستاد مبارزه با مواد مخدر استحصال می‌کنند، این تولیدات علاوه بر تأمین نیاز داخل، بخش عمده‌ای از آن صادر می‌شود. در ایران بیش از ۲۰ گونه از جنس خشخاش در فلور ایران نام برده شده که ۶ گونه از آن انحصاری ایران می‌باشد. با توجه به اینکه پنج ترکیب مورفین، کدئین، تبائین، پاپاورین و ناسکاپین ازجمله ترکیبات اقتصادی موجود در گیاهان خانواده پاپاور می‌باشند، هدف اصلی این است که با توسعه روشی بتوان آلکالوئیدهای مذکور را در گیاهان خانواده پاپاور جداسازی و اندازه‌گیری نمود. در این روش، مراحل مختلف شامل خشک کردن بافت گیاه، استخراج در حمام اولتراسونیک و تجزیه عصاره توسط دستگاه HPLC توضیح داده شده است.

مقدمه

از نظر تاریخی گیاهان اهمیت فراوانی در توسعه جوامع مختلف داشته‌اند. در این بین گیاهان دارویی از هزاران سال پیش بعنوان یکی از مهمترین منابع مهم دارویی کاربرد و اهمیت درمانی داشته و در طول تاریخ همیشه با انسان قرابت خاصی داشته و آثار دارویی و موارد استفاده آنها بر هیچ کس پوشیده نیست. در همین راستا، استفاده از بعضی گیاهان دارویی به صورت سنتی

مرسوم بوده و هنوز هم رواج دارد. اگرچه علاقه‌مندی و توجه به این گیاهان در صده گذشته ناچیز بوده و اقبال به سمت داروهای سنتز شده شیمیایی بوده ولی خوشبختانه به علت مزایای فراوان این داروها که بعد از دهه‌ها، اخیراً مورد توجه قرار گرفته است (اسدالهی و همکاران، ۱۳۹۲) و تلاش‌ها بر روی گیاهان دارویی و شناخت ترکیبات مفید دارویی آنها افزایش یافته است. به همین دلیل، همیشه تحقیقات وسیعی برای یافتن فراورده‌ها و مواد طبیعی دارویی گیاهان با استفاده از دانش پیشینیان در حال انجام می‌باشد. ضرورت این قبیل از بررسی‌ها زمانی مشخص می‌شود که تهیه برخی از مواد مؤثره فعال که در صنایع دارویی حائز اهمیت بسیاری هستند، به‌طور مصنوعی امکان‌پذیر نبوده و تنها به‌صورت طبیعی از گیاهان مورد نظر قابلیت استخراج دارند (Li et al. 2009).

در کشوری مانند ایران که گونه‌های دارویی انحصاری زیادی دارد، تحقیق و یافتن گیاهانی با خواص دارویی و صنعتی یکی از وظایف اصلی محققان این بخش است. کشور ایران با توجه به دارا بودن شرایط متنوع اقلیمی و جغرافیایی، حدود ۱۴۰۰ گونه دارویی را در خود جای داده است که بسیاری از آنها در هیچ کجای دنیا یافت نمی‌شوند. در این بین، گیاهان آلکالوئیدی قسمت بسیار مهمی از گیاهان دارویی و داروهای گیاهی را تشکیل می‌دهند (امید بیگی، ۱۳۸۸).

آلکالوئیدها

آلکالوئیدها از نظر ساختاری، گروه‌های مختلفی از متابولیت‌های ثانویه حاوی نیتروژن هستند که عمده آنها از اسیدهای آمینه مشتق شده‌اند. اهمیت این قبیل از ترکیبات در صنایع دارویی از دیرباز شناخته شده است. آلکالوئیدها همانند سایر متابولیت‌های ثانویه در گیاهان نقش دفاعی داشته و به‌عنوان دافع عوامل استرس‌زای محیطی هستند (Julsing et al. 2006). این

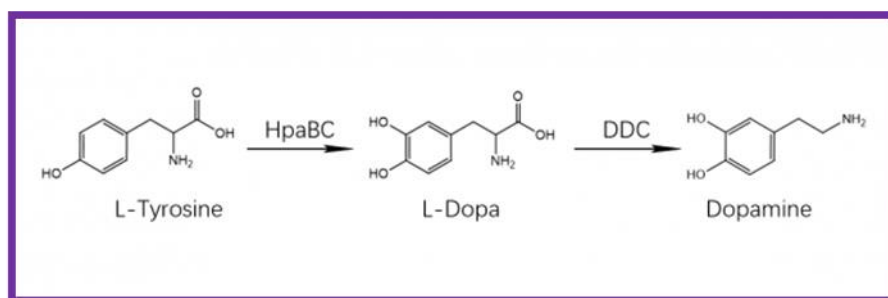
ترکیبات به‌عنوان سازوکار دفاعی در گیاهان شناخته شده و مصارف مختلفی در صنایع مختلف دارند. ازجمله مصارف این ترکیبات، می‌توان به استفاده آنها در صنایع برای تولید نوشیدنی به‌عنوان نوشابه‌های انرژی‌زا، در صنایع رنگ برای رنگرزی پارچه، در داروسازی برای ساخت داروهای مختلف با اثرهای ضد درد، ضد آلزایمر، ضد سرطان، ضد ویروس و غیره اشاره کرد. البته اثرهای دارویی این ترکیبات به مراتب دارای اهمیت بیشتری بوده که در همین راستا می‌توان به ۵۰ ترکیب آلکالوئیدی فرموله شده از آلکالوئیدهای با خواص دارویی مختلف که امریکا و هنریش (۲۰۱۴) در مقاله خود ذکر کرده‌اند اشاره نمود (Amikia and Heinrich 2014).

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی حاوی ترکیبات آلکالوئیدی و پراکنش وسیع این گیاهان با تنوع گوناگون در جای جای کشور، می‌تواند اقدامات عملی برای شناسایی این قبیل از گیاهان حاوی ترکیبات دارویی ارزشمند انجام شود. با توجه به اینکه گیاهان حاوی ترکیبات آلکالوئیدی بخش بسیار مهمی از گیاهان دارویی کشور را تشکیل می‌دهند، برای مشخص شدن مقادیر ترکیبات ارزشمند دارویی، بایستی مبادرت به استخراج و بررسی مواد مؤثره آنها کرد. با یافتن گیاهان ارزشمند و اهلی کردن آنها و توصیه برای کشت و بهره‌برداری از ترکیبات آلکالوئیدی موجودشان، می‌توان به صنایع دارویی داخلی کمک نمود و جایگاه مهمی در صادرات برای آنها یافت.

آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکینولین

ازجمله آلکالوئیدهایی که برای مدت‌های مدید در صنایع دارویی و بهداشتی شناخته شده‌اند، آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکینولین هستند که جزء بزرگترین و شاخص‌ترین دسته آلکالوئیدها محسوب می‌شوند (Wink, 2010). از بیش از ۲۴۰۰۰ ترکیب آلکالوئیدی شناخته شده بیش از

۲۵۰۰ ساختار شیمیایی مربوط به آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکلینولین می‌باشد. این ترکیبات به‌عنوان دفاع شیمیایی در خانواده‌های مختلف گیاهی وجود دارند. در آلکالوئیدهای ایزوکلینولین خواص منحصر به فرد دارویی دیده می‌شود که می‌توان به ترکیب کلشی‌سین (با خواص کنترل‌کننده نقرس)، بربرین (با خواص ضد میکروبی علیه عفونت‌های چشم و روده)، مورفین (با خواص ضد درد قوی)، کدئین (با خواص مسکن و ضدسرفه) و سانگوینارین (با خواص ضد میکروبی) اشاره کرد. بنزیل ایزوکلینولین‌ها از دو مولکول آروماتیک تشکیل می‌شوند که تیروزین نقطه آغازین (شکل ۱) چرخه بیوسنتزی این ترکیبات آلکالوئیدی است (Facchini and Luca 1995).



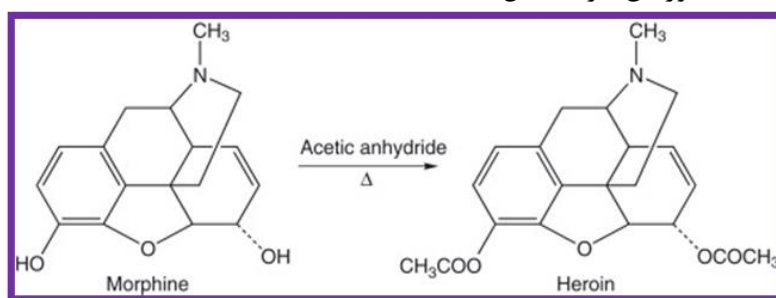
شکل ۱- نقطه آغازین سنتز بنزیل ایزوکلینولین آلکالوئیدها

آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکینولین اقتصادی موجود در گیاه تیره خشخاش

گیاهان تیره خشخاش شامل چندین جنس و گونه گیاهی هستند که به‌عنوان سنتزکننده آلکالوئیدهای بنزیل ایزوکینولین محسوب می‌شوند. این آلکالوئیدها به‌طور گسترده در صنایع دارویی مورد استفاده قرار گرفته و به‌عنوان بخشی از صنعت مواد مخدر غیرقانونی مشکلات عدیده‌ای را برای جوامع بشری ایجاد کرده‌اند. در حال حاضر، تنها یک گونه از این جنس گیاهی، یعنی خشخاش *Papaver somniferum* است که به‌صورت صنعتی کشت و کار شده و از آن به‌عنوان منبع قابل استخراج آلکالوئیدهای مجاز و غیرمجاز استفاده می‌شود. کشت و کار تجاری این گیاه از سال‌ها قبل در کشورهای مختلف برای مصارف دارویی شروع شده است. از مهمترین مناطقی که کشت قانونی این گیاه در آن انجام می‌شود می‌توان به منطقه اقیانوسیه و به‌ویژه تاسمانی استرالیا اشاره کرد که در حال حاضر تقریباً ۴۰ درصد از مواد آلکالوئیدی مورد نیاز تجارت قانونی جهان را تأمین می‌کند (Chitty et al. 2003). برآوردها حکایت از آن دارد که بازار جهانی در آینده نزدیک شاهد افزایش مداوم تقاضا با افزایش میزان ۵ درصدی در سال خواهد بود.

گیاه خشخاش یکی از معروف‌ترین و یکی از بدنام‌ترین گیاهان مورد استفاده بشر است. مواد موجود در آن در هیچ گونه گیاهی دیگری تا این حد امکان تسکین درد نداشته و به همین علت، هم به‌صورت قانونی و هم غیرقانونی مصرف می‌شود. مشتقات دارویی مانند مورفین و کدئین که از خشخاش استخراج می‌شوند، مسکن‌های قدرتمندی هستند که در روش‌های پزشکی مدرن نقش ویژه‌ای را ایفا می‌کنند. این مواد پرمصرف آلکالوئیدی (کدئین و مورفین) که جنبه مسکن دارند یا از تریاک (لاتکس خشک)، توسط خراش‌دهی کپسول‌های خشخاش سبز استخراج می‌شود یا از کاه و کپسول خشک خشخاش استخراج می‌شوند (Neild 1987).

علاوه بر دو ترکیب آلکالوئیدی مورفین و کدئین، سه ترکیب آلکالوئیدی تبائین، ناسکاپین و پاپاورین از دیگر ترکیبات مهم تولید شده توسط خشخاش هستند. ناسکاپین و پاپاورین به‌طور گسترده در صنایع داروسازی به عنوان دارو استفاده شده و تقاضا برای این مواد نیز در حال افزایش است (Roberts and Wink 1998). در مورد تبائین، این ترکیب خود به تنهایی اثر دارویی نداشته، بلکه در صنعت، پیش‌ساز تعداد زیادی از ترکیبات دارویی سنتتیک می‌باشد. همانطور که ذکر شد، در مقابل استفاده قانونی، استفاده غیرقانونی سنتی خشخاش مانند استعمال تریاک و هروئین هم وجود دارد که اثرهای منفی بر زندگی معتادان دارد (Neild 1987) و مقدار استفاده از این مواد غیرقانونی در مناطق و کشورهای مختلف تحت تأثیر عوامل متنوعی مانند در دسترس بودن، قیمت و مقبولیت اجتماعی متغیر است. اثرهای منفی سوء مصرف مواد افیونی مستخرج از خشخاش نه تنها در کشورهای تولیدکننده تریاک در آسیا مشاهده شده، بلکه از قرن نوزدهم و اوایل قرن بیستم در اروپا و آمریکای شمالی (Brian 1994; Jonnes 1995) مشکلات متعددی را به‌همراه داشته است. ترکیب سنتزی هروئین از جمله این مواد افیونی غیر قانونی است که از استیل‌اسیون مورفین و غوطه‌وری مورفین در استیک اسید بدست می‌آید که مورد سوء استفاده غیر قانونی قرار گرفته و اثرهای به مراتب اعتیادآورتر و مخرب‌تر نسبت به مورفین دارد (شکل ۲).



شکل ۲- واکنش شیمیایی تبدیل مورفین به هروئین

دستورالعمل**آماده‌سازی نمونه‌ها**

برای استخراج تبائین از بافت گیاهی، ابتدا نمونه‌های گیاهی در آون ۵۵ درجه سانتی‌گراد خشک می‌شوند. در مورد کپسول و بذر موجود در آن، برای جداسازی و ممانعت از تداخل ترکیبات موجود در آن برای آنالیز ترکیبات شیمیایی، کپسول‌ها توسط هاون به صورت جزئی خرد شده و توسط الک، بذرها از بقیه کپسول خرد شده جدا می‌گردند. نمونه‌های خشک شده با دستگاه آسیاب پودر شده و توسط الک با مش اندازه ۳۰، بقایای درشت آسیب ندیده از بقایای ریز آن جدا می‌شود.

روش عصاره‌گیری از اندام گیاهی پودر شده

مقادیر تقریبی ۲۵ میلی‌گرم از بافت گیاهی پودر شده را در ویال‌های دو میلی‌لیتری توزین کرده و بعد نمونه‌ها با ۱ میلی‌لیتر از ترکیب حلال متانول و آب اسیدی شده نسبت ۴ به ۱ حجمی به حجمی که اسیدیته آن با اسید سولفوریک تنظیم شده بود (اسیدیته ۲) غوطه‌ور می‌گردد و بعد بوسیله دستگاه اولتراسونیک در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد عصاره به مدت ۳۰ دقیقه استخراج می‌شود. بعد از هر مرحله از استخراج با دستگاه اولتراسونیک، ذرات معلق نمونه‌ها با سانتریفوژ جداسازی شده و کلیه مراحل استخراج به تعداد ۳ مرتبه یعنی با دستگاه سونیکاسیون و حلال جدید تکرار می‌شود. بعد از عصاره‌گیری و قبل از تزریق نمونه‌ها به دستگاه HPLC، نمونه‌ها برای جداسازی ذرات باقی‌مانده از عصاره از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده می‌شوند.

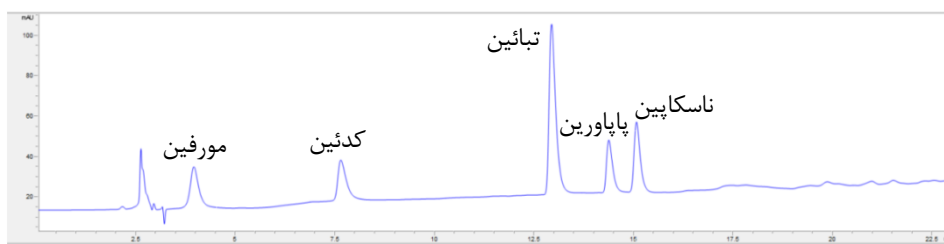
روش آنالیز نمونه‌ها با دستگاه HPLC

برای آنالیز ترکیبات با روش توسعه یافته HPLC ذکر شده ذیل، زمان بازداری (Retention Time) پیک‌های مربوط به استانداردهای خریداری شده (شامل مورفین، کدئین، پاپاورین، تبائین و ناسکاپین) با پیک‌های مد نظر موجود در نمونه‌ها مقایسه می‌شوند. علاوه بر مقایسه زمان بازداری استانداردهای ذکرشده با پیک‌های مربوط به نمونه‌ها، طیف جذبی مربوط به پیک‌های نمونه‌های استاندارد که زمان بازداری یکسان با نمونه‌ها دارند نیز توسط ردیاب APD دستگاه HPLC اجیلنت ۱۲۶۰ با همدیگر مقایسه می‌شوند. نوع ستون HPLC مورد استفاده از نوع Eurospher-C18 و ابعاد ستون مورد استفاده و اندازه ذرات سیلیکا به ترتیب ۲۵۰×۴/۶ و ۵ میکرومتر می‌باشد.

بخش متحرک مورد استفاده برای تجزیه نمونه‌ها با دستگاه HPLC شامل آب اسیدی (حاوی دو درصد استیک اسید) و متانول اسیدی (حاوی ۲ درصد استیک اسید) است. برنامه گرادیان مورد استفاده برای آنالیز نمونه‌ها با دستگاه HPLC در نقطه آغازین شامل ۹۰ درصد آب اسیدی و ۱۰ درصد متانول اسیدی می‌باشد که این مقدار در دقیقه ۱۹ به ۱۰ درصد آب اسیدی و ۹۰ درصد متانول اسیدی می‌رسد. مقدار جریان و حجم تزریق هریک از عصاره‌ها به ترتیب ۱ میلی‌لیتر و ۲۰ میکرولیتر است. ردیاب دستگاه برای بررسی ترکیبات در مقدار ۲۸۰ نانومتر تنظیم می‌شود. بعد از استخراج عصاره غنی از آلکالوئیدها و قبل از تزریق نمونه‌ها به دستگاه HPLC، حداقل سه غلظت مختلف از استانداردها (با غلظت کمتر ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای رسم منحنی شیب خط به دستگاه HPLC تزریق می‌شوند.

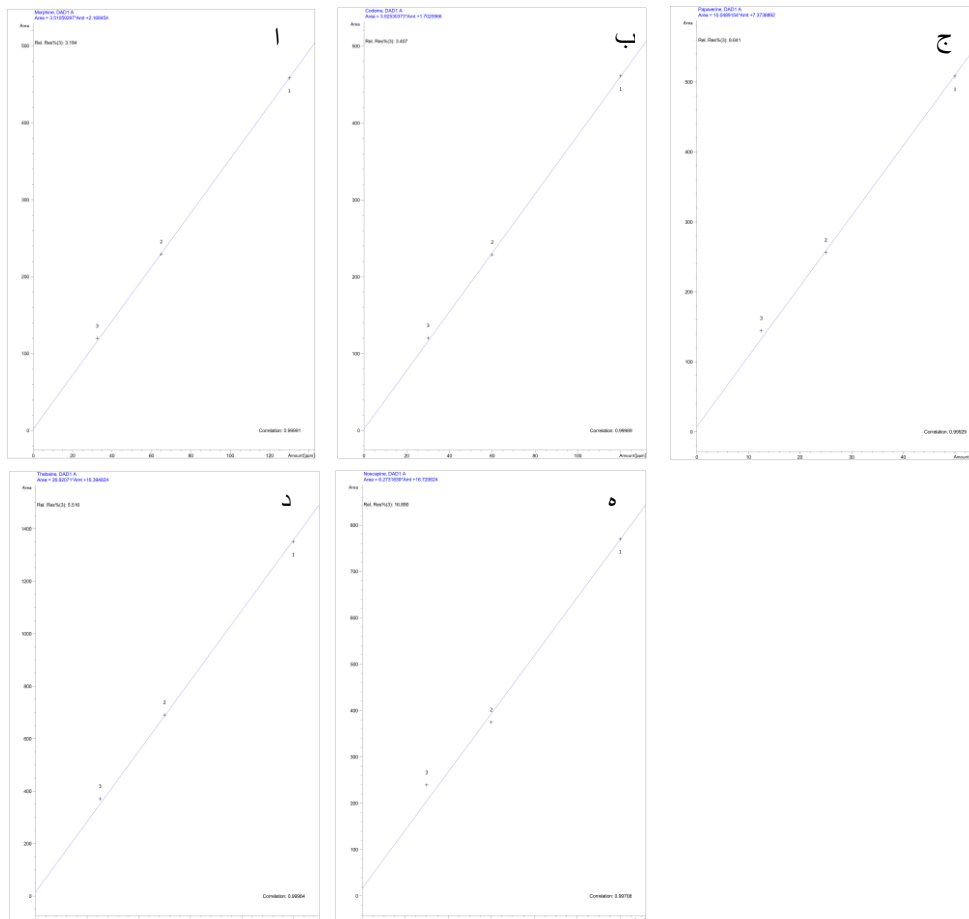
نتایج مربوط به آنالیز نمونه‌ها

پیک‌های ظاهر شده در زمان‌های ۴، ۷/۷، ۱۳، ۱۴/۵ و ۱۵ (شکل ۳) به ترتیب مربوط به آلکالوئیدهای مورفین، کدئین، تبائین، پاپورین و ناسکاپین می‌باشد. برای اندازه‌گیری غلظت آلکالوئیدها در نمونه‌ها، بعد از تزریق غلظت‌های مختلف استاندارد، منحنی کالیبراسیون (شکل ۴) مربوط به هریک از استانداردهای آلکالوئیدها رسم و با استفاده از فرمول شیب خط محاسبه شده برای هریک از آنها، غلظت آلکالوئیدها در نمونه‌های گیاهی محاسبه می‌شود. برای محاسبه مقادیر هریک از ترکیبات در نمونه‌های گیاهی، مقادیرشان در نمونه‌ها در فرمول شیب خط مربوط به هریک از استانداردها جایگذاری و محاسبه می‌شود.



شکل ۳. کروماتوگرام مربوط به مخلوط ۵ ترکیب استاندارد

استخراج و اندازه‌گیری بنزیل ایزوکلینولین آلکالوئیدهای اقتصادی از گیاهان جنس پاپاور بومی ایران



شکل ۴. منحنی کالیبراسیون مربوط به ترکیبات، به ترتیب ا. مورفین، ب. کدئین، ج. پاپاورین،

د. تبائین، ه. ناسکاپین

منابع

اسدالهی، ا.، جهانگیری، ب.، امیدی، م. ۱۳۹۲. بررسی اثر محیط کشت بر درصد جوانه‌زنی بذور شقایق ایرانی (Persian poppy)
امید بیگی، ر. ۱۳۸۸. تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد اول، انتشارات آستان قدس رضوی، ۳۴۷.

- Amirkia, Vafa; Heinrich, Michael (2014): Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. In *Phytochemistry Letters* 10, pp. xlviii–liii.
- Brian, J. (1994): Opium and infant-sedation in 19th century England. In *Health visitor* 67 (5), pp. 165–166.
- Chitty, Julie A.; Allen, Robert S.; Fist, Anthony J.; Larkin, Philip J. (2003): Genetic transformation in commercial Tasmanian cultivars of opium poppy, *Papaver somniferum*, and movement of transgenic pollen in the field. In *Functional plant biology : FPB* 30 (10), pp. 1045–1058.
- Facchini, P. J.; Luca, V. de (1995): Phloem-Specific Expression of Tyrosine/Dopa Decarboxylase Genes and the Biosynthesis of Isoquinoline Alkaloids in Opium Poppy. In *The Plant cell* 7 (11), pp. 1811–1821.
- Jonnes, J. (1995): The rise of the modern addict. In *American journal of public health* 85 (8 Pt 1), pp. 1157–1162.
- Julsing, Mattijs K.; Koulman, Albert; Woerdenbag, Herman J.; Quax, Wim J.; Kayser, Oliver (2006): Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. In *Biomolecular engineering* 23 (6), pp. 265–279.
- Li, He; Ruan, Cheng-Jiang; Da Teixeira Silva, Jaime A. (2009): Identification and genetic relationship based on ISSR analysis in a germplasm collection of sea buckthorn (*Hippophae* L.) from China and other countries. In *Scientia Horticulturae* 123 (2), pp. 263–271.
- Neild, R. E. (1987): Use of Climatic Data to Identify Potential Sites in the United States for Growing *Papaver bracteatum* as a Pharmaceutical Crop. In *J. Climate Appl. Meteor.* 26 (9), pp. 1117–1123.
- Roberts, M. F.; Wink, Michael (Eds.) (1998): Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications. New York, London: Springer.
- Tétényi, Péter (1997): Opium Poppy (*Papaver somniferum*): Botany and Horticulture. In Jules Janick (Ed.): Horticultural reviews. New York: Wiley (Horticultural reviews, v. 19), pp. 373–408.
- Wink, Michael (2010): Biochemistry of plant secondary metabolism. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell (Annual plant reviews, 40).