



Zora Jandrić

**RAZVOJ HROMATOGRAFSKIH METODA ZA SIMULTANO
ODREĐIVANJE TROPANSKIH I GLIKOALKALOIDA I
PRAĆENJE APSORPCIJE I TRANSLOKACIJE ATROPINA
¹⁴C U PŠENICI**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2011.

UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Ime i prezime autora: Zora Jandrić
AU

Mentor: Dr Jaroslava Svarc-Gajiić, docent
MN

Naslov rada: Razvoj hromatografskih metoda za simultano određivanje
NR tropanskih i glikoalkaloida i praćenje apsorpcije i translokacije
atropina ¹⁴C u pšenici

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski / Engleski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina
UGP

Godina: 2011.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
MA

Fizički opis rada: (broj poglavlja / stranica / slika / tabela/ referenci)
FO 6 105 40 9 173

Naučna oblast: Hemijsko-tehnološke nauke
NO

Naučna disciplina: Primenjena hemija
ND

Predmetna odrednica, ključne reči: Gasna i tečna hromatografija, masena spektrometrija, tropanski alkaloidi, glikoalkaloidi, apsorpcija, hrana, stočna hrana

PO
UDK

Čuva se: U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad,
ČU Bulevar cara Lazara 1

Važna napomena: -
VN
Izvod:
IZ

U okviru doktorske disertacije su razvijeni i optimizovani postupci pripreme uzoraka hrane (žitarica, sirovina, poluproizvoda i prehrambenih proizvoda na bazi žitarica, voća i povrća) i stočne hrane, kao i simultano određivanje tropanskih i glikoalkaloida primenom gasne i tečne hromatografije uz maseno-spektrometrijsku detekciju. Razdvajanje alkaloida primenom gasne hromatografije je izvedeno na kapilarnoj koloni (HP-5MS UI), uz detekciju sa kvadrupolnom masenom spektrometrijom SIM tehnikom, u intervalu m/z 50–550 a.m.u. Pri optimizovanim uslovima postignuto je razdvajanje homotropina, atropina i skopolamina u vremenu od 12.75 min, pri čemu tropin i anisodamin nisu mogli biti detektovani. Glikoalkaloidi nisu direktno mogli biti određivani gasnom hromatografijom usled njihove visoke molekulske mase i male isparljivosti. Za simultano određivanje tropanskih alkaloida (tropin, l-hiosciamin, atropin, skopolamin, homotropin i anisodamin) i glikoalkaloida (α -solanin i α -kakonin) validirana je brza i osetljiva multirezidualna LC–MS/MS metoda. Korišćena je disperzivna

čvrsto-fazna ekstrakcija sa 0.5% mravlje kiseline u acetonitrilu/vodi (75:25, v/v), solima magnezijum sulfat, natrijum hlorid i natrijum citrat kao i C₁₈ sorbent. Analiti su razdvojeni na Chirobiotic V koloni, sa mobilnom fazom sastavljenom od 10 mM amonijum formata u voda/acetonitril (90:10, v/v) i metanol/acetonitril (50:50, v/v), mešanim u odnosu 20:80 (v/v). Detekcija komponenti je izvedena u pozitivnom elektrosprej modu (ESI⁺), korišćenjem reakcionog višestrukog monitoring akvizacionog moda (MRM). Optimizovana tečno-hromatografska metoda je podrazumevala brz i jednostavan proces ekstrakcije, sa prinosom od 61-111% za pojedine alkaloide, dobru linearnost u širokom opsegu (5-80 µg/kg, r²=0.998), dobru selektivnost, robusnost i preciznost (CV < 5%). Granica detekcije (LOD) za sve alkaloida je bila u opsegu od 0.74 do 0.79 ng/g dok se granica kvantifikacije (LOQ) kretala od 2.17 do 2.46 ng/g u svim žitaricama, izuzev za tropin u soji i lanenom semenu (LOD = 1.55 i LOQ = 4.91 ng/g). Pri analizi uzoraka sa tržišta alkaloidi nisu detektovani u analiziranim uzorcima hrane, kao što su: pšenica, raž, kukuruz, brašno od mešanih žitarica, kukuruzno brašno, biskvit i krekeri. Stočna hrana namenjena ishrani svinja i peradi je sadržala atropin, skopolamin, α-solanin i α-kakonin u koncentracionom opsegu od 3.6 do 21.7 ng/g. Atropin i skopolamin su detektovani u koncentracionom opsegu od 2.8 do 9.8 ng/g u hrani namenjenoj ishrani krava i zečeva, dok u hrani nemenjenoj ishrani konja i divljih životinja alkaloidi nisu detektovani. U analiziranim uzorcima voća i povrća (jabuka, kruška, avokado, mrkva, krastvac i paprika) po prvi put u ovom radu su detektovani glikoalkaloidi, α-solanin i α-kakonin. Koncentracija oba glikoalkaloida se kretala u opsegu od 0.3 do 15 ng/g. Sadržaj glikoalkaloida u krompiru i čipsu (8708.9-18794.7 ng/g) se nalazio u okviru preporučenog ukupnog sadržaja glikoalkaloida od 200 mg/kg (sirova odvaga) (FAO/WHO, 1999). Apsorpcija i translokacija alkaloida od strane pšenice u koren, listove i stabljiku je ustanovljena upotrebom atropina ¹⁴C. Utvrđeno je da biljka nakon 15 dana apsorbuje 4.30% i 2.28% atropina ¹⁴C za niži (13676 dpm/g soil) i viši (37203 dpm/g soil) sadržaj standarda sa kojim je zemljište spajkovano, redom. Količina apsorbovanog atropina se smanjivala tokom rasta biljke. Biljka starosti 90 dana je apsorbivala 0.38% i 0.21% atropina ¹⁴C za niži i viši sadržaj standarda,

redom. Povećanje koncentracije supstance u zemljištu nije uticalo na dalje povećanje apsorpcije. Do nagomilavanja supstance je došlo u listovima (83%) dok su niže koncentracije zabilježene u korenu (8.6%), stabljici (4.2%) i semenu (4.1%). U analiziranim uzorcima vode, koja je poticala od ispiranja zemljišta obogaćenog atropinom ^{14}C , nakon 30 dana supstanca je detektovana u koncentraciji od 0.5%. Tokom vremena je ustanovljeno smanjenje ispiranja ove supstance (0.01% nakon 90 dana). Analiza uzoraka zemljišta nakon 30 i 60 dana je pokazala značajne adsorpcione osobine atropina, tako da je količina čvrsto adsorbovanog (neekstrahovanog) atropina iznosila 60% i 70%, redom. Zaostali atropin je bio stabilan i nakon 90 dana.

Datum prihvatanja teme: 28.01.2011.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

predsednik: prof. Dr Eva Lončar, redovni profesor Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
član: Dr Momir Mikov, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
član: Dr Radomir Malbaša, vanredni profesor Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu
član: Dr Jaroslava Švarc-Gajić, docent Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

DT

Monograph documentation

Type of record:

TR

Textual material, printed

Contents code:

CC

PhD Thesis

Author:

AU

Zora Jandrić

Mentor:

MN

Dr Jaroslava Svarc-Gajjić, assistant professor

Title:

TI

Development of chromatographic methods for simultaneous determinations of tropane and glycoalkaloids and tracking of ¹⁴C atropine uptake in wheat

Language of text:

LT

Serbian (Roman)

Language of abstract:

LA

Serbian / English

Country of publication:

CP

Serbia

Locality of publication:

LP

AP Vojvodina

Publication year:

PY

2011

Publisher:

PU

Author`s reprint

Publication place:

PP

21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Physical description: (Chapters / pages / figures / tables / ref.)
PD 6 105 40 9 173

Scientific field
SF Chemical-technological sciences

Scientific discipline
SD Applied chemistry

Subject, Key words
SKW Gas and liquid chromatography, mass spectrometry, tropane alkaloids, glycoalkaloids, absorption, food, feed

UC

Holding data:
Library of Faculty of Technology, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Serbia

HD

Note:
N -

Abstract:
AB

The methods of sample preparation have been developed and optimized for food (grains, raw materials, food products based on grains and fruits and vegetables) and feed analyses for the purpose of simultaneous determination of tropane and glycoalkaloids by gas and liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry. Separation of alkaloids by gas chromatography was achieved by using capillary column HP-5MS UI. The alkaloids have been detected by using a quadrupole mass spectrometer inSIM mode for the range of m/z 50–550 a.m.u. Under optimised conditions, good separation of homatropine, atropine and scopolamine was achieved after 12.75 min, while tropine and anisodamine couldn't be detected. Glycoalkaloids could not be analysed directly by gas chromatography due to their high molecular weight and low volatility. For simultaneous determination of tropane alkaloids (tropine, atropine, scopolamine, homatropine, anisodamine) and glycoalkaloids (α -solanine, α -chaconine) fast and sensitive multiresidue LC–MS/MS method was validated. In sample preparation dispersive solid phase extraction (DSPE) was performed with 0.5% formic acid in acetonitrile/water (75:25, v/v) and a mixture of magnesium sulphate, sodium chloride, sodium citrate and C₁₈ sorbent. The analytes were separated by

isocratic HPLC on a Chirobiotic V column with the mobile phase that consisted of 10 mM ammonium formate in water/acetonitrile (90:10, v/v) and methanol/acetonitrile (50:50, v/v), mixed in the ratio of 20:80 (v/v). Compounds were detected in positive electrospray ionization mode (ESI⁺), using multi reaction monitoring (MRM). Optimised liquid-chromatographic method exhibited good linearity in the range 5-80 ng/g ($r^2=0.998$). The method has shown to be specific, selective, accurate (recoveries from 61-111%), precise (CV < 5%) and rugged. Calculated limits of detection (LOD) for all alkaloids were in the range 0.74-0.79 ng/g, while the limits of quantitation (LOQ) were in the range 2.2-4.9 ng/g in all grains, except for tropine in soybean and linseed (LOD = 1.55 and LOQ = 4.91 ng/g). The proposed method was applied in the analyses of samples obtained from local supermarkets. The alkaloids were not detected in following food samples: wheat, rye, maize, mixed grain flour, corn flour, biscuits and crackers. The feeds for pigs and chicken were the most contaminated with atropine, scopolamine, α -solanine and α -chaconine with the contents of alkaloids in the range of 3.6 to 21.7 ng/g. Atropine and scopolamine were detected in cattle and rabbit feed in concentrations ranging from 2.8 to 9.8 ng/g, while in feed for horses and wild animals none of the target alkaloids were detected. Conducted research reports for the first time the presence of glycoalkaloids, α -solanine and α -chaconine in fruit and vegetable samples (apple, pear, avocado, carrot, cucumber and paprika). The concentrations of these alkaloids were in the range of 0.3 to 15 ng/g. The content of glycoalkaloids in potato and chips complied with the recommended content of total glycoalkaloids concentration of 200 mg/kg (raw weight) (FAO/WHO, 1999). Absorption and translocation of alkaloids in wheat (roots, leaves, stem) was determined by using atropine ¹⁴C. It was found that young wheat after 15 days absorbed approximately 4.30% and 2.28% of atropine ¹⁴C for low (13676 dpm/g soil) and high (37203 dpm/g soil) spiked levels in soil, respectively. Increase in the spiked concentration in the soil did not affect higher absorption of atropine ¹⁴C in wheat. The highest accumulation of atropine ¹⁴C was observed in the leaves (83%) while lower concentrations were detected in the roots (8.6%), stems (4.2%) and seeds (4.1%). In collected water samples during the soil leaching, atropine ¹⁴C

was detected in the concentration of 0.5%. Leaching decreased with the time (0.01% after 90 days). Analyses of soil samples after 30 and 60 days showed strong adsorption of atropine to the soil and quantity of adsorbed atropine was 60% and 70%, respectively. Adsorbed atropine in the soil was stable after 90 days.

Accepted on Scientific
Board on:
AS

January 28, 2011

Defended:
DE

Thesis Defend Board:
DB

president: Eva Lončar, PhD, full professor, Faculty of
Technology, University of Novi Sad
member: Momir Mikov, PhD, full professor, Faculty of
Medicine, University of Novi Sad
member: Radomir Malbaša, PhD, associate professor,
Faculty of Technology, University of Novi Sad
member: Jaroslava Švarc-Gajić, PhD, assistant professor,
Faculty of Technology, University of Novi Sad

Spisak skraćenica

a.m.u.	atomska jedinica mase (<i>engl.</i> atomic mass unit)
ACN	acetonitril
APCI	hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (<i>engl.</i> Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
API	jonizacija pod atmosferskim pritiskom (<i>engl.</i> Atmospheric Pressure Ionization)
APPI	fotjonizacija pod atmosferskim pritiskom (<i>engl.</i> Atmospheric Pressure Photo Ionization)
BSTFA	bis(trimetilsilil-trifluoroacetamid)
CDC	Centar za kontrolu i zaštitu od bolesti (<i>engl.</i> Center for disease control and prevention)
CE	kapilarna elektroforeza (<i>engl.</i> Capillary Electrophoresy)
CE-MS	kapilarna elektroforeze-masena spektrometrije (<i>engl.</i> Capillary Electrophoresy-Mass Spectrometry)
CI	hemijska jonizacija (<i>engl.</i> Chemical Ionization)
DSPE	disperezivna čvrsto-fazna ekstrakcija (<i>engl.</i> Dispersive Solid Phase Extraction)
EA-IRMS	elementalni analizator (<i>engl.</i> Elemental Analyser) spojen sa masenim spektrometrom (<i>engl.</i> Isotope Ratio Mass Spectrometry)
EC	Evropska zajednica (<i>engl.</i> European Community)
EFSA	Evropska agencija za sigurnost hrane (<i>engl.</i> European Food Safety Agency)
EI	jonizacija elektronima (<i>engl.</i> Electron Impact)
ELISA	enzimska imunološka metoda (<i>engl.</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ESI	elektron sprej jonizacija (<i>engl.</i> Electron Spray Ionization)
ESCI	hemijska jonizacija sa elektron sprejom (<i>engl.</i> Elektron Spray Chemical Ionization)
FAB	bombardovanje brzim atomima (<i>engl.</i> Fast Atom Bombardment)
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu (<i>engl.</i> Food and Agriculture Organization)

FD	jonizacija desorpcijom (<i>engl.</i> Field Desorption)
FI	jonizacija u električnom polju (<i>engl.</i> Field Ionization)
FID	plameno jonizacioni detektor (<i>engl.</i> Flame Ionization Detector)
FLD	fluorescentni detektor (<i>engl.</i> Fluorescence Detector)
GC	gasna hromatografija (<i>engl.</i> Gas Chromatography)
GC-MS	gasna hromatografija-masena spektrometrija (<i>engl.</i> Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HLB	hidrofilni-lipofilni balans (<i>engl.</i> Hydrophilic Lypophilic Balance)
HOAc	sirćetna kiselina
HPLC	visokopritisna tečna hromatografija (<i>engl.</i> High Preassure Liquid Chromatography)
HPLC-MS/MS	visokopritisna tečna hromatografija- maseno/masena spektrometrija (<i>engl.</i> High Preassure Liquid Chromatography- Mass/Mass Spectrometry)
HPLC-UV	visokopritisna tečna hromatografija sa UV detektorom (<i>engl.</i> High Preassure Liquid Chromatography with UV detection)
HPLC-UV/VIS	visokopritisna tečna hromatografija sa UV/VIS detektorom (<i>engl.</i> High Preassure Liquid Chromatography with UV and VIS detection)
IAEA	Internacioanalna atomska agencija za energiju (<i>engl.</i> Internacional Atomic Energy Agency)
IS	unutrašnji standard (<i>engl.</i> Internal Standard)
IT	jon trap analizator (<i>engl.</i> Ion Trap)
LC	tečna hromatografija (<i>engl.</i> Liquid Chromatography)
LC-MS	tečna hromatografija-masena spektrometrija (<i>engl.</i> Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LLE	tečno-tečna ekstrakcija (<i>engl.</i> Liquid Liquid Extraction)
LSC	tečni sciantilacioni brojač (<i>engl.</i> Liquid Sciantilation Counter)
MALDI	jonizacija potpomognuta laserskom desorpcijom iz matriksa (<i>engl.</i> Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
MALDI-TOF-MS	matriks podržana laserska desorpcija/jonizacija sa vremenom preleta i masenom spektrometrijom (<i>engl.</i> Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight-Mass Spectrometry)
MAX	mešani anjonski izmenjivi rastvarači (<i>engl.</i> Mixed-mode anion exchange)
MCX	mešani katjonski izmenjivi rastvarači (<i>engl.</i> Mixed-mode cation exchange)

MeOH	metanol
MRM	praćenje jona definisanih masa u posebnim kanalima (<i>engl.</i> Multiple Reaction Monitoring)
MS	masena spektrometrija (<i>engl.</i> Mass Spectrometry)
MSD	maseno selektivni detector (<i>engl.</i> Mass Selective Detector)
MS/MS	maseno/masena spektrometrija (<i>engl.</i> Mass/Mass Spectrometry)
MSPD	dispergovani čvrsto-fazni materijal (<i>engl.</i> Matrix Solid Phase dispersion)
NMR	nuklearna magnetna rezonanca (<i>engl.</i> Nuclear Magnetic Resonance)
NPD	azotno fosforni detektor (<i>engl.</i> Nitrogen Phosphorus Detector)
PLOT	kapilarne kolone sa poroznim slojem (<i>engl.</i> Porous Layer Open Tubular)
PSA	primarni sekundarni amin (<i>engl.</i> Primary Secondary Amine)
PTV	temperaturno programirano isparavanje (<i>engl.</i> Programmed Temperature Vaporizing)
TCD	detektor termičke provodljivosti (<i>engl.</i> Thermal Conductivity Detector)
TEA	trietilamin
TIC	totalni jonski hromatogram (<i>engl.</i> Total Ion Chromatogram)
TLC	hromatografija na tankom sloju (<i>engl.</i> Thin Layer Chromatography)
TMCS	trimetilhlorosilan
TOF	analizator na bazi vremena preleta (<i>engl.</i> Time Of Flight)
SCAN	snimanje masenog spektra
SCOT	kolone sa unutrašnjim zidom prevučenim stacionarnom likvidnom fazom i sprašenim inertnim nosačem (<i>engl.</i> Supported Coated Open Tubular)
SIM	praćenje jona definisanih masa (<i>engl.</i> Selected Ion Monitoring)
SS	jonizacija varnicom (<i>engl.</i> Spark Source)
SPE	čvrsto-fazna ekstrakcija (<i>engl.</i> Solid Phase Extraction)
SSE	povećanje/smanjenje signala (<i>engl.</i> Signal Suppression/Enhancement)
POPOP	1,4 bis-2-(5-feniloksazolil)-benzen (<i>engl.</i> 1,4 bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene)
PPO	2,5-difeniloksazolil (<i>engl.</i> 2,5-dipheniloxazolyl)
UV	ultraljubičasta oblast elektromagnetnog spektra (<i>engl.</i> Ultraviolet)
VIS	vidljiva oblast elektromagnetnog spektra (<i>engl.</i> Visible)
VPDB	Vienna PeeDee Belemnite
WCOT	standardne kapilarne kolone (<i>engl.</i> Wall-Coated Open Tubular)
WHO	Svetska zdravstvena organizacija (<i>engl.</i> World Health Organization)

k	količina adsorbovane supstance
CK	količina ugljenika u korenu
CO	količina ugljenika u ostatku biljke
TK	težina korena
TO	težina ostataka biljke

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORETSKI DEO	3
2.1. Alkaloidi	3
2.1.1. Osnovne osobine tropanskih i glikoalkaloida.....	7
2.1.2. Biosinteza tropanskih i glikoalkaloida.....	13
2.1.3. Toksičnost tropanskih i glikoalkaloida.....	16
2.2. Masena spektrometrija	17
2.3. Hromatografske tehnike spregnute sa masenom spektrometrijom	22
2.3.1. Gasna hromatografija.....	23
2.3.2. Visokopritisna tečna hromatografija.....	25
2.4. Tehnike korišćene za praćenje apsorpcije atropina ¹⁴C u pšenici	26
2.4.1. Tečni scintilacioni brojač.....	26
2.4.2. Biološki uređaj za oksidaciju.....	28
2.4.3. Elementalni analizator sa masenim spektrometrom.....	29
2.5. Određivanje tropanskih i glikoalkaloida	29
2.5.1. Priprema uzoraka.....	30
2.5.1.1. Tečno-tečna ekstrakcija	30
2.5.1.2. Ekstrakcija na čvrstim fazama.....	31
2.5.1.3. Disperzivna čvrsto-fazna ekstrakcija.....	32
2.5.2. Analitičke tehnike korišćene pri određivanju tropanskih i glikoalkaloida....	32
2.5.2.1. Tankoslojna hromatografija.....	33
2.5.2.2. Gasna hromatografija.....	33
2.5.2.3. Visokopritisna tečna hromatografija.....	34
2.5.2.4. Enzimsko-imunološke metode.....	35
2.5.2.5. Druge metode određivanja tropanskih i glikoalkaloida.....	36
2.5.2.6. Izbor metode.....	36
3. EKSPERIMENTALNI DEO	38
3.1. Aparatura	38

3.1.1. Kolona korišćena za GC.....	39
3.1.2. Kolone korišćene za HPLC.....	39
3.2. Hemikalije, reagensi i standardi.....	39
3.3. Priprema rastvora.....	40
3.4. Priprema mobilnih faza.....	41
3.5. Uzorci.....	42
3.5.1. Priprema uzoraka za analizu pomoću HPLC-MS/MS.....	42
3.5.2. Priprema uzoraka za analizu pomoću GC.....	43
3.5.3. Priprema uzoraka za analizu pomoću LSC, biološkog uređaja za oksidaciju i EA-IRMS.....	43
3.5.4. Spajkovanje uzoraka za eksperiment validacije.....	44
3.6. Određivanje alkaloida hromatografskim tehnikama.....	44
3.6.1. Određivanje tropanskih i glikoalkaloida pomoću HPLC-MS/MS.....	44
3.6.2. Određivanje tropanskih alkaloida pomoću GC-MS.....	45
3.7. Analiza uzoraka pomoću LSC, biološkog uređaja za oksidaciju i EA-IRMS.....	45
3.8. Eksperimentalni dizajn praćenja procesa apsorpcije i translokacije atropina ¹⁴C u pšenici.....	46
4. RESULTATI I DISKUSIJA.....	47
4.1. Optimizacija procesa ekstrakcije.....	47
4.2. Uticaj matriksa na proces analize.....	53
4.3. Optimizacija uslova određivanja tropanskih alkaloida pomoću GC-MS	54
4.3.1. Podešavanje rada masenog spektrometra	54
4.3.2. Optimizacija temperaturnog programa	54
4.4. Optimizacija uslova određivanja tropanskih i glikoalkaloida pomoću HPLC-MS/MS.....	59
4.4.1. Optimizacija hromatografskog razdvajanja.....	59
4.4.2. Optimizacija MS/MS.....	63
4.5. Validacija metode.....	69
4.5.1. Selektivnost i specifičnost.....	69
4.5.2. Granice detekcije i kvantifikacije.....	70
4.5.3. Prinos metode (recovery).....	71
4.5.4. Robusnost metode.....	73
4.6. Poređenje HPLC-MS/MS i GC-MS metoda pri određivanju tropanskih i	

glikoalkaloida.....	73
4.7. Određivanje tropanskih i glikoalkaloida u uzorcima sa tržišta.....	75
4.8. Apsorpcija i translokacija atropina ¹⁴C u pšenici.....	78
5. ZAKLJUČAK.....	84
6. LITERATURA	87
Prilog: Fotografije.....	104

1. UVOD

Alkaloidi su bazna, azotova organska jedinjenja, heterociklične strukture i izrazitog fiziološkog dejstva. Hemija alkaloida datira od 1805. godine, kada je prvi put izolovan morfin. Nova klasa jedinjenja dobila je tada naziv "biljne alkalije", a 1818. godine Meisner je ovim jedinjenjima dao ime "*alkaloidi*". U hemijskom pogledu, alkaloidi pripadaju raznim grupama organskih jedinjenja. Veći deo su heterociklična azotova jedinjenja, a manji dio sadrži azot u alifatičnom dijelu molekula. Pored azota alkaloidi često sadrže i kiseonik.

Tropanski alkaloidi i glikoalkaloidi su prirodni toksini koje proizvode biljke iz familije *Solanaceae*, koja broji preko 100 rodova i 3000 vrsta. Visoke koncentracije ovih alkaloida su posebno nađene u sledećim rodovima: *Datura* (*Datura stramonium* (tatula), *Datura ferox*, *Datura innoxia*, *Atropa beladonna* (bunika), *Hyoscyamus*, *Brugmansia*, *Solanum nigrum*, *Solanum tuberosum* (krompir), *Lycopersicon esculentum* (paradajz), *Capsicum* (različite vrste slatke i ljute paprike) i *Solanum melongena* (patlidžan). Svi delovi biljke a posebno seme, su toksični. Najznačajniji tropanski alkaloidi su: tropin, l-hiosciamin, atropin (racemska smeša l- i d-hiosciamina), skopolamin (takođe poznat kao hioscin), homatropin i anisodamin. Glikoalkaloidi su steroidni glikozidi, a najčešći nađeni u biljkama su: α -solanin, α -kakonin, tomatin i dehidrotomatina.

Toksično delovanje tropanskih alkaloida i glikoalkaloida se najčešće ogleda u blokiranju aktivnosti nervnog sistema inhibicijom holinesteraze, i oštećenju ćelijske membrane, kao i zglobova uzrokovanjem inflamacije i izmene mineralnog sastava.

Biljke koje proizvode tropanske i glikoalkaloide često rastu kao korov na poljima zajedno sa žitaricama i njihovo seme može kontamirati useve (pšenica, kukuruz, raž, soja, lan, itd.), kao i hranu za ljude i životinje. Drugi način dospevanja alkaloida u žitarice podrazumeva apsorpciju alkaloida od strane biljaka iz zemljišta na kome su prethodno uzgajane biljke koje prirodno proizvode ove alkaloidne, kao npr. krompir, paradajz, parika, patližan.

Tropanski alkaloidi i glikoalkaloidi su prepoznati od strane evropske organizacije za bezbednost hrane (EFSA, 2008, 2009) kao jako stabilne, toksične, adiktivne i fizotropske supstance. Većina do sad razvijenih metoda određivanja alkaloida se bazirala na određivanju u biljkama koje ih proizvode, korišćenjem jako komplikovanih i dugih metoda ekstrakcije, i analizi pomoću visokopritisne tečne hromatografije uz UV, fluorescentni detektor (HPLC-UV/FLD) ili masenu detekciju (HPLC-MS), kao i gasne hromatografije uz plameno jonizacionu (GC-FID), azotno fosforu (GC-NPD) ili masenu detekciju (GC-MS), uz dosta

visok prag detekcije i kvantifikacije. Jako je malo dostupnih visoko-osjetljivih metoda koje omogućavaju određivanje tragova toksičnih supstanci u drugim biljkama koje su kontaminirane sa ove dve grupe alkaloida.

S obzirom na toksičnost tropanskih i glikoalkaloida, kao i na realan rizik od trovanja ovim jedinjenjima, a bazirajući se na preporuci evropske organizacije za bezbednost hrane, osnovni cilj ove disertacije je bio razvoj i validacija pouzdane, brze, jednostavne i osetljive analitičke (hromatografske) metode za određivanje najznačajnijih tropanskih alkaloida (tropin, l-hiosciamin, atropin, skopolamin, homatropin i anisodamin) i glikoalkaloida (α -solanin i α -kakonin) u hrani i stočnoj hrani. Razvijena metoda je korišćena u analizi uzoraka sa tržišta i uzoraka pšenice koja je uzgajana na zemljištu kontaminiranom sa atropinom ^{14}C . Uzgoj pšenice, na zemljištu spajkovanom¹ sa atropinom ^{14}C , je vršen da bi se pratila i utvrdila moguća kontaminacija žitarica sa alkaloidima putem apsorpcije iz zemljišta. Takođe je praćen način translokacije i stabilnost radioaktivne supstance, analizom uzoraka zemljišta, vode i pojedinih delova biljke (listova, stabljike i semena) u određenim vremenskim periodima.

Prema našem saznanju do sada nisu razvijeni i validirani metodi za simultano određivanje tropanskih alkaloida i glikoalkaloida u hrani baziranoj na žitaricama i stočnoj hrani. S obzirom da u literaturi nisu dostupni ni podaci o apsorpciji i translokaciji ovih alkaloida u biljkama koje rastu na kontaminiranom zemljištu, značajan deo istraživanja izvedenih u okviru ove disertacije je bio posvećen razjašnjavanju mehanizama kontaminacije useva pomoću radioaktivnih izotopa.

¹ Spajkovanje podrazumeva dodatak poznate količine standarda uzorku. Termin je usvojen iz engleskog jezika „to spike“ i prihvaćen je kao takav u krugovima hemijskih analitičara.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Alkaloidi

Velik je broj biljaka otrovnih, lekovitih i halucinogenih osobina, koje su poznate od davnina mnogim civilizacijama. Većina takvih biljaka pripada porodici *Papaveraceae*, *Papilionaceae*, *Apocyanaceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Convolvulaceae*, *Erythroxylaceae*, *Euphorbiaceae*, *Oleaceae*, *Proteaceae*, *Compositae*, *Rutaceae*, *Rubiaceae* i drugim. Ove biljke sadrže bazna, najčešće heterociklična, jedinjenja nazvana **alkaloidima**, prema izrazu „alkali-like“ (alkalijama slični) koji je 1818. godine predložio W. Meisner. Hemija alkaloida, poznavanje osobina i strukture, kao i sinteza ovih jedinjenja novijeg je datuma, mada je još 1805. godine F.W. Sertürner izolovao prvi alkaloid, morfin, iz opijuma maka, a nova klasa jedinjenja dobila je tada naziv "biljne alkalije".

Alkaloidi su bazna, azotova organska jedinjenja, heterociklične strukture i izrazitog fiziološkog dejstva. U hemijskom pogledu, alkaloidi pripadaju raznim grupama organskih jedinjenja. Veći deo su heterociklična azotova jedinjenja, a manji deo sadrži azot u alifatičnom delu molekula. Azot najčešće zatvara heterociklični prsten, tako da su neka druga bazna jedinjenja vrlo retko prisutna u organima biljaka, kao npr. metil-, -trimetil i ostali alifatični prosti alkilamaini, holini i betaini, pa čak i purini. Ovakva jedinjenja se ne ubrajaju u alkaloide, već se često klasifikuju kao „amini bioloških osobina“ ili kao „protoalkaloidi“ (Milić i sar. 1998). Pored azota alkaloidi često sadrže i kiseonik.

Alkaloidi su nađeni u mnogim biljkama u približno 100 različitih porodica, gde se javljaju u biljnom tkivu (listu, cvetu, kori, semenu ili korenu biljke) kao metaboliti intenzivne ćelijske aktivnosti. Pojedine vrste gljiva se ubrajaju u druge prirodne proizvođače alkaloida (ergot alkaloidi i amidi lisergične kiseline), dok se samo jedan alkaloid – bufotenin nalazi i u biljkama, gljivama i sekretu gmizavaca (Milić i sar., 1998).

Funkcija i fiziološka uloga alkaloida u biljkama još uvek nije dovoljno razjašnjena, ali se pretpostavlja da su oni skladište azota i da fiziološki štite biljku od napada insekata i životinja. Neka istraživanja ukazuju da su alkaloidi, zbog svoje specifične strukture, helatni agensi i pomažu biljkama u selekciji pojedinih metala iz zemljišta (Milić i sar. 1998). Prema današnjim podacima biljke koje sadrže alkaloide čine oko 10% od ukupne svetske flore.

U zavisnosti od stepana zastupljenosti alkaloidnih vrsta biljaka, porodice koje proizvode alkaloide se dele u tri grupe:

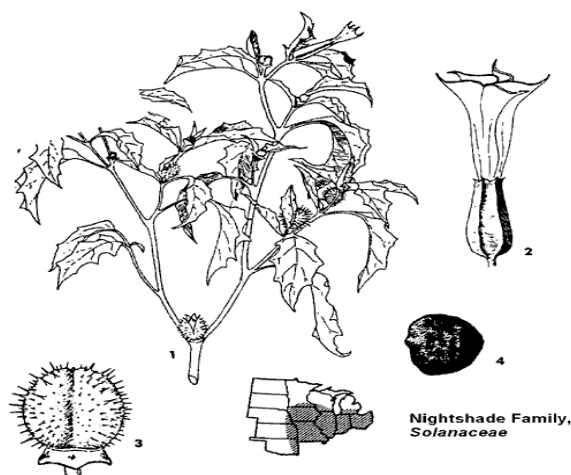
1. "Visokoalkaloidne porodice", koje imaju preko 20% rodova sa alkaloidnim vrstama,

2. "Srednjealkaloidne familije", čijih 10-20% rodova sadrži alkaloidne vrste,
3. "Maloalkaloidne familije", čijih 1-10% rodova ima vrste bogate alkaloidima.

Alkaloidi se u biljkama nalaze u obliku soli različitih organskih (mlečna, jabučna, sirćetna i dr.) ili neorganskih (najčešće sumporna i fosforna) kiselina, estara ili amida, koji su rastvorni u vodi i etanolu. Bazni karakter alkaloida potiče od prisustva azota koji može da reaguje sa protonom kiseline svojim slobodnim elektronskim parom. Ova jedinjenja se najčešće javljaju kao kristalna i bezbojna. Manji broj alkaloida je tečan (nikotin, arekolin) ili obojen (berberin). Tečni alkaloidi destiluju se vodenom parom. Alkaloidi se dobro rastvaraju u mnogim organskim rastvaračima.

Postoji više podela alkaloida, ali se alkaloidi najčešće klasifikuju na osnovu hemijske strukture ili na osnovu biogeneze. Na osnovu strukture molekula, odnosno onog dela koji sadrži azot, može se izvršiti sledeća podela: alkaloidi proste strukture (fenil-alkilamini, efedrin, meskalin), alkaloidi sa pirolidinskim, piperidinskim i piridinskim prstenom (piperin, lupinin), alkaloidi sa kondenzovanim pirolidinskim i piperidinskim prstenom (atropin, kokain), alkaloidi sa izohinolinskim prstenom (narkotin, emetin), alkaloidi sa fenantrenskim prstenom (morfin, heroin), alkaloidi sa hinolinskim prstenom (hinin), alkaloidi sa indolovim prstenom (johinbin, strihnin), betalaini - pigment alkaloidi, likopodijum alkaloidi, purinski alkaloidi, steroidni alkaloidi i alkaloidi različite strukture. Prema Herbertu (1979), klasifikacija alkaloida se zasniva na biogenezi ovih jedinjenja, odnosno na strukturi njihovih prekursora. Većina alkaloida je izvedena iz lizina i ornitina, a manji broj iz aromatičnih kiselina, fenilalanina, tirozina i triptofana. Alkaloidi su po strukturi svojih prekursora svrstani u devet posebnih grupa:

1. Pirolidin alklaoidi
2. Piperidin i piridin alklaoidi
3. Izokvinolin i slični alklaoidi
4. *Amaryllidaceae* i mecembrin alklaoidi
5. Kvinolin i slični alklaoidi
6. Indol alklaoidi
7. Ipeka alklaoidi
8. Steroidni i terpenoidni alklaoidi
9. Ostali alklaoidi.

Slika 1. Tatula, *Datura stramonium* L.

1, gornji deo biljke; 2, cvetovi; 3 semena čahura; 4, seme

Za čoveka alkaloidi predstavljaju važnu grupu jedinjenja kao sastojci različitih lekova i farmaceutskih preparata. Njihova upotreba u humanoj medicini za lečenje raznih bolesti, može biti nezamenljiva u nekim slučajevima. Do sada je poznato više od 6000 različitih vrsta alkaloida, od kojih su neke višestruko korisne i upotrebljavaju se dugi niz godina u farmaceutskoj industriji. Ipak, bitno je napomenuti da se alkaloidi često koriste u vidu opojnih sredstava za uživanje (droge) i pri tome toksično deluju na zdravlje čoveka. S druge strane, biljke koje proizvode alkaloidne često rastu kao korov na poljima zajedno sa žitaricama i njihovo seme je odgovorno za kontaminaciju useva pšenice, kukuruza, raži, soje, lana i dr. Tokom žetve, proizvodnje, prerade i prometa žitarica, zbog svoje hemijske stabilnosti alkaloidi se skladište zajedno sa sirovinama. Ovakve zagađene sirovine unose kontaminaciju u hranu namenjenu ishrani ljudi i životinja. Biljke iz familije *Solanaceae* sadrže kapsule (najčešće 50 kapsula po biljci) u kojima se nalazi oko 1500 sjemenki, koje sadrže toksične supstance (Slika 1). Procenjeno je da oko 30000 sjemenki iz suhe kapsule se rasprši po površini od oko 1-4 kvadratna metra (Mountain 1987). Na taj način se kontaminiraju voda, zemljište, ali i usevi u toku žetve. Jestive biljke kao što su krompir, paradajz, parika, patližan, takođe proizvode određene količine alkaloida, čija koncentracija se menja zavisno od uzgoja, načina obrade i skladištenja. Jasno je da povećane koncentracije usled dejstva određenih faktora mogu da ugroze zdravlje potrošača. Zbog visoke toksičnosti alkaloida u niskim koncentracijama, veoma je važno pratiti potencijalno povećanje koncentracije alkaloida u jestivim biljkama (krompir, paprika, patlidžan) i moguću kontaminaciju namirnica koje se koriste u ishrani ljudi i životinja.

Uloga hrane je višestruka, a pored ostalog, ona ima gradivni, energetski i zaštitni značaj. Na zdravlje čoveka negativno deluju strane supstance koje u organizam mogu dospeti preko zagađene hrane i vode. Biološka kontaminacija (prirodnim toksinima i toksinima koje proizvode mikroorganizmi) i hemijska antropogena kontaminacija (pesticidi, antibiotici, hormoni, toksični metali, policiklični aromatski ugljovodonici, polihlorovani bifenili, fenoli, itd.) su najčešći načini kontaminacije namirnica (Đarmati, 1985). Namirnice i stočna hrana su podložne kontaminaciji alkaloidima, pa su velike i mogućnosti unošenja ovih toksina u organizam. Prirodni toksini zahtevaju značajnu pažnju zbog svoje akutne toksičnosti, ali i kao potencijalni rizik pri hroničnom unosu i to prvenstveno usled kancerogenog efekta. Otuda je analitika prirodnih toksina izuzetno značajna u kontroli zdravstvene ispravnosti hrane i ovom problemu u svetu se u poslednje vreme posvećuje sve veći značaj.

Alkalodi mogu izazvati primarno i sekundarno toksično delovanje na zdravlje čoveka u zavisnosti od načina ulaska u lanac ishrane. Do primarnog delovanja kod ljudi uglavnom dolazi zbog konzumiranja kontaminirane hrane biljnog prekla. Alkaloidi, koje domaće životinje unesu u organizam, mogu preći u mleko, meso i jaja, čime i oni postaju kontaminirani i mogu ugroziti ljudsko zdravlje (sekundarno delovanje).

Kroz istoriju je zabeležen veliki broj slučajeva masovnih trovanja različitim alkaloidima. 1979. godine u Velikoj Britaniji je zabeleženo 50 slučajeva trovanja sa quinolizidine i isoquinoline alkaloidima koje proizvode *Laburnum* biljke, dok je u Njemačkoj između 1998 i 2004 je zabeleženo 892 slučaja trovanja (Pietsch i sar., 2008; Forrester, 1979; Bramley i sar., 1981). Ove biljke su uglavnom konzumirane pušenjem, zbog stimulirajućih halucinogenih efekata.

Trovanje ergot alkaloidima je poznato kao ergotizam i prvi put je zabeleženo 1853. godine u Engleskoj (Caporaal, 1976). Ergotizam je posledica dugotrajnog izlaganja ergot alkaloidima, najčešće konzumiranjem hleba pripremljenog od kontaminirane raži ali i drugih žitarica. Kod nas je ova pojava poznata kao bolest „ražene glavnice“.

Najčešća trovanja sa tropanskim alkaloidima su posledica direktnog konzumiranja biljaka koje proizvode ove alkaloida. Biljke su uzimane kao opojna sredstva a posledice konzumacije su rezultirale u antiholiregičnom trovanju, pa čak i smrti. 975 takvih slučajeva trovanja je zabeleženo u Americi 2005. godine (Lai i sar., 2006). Međutim poznata su trovanja sa tropanskim alkaloidima putem kontaminirane hrane, i to najčešće konzumacijom domaćih proizvoda kao što su kompot i vino (CDC, 2010), med (Ramirez i sar., 1999), hamburgeri (CDC, 1984), biljni čaj, i jela pripremana od mrkve i žitarica (Fretz i sar., 2007). U Sloveniji je 2005. godine registrovano trovanje konzumiranjem domaće hrane pripremljene

od pšeničnog brašna (Perharic, 2005). Druge akcidentne situacije su zabeležene nakon konzumacije divljeg voća (Chang i sar., 1999) i ručno pravljenе paste za zube (Pereira, 1994). Do velike epidemije u New Yorku je došlo kao posledice konzumiranja heroína kontaminiranog sa skopolaminom (Hamilton i sar., 2000).

Glikoalkaloidi, posebno α -solanin i α -kakonin, poseduju izuzetno visoku akutnu toksičnost i mogu biti fatalni i za ljude i za životinje (Korpan i sar., 2004). Opšte poznato je da se zeleni delovi krompira ne bi trebali konzumirati zbog povećane koncentracije glikoalkaloida. U Severnoj Koreji su zabeležena 382 slučaja trovanja kao posledica konzumiranja crvenog krompira. Od toga 52 osobe su bile smeštene u bolnicu sa simptomima glavobolje, povraćanja, proliva i halucinacije, a 22 slučaja su se završila smrtnim ishodom (McMillan i Thompson, 1979). Često citiran je i slučaj trovanja 78 učenika nakon jela (McMillan and Thompson, 1979), koje se delimično sastojalo od krompira a stajalo u kuhinji u toku duge školske pauze. Analiza preostolag krompira u jelu je pokazala visok sadržaj glikoalkaloida. 17 učenika je smešteno u bolnicu sa simptomima povraćanja, dijareje i abdominalnog bola. Trovanje sa glikoalkaloidima iz krompira je izvešteno i u Švedskoj, Kipru i Velikoj Britaniji (McMillan i Thompson, 1979).

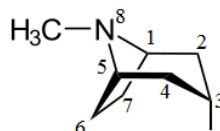
Zbog izuzetno velike akutne toksičnosti, alkaloidi u namirnicama ne mogu da se određuju putem hemijskih metoda analize, već je za njihovo određivanje neophodno primeniti visokoselektivne i visokoosetljive instrumentalne metode analize.

2.1.1. Osobine tropanskih i glikoalkaloida

Tropanski alkaloidi i glikoalkaloidi su prirodni toksini koje proizvode biljke iz familije *Solanaceae*, koja broji preko 100 rodova i 3000 vrsta. Visoke koncentracije ovih alkaloida su pronađene u sledećim rodovima: *Datura* (*Datura stramonium* (tatula), *Datura ferox*, *Datura innoxia*), *Atropa beladonna*, *Hyoscyamus niger* (bunika), *Brugmansia* (rajska truba), *Solanum nigrum*, *Solanum tuberosum* (krompir), *Lycopersicon esculentum* (paradajz), *Capsicum* (različite vrste slatke i ljute paprike) i *Solanum melongena* (patlidžan). Svi delovi biljke a posebno seme, su toksični. Najznačajniji tropanski alkaloidi su: tropin, l-hiosciamin, atropin (racemska smeša od l- i d-hiosciamina), skopolamin (takođe poznat kao hioscin), homatropin i anisodamin. Glikoalkaloidi su steroidni glikozidi, a najčešći nađeni u biljkama su: α -solanin, α -kakonin, tomatin i dehidrotomatin.

U grupu tropanskih alkaloida spada preko 200 jedinjenja, sa karakterističnom strukturom od dva kondenzovana prstena: pirolidinskog i pipiredinskog. Ovi prstenovi imaju

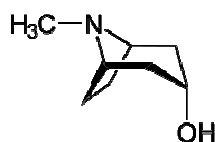
tri zajednička atoma, jedan atom azota i dva atoma ugljenika. Amino grupa, karakteristična za sve alkaloide, je u većini slučajeva metilovana. Prema tome, uobičajna struktura tropanskih alkaloida je biciklo azabiciklo-oktanski skelet prikazan na Slici 2 (Lounasmaa i Tamminen, 1993). Veliki broj alkaloida, koji se pojavljuje u porodici *Solanaceae*, nastaje esterifikacijom kiseline, kao što su: sirćetna, propionska, izobuterna, izovalerijska, α -metilbuterna, tiglinska, (+)- α -hidroksi- β -fenilpropionska tropinska i atropinska, sa različitim hidroksitropanima (α -tropanol, α -tropan-diol ili α -tropan-triol).



Slika 2. Osnovni skelet molekula tropanskih alkaloida

Najznačajniji tropanski alkaloid je l-hiosciamin, prvi put izolovan 1833. god. iz *Hyoscyamus niger* (bunika), ali je takođe i glavni alkaloid u vrsti *Datura stramonium*. Racemizacijom l-hiosciamina nastaje atropin. Atropin se koristio u medicini još od 1500. god. kada je i prvi put izolovan u Evropi iz *Solanacea* vrste, *Atropa belladonna* (velebilje ili ludača). l-skopolamin, poznat i kao hioscin, je prvi put izolovan iz *Scopola carniolica* 1881. godine, a kasnije je identifikovan i u *Hyoscyamus niger*, *Datura metel*, *Datura wrightii* i *Datura ferox*. Kao i l-hiosciamin i l-skopolamin može da formira racemsku smešu pri izolaciji.

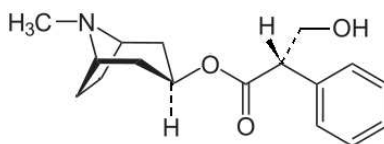
Tropin je endo-8-metil-8-azabiciklo(3,2)oktan-3-ol. Čvrsta je supstanca, pločastog kristalo-grafskog oblika, lako higroskopna sa tačkama topljenja 63°C i ključanja 233°C . Rastvoran je u etru, hloroformu, vodi i alkoholu. Lako se sintetiše iz tropidina reakcijom sa HBr, zatim hidrolizom i razdvajanjem od svog izomera pseuodtropina, ili iz tropinona hidrogenacijom u prisustvu katalizatora R-Ni. Tropin u svom čistom stanju nije detektovan u prirodi, međutim nalazi se u osnovi skeleta tropanskih alkaloida (Slika 3).



Slika 3. Struktura tropina

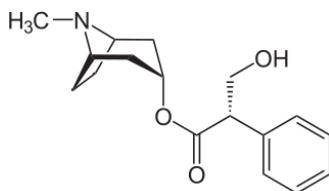
Hiosciamin je po svojoj strukturi 8-metil-8-azabiciklo[3,2,1]okt-3-il estar [3(S)-endo]- α -(hidroksimetil) benzosirćetne kiseline. Čvrsta je supstanca, svilenkastih tetragonalnih

igličastih kristala sa tačkom topljenja 108.5°C i optičkom rotacijom $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -21^{\circ}$. Lako je rastvoran u alkoholu i hloroformu. Hiosciamin je izolovan iz *Hyoscyamus niger* L., *Atropa beladonna* L., *Datura stramonium* L., i ostalih biljaka iz familije *Solanaceae* (Slika 4).



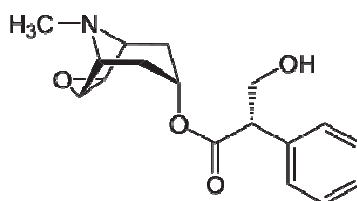
Slika 4. Struktura hiosciamina

Atropin (endo-(±)- α -racemska smeša ili dl-hiosiamin) je čvrsta supstanca dugih ortoromboedarskih prizmatičnih kristala, tačke ključanja $114-116^{\circ}\text{C}$. Atropin sublimuje u visokom vakumu na temperaturama od 93°C do 110°C (Slika 5) i sa kiselinama gradi soli.



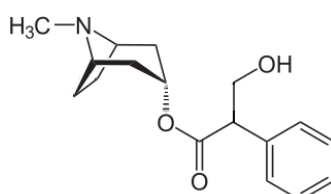
Slika 5. Struktura atropina

Skopolamin je 9-metil-3-oksa-9-azatriciklo[3,2,1,0]non-7-il estar [7(S)-(1 α ,2 β ,4 β ,5 α , 7 β)]- α -(hidroksimetil) benzensirćetne kiseline. Viskozna je tečnost sa optičkom rotacijom $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -28^{\circ}$ i tačkom topljenja 59°C . Rastvoran je u vodi (1 g skopolamina u 9.5 g vode), a takođe je lako je rastvoran u alkoholu, etru, hloroformu i acetonu. U kiseljoj i alkalnoj sredini, skopolamin se lako hidrolizuje i spontano se dekarboksiluje. Javlja se u većini biljaka familije *Solanaceae*, posebno u *Datura metel* L., i *Scopola Carniolica* J., kao i u nečistom izolatu duboiscina iz *Duboisia myoporoides* R. Čist duboiscin je l-hiosciamin. Skopolamin (Slika 6) je jedan od najrasprostranjenijih tropanskih alkaloida visokog stepena oksidacije, nastao iz tropina (dehidrotropina), odnosno hiosciamina koji je intermedijer u biosintezi. Prosta reakcija epoksidovanja dehidrotropina vodi nastajanju skopolamina.



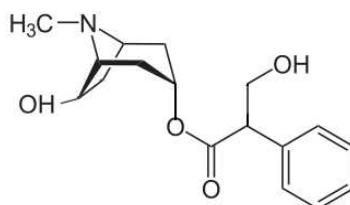
Slika 6. Struktura skopolamina

Homatropin je (*N,N*-dimetil-8-azoniabiciklo[3,2,1]oct-3-il) 2-hidroksi-2-fenilacetat. Homatropin takođe nastaje kao proizvod sinteze biljaka iz familije *Solanaceae*. Stabilan je u rastvorima a prosečno 0.38% homatropina (kod $pK_a=9.88$) se nalazi u nejonizovanom obliku. Takođe se može i veštački sintetizovati pri čemu se koristi kao lek u inhibiciji acetilholnih receptora, delujući parasimpatetički na nervni sistem (Slika 7).



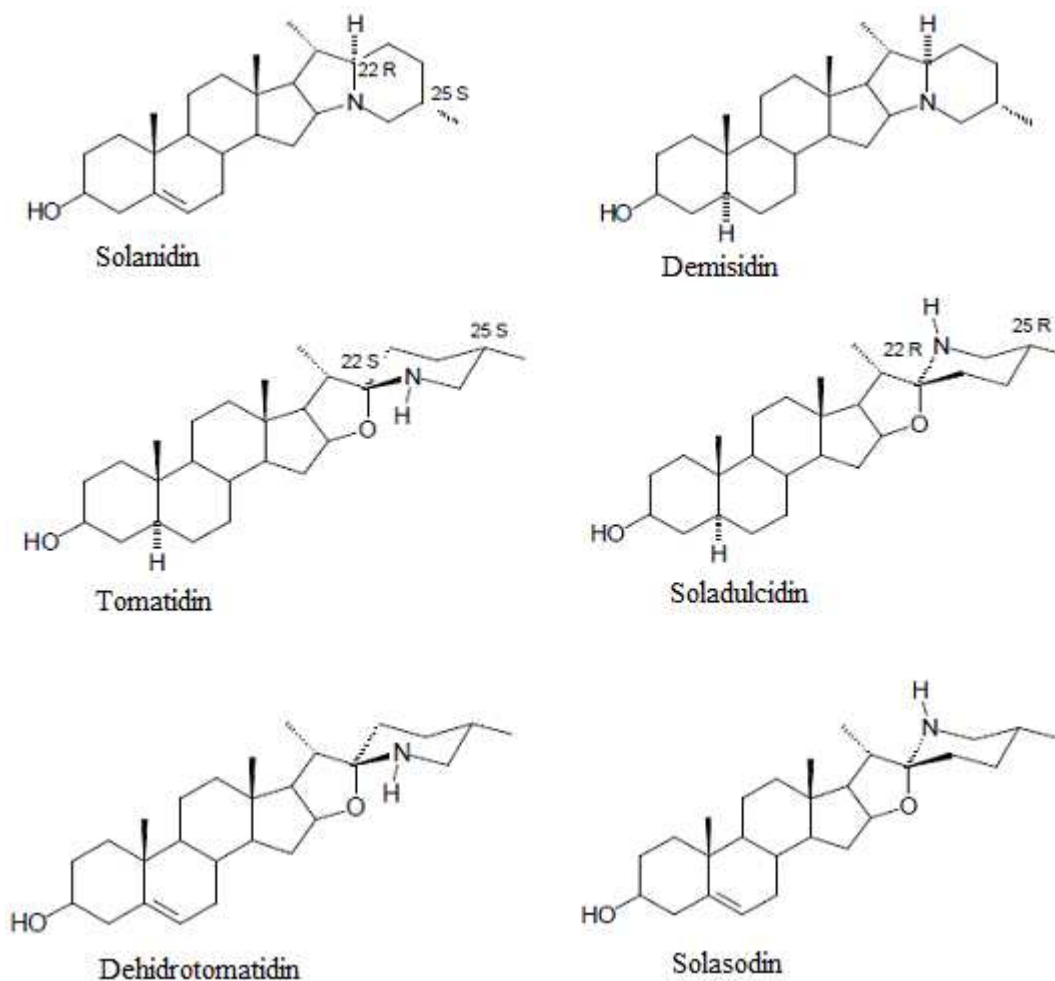
Slika 7. Struktura homatropina

Anisodamin je [(1*S*,3*S*,5*S*,7*S*)-7-Hidroksi-8-metil-8-azabicyklo[3,2,1]oktan-3-il] (2*S*)-3-hidroksi-2-fenil-propanoat (6 β -hidroksihiosciamin), nastaje kao intermedijer između hiosciamina i skopolamina (Slika 8). Prvi put je izdvojen iz *Hyoscyamuse niger* L. a detektovan je i u nekim biljkama koje sadrže skopolamin. Antagonistički deluje na centralni nervni ali je manje toksičan od atropiana i skopolamina. U Kini je korišćen kao lek za poboljšanje mikrocirkulacije, posebno u toku septičkog šoka (Norby i Ren, 2002).



Slika 8. Struktura anisodamina

Steroidni glikoalkaloidi su uglavnom pronađeni u familiji *Solanaceae* i zbog toga su i dobili naziv *Solanum* glikoalkaloidi. Pored familije *Solanaceae*, glikoalkaloidi su takođe otkriveni i u familiji *Liliaceae*, ali u tom slučaju se nazivaju *Veratrum* alkaloidi. Najveća koncentracija glikoalkaloida je pronađena u krompiru, ali pored krompira postoje i druge biljke koje sadrže glikoalkaloide kao što su paradajz (*Lycopersicon esculentum*) i patlidžan (*Solanum melongena* L.).

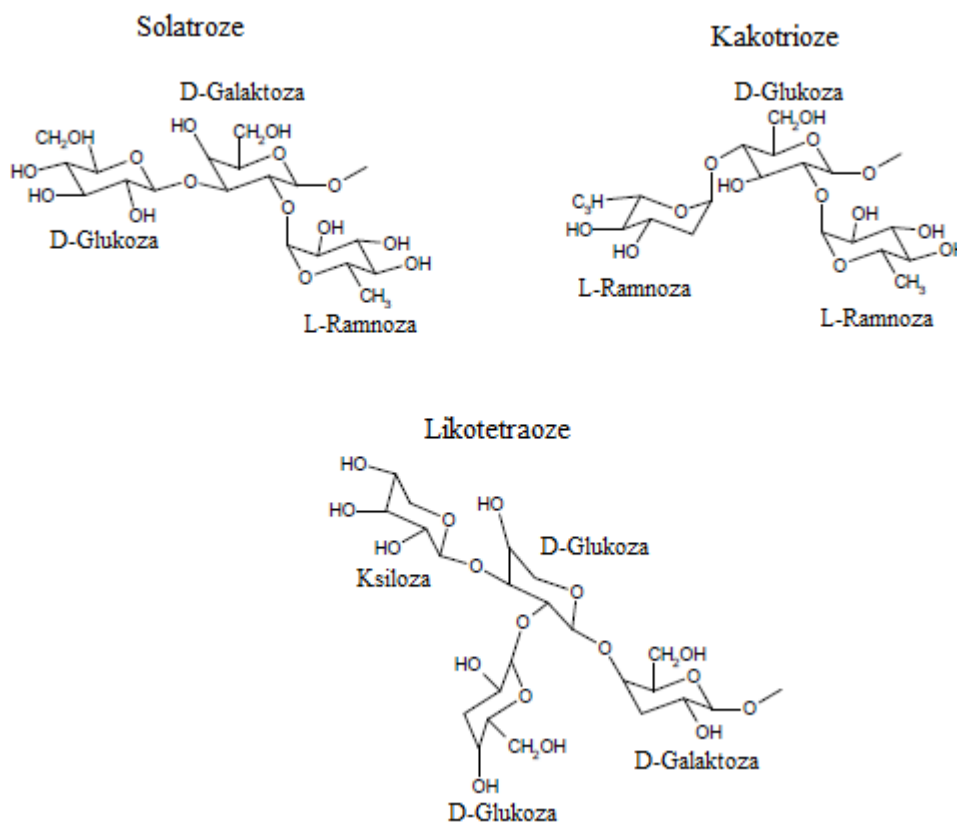


Slika 9. Strukture aglikona najznačajnijih glikoalkaloida pronađenih u *Solanum* vrstama (Friedman i McDonald 1997)

Veća pažnja istraživanju glikoalkaloida je posvećena posle otkrića solanina 1820 godine. Kasnije je dokazano da je solanin smeša od dva glikoalkaloida: solanina i kakonina, koji se nalaze u obliku glikozida (Kuhn i sar. 1955a, b). Glikoalkaloidi pripadaju grupi pseudoalkaloida ili izoprenoidnih alkaloida zbog toga što je atom azota ugrađen u ne-amino kiselinski ostatak (Goodwin i Mercer 1988). Postoje i druge klasifikacije po kojima su glikoalkaloidi svrstani u grupu steroidnih saponina (Mahato i sar., 1982) i steroida (Heftmann 1983). Glikoalkaloidi krompira su glikozidi, koji se sastoje od dve strukturne komponente: hidrofobnog C27-ugljenikovog skeleta aglikona i hidrofилnog ugljenohidratnog lanca. Aglikoni sadrže amino i alkoholnu funkcionalnu grupu što upućuje da su oni alkamini (amino-alkoholi). Na osnovu strukture, aglikoni su podeljeni u pet različitih grupa: solanidini (npr. solanidin), spirosolani (tomatidin), epiminoholestani (solakongestidin), alkaloidi sa solanokapsinskim skeletom (solanokapsin) i 3-aminospirostani (jurubidin) (Schreiber 1968; Ripperger i Schreiber, 1981). Najmanje 90 strukturno različitih steroidnih alkaloida je

pronađeno u preko 350 *Solanum* vrsta (Friedman i McDonald, 1997). Najznačajniji aglikoni pronađeni u *Solanum* vrstama su: solanidin, demisidin, i solasodin, tomatidenol i tomatidin (Slika 9).

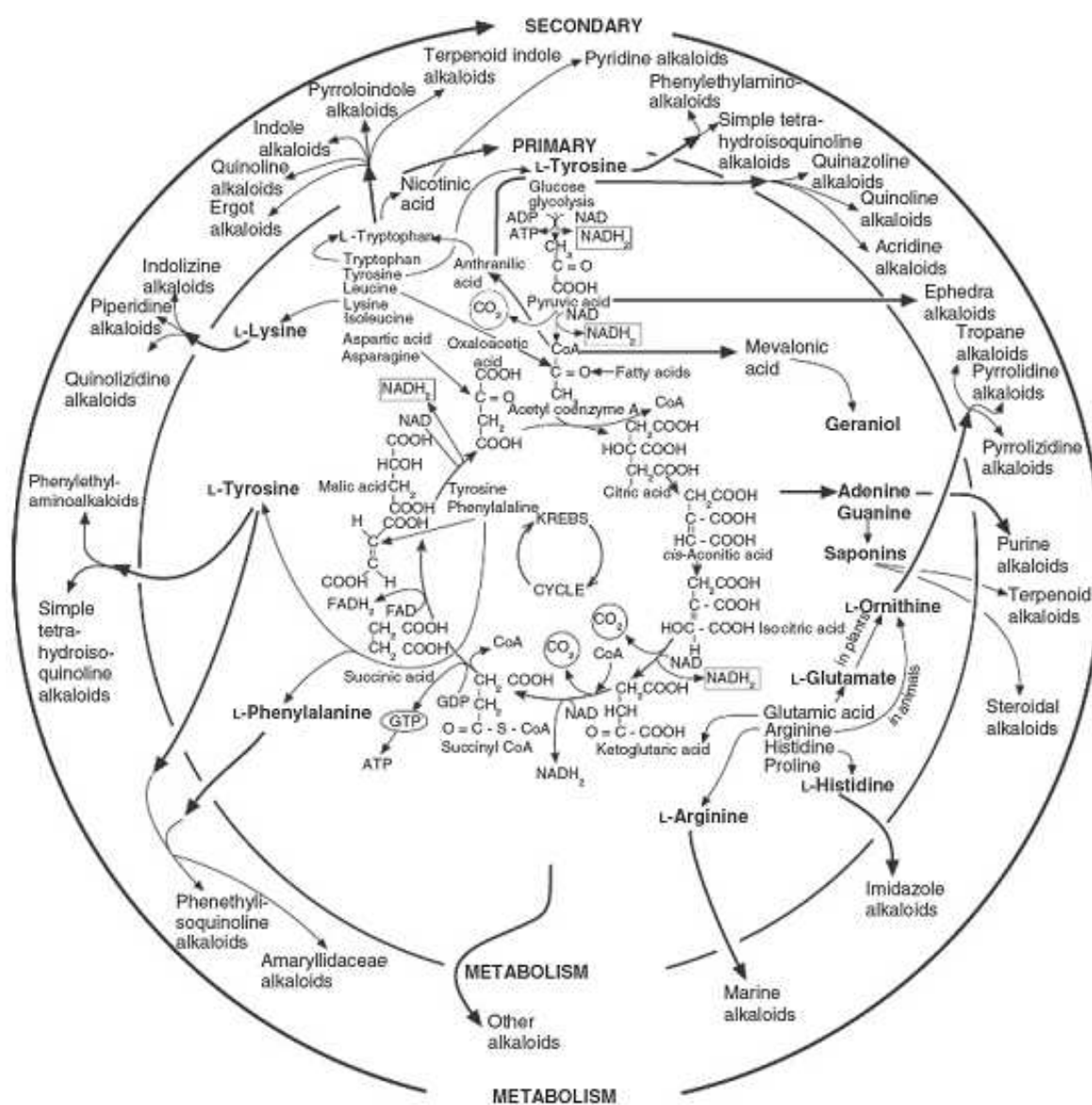
U prirodi su steroidni alkaloidi uglavnom prisutni u obliku α -glikozida. Ugljenohidratni dio glikoalkaloida je povezan sa 3-hidroksi grupom prvog prstena aglikona. β , γ i δ glikozidi (mono-, di- i trisaharidi) su takođe pronađeni ali su oni uglavnom proizvodi hidrolize α -glikozida. Ugljenohidratne komponente glikoalkaloida su uglavnom tri- i tetrasaharidi. Najznačajniji ugljeno-hidratni šećeri su: D-glukoze, D-galaktoze, D-ksiloze i L-ramnoze. β -solatrioze predstavljaju ugljenohidratni deo α -solanina i sastoje se od: D-glukoze, D-galaktoze i L-ramnoze. α -kakonin sadrži glikozidno vezanu β -kaktiozu, dok šećerni deo tomatidina i demisidina je β -likotetraoza (Slika 10). Ugljenohidratni lanci solatrioze i likotetraoze su pripojeni kroz hidroksilnu grupu prvog ugljenikovog atoma β -D-galaktoze, a kaktioze kroz hidroksilnu grupu prvog ugljenikovog atoma β -D-glukoze.



Slika 10. Strukture tri najčešća ugljenohidratna lanca glikoalkaloida *Solanum* vrsta

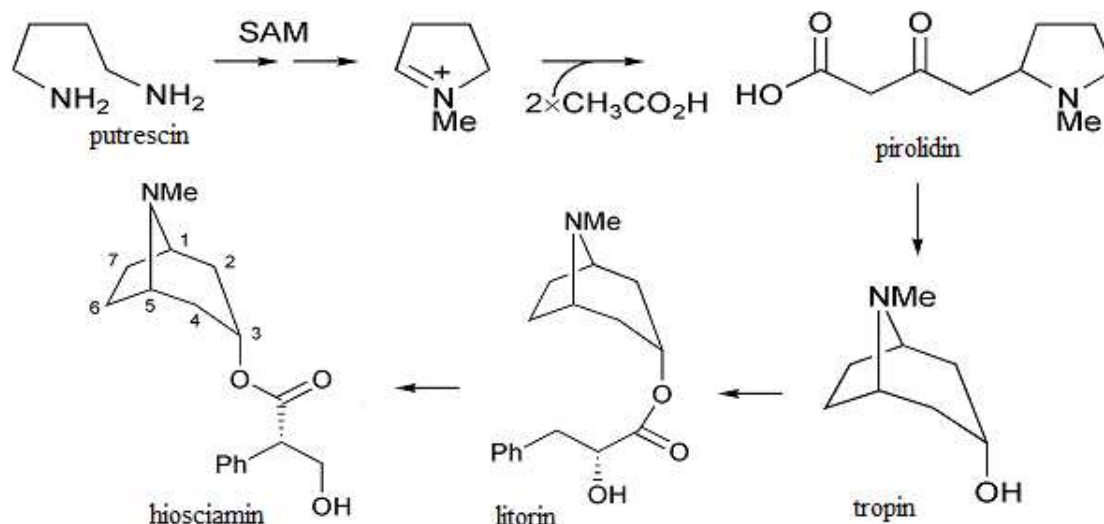
2.1.2. Biosinteza tropanskih i glikoalkaloida

Alkaloidi predstavljaju sekundarne metabolite biljaka i važni su kao njihov odbrambeni mehanizam od insekata. Biosintetski put alkaloida je predstavljen na Slici 11. Smatra se da biosinteza tropanskih alkaloida započinje iz α -aminokiseline, ornitina. Leete (1962) i Nelson (1969) su utvrdili da se [2- ^{14}C]ornitin ugrađuje u različite alkaloide, npr. hiosciamin, kao i njegov derivat nastao dekarboksilovanjem, putrescin. Kod putrescina se obeleženi ^{14}C -atomi nalaze u položajima C_1 i C_4 , odnosno u premošćenim ugljenikovim atomima (Slika 12).



Slika 11. Biosintetski put alkaloida

Tropanski alkaloidi se obično javljaju esterifikovani tropinskom ili tiglinskom kiselinom, kao kod hiosciamina, odnosno meteloidina. Istraživanja biosinteze tropinske kiseline su pokazala da ona nastaje iz fenilalanina, a potvrđena su ispitivanjima sa ^{14}C -fenilalaninom (Beresford i Woolley, 1974). Biosinteza tiglinske kiseline je posledica transformacije izoleucina (Basey i Wooley, 1973).



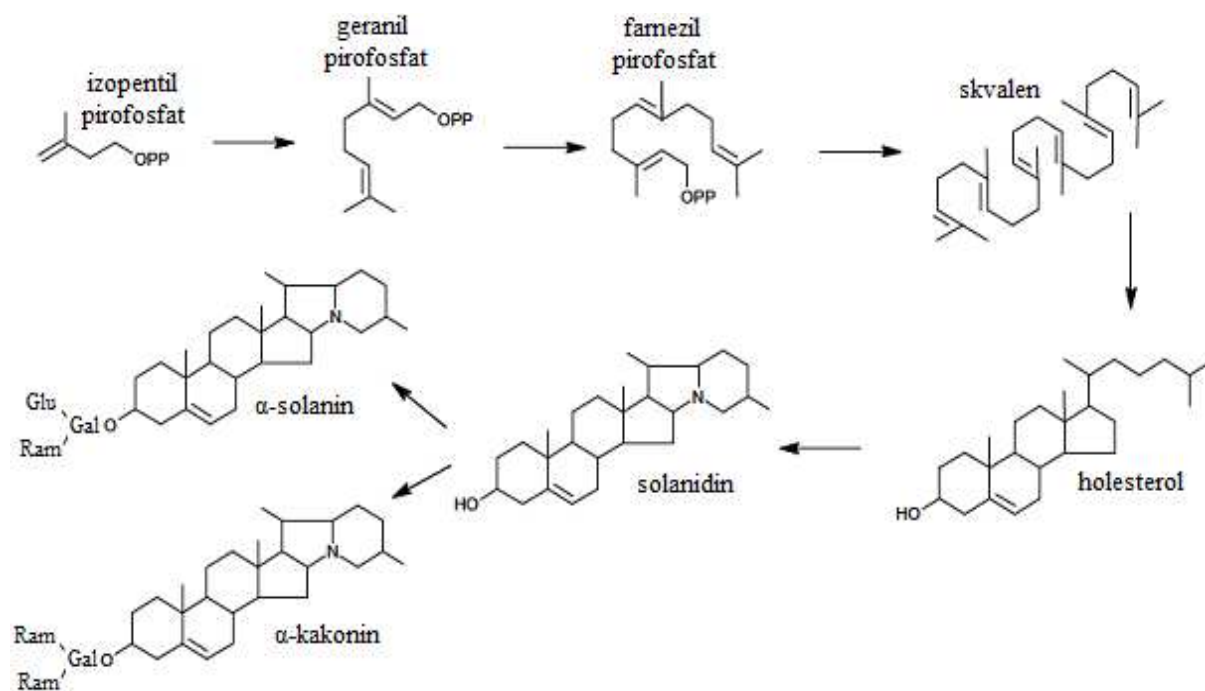
Slika 12. Biosinteza tropanskih alkaloida iz putrescina (Herbert, 2003)

Iako su istraživanja vezana za biosintezu glikoalkaloida brojna, biosintetski put od holesterola do glikoalkaloida još nije potpuno objašnjen. U biljkama biosinteza glikoalkaloida započinje u toku klijanja (Heftmann 1983). Na osnovu studija izvedenih sa paradajzom predpostavlja se da su mikrozomalne organele ćelije mesta biosinteze glikoalkaloida (Roddick 1976). Druga mesta u ćeliji, kao što su plastidi su takođe predloženi (Bergenstråle i sar., 1992). Nakon sinteze glikoalkaloidi prelaze u citoplazmu i/ili vakuolu (Roddick 1976, 1977). Za glikoalkaloide je karakteristično da se ne transportuju iz jednog dela biljke u drugi (Roddick 1982; Heftmann 1983), oni ostaju na mestu sinteze.

Početna tačka sinteze glikoalkaloida se smatra da je ista kao i kod svih drugih steroidnih biosinteza. Biosinteza započinje reakcijom između acetata i acetil koenzima A, i nastavlja se kroz intermedijerne produkte mevalonske kiseline, skvalena, lanosterola i cikloartenola do holesterola. Nedavno je utvrđeno da holesterol djeluje kao prekursor u sintezi glikoalkaloida (Arnqvist i sar. 2003). Postoje dva moguća puta sinteze glikoalkaloida iz holesterola.

Petersen i sar. (1993) smatraju da se solasodin i soladulcidin formiraju iz holesterola, dok tomatidenol, tomatidin, solanidin i demisidin nastaju iz zasićenog holesterola. Tomatidenol i solanidin imaju sličan biosintetski put, što se ne bi moglo očekivati na osnovu njihove hemijske strukture. Za razliku od njih, solasodin i tomatidin, koji su jako slične hemijske strukture, su biosintetski različiti. Smatra se da aglikoni sa dvostrukim vezama nastaju prvi, a zatim zasićeni aglikoni.

Nešto drugačiji biosintetski put glikoalkaloida je opisan od strane Kaneko i sar. (1972, 1976, 1977 a, b, 1978) posle proučavanja *Veratrum grandiflorum*. Oni su prikazali biosintetske faze formiranja solanidina (Slika 13) i smatraju da najverovatnije l-arginin predstavlja izvor azota za solanidin. S druge strane Jadhav i sar. (1973) smatraju da su glicin i alanin donori sinteze azota.



Slika 13. Pretpostavljeni biosintetski put solanidina, odnosno α -solanina i α -kakonina
(Kaneko i sar., 1976)

Sledeći korak u biosintezi, posle formiranja aglikona, je glikozilacija u toku koje se aglikoni jako brzo enzimatski glikoziraju do α -forme glikoalkaloida (Jadhav i sar., 1973; Osman i sar., 1980). Zbog ovako brze reakcije aglikona sa šećerima slobodni oblik aglikona se ne može naći u krompiru.

2.1.3. Toksičnost tropanskih i glikoalkaloida

Nezavisno kojoj hemijskoj grupi pripadaju, neke osnovne karakteristike toksičnog delovanja alkaloida se mogu definisati kao:

- Nastalo patološko stanje nije infektivno,
- Do trovanja alkaloidima dolazi slučajnom konzumacijom kontaminirane hrane ili biljaka koje sadrže alkaloidne, ali i svesnim unošenjem izolovanih alkaloida u vidu narkotika, odnosno zloupotrebom toksičnih biljaka,
- Alkaloidi mogu ispoljiti svoje delovanje na zdravlje akutno i hronično, što zavisi od doze i dužine izlaganja.

Kod hroničnog trovanja alkaloidima, zavisno od vrste alkaloida i njihovih ciljnih tkiva i organa, toksična delovanja mogu biti različita. Osnovna akutna toksična dejstva alkaloida uključuju blokiranje adrenergičnih nervnih impulsa, halucinogeno dejstvo, stimulatívno delovanje na centralni nervni sistem i zastoj rada srca. Pri prolongiranom unosu može doći do moždanog krvarenja i izazivanja depresije, impotencije, anorgazmije, itd.

Toksičnost tropanskih i glikoalkaloida je uglavnom proučavana posmatranjem dva mehanizma dejstva. Prvi je njihova sposobnost da ometaju provođenje nervnih impulsa, odnosno inhibicija holinesteraze. Kod izrazitog inhibitornog dejstva na holinesterazu, kao što je slučaj kod tropanskih alkaloida, bivaju pogođeni i nervi koji kontrolišu pokretanje mišića što dovodi do nekontrolisanog grčenja i opuštanja mišića, a u težim slučajevim i do paralize. Glikoalkaloidi takođe blokiraju aktivnost holinesteraze ali blokada nije dovoljno jaka da izazove nekontrolisano grčenje i opuštanje mišića. Solanine i kakonine poseduju približno inhibitorno dejstvo na holinesteraze (acetil- i butilholinesteraze) (Rodnick, 1989). Drugi simptomi hronične toksičnosti solanum alkaloida uključuje oštećenje zglobova zbog inflamacije i izmene mineralnog sastava kostiju pošto pri prolongiranom unosu alkaloidi izazivaju gubitak kalcijuma iz kostiju. Zbog toga naučnici preporučuju eliminaciju hrane (posebno one koja potencijalno sadrži visoke koncentracije glikoalkaloide) ljudima koji boluju od osteoartritisa, reumatidnog artritisa ili sličnih bolesti kao što je kostobolja. Glikoalkaloidi takođe mogu da uzrokuju razaranje ćelijske membrane. Do razaranja dolazi usled formiranja kompleksa u ćelijskoj membrani između aglikonskog dela glikoalkaloida i sterola (Friedman, 2006). Ovo uzrokuje strukturnu promenu ćelijske membrane, njeno oštećenje i gubitak ćelijskog sadržaja. Kakonin ima jače delovanje na razaranje ćelijske membrane od solanina, jer stvara stabilnije komplekse sa holesterolima i fitosterolima (Rodnick, 1979).

Trovanje sa datura biljkama izaziva efekte zamagljenje vida, sprečavanje lučenje pljuvačke, vazodilataciju, hiperpireksiju, priviđenje i delirijum, kao i kompletnu nesposobnost razlikovanja realnosti i fantazije. Hipertermija, tahikardija, amnezija, fotofobija, nastrano i nasilno ponašanje, glavobolje, povraćanje, proliv, su neke od posledica trovanja solanum alkaloidima koje mogu trajati i do nekoliko dana (Švarc-Gajić, 2011; CDC, 2010; Freye 2009; van Gelder, 1991; Friedman and McDonald, 1997, 1999).

Predloženi sigurnosni sadržaj glikoalkaloida u krompiru je 200 mg/kg (sirova odvaga) (1000 mg/kg, suha odvaga) (FAO/WHO, 1999). Sadržaj glikoalkaloida ispod ove granice se ne smatra opasnim po ljudsko zdravlje. Akutna toksičnost glikoalkaloida za ljude varira između 2-5 mg/kg, a letalna doza iznosi 3-6 mg/kg (Morris i Lee, 1984), međutim može biti i dosta niža (1-2 mg/kg) (Friedman i McDonald, 1997).

2.2. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija (MS) predstavlja jedan od moćnijih i pouzdanijih načina identifikacije komponenata na osnovu njihove mase i naelektrisanja. Osnovni cilj u masenoj spektrometriji je dobijanje specifične informacije o strukturi ispitivanog molekula, koja omogućava njegovu identifikaciju uz prihvatljiv nivo osetljivosti. Princip tehnike se sastoji u jonizaciji supstanci da bi se proizveli joni ili naelektrisani molekulski fragmenti. Nastali joni se dalje razdvajaju na osnovu odnosa mase i naelektrisanja (m/z) pri čemu se meri intenzitet svakog od njih. Na osnovu tipične fragmentacije molekula, veličine fragmenata i njihovog odnosa utvrđuje se tačna hemijska struktura analiziranog jedinjenja. Signal razdvojenih, detektovanih jona sa njihovim relativnim intenzitetima (abundancom) se prikazuje u obliku masenog, odnosno m/z spektra.

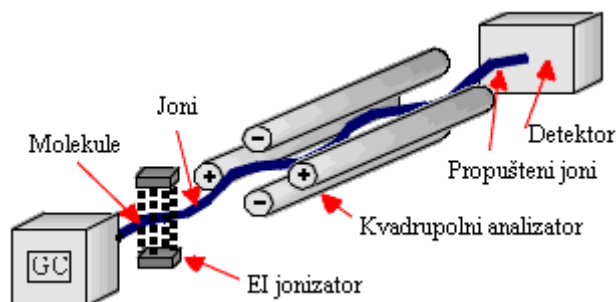
Osnovni delovi masenog spektrometra su: jonizator, analizator i detektor. Prvi korak pri analizi molekula masenom spektrometrijom je jonizacija molekula. Nastali joni se provode kroz maseni analizator, koji razdvaja jone u prostoru i/ili vremenu na osnovu odnosa njihove mase i naelektrisanja (m/z), tako da maseni analizator predstavlja najznačajniji deo masenog spektrometra. Iz analizatora joni se dalje usmeravaju ka detektoru gde proizvode električni signal, koji se može registrovati na osciloskopu, pisaču, računaru ili na nekom drugom uređaju.

Obrazovanje jona u velikoj meri zavisi od jonskog izvora koji treba da omogući nastajanje što većeg broja jona iz neutralnih čestica kako bi se povećala osetljivost, odnosno smanjila potrebna količina injektovanog uzorka. Radi što pouzdanije analize nastali joni

moraju imati što uniformniju energiju, jonska struja mora biti stabilna i fon (joni i čestice koji ne potiču iz uzorka) jonskog izvora moraju biti što manji (Marsel, 1977).

Postoji velik broj jonizacionih tehnika, a često korišćene su: jonizacija elektronima (Electron Impact, EI), hemijska jonizacija (Chemical Ionization, CI), jonizacija u električnom polju (Field Ionization, FI), jonizacija desorpcijom (Field Desorption, FD), jonizacija varnicom (Spark Source, SS), bombardovanje brzim atomima (Fast Atom Bombardment, FAB) i jonizacija potpomognuta laserskom desorpcijom iz matriksa (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI). Izbor tehnike jonizacije pre svega zavisi od cilja analize, kao i od vrste uzorka.

U ovom radu je korišćena jonizacija elektronima kod GC-MS tehnike. Jonski izvor za jonizaciju elektronima (Slika 14) se sastoji iz evakuisane komore na čijoj se jednoj strani nalazi filament – usijano vlakno od volframa ili renijuma (katoda), a na suprotnoj, pozitivno naelektrisana ploča (anoda). Usijana katoda emituje elektrone koje privlači anoda pri čemu je energija elektrona određena razlikom potencijala između elektroda. Koristi se visoka energija elektrona (70 eV) usled čega nastaje veoma velik broj jona ispitivanog uzorka. Molekulski jon nastaje izbijanjem samo jednog elektrona iz molekula tako da njegov m/z odnos ukazuje direktno na molekulsku masu supstance. Kod ovog vida jonizacije molekularni jon je obično slabog intenziteta i teško se uočava, ali zato prisustvo velikog broja ostalih jona omogućava utvrđivanje strukture molekula. Obrazovani joni se potiskuju iz jonskog izvora ka masenom analizatoru, gde nailaze na uzani razrez i usled razlika potencijala od 2000–10000 V (između jonske komore i razreza) ubrzano ulaze u maseni analizator.

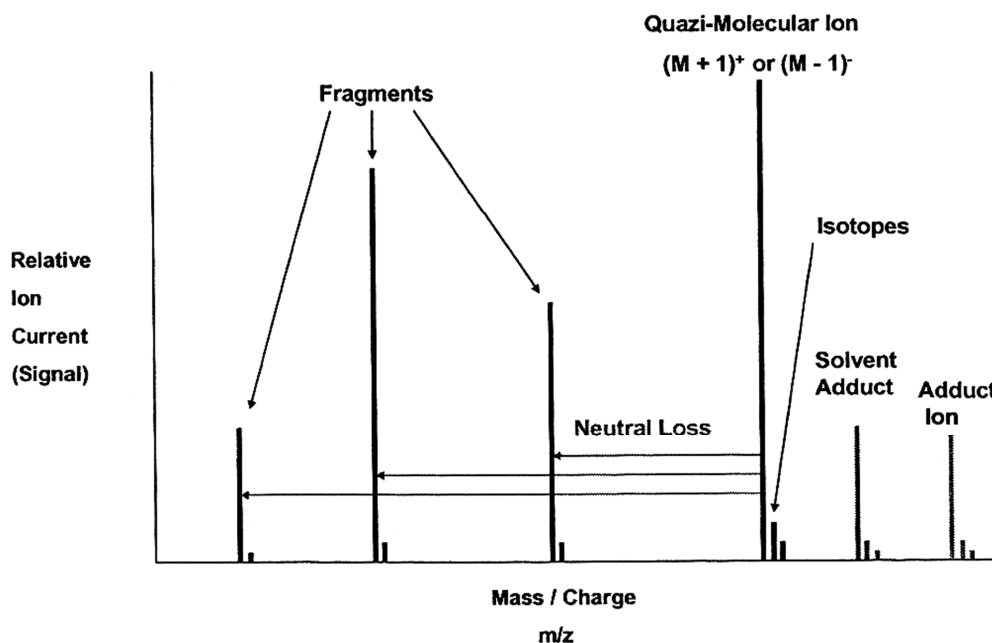


Slika 14. Šematski prikaz EI jonizatora i kvadropolnog analizatora

Prilikom korišćenja HPLC sa MS, uslovi jonizacije su složeni zbog prisustva mobilne faze, koja je i sama najčešće jonizovana. Zbog toga se primenjuju različiti načini jonizacije da se njen uticaj svede na minimum, a da se pri tom ne izgube osnovne karakteristike određivanog jedinjenja. Kod masene spektrometrije u kombinaciji sa HPLC, može se definisati pet načina jonizacije: jonizacija pod atmosferskim pritiskom (Atmospheric Pressure

Ionization, API), elektron sprej jonizacija (Electron Spray Ionization, ESI), hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI), hemijska jonizacija sa elektron sprejom (Elektron Spray Chemical Ionization, ESCI) i fotojonizacija pod atmosferskim pritiskom (Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI).

Elektron sprej jonizacije se zasniva na provođenju eluata kroz kapilaru koja se nalazi na visokom potencijalu od 3-4 kV. Prolaskom kroz naelektrisanu kapilaru formiraju se naelektrisane kapljice eluata. Desolvatacija nastalih kapljica se potpomaže uvođenjem inertnog gasa, najčešće azota. U momentu kada kulonove sile između naelektrisanih kapljica nadvladaju adhezione sile u kapljici eluata dolazi do tzv. kulonove eksplozije čime se kapljice raspadaju na još manje. Proces se nastavlja sve dok ne zaostanu individualni joni. Kako se kapilara visokog napona može naelektrirati pozitivno i negativno, tako se može favorizovati pozitivna i negativna jonizacija. Kod ESI jonizacije dolazi do formiranja $(M^{+H})^{+}$ ili $(M^{-H})^{-}$ jona. Bazne supstance (npr. amini) mogu formirati protonizovane molekule $(M^{+H})^{+}$ koji se mogu analizirati u pozitivnom jonskom modu, dajući pik na masi $(M^{+H})^{+}$. Kisele supstance (npr. sulfonske kiseline) mogu formirati deprotonizovane molekule $(M^{-H})^{-}$ koji se mogu detektovati u negativnom jonskom modu dajući pik na masi $(M^{-H})^{-}$ (introduction to LC/MS, Waters Corp. 2002).



Slika 15. Nastanak masenih spektara pri ESI i API jonizaciji
(Introduction to Waters Corp., 2002)

Kada je reč o kombinaciji MS sa GC i HPLC, najčešće korišćeni maseni analizatori su: kvadrupolni analizator (jednostruki ili višestruki), analizator sa magnetnim sektorom,

jonska zamka analizator (Ion Trap, IT) i analizator na bazi vremena preleta (Time Of Flight, TOF).

Kvadrupolni analizator (korišćen u ovom radu u kombinaciji sa GC) spada u analizatore niske rezolucije. Sastoji se od četiri štapne elektrode kojima se istovremeno saopštavaju električni i radiofrekventni impulsi. Radiofrekventni impulsi koji se dovode na par suprotno postavljenih elektroda su smaknuti u fazi za 180° . Pod dejstvom radiofrekventnog potencijala joni određenog odnosa m/z bivaju naizmenično fokusirani u različitim ravnima. U prvoj polovini radiofrekventnog ciklusa gornja i donja elektroda su na pozitivnom potencijalu, dok su leva i desna na negativnom potencijalu, usled čega joni bivaju potisnuti u horizontalnu ravan. U drugoj polovini ciklusa polarnost elektroda je obrnuta, što menja električno polje i fokusira jone u vertikalnoj ravni. Usled ovakvog dejstva kvadrupolnog polja dolazi do složenog kretanja jona, odnosno nastaje trodimenzionalni talas. Amplituda trodimenzionalnog talasa zavisi od odnosa m/z datog jona, primenjenog potencijala i frekvencije naizmeničnog potencijala, te kvadrupolno polje propušta samo određene jone. Snimanje masenog spektra se izvodi promenom jednosmerne i naizmenične komponente napona, pri čemu je njihov odnos konstantan (Silverstein i Webster, 1997).

Maseni spektrometri koji se sastoje od više kvadrupolnih analizatora (quadropole - quadrupole) se nazivaju tandem maseni spektrometri (MS-MS). Tehnika maseno-masene spektrometrije se može primenjivati u različite svrhe a najčešće od njih su: analiza jona-produkata, analiza prekursor jona, praćenje neutralnog gubitka i izvođenje SRM (Selected Reaction Monitoring) tehnike. Kod maseno-masene spektrometrije jona-produkta, koja je primenjena u ovom radu, u poslednjem masenom analizatoru se razdvajaju joni koji su nastali od tačno određenog jona primarne jonizacije. Taj jon se naziva prekursor jon te se samo on dalje uvodi u kolizionu ćeliju i prati se njegov maseni spektar analizom produkata jona. U ovom radu, MS-MS je korišćen sa u kombinaciji sa HPLC. Kvadrupolni analizatori su razdvojeni pomoću kolizione ćelije koja takođe može biti jedan kvadrupolni segment u koju se uvodi inertni gas (argon, ksenon) i vrši fragmentacija prekursor jona odredivanog analita (obično $(M+H)^+$ ili $(M-H)^-$). Identifikacija nastalih fragmentiranih jona se vrši na osnovu odnosa njihovih masa i naelektrisanja (m/z) pomoću drugog analizatora.

Analizator sa magnetnim sektorom se sastoji od magneta, između čijih polova prolaze joni. Na ulasku i izlasku iz magnetskog sektora nalaze se dve pukotine koje ograničavaju snop jona koji ulaze, odnosno onih koji izlaze iz sektora kako bi se smetnje na detektoru minimizirale. Magnetno polje deluje na naboj u kretanju Lorenzovom silom. Zbog te sile,

putanje jona u magnetnom polju su zakrivljene, i samo određeni joni mogu proći kroz izlaznu pukotinu i biti detektovani. Pretraživanje po masama se provodi promenom jačine magnetnog polja zbog uticaja na radijuse zakrivljenosti jona u magnetnom polju. Razdvajanje jona po odnosu njihovih masa i naelektrisanja je sporo, ali se odlikuje vrlo dobrim razdvajanjem.

Jonska zamka se sastoji od prstenaste elektrode i dve disk elektrode smeštene ispod i iznad nje. Elektrodama se saopštavaju radiofrekventni i električni signali. Jon koji uđe u zamku oscilira u zamci kompleksnim putanjama, koje se kontrolišu elektrodama s istosmernim naponom. Ova metoda je brza ali se odlikuje slabim razdvajanjem jona. Pored klasične masene spektrometrije maseni analizatori sa jonskom zamkom omogućavaju i izvođenje maseno-masene spektrometrije. U ovom slučaju se i fragmentacija i razdvajanje jona odvijaju u istom delu instrumenta, a proces se postiže promenom uslova rada. Prilagođavanjem načina rada svi joni osim jona-prekursora mogu biti izbačeni iz prostora elektroda. Po njegovoj fragmentaciji joni se uvode u maseni analizator. Na sličan način se može postići i dalje praćenje sudbine jona, omogućavajući MS^n spektrometriju.

TOF analizator ubrzava jone iz jonizatora pomoću homogenog električnog polja. Ukoliko se svim jonima saopšti ista kinetička energija, njihova brzina će biti obrnuto-proporcionalna kvadratnom korenu mase. Vreme potrebno da joni različite mase dospeju do detektora čini osnovu razdvajanja jona u TOF-u. Lakši joni se jače ubrzavaju i prvi dolaze do detektora. TOF metoda je brza, ali je razdvajanje slabije od onog u električnom ili magnetnom sektoru.

Nakon razdvajanja jonskih vrsta u masenom analizatoru, njihovo prisustvo je potrebno detektovati, a količinu izmeriti. Detekcija se najčešće izvodi električnim putem, merenjem ukupne jonske struje (abundance). Dva najčešće korišćena detektora su: elektronmultiplikator (electron multiplier) i fotomultiplikator (photomultiplier conversion dynode). Princip rada elektronmultiplikatora zasniva se na upotrebi više uzastopnih „Faradejevih kapa“, dinoda (8–20) sa rastućim potencijalom. Jonski zrak iz masenog analizatora (sa energijom 4000–8000 eV) pada na elektrodu („Faradejeva kapa“) multiplikatora i izbija elektrone (obično 1–2 elektrona po jonu). Oni se ubrzavaju prema sledećoj „Faradejevoj kapi“ koja je na višem pozitivnom potencijalu u odnosu na prethodnu, usled čega dolazi do emisije još većeg broja elektrona, i tako redom.

Pri radu sa kvadrupolnim masenim spektrometrom postoje dva načina prikupljanja podataka tokom hromatografske analize:

1. SCAN – snimanje kompletnog masenog spektra i
2. SIM (Selected Ion Monitoring) – snimanje određenih jona.

SCAN tehnika podrazumeva snimanje kompletnog masenog spektra, odnosno praćenje masa u određenom opsegu uz simultano praćenje retencionog vremena što omogućuje identifikaciju analita na osnovu masenog spektra i retencionog vremena. Ova tehnika se prvenstveno koristi za kvalitativnu analizu. Ukupne abundance sabrane tokom analize, prikazane u funkciji vremena predstavljaju totalni jonski hromatogram (TIC), koji sadrži podatke o kvalitetu (retenciono vremena) i podatke o kvantitetu (površina zahvaćena pikom).

Kod SIM tehnike se detektuju samo m/z vrednosti jona reprezentativnih za određeni molekul, tako da se povećava vreme praćenja određenog jona, a samim tim i osetljivost za 100 do 1000 puta. Tako da se SIM tehnika prvenstveno koristi za kvantitativna određivanja i to komponenata u tragovima. U toku razvoja SIM metode neophodno je optimizovati parametre kao što su: karakteristični joni za pojedinačne komponente, vreme početka snimanja jona (start time), vreme praćenja jona (dwell time), itd. Neophodno je poznavati izgled masenog spektra i samog hromatografskog pika za svaku ispitivanu komponentu.

U današnje vreme MS se često koristi u kombinaciji sa GC ili HPLC. Nedostatak GC-MS se ogleda u ograničenju po pitanju upotrebe. Pomoću GC-MS se mogu analizirati samo komponente čiji je napon pare veći od 10^{-10} mbar a maseni spektri izomernih komponenti se ne razlikuju. Problem razdvajanja izomera se prevazilazi upotrebom specifičnih kapilarnih kolona (hiralnih), pomoću kojih se postiže njihovo hromatografsko razdvajanje. Prednost HPLC-MS u odnosu na GC-MS se ogleda u mogućnosti određivanja većeg broja različitih supstanci. Supstance koje su toplotno nestabilne, visoko polarne ili sa visokom molekulskom masom se najčešće određuju pomoću HPLC-MS.

2.3. Hromatografske tehnike spregnute sa masenom spektrometrijom

Može se reći da hromatografske tehnike u kombinaciji sa masenom spektrometrijom predstavljaju jednu od najmoćnijih kombinovanih analitičkih tehnika današnjice, nezamenljivih u analizi kompleksnih smeša. Prvi radovi vezani za primenu GC i HPLC u kombinaciji sa MS su objavljeni pedesetih godina XX veka. Krajem sedamdesetih i početkom osamdesetih godina XX veka usledio je veoma brz porast u upotrebi ovih tehnika u svim oblastima organske analize. U ovom radu su korišćene GC-MS i HPLC-MS/MS, pa su ove tehnike u narednom tekstu i detaljnije objašnjene.

2.3.1. Gasna hromatografija

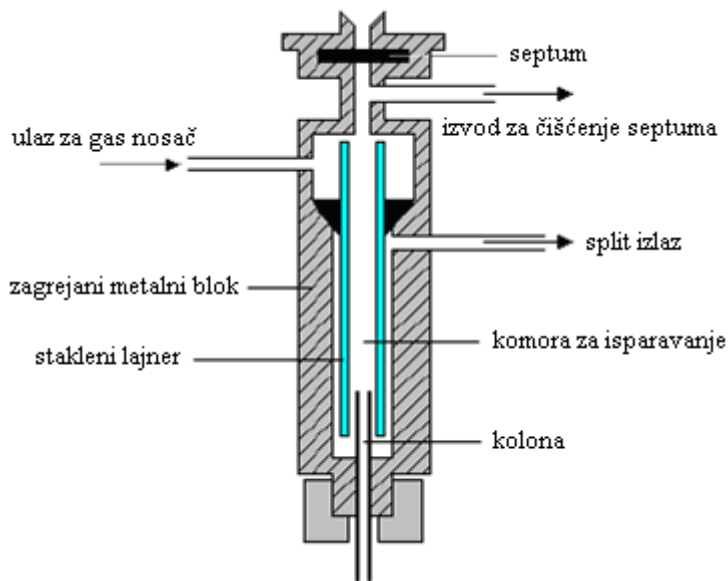
Gasna hromatografija (GC) je hromatografska metoda razdvajanja i detekcije organskih jedinjenja u kojoj se komponente razdvajaju između mobilne gasne faze i čvrste (adsorpciona GC) ili tečne (podeona GC) stacionarne faze. Princip gasno-hromatografske analize je u prolasku uzorka nošenog gasom nosačem kroz kolonu u kojoj se razdvajaju komponente uzorka u zavisnosti od njihovih fizičkih i hemijskih osobina i njihovih mogućih uzajamnih odnosa sa stacionarnom fazom, tj. kolonskim punjenjem. Razdvajanjem komponenata smeše, različitim vremenskim zadržavanjem komponenti u koloni (svaka komponenta ima svoje retenciono vreme) i njihovom detekcijom, vrši se identifikacija pojedinih komponenti. Na kraju kolone je detektor koji električnim putem registruje pojedine komponente uzorka proporcionalno koncentraciji svake u datom uzorku. Brzina prolaska uzorka kroz kolonu se određuje temperaturom kolone u peći i podešavanjem brzine prolaska nosećeg gasa.

Kod ove instrumentalne metode mobilna faza je najčešće inertan gas, argon, helijum ili azot. Pored osnovnih zahteva o čistoći, malom viskozitetu, niskoj ceni i hemijskoj inertnosti prema komponentama koje se razdvajaju, osobine gasa tokom strujanja kroz kolonu i detektor moraju ostati konstantne u najvećoj mogućoj meri (Marjanović, 2001). Protok nosećeg gasa ima značajan uticaj na proces analize. Brži protok omogućava bržu analizu ali smanjuje mogućnost potpunog razdvajanja komponenti smeše usled kraćeg zadržavanje pojedinih komponenti u koloni. Zbog toga, pri razvoju metode određivanja nekog analita, protok nosećeg gasa se optimizuje zajedno sa optimizacijom dužine kolone i temperaturnim režimom.

Injektovanje uzoraka u kapilarnoj gasnoj hromatografiji se može vršiti na više načina: direktno na kolonu (on column), injektovanje uz razdeljivanje (split), injektovanje bez razdeljivanja (splitless), temperaturno programiranim isparavanjem (Programmed Temperature Vaporizing – PTV).

Osnovni princip rada *split*-injektora je uvođenje uzorka mikrošpicem preko septuma u komoru za isparavanje (liner). U lajneru dolazi do momentalnog isparavanja uzorka, nakon čega kroz jedan vod samo mali deo ulazi u kolonu, a ostatak preko drugog voda izlazi u atmosferu. Ovo omogućuje injektovanje uzorka zapremine 0.1–2 μ l, a da pri tom ne dođe do zasićenja kapilarne kolone. Pomoću split moda (Slika 14) mogu se određivati analiti prisutni u

većim koncentracijama. Kod *splitless*-injektora, sav ispareni uzorak iz komore ulazi u kolonu. Ovaj injektor se uglavnom koristi za određivanje analita čije su koncentracije u tragovima.



Slika 16. Šematski prikaz split injektora

Jako je bitno da se uzorak nanese na sam vrh kolone u što užoj zoni od čega zavisi i kvalitet hromatograma, pri čemu neisparljive komponente ne bi smele dospeti u kolonu.

Tradicionalne kolone u gasno hromatografskoj analizi se dele na dve osnovne vrste: punjene i kapilarne. Osnovne karakteristike kolona su: dužina, unutrašnji prečnik, vrsta stacionarne faze, polarnost i debljina filma stacionarne faze. U savremenim gasno-hromatografskim tehnikama stacionarna faza obuhvata čitavu lepezu punjenja od molekulskih sita pa do viskoznihi tečnosti ili mikroskopskih slojeva polimera (Rouessac i Rouessac, 2007). Pakovane kolone su dužine od 1.5 - 10 m i dijametra od 2 - 4 mm. Telo kolone je napravljeno obično od nerđajućeg čelika (*stainless steel*) ili stakla i sadrži inertno punjenje koje je čvrsto ili je presvučeno sa tečnom stacionarnom fazom. Većina kapilarnih kolona su napravljene od stopljene silike sa poliimidom kao oblogom. Uobičajena dužina kapilarnih kolona je 25–60 m, a dijametar: ≤ 0.1 mm, 0.18–0.32 mm i 0.53 mm. Postoji više različitih tipova kapilarnih kolona kod kojih unutrašnji zid može biti prevučen sa: stacionarnom likvidnom fazom (WCOT-Wall Coated Open Tubular), slojem adsorbensa (PLOT -Porous Layer Open Tubular), stacionarnom likvidnom fazom i sprašenim inertnim nosačem (SCOT - Supported Coated Open Tubular) i mikropakovane kapilarne kolone – kod kojih je celokupna unutrašnjost ispunjena inertnim nosačem impregniranim stacionarnom likvidnom fazom. Prednost upotrebe kapilarnih kolona nad punjenim je u povećanoj efikasnosti razdvajanja, nižim radnim temperaturama i kraćem vremenu analize. Izbor kolone, odnosno njenih

karakteristika, zavisi pre svega od vrste i sastava uzorka, kao i od detektora. Unutrašnji prečnik kolone utiče na efikasnost razdvajanja i vreme trajanja analize. U cilju dobijanja što bolje rezolucije, treba koristiti kolone sa manjim unutrašnjim prečnikom i većom dužinom. Injektirane supstance, nakon prolaska kroz kolonu, se registruju pomoću detektora. U gasnoj hromatografiji se koriste više vrsta detektora. Najpoznatiji i najkorišćeniji među njima su plameno jonizacioni detektor (FID), detektor termičke provodljivosti (TCD) i azot-fosforni detektor (NPD). Pomoću ovih detektora je moguće detektovati veliki opseg komponenti u širokom opsegu koncentracije.

2.3.2. Visokopritisna tečna hromatografija

HPLC je kolonska hromatografska tehnika razdvajanja supstanci na osnovu njihove raspodele između stacionarne i mobilne tečne faze. Mobilna faza se propušta kroz kolonu pomoću visokog pritiska i komponente uzorka se postepeno razdvajaju između faza. Razdvajanje komponenti zavisi od njihovog afiniteta prema fazama. Komponente se eluiraju iz kolone pri određenom vremenu, specifičnom za svaku komponentu, i u tom slučaju svaka supstanca se individualno detektuje.

Osnovni delovi tečnog hromatografa uključuju pumpu, injektor, kolonu i detektor, kao i neki registrator za snimanje signala sa detektora. Danas ipak gotovo svi HPLC sistemi pored ovih osnovnih delova imaju i sistem za akviziciju i obradu podataka, što je najčešće personalni računar koji ima ulogu procesnog računara i kojim se reguliše rad kompletne opreme.

U tečnoj hromatografiji razdvajanje komponenta može da se izvede pomoću izokraskog ili postepenog (gradijentnog) razdvajanja. U slučaju izokraskog razdvajanja, sastav mobilne faze se održava konstantnim, dok se kod gradijentnog razdvajanja, sadržaj postepeno menja prema mobilnoj fazi u kojoj su komponente više rastvorljive. Postoji veliki broj različitih stacionarnih faza koje sa analitima intereaguju putem različitih mehanizama. Dominantan tip HPLC razdvajanja danas za većinu nepolarnih organskih jedinjenja je razdvajanje na obrnutim fazama, gdje se nepolarne stacionarne faze koriste u kombinaciji sa polarim mobilnim fazama. Stacionarne faze sadrže nepolarne grupe kao što su: $-C_{18}H_{37}$ (poznate kao C18), $-C_8H_{17}$ (C8), $-CN$, NH_2 . Drugi tipovi HPLC razdvajanja uključuju hromatografiju na normalnim fazama i sa jonskom izmenom (Rubinson i Rubinson, 2000). Efikasnost kolona se obično izražava brojem ekvivalentnih teoretskih platoa (podova), što suštinski predstavlja broj uspostavljenih ravnoteža u koloni. Veći broj teorijskih ekvivalentnih

platoa omogućuje bolju rezoluciju između pikova. Kvalitet kolone se meri stabilnošću i reproduktivnošću retencionih vremena i brojem analiza koje se mogu izvesti do regeneracije, odnosno zamene kolone. Izbor mobilne i stacionarne faze zavisi od tipa uzorka, analita i načina detekcije. HPLC tehnika se najčešće koristi za određivanje neisparljivih jedinjenja. Na razdvajanje komponenti takođe mogu uticati dimenzije kolone, protok kroz kolonu, kao i sastav mobilne faze.

Nakon razdvajanja komponenata u koloni one dospevaju do HPLC detektora, čija je uloga da signal koncentracije, mase ili sadržaja prevede u električni signal koji se kasnije na odgovarajući način registruje. U kombinaciji sa HPLC najčešće su u primeni UV/VIS-detektori (zasnovani na apsorpciji zračenja iz UV i vidljive oblasti elektromagnetnog spektra), detektori na bazi merenja fluorescencije (FLD), indeksa refrakcije, elektrohemijski i ostali. Fluorescentne osobine izvesnih jedinjenja dozvoljavaju njihovo određivanje u malim (pikogramskim) količinama. Pod optimalnim uslovima fluorescencija omogućava oko 30 do 40 puta osetljivije određivanje pomoću FLD nego UV detektora. Ukupna osetljivost je delimično funkcija dizajna detektora i takođe, efikasnosti prečišćavanja uzorka, koja ograničava količinu analita koji može biti detektovan.

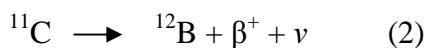
2.4. Tehnike korišćene za praćenje apsorpcije atropina ^{14}C u pšenici

Stabilnost atoma se menja izmenom odnosa neutrona i protona pri čemu nastaju stabilni i nestabilni (radioaktivni) izotopi. Izotopi hemijskog elementa imaju iste hemijske osobine i često se koriste za praćenje sudbine pojedinih supstanci u različitim hemijskim, biološkim i biohemijskim procesima. Praćenje apsorpcije i translokacije alkaloida iz zemljišta u pšenicu je izvođeno korišćenjem radioaktivnog atropina ^{14}C . Za analizu nestabilnog izotopa ugljenika (^{14}C) su korišćeni tečni sciantilacioni brojač (Liquid Scintillation Counter, LSC) i biološki uređaj za oksidaciju, dok je analiza stabilnog izotopa (^{12}C) izvođena pomoću elementalnog analizatora (EA) spojenog sa masenim spektrometrom (Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS).

2.4.1. Tečni sciantilacioni brojač

Radioaktivnost je spontani proces u kojem se atomsko jezgro, emitujući jednu ili više čestica ili kvanata elektromagnetnog zračenja, preobražava u drugačije jezgro. Prvobitno nije bila poznata priroda zračenja nego se zbirno govorilo o radijaciji pa je ova pojava "raspada"

jezgra nazvana radioaktivnost, a jezgra koja emituju čestice ili zračenje - radioaktivna jezgra, radionukleidi ili radioaktivni izotopi (IAEA, 1991). Raspadom početnog jezgra, koje se naziva i jezgro roditelj, nastaje novo jezgro, potomak, koje može da ima redni broj Z i/ili maseni broj A različit od jezgra roditelja. Radioaktivni raspad atoma karakteriše se vrstom i energijom emitovane radijacije i vremenom poluraspada. U prirodi se javljaju alfa raspad, beta⁻-raspad i gama raspad. Pri alfa-raspadu radioaktivna jezgra emituju jezgra helijumovih atoma ${}^4\text{He}^{++}$. Kod beta⁻-raspada, iz jezgra se emituju elektron i antineutrino (1), a kod gama-raspada jezgro zrači elektromagnetne talase (fotone) velike energije. U laboratoriji mogu da se dobiju i jezgra koja se raspadaju emitujući pozitrone i neutrina (beta⁺-raspad) (2):



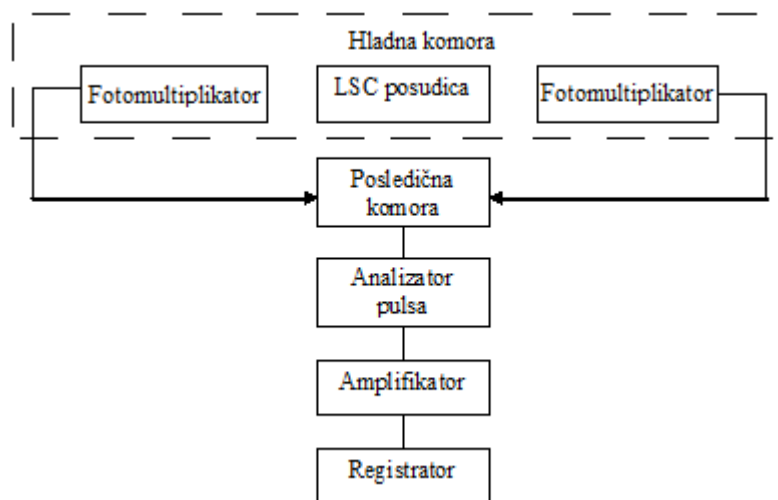
U biohemijskim istraživanjima se često koriste radioaktivne supstance i prati njihovo ponašanje u sistemima. U ovom slučaju se u neradioaktivnu strukturu supstance ugrađuje jedan od radioaktivnih izotopa obeležavajući na taj način supstancu kako bi se mogla pratiti njena sudbina. Prednost radioaktivnih izotopa je da se mogu koristiti jako male količine i lako pratiti njihovo ponašanje u određenom sistemu u poređenju sa stabilnim izotopima istog elementa. Radioaktivni izotopi imaju isto ponašanje kao i njihovi stabilni izotopi a detekcija je mnogo jednostavnija korišćenjem radiohemijskih tehnika. Najčešće se koriste radioaktivni izotopi ${}^{14}\text{C}$, ${}^3\text{H}$, ${}^{35}\text{S}$, čije određivanje se veoma efikasno izvodi pomoću LSC (Slika 17).

Da bi se izmerio intenzitet emitovanog zračenja radioaktivni uzorak sa meša sa scintilacionim koktelom u LSC posudicama, gde dolazi do interakcije između beta čestica i scintilatora (fluora) pri čemu se emituju fotoni. Broj nastalih fotona je direktno proporcionalan energiji beta čestica, odnosno radioaktivnosti uzorka. Nastali fotoni se registruju na fotokatodnom-fotomultiplikator sistemu. LSC posudice sa radioaktivnim uzorkom se smeštaju u odgovarajuće komore okružene fotokatodnim-fotomultiplikator sistemom. Obično se koriste dva fotomultiplikatora za kolekciju zračenja emitovanog iz LSC posudica. Na ovaj način se povećava odnos između registrovanih fotona uzorka i elektronskog šuma. Nakon svakog jonizacionog događaja fotoni se registruju na obe fotokatode. Elektromagnetno zračenje registrovano na katodi se pretvara u električni impuls gde je visina signala direktno proporcionalna broju apsorbovanih fotona. Signal koji potiče od elektronskog šuma se kompenzuje u elektronskoj posledičnoj komori tzv. „coincidence unit“, pri čemu se povećava osetljivost sistema. Signali koji potiču od elektronskog šuma jednog

fotomultiplikatora su u posledičnoj reakciji sa signalima drugog fotomultiplikatora i poništavaju se. Registruju se samo signali koji dolaze sa obe fotokatode uzastopno (u praksi sa jako kratkim vremenskim intervalom od 1 μ s) a eliminišu se sva pulsiranja koja potiču od samo jedne katode.

Generisani električni signal se analizira u analizatoru, pojačava, kvantifikuje i računarski registruje. LSC instrumenti mogu biti spojeni sa dva ili tri analizatora ili danas sve više u upotrebi su višekanalni analizatori. Rezultat se obično prikazuje broјčano u dpm ili cpm jedinicama (broј dezintegracija po minuti-desintegration per minute ili brojanje po minuti-counting per minute) ili u obliku grafika.

Efikasnost brojanja zavisi od hemijskog tretmana uzorka i korišćenog koktela. Interferencije (hemijske i optičke) koje potiču od uzorka mogu ometati prenos energije emitovane od strane fotona. U tom slučaju je neophodno obratiti pažnju na način pripreme i prečišćavanja uzorka. Efikasnost brojanja ^{14}C pomoću LSC je obično oko 96% kod neinterferirajućih uzoraka.



Slika 17. LSC blok dijagram

2.4.2. Biološki uređaj za oksidaciju

Biološki uređaj za oksidaciju se koristi za analizu uzoraka koji sadrže ^{14}C radionukleide. Princip tehnike se sastoji od spaljivanja uzorka u struji kiseonika na jako visokoj temperaturi (oko 900°C) da bi se proizveo CO₂. Nastali gasni produkti se unose u redukcionu komoru (oko 700°C) u kojoj se izvodi oksidacija preostale količine organskog materijala koja nije prethodno oksidovana. Nastali CO₂ se zatim apsorbuje u LSC posudice punjene sa odgovarajućim koktelom a ^{14}C radionukleidi se određuju pomoću LSC.

2.4.3. Elementalni analizator sa masenim spektrometrom

Pomoću elementalnog analizatora sa masenim spektrometrom (EA-IRMS) se obično izvodi određivanje stabilnih izotopa ugljenika, azota i sumpora. Princip tehnike se sastoji u oksidaciji i redukciji uzoraka na visokim temperaturama da bi se proizveli gasni produkti. Nakon toga, gasni produkti se razdvajaju na hromatografskoj koloni i prolaze kroz detektor toplotne provodljivosti. U ovom radu je izvedeno određivanje izotopa ugljenika i azota, pa su nastali gasni produkti bili CO₂ i N₂. Ulaskom gasova u IRMS se meri odnos izotopa uzorka i referentnog standarda poznatog izotopskog sastava. Sadržaj izotopa u uzorku se određuje iz kalibracione krive koja se konstruiše analizom referentnog standarda za specifičan element definisanjem zavisnosti intenziteta signala (površine pika) gasnih produkata i njihove koncentracije.

Izotopski odnos se izražava u promilima (δ) i predstavlja odnos između intenziteta masa teškog i laganog izotopa u uzorku i standardu :

$$\delta (\text{‰}) = (R_S/R_R - 1) \times 1000 \quad R = I_{\text{teški-izotop}} / I_{\text{lagani-izotop}}$$

R_S- odnos masa izotopa u uzorku,

R_R - odnos masa izotopa u referentnom standardu,

R - odnos između intenziteta masa teškog (I_{teški-izotop}) i laganog izotopa (I_{lagani-izotop}).

Izražavanje izotopskog odnosa sa δ je uvedeno da bi se izrazile jako male varijacije koje postoje između izotopskog sastava materijala prirodnog porekla. Za određivanje izotopa azota (¹⁵N/¹⁴N) se kao referentni standard koristi atmosferski azot, za koji je poznato da ima veoma stabilan izotopski sastav (R=0.0036765) širom sveta (Mariotti, 1983). Dok se za ugljenik najčešće koristi Vienna PeeDee Belemnite (VPDB), referentni standard za određivanje izotopa ugljenika (¹³C/¹²C) ("Marine Carbonate Standard" dobijen iz fosila, *Belemnitella americana*) koji ima izotopski odnos R=0.0112372.

2.5. Određivanje tropanskih i glikoalkaloida

Analitički postupak određivanja alkaloida u realnim uzorcima može da se podeli u tri faze: ekstrakcija supstanci iz matriksa, prečišćavanje ekstrakta (pri čemu se uklanjaju interfirajuće komponente) i određivanje analita odgovarajućom analitičkom tehnikom. Dodatne faze mogu uključiti koncentrovanje i derivatizaciju analita, što zavisi od primenjenog analitičkog postupka.

2.5.1. Priprema uzoraka

Priprema uzorka je ključna procedura u modernim instrumentalnim analizama. Po nekim procenama, 60-80% radne aktivnosti i operativnih troškova u analitičkim laboratorijama se utroši na pripremu uzoraka. Tri glavna razloga koja daju ogroman značaj pripremi uzoraka su: uklanjanje interferirajućih komponenata, dovođenje koncentracije analita u oblast kvantitativnog određivanja i prevođenje analita u rastvor. Prisustvo interferirajućih komponenata matriksa može maskirati ili ometati određivanje određenog analita. Pri pripremi uzorka za hromatografsku analizu neophodno je otkloniti komponente matriksa u cilju postizanja čistog, informativnog hromatograma. Pored toga prečišćavanje ekstrakata uzoraka smanjuje kontaminaciju samog instrumenta.

Tehnike koje su najčešće korišćene za pripremu uzoraka pri određivanju alkaloida su: tečno-tečna ekstrakcija i ekstrakcija na čvrstim fazama.

2.5.1.1. Tečno-tečna ekstrakcija

Ova vrsta prečišćavanja uzoraka je najstarija i zasniva se na raspodeli analita između dve tečne faze koje se međusobno ne mešaju. Različiti koeficijenti raspodele, konstante disocijacije, konstante nestabilnosti kompleksa i druge osobine analita u različitim rastvaračima, dovode do toga da se supstance od interesa odvoje od čitavog niza neželjenih (balastnih) materija.

Važno je napomenuti da se često korekcijom vrednosti pH može uticati na izmenu oblika ne samo analiziranog jedinjenja nego i na interferencije iz matriksa. Prelazak iz jedne u drugu fazu nikad nije kvantitativan, pošto se na graničnoj površini između dve faze uspostavlja dinamička ravnoteža koja može biti pomjerena ka organskoj ili vodenoj fazi. Količina jedinjenja koja prelazi u drugu fazu zavisi od veličine aktivne dodirne površine, koncentracije rastvora, dužine kontakta i temperature. Takođe, i jačina mešanja ima veliki uticaj na efikasnost ekstrakcije. Dužina mućkanja je najčešće u intervalu između 15 i 30 min. Obično je potrebno ekstrakciju vršiti barem tri puta da bi se dobilo kvantitativno iskorišćenje. Zbog neizbežnih gubitaka tokom procedure ekstrakcije potrebno je utvrditi prinos, odnosno efikasnost ekstrakcije (recovery).

Tečno-tečna ekstrakcija je najčešće prvi korak pripreme realnih uzoraka kada je reč o određivanju alkaloida. Alkaloidi se najčešće ekstrahuju iz uzorka pomoću rastvarača koji se meša sa vodom. Metod zavisi od rastvorljivosti alkaloida u ekstrakcionom rastvaraču i

složenosti matriksa uzorka. Pri primeni HPLC tehnika čija je granica detekcije u ppb opsegu ekstrahovane alkaloida je neophodno koncentrovati. Danas se gotovo kao pravilo u te svrhe koristi ekstrakcija na čvrstim fazama.

2.5.1.2. Ekstrakcija na čvrstim fazama

Napredak u tehnologiji čvrsto-fazne (SPE) ekstrakcije omogućava da se brzo, lako, efikasno i isplativo obavi priprema uzorka (Vicom, Waters Co, Agilent, J.T. Baker, Supelco Co, Application note for SPE). Korišćenjem relativno jeftinih, prethodno pakovanih kolonica (kertridža) koje sadrže odgovarajući sorbent, traženo jedinjenje iz rastvora uzorka, odnosno ekstrakta, se odvaja od ostalih supstanci iz matriksa. Unošenjem rastvora uzorka u kertridž analiti se vezuju za sorbent i zatim, pomoću selektivnog eluiranja različitim rastvaračima se ispiraju sa kertridža. Pogodnost i jednostavno korišćenje su osnovne osobine kolonica za ekstrakciju na čvrstim fazama.

Postoje dve osnovne strategije ekstrakcije na čvrstim fazama za pripremu uzorka.

Strategija 1. Tražena jedinjenja se propuštaju, dok se interferencije iz matriksa uzorka zadržavaju na sorbentu.

Strategija 2. Zadržavaju se tražena jedinjenja, dok se interferencije matriksa propuštaju. Analiti od interesa se naknadno eluiraju.

Prva strategija se obično bira kada je koncentracija analita u uzorku dovoljno visoka. U slučaju nižih koncentracija ili potrebe za izolacijom više jedinjenja jako različitih polarnosti, uglavnom se koristi druga strategija. Druga strategija se takođe može koristiti za koncentrisanje jedinjenja ekstremno niskih koncentracija. Obe strategije prečišćavanja se mogu koristiti za izolovanje različitih ciljnih analita kod kompleksnih matriksa.

Bez obzira na to koja strategija se koristi, u praksi se najčešće primenjivani mehanizmi sorpcije na čvrstoj fazi mogu podvesti pod hromatografiju: na normalnim fazama, na obrnutim fazama i sa jonskom izmjenom. Postoji jako velik broj sorbenata za svaki od mehanizama sorpcije. Izbor sorbenta i elucionih rastvora zavisi od analita, matriksa i cilja analize.

U razvoju tehnika ekstrakcije na čvrstoj fazi teži se bržim protocima, boljoj ponovljivosti, reproduktivnost i selektivnost. Za izdvajanje tropanskih alkaloida i glikoalkaloida često je korišćen Oasis[®] HLB kopolimer sa jedinstvenim hidrofilnim-lipofilnim balansom, i to više različitih tipova:

- HLB – hidrofilni-lipofilni balans

- MCX – smeša HLB i jakog katjonskog izmjenjivačkog kopolimera
- MAX – smeša HLB i jakog anjonskog izmjenjivačkog kopolimera

Treba naglasiti da je izbor odgovarajuće vrste sorbenta od velikog značaja posebno u slučaju ekstrakcije nekih tropanskih alkaloida (npr. l-hiosciamina i atropina), gde u toku ekstrakcije može doći do racemizacije l-hiosciamina do atropina (Bunke i sar., 1996; Reist i sar., 1997).

2.5.1.3. Disperzivna čvrsto fazna ekstrakcija

Disperzivna čvrsto-fazna ekstrakcija (Dispersive Solid Phase Extraction, DSPE) je metod ekstrakcije koji podrazumeva da se čvrsta ekstrakciona faza disperguje u tečnom uzorku. Umesto sa SPE gde je sorbent čvrsto pakovan u kertižima, kod ove tehnike se sorbent suspenduje u uzorku, a dobar kontakt se postiže intenzivnim mućkanjem. Originalno razvijen za analizu pesticida (Payá i sar., 2007; Aysal i sar., 2007), ovaj metod je po prvi put korišćen u ovom radu za ekstrakciju alkaloida. Tehnika je korišćena kao alternativa tradicionalnoj tečno-tečnoj i ekstrakciji na čvrstim fazama. Korišćenjem ove metode moguće je brzo i robusno prečišćavanje matriksa, pri čemu se štedi vreme neophodno za čišćenje, kondicioniranje i eluiranje analita (što je neophodno kada se koriste SPE kertridži).

Procedura se sastoji iz dve faze. Prva je homogenizacija uzorka sa organskim rastvarčima i solima (magnezijum sulfat, natrijum hlorid-NaCl, natrijum citrat dibazni hidrat- $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$, natrijum hidrogencitrat šesthidrat- $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$). Ove soli potpomažu razdvajanje faza organskog rastvarača i uzorka smanjujući rastvorljivost ciljanog analita u uzorku. Druga faza je prečešćivanje ekstrakta pomoću čvrstih sorbenta kao što su primarni sekundarni amin (Primary Secondary Amine, PSA) i C_{18} materijali. U ovoj fazi se takođe može dodati $MgSO_4$ koji ima ulogu sušenja ekstrakta, dok PSA adsorbuje šećere i masne kiseline. Dispergovani čvrsto-fazni materijal (MSPD) C_{18} uklanja nepolarne interfirajuće komponente kao što su lipidi. Prečišćen ekstrakt primenjenim postupkom se može direktno injektovati u hromatografski sistem.

2.5.2. Analitičke tehnike korišćene pri određivanju tropanskih i glikoalkaloida

Tokom godina, različiti analitički metodi su korišćeni za određivanje tropanskih i glikoalkaloida. Razvoj u oblasti analitičke hemije je doprineo tome, da se primenjujane tehnike zamene onim koje bolje ispunjavaju najznačajnije analitičke zahteve, kao što su

osetljivost i selektivnost. Prve korišćene metode, kao što su kolorimetrija, papirna hromatografija i tankoslojna hromatografija (TLC) (Paseshnikchenko i Guseva, 1956) su brzo zamenjene novijim tehnikama, kao što su HPLC i GC. U analizi alkaloida su takođe upotrebljavane enzimska imunološka metoda (ELISA), kapilarna elektroforeza (CE), micelarna elektrokinetička hromatografija, MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-mass spectrometry) i nuklearna magnetna spektroskopija (NMR).

2.5.2.1. Tankoslojna hromatografija

TLC je hromatografska tehnika kod koje se razdvajanje izvodi između stacionarne faze pričvršćene na staklenu ili plastičnu ploču i mobilne faze. TLC tehnika je uglavnom primenjivana za kvalitativno određivanje tropanskih alkaloida, glikoalkaloida i njihovih aglikona (Schreiber i sar., 1963b; Coxon, 1979). Analiza alkaloida je izvođena pomoću silikagela (stacionarne faze) i mobilne faze sastavljene od različitih kombinacija rastvarača (hloroform, metanol, amonijak i voda) (Friedman i McDonald, 1997; Roddick i Melchers, 1985; Bodart i sar., 2000; Nikolic i Stanković, 2003). Osnovna prednost TLC metoda je njihova jednostavnost i mogućnost brze analize velikog broja uzoraka. Ova tehnika se takođe koristila i za kvantitativno određivanje alkaloida, denzitometrijski, na bazi merenja apsorpcije ili fluorescencije na odgovarajućoj talasnoj dužini (Ferreira i sar., 1993; Simonovska i Vovk, 2000). TLC je danas uglavnom zamenjena sa HPLC.

2.5.2.2. Gasna hromatografija

Zbog visoke molekulske mase i slabe isparljivosti, glikoalkaloidi i njihovi aglikoni se teško određuju gasnom hromatografijom. Primenom gasne hromatografije mnogo češće su određivani tropanski alkaloidi u odnosu na glikoalkaloide. Iako prilično precizna i efikasna, gasna hromatografija izlaže uzorke visokim temperaturama koje mogu uzrokovati raspad nekih alkaloida, pa je zato mnogo češće korišćena metoda tečne hromatografije.

U praksi je pri određivanju glikoalkaloida obično vršena hidroliza do njihovih odgovarajućih aglikona (solanidin, tomatidin, itd.), koji su potom direktno određivani pomoću GC-MS (Nikolić i sar., 2003; Lawson i sar., 1992). Druga mogućnost određivanja glikoalkaloida gasnom hromatografijom je analiza nakon derivatizacije. Prve korišćene metode derivatizacije su bazirane na metilaciji i određivanju glikozida (Herb i sar., 1975; Osman i sar., 1978; Gregory i sar., 1981). Razdvajanje solanidina, solasodina, leptinidina,

tomatidina i acetileptinidina je postignuto pomoću kapilarne GC, nakon kombinovane ekstrakcije i hidrolize (Lawson i sar. 1992).

Za određivanje tropanskih i glikoalkaloida, gasna hromatografija je najčešće upotrebljavana u kombinaciji sa: FID, NPD i MS (van Gelder 1984; Lawson i sar., 1992; Kartal i sar., 2002; Namera i sar., 2002; Nikolić i sar., 2003) Scopolamin i l-hosciamin (u biljkama *Datura stramonium*, *Hyoscyamus reticulatus* i *Datura ferox*) su određivani pomoću GC-MS, u split modu, korišćenjem kapilarnih kolona (30 m x 0.25 mm i.d., debljina filma 0.25 μ m) (Amdouna i sar., 2009; Kartal i sar., 2002; Vitale i sar., 1995). Da bi se smanjio raspad tropanskih alkaloida usled visoke temperature, korišćena je derivatizacija koja poboljšava toplotnu stabilnost supstanci. Najčešće upotrebljavane supstance za derivatizaciju tropanskih alkaloida su silani: bis(trimetilsilil-trifluoroacetamide) (BSTFA) i trimetilhlorosilane (TMCS) (Namera i sar., 2002).

Prednost gasno-hromatografske metode određivanja glikoalkaloida u odnosu na druge hromatografske tehnike je u dobrom razdvajanju različitih aglikona. Hidroliza glikoalkaloida je najčešće izvođena pod dejstvom rastvora kiselina (Osman i Sinden, 1977; Coxon i sar. 1979) i enzima (Nikolić i sar., 2003; King, 1980; van Gelder, 1984; Lawson i sar. 1992; Friedman i McDonald 1995a) u različitim vremenskim periodima. Oimalno vreme hidrolize za solanin i tomatin je iznosilo 2.5-3 sata u dvofaznom sistemu (van Gelder, 1984). Derivatizacija aglikona sa reagensima za metilovanje do više isparljivih i toplotno stabilnijih komponenti nije postala uobičajna procedura u pripremi uzoraka. Međutim formiranje acetil (King 1980) i trimetilsilil (Juvik i sar., 1982) derivata je optimizovano i više korišćeno. Solanidin je najčešće određivan u vidu trimetilsilil derivata (Griffiths i sar., 2000).

2.5.2.3. Visokopritisna tečna hromatografija

HPLC-UV tehnika je najviše korišćena hromatografska tehnika u analitičkim laboratorijama za određivanje tropanskih i glikoalkaloida (Papadoyannis, 1995). Prvi HPLC-UV metod određivanja glikoalkaloida je objavljen prije 30 godina (Bushway i sar., 1979), gdje je razdvajanje α -kakonina i α -solanina postignuto na koloni sa amino punjenjem. Kasnije, razvojem novih tehnika i kolona, objavljen je jako veliki broj usavršenih metoda (Carman i sar., 1986; Edwards i Cobb, 1996; Kuronen i sar., 1999; Friedman i sar., 2003b). Najčešće su upotrebljavane kolone sa C18 stacionarnom fazom, ali kolone sa C8 i NH₂ punjenjem isto tako mogu biti korišćene. Sastav mobilnih faza, korišćenih za razdvajanje glikoalkaloida, su uglavnom podrazumevale smeše acetonitrila i vode ili acetonitrila i

alkohola. Da bi se poboljšala separacija, u mobilnu fazu su često dodavane različite soli i kiseline (Friedman i McDonald, 1997). U oficijalnim AOAC metodama određivanja glikoalkaloida u krompiru koristi se C18 kolona u kombinaciji sa mobilnom fazom od 60:40 acetonitrile/voda (0.01 M fosfatni pufer, pH 7.6) (AOAC, 2000). Glikoalkaloidi ne sadrže hromofore i jako malo apsorbiraju UV svetlost što se odražava na osetljivost određivanja. Određivanje pomoću UV detektora je obično izvođeno na 200-215 nm (Veerporte, 2000) a većina razvijenih metoda je bila usmerena na određivanju glikoalkaloida u biljkama (Solanaceae) (Saito i sar., 1990; Hellenäs i sar., 1992). Tipične granice detekcije za glikoalkaloide pomoću HPLC-UV su 2-8 mg/l (Sotelo i Serrano, 2000; Friedman i sar., 2003b).

Kolone punjene sa C18 stacionarnom fazom su takođe korišćene i pri određivanju tropanskih alkaloida (Miraldi i sar., 2001; Bucher i sar., 1989). Radvajanje je najčešće izvođeno sa izokratnom elucijom, upotrebom mobilnih faza različitog odnosa organskih rastvarača (acetonitril i metanol) u kombinaciji sa vodom. Za podešavanje hromatografskih uslova analize (razdvajanja, osetljivosti) najčešće su dodavani: tetrahidrofur, sirćetna kiselina, trietilamin i trietilamonium fosfat (Draeger, 2002; Xu i sar., 1995). Većina tropanskih alkaloida ne posjeduje tako snažne UV hromofore u pogodnim regijama spektra, ali je ipak moguće njihovo određivanje pomoću UV i FLD detektora (Steenkamp i sar., 2004). Određivanje tropanskih alkaloida je izvođeno na sledećim talasnim dužinama: 210 nm, 220 nm i 254 nm (Papadoyannis, 1995; Bucher i sar., 1989). Granice detekcije određivanja tropanskih alkaloida pomoću HPLC-UV/FLD, su se kretale od 0.1 µg/ml do 50 µg/ml.

Danas, sve više korišćena tehnika u analitici alkaloida je masena spektrometrija (MS) u kombinaciji sa HPLC. Određivanje tropanskih alkaloida pomoću HPLC-MS je najčešće izvođeno u ekstraktima biljaka. Korišćenjem različitog interfejs sistema (termosprej, elektrosprej, jonsprej itd.) sa odgovarajućom mobilnom i stacionarnom fazom, postignute su granice detekcije i do 5 ng/ml (Drager, 2002). Prvi metod određivanja glikoalkaloida korišćenjem LC-MS je objavljen 2003 god. (Stobiecki i sar., 2003). Kasnije je objavljeno i nekoliko drugih metoda sa granicom detekcije u opsegu 0.25 to 39 µg/l (Matsuda i sar., 2004; Chuda i sar., 2004; Zywicki i sar., 2005).

2.5.2.4. Enzimsko-imunološke metode

Osnovna karakteristika ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) metode je „obeležavanje“ određivane komponente enzimom. Aktivnost enzima u kompleksu se određuje

na osnovu indikatorske reakcije tog enzima sa određenim supstratom, koji se dejstvom enzima transformiše u bojeni produkt. ELISA je uspešno korišćena pri određivanju ukupnih glikoalkaloida (Morgan i sar., 1983; Morgan i sar., 1985; Ward i sar., 1988; Friedman i sar., 1998), kao i njihovih aglikona (Plhak i Sporns, 1994) i tropanskih alkaloida (Kikuchi i sar., 1991). Prednosti ELISA metode su jednostavnost u rukovanju i pripremi uzoraka za analizu, kao i nešto niža cena instrumenta. Međutima, ELISA ne može biti korišćena u analizi kompleksnih smeša alkaloida, kao ni u određivanju njihove strukture. U tom slučaju se mora koristiti neka od hromatografsko-maseno spektrometrijskih metoda.

2.5.2.5. Druge metode određivanja tropanskih i glikoalkaloida

Objavljeno je i nekoliko drugih tehnika određivanja tropanskih i glikoalkaloida, i to pomoću kapilarne elektroforeze-masene spektrometrije (CE-MS) sa granicom detekcije u opsegu od 10-50 µg/l (Bianco i sar., 2002). CE-MS je takođe uspešno korišćena i za razdvajanje enantiomera tropanskih alkaloida uz upotrebu β-cyclodextrin supstanci kao hiralnih selektora (Mateus i sar., 1998, 2000; Cherkaoui i sar., 1997, 1999, 2001). Pomoću masene spektrometrije u kombinaciji sa MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) su određivani glikoalkaloidi (Jensen 2008). Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija (NMR) je uglavnom korišćena za određivanje strukture različitih glikoalkaloida i njihovih aglikona (solasonine, α-tomatine, solanidine, demissidine, tomatidine, itd.) (Radeaglia i sar., 1977; Weston i sar., 1977). Ova tehnika je takođe upotrebljavana i za identifikaciju pojedinih glikoalkaloida (solasonine i solamargine) izolovanih iz *Solanum* biljaka (Valverde i sar., 1993; Puri i sar., 1994).

2.5.2.6. Izbor metode

Iz prethodnih razmatranja je demonstrirano da se u analizi tropanskih i glikoalkaloida mogu primeniti različite analitičke tehnike. Izbor metode zavisi od vrste uzoraka koji se planiraju analizirati kao i cilja analize, odnosno da li je neophodno odrediti ukupnu količinu glikoalkaloida ili samo sadržaj pojedinačnih alkaloida. Pri analizi uzoraka u kojima se očekuje povišen sadržaj alkaloida može se primeniti bilo koja od navedenih metoda, dok se u analizi uzoraka gde se očekuju niske koncentracije, kao što su kontaminirano zemljište, voda, hrana i stočna hrana, neophodno primeniti osetljiviju metodu detekcije, kao npr. MS.

U ovom radu je planirana analiza uzoraka hrane i stočne hrane u kojima se očekuje prisutvo alkaloida u tragovima. Iz tih razloga su pri razvoju metoda korišćene hromatografske

tehnike u kombinaciji sa masenom spektrometrijom. Ispitivanja su izvedene uz prethodno razdvajanje komponenata gasnom i tečnom hromatografijom, uz masenu i maseno-masenu spektrometriju (GC-MS i HPLC-MS/MS).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Aparatura

U radu je korišćena sledeća aparatura:

1. Tečni hromatograf (Waters Alliance HPLC 2695, UK) spojen sa maseno-masenim spektrometrom MS/MS (Micromass Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer, Waters, UK)
2. Gasni hromatograf (7890A, GC) spojen sa masenim detektorom (5975C, EI/CI MSD) (Agilent, USA)
3. Tečni scintilacioni brojač (Beckman LS6000 Liquid Scintillation Counter, LSC, Beckman Instruments, USA)
4. Biološki uređaj za oksidaciju (OX-400 Biological Material Oxidizer, R. J. Harvey. Instrument Co.)
5. Elementalni analizator (EA) Flash 2000 Thermo Scientific (Massachusetts, USA) spojen sa masenim spektrometrom (Isotope Ratio Mass Spectrometry-IRMS) GV Instrument Iso Prime (Manchester, UK)
6. Porapak Q gasno- hromatografska kolona za EA-IRMS (3 m x 2.3 mm, 5A) (Agilent, USA)
7. Centrifuga
8. Mešać
9. Ultrazvučno kupatilo (VWR™, Model USC 300T)
10. Sistem za ultračistu vodu, Milli-Q system (Millipore, Molsheim, S.A., France)
11. Mlin (Cemotec 1090sample Mill, Tecator, Sweden)
12. Mikser (TuoMing, Kina)
12. Azotni uparivač, TurboVap® LV evaporator (Zymark, Runcorn, UK)
13. PTFE (politetrafluoretilen) filteri (0.22µm) za špric
14. Hidrofilno-lipofilno reverzno-fazni kertridži (Oasis, HLB, 200 mg)
15. Polimerni reverzno-fazni kertridži (Strata-X 33µ, 500 mg).

3.1.1. Kolona korišćena za GC

1. Kapilarna kolona HP-5MS UI (stacionarna faza fenil arilen polimer), 30 m x 0.25 mm, I.D., 0.25 μm (Agilent, USA).

3.1.2. Kolone korišćene za HPLC

1. X-Bridge C18 kolona (C18 stacionarna faza) (100 x 2.1 mm, I.D., 3.5 μm) (Waters, UK)

2. Synergi 4U Fusion-RP 80A (C18 stacionarna faza) (150 x 4.6 mm, I.D., 4 μm) (Phenomenex, USA)

3. Gemini C18 (C18 stacionarna faza) (150 x 4.6 mm, I.D., 3 μm) (Phenomenex, USA)

4. Chirobiotic V kolona (hiralna stacionarna faza, vankomicin), dužina x unutrašnji prečnik: 250 x 4.6 mm, debljina filma stacionarne faze-I.D. (inerr diameter) 5 μm , spojena sa predkolonom Chirobiotic V zaštitnom „guard“ kolonom (20 x 4.0 mm, I.D., 5 μm) (Astec, Advanced Separation Technologies Inc., USA).

3.2. Hemikalije, reagensi i standardi

- Metanol (HPLC stepena čistoće $\geq 99.9\%$), Sigma Aldrich
- Acetonitril (HPLC stepena čistoće $\geq 99.9\%$), Sigma Aldrich
- Aceton (HPLC stepena čistoće $\geq 99.9\%$), Sigma Aldrich
- Etilacetat (GC stepena čistoće $\geq 99.9\%$), Sigma Aldrich
- Mravlja kiselina (ultrapure), Sigma Aldrich
- Magnezijum sulfat (p.a.), Sigma Aldrich
- Natrijum hlorid (p.a.), Sigma Aldrich
- Natrijum citrat dibazni hidrat (p.a.), Sigma Aldrich
- Natrijum hidrogencitrat šesthidrat (p.a.), Sigma Aldrich
- Amonijum format (p.a.), (Karlsruhe, Njemačka)
- Amonijum sulfat (Helm, Austria)
- Trietilamin (p.a.), Sigma Aldrich
- Sirćetna kiselina (p.a.), Sigma Aldrich
- Čvrsto-fazni disperzioni materijal C₁₈ (p.a.) (MSPD), Biotage (Uppsala, Švedska
- „Ultima gold“ tečni sciantilacioni rastvor, Perkin Elmer

- Ultra-čista voda
- Atropin (d,l-hiosciamin) (The United States Pharmacopeia, USP), Sigma-Aldrich
- l-skopolamin hidrobromid trihidrat ($\geq 98\%$, HPLC), Sigma-Aldrich
- tropin hidrat ($\geq 97\%$, HPLC), Sigma-Aldrich
- α -solanin ($\geq 99\%$, HPLC), Sigma-Aldrich
- Anisodamin (98.6%, HPLC), Oskar Tropitsch (Marktredwitz, Njemačka)
- α -kakonin (98.9%, HPLC), Oskar Tropitsch (Marktredwitz, Njemačka)
- l-hiosciamin ($\geq 99.9\%$, HPLC), Tokyo chemical industry (Tokyo, Japan)
- l-skopolamin-d₃ hidrobromid (N-metil-d₃) trihidrat, ($\geq 99.9\%$, HPLC), Dr. Ehrenstorfer (Ausborg, Germany)
- (d,l)-Atropine, [N-metil-¹⁴C], Perkin Elmer (Boston, USA) sa specifičnom aktivnošću od 20 mCi/mmol i radiohemijском čistoćom 98.8%, određenom pomoću HPLC
- 2,5-dipheniloxazolyl (PPO), Merck
- 1,4 bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene (POPOP), United technologies packard (Zirih, Švedska)
- Vienna PeeDee Belemnite (VPDB), standard za određivanje sadržaja izotopa ugljenika (¹³C/¹²C) ("Marine Carbonate Standard")
- atmosferski azot Linde Gas (Njemacka)
- Helium 5.0 (≥ 99.999) Linde Gas (Njemacka)
- Azot 5.0 (≥ 99.999) Linde Gas (Njemacka)
- Argon 5.0 (≥ 99.999) Linde Gas (Njemacka)
- Pšenica (Kronjet-ljetna vrsta, *Triticum aestivum*) (Lagerhaus, Austrija).

3.3. Priprema rastvora

Osnovni standardni rastvori (1 g/l) tropanskih alkaloida (tropine, atropine, skopolamine, homatropine, anisodamine, skopolamine-d₃) i glikoalkaloida (α -solanine, α -kakonine) su pripremljeni pojedinačno vaganjem 10 mg svake supstance i rastvaranjem u 10 ml metanola. Standardna smeša svih navedenih alkaloida, koncentracije 100 μ g/ml svakog pojedinačnog analita u metanolu, pripremljena je od rastvora pojedinačnih alkaloida. Radni standardni rastvori smeše alkaloida koncentracija: 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.48 i 0.64 μ g/ml, su pripremljeni razblaživanjem određene količine standarda kombinovanog standardnog rastvora koncentracije 100 μ g/ml u mobilnoj fazi B (10 mM amonijum format u 50/50=MeOH/ACN).

Kao unutrašnji standard za kvantifikaciju alkaloida je primenjen skopolamin-d₃ hidrobromid (N-metil-d₃) trihidrat. Njegov rastvor je pripremljen razblaživanjem 10 mg supstance u 10 ml metanola (1 g/l). Radni standardni rastvori od 100 µg/ml i 5 µg/ml su pripremljeni razblaživanjem određene količine osnovnog standardnog rastvoara metanolom.

Kalibracioni standardi su pripremljeni dodavanjem određene zapremine radnih standarda u 0.5 ml blank ekstrakta. Kalibraciona kriva je konstruisana injektiranjem kalibracionih standarda sledećih koncentracija: 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.24 i 0.32 µg/ml, uključujući i unutrašnji standard koncentracije 0.16 µg/ml. Primljeni kalibracioni opseg (0.01 - 0.32 µg/ml) je odgovarao koncentracijama pojedinačnih alkaloida između 2.5 i 80 ng/g u uzorcima. Kalibracione krive su konstruisane definisanjem zavisnosti intenziteta signala (površine pika) određivanog analita i unutrašnjeg standarda (scopolamine-d₃), nasuprot koncentracije određivanog analita.

Radni i kalibracioni standardni rastvori za analizu tropanskih i glikoalkaloida pomoću GC su pripremljeni na isti način kao za HPLC, rastvaranjem određene količine osnovnog standarda (1 g/l) u etilacetatu.

Osnovni, radni i kalibracioni standardni rastvori korišćeni za HPLC i GC analizu su čuvani na temperaturi od -25 °C. Osnovni standardni rastvori su pripremljeni na početku eksperimenta, dok su radni standardni rastvori pripremani jednom mesečno, a kalibracioni pre početka svake analize.

3.4. Priprema mobilnih faza

U toku procesa optimizacije hromatografskog razdvajanja isprobane su mobilne faze različitog sastava kombinovanjem organskih rastvarača i vode sa dodatkom kiselina, soli i baza, kao što su:

1. Acetonitril (65%) i voda (35%),
2. Metanol (50%) i voda (50%),
3. 0.1 i 1 % mravlja kiselina u metanolu (70%) i vodi (30%),
4. 1% sirćetna kiselina pripremljena u acetonitrilu (60%), metanolu (30%) i vodi (10%),
5. Trietilamin (TEA) i sirćetna kiselina (HOAc), u različitim odnosima (TEA:HOAc = 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, i obrnuto) a ukupno 1 ml u metanolu,
6. 10 mM amonijum format u vodi (50%) i metanol (50%)
7. 20 mM amonijum format u vodi (50%) i metanol (50%).

Konačna optimizovana mobilna faza se sastojala od 10 mM amonijum formata u voda/acetonitril=90/10, v/v (rastvarač A) i metanol/acetonitril=50:50 v/v (rastvarač B).

3.5. Uzorci

Uzorci korišćeni pri razvoju i validaciji metode, kao i analizirani uzorci hrane (pšenica, raž, soja, kukuruz, laneno seme, mešano brašno od žitarica, kukuruzno brašno, biskvit, krekeri, čips, jabuke, kruške, avokado, krompir, paradajz, paprika, krastavac, mrkva, patlidžan) su nabavljeni iz okolnih marketa na području Beča. Uzorci mešavine stočne hrane za ishranu svinja, piletine, krava, zečeva, konja i divljih životinja, kao i pšenice (korišćene u eksperimentu praćenja translokacije i apsorpcije atropine ^{14}C), su nabavljeni direktno od proizvođača (Lagerhaus, Austrija).

3.5.1. Priprema uzoraka za analizu pomoću HPLC-MS/MS

Uzorci žitarica i stočne hrane su samljeveni pomoću mlina do čestica veličine <1 mm dok su uzorci voća i povrća usitnjeni u mikseru. Samljeveni uzorci žitarica korišćeni pri razvoju metode (5g) su spajkovani sa 200 μl smeše radnog standarda (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tropanskih alkaloida i glikoalkaloida da bi se postigla koncentracija od 40 ng po g uzorka. U uzorke je takođe dodato 40 μl unutrašnjeg standarda (scopolamine- d_3) sadržaja 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, kako bi konačni sadržaj u uzorku bio 40 ng/g. Uzorci su mešani na mešaču 30 s i ostavljeni da odstoje 15 min, kako bi se obezbedila interakcija dodatih supstanci sa matriksom. Pri analizi realnih uzoraka baziranih na žitaricama postupak je bio isti osim koraka dodavanja standarda (spajkovanja). Uzorcima je zatim dodano 20 ml rastvora 0.5% mravlje kiseline u acetonitrilu/vodi=75/25 (v/v) i smeša magnezijum sulfata (MgSO_4 , 2 g), natrijum hlorida (NaCl , 0.5 g), natrijum citrata dihidrata ($\text{C}_6\text{H}_8\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g) i natrijum hidrogencitrata šesthidrata ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g). Uzorci su ručno mučkani 1 min a potom centrifugirani (2600 x g, 4 °C, 10 min). Alikvot (8 ml) ekstrakta je prenešen u staklene posudice i uparen do suha na temperaturi od 45 °C pomoću azotnog uparivača.

Kod uzoraka soje i lanenog semena, dodatno je vršeno prečišćavanje da bi se uklonile masne komponente matriksa. MSPD C18 materijal je dodavan ekstraktu uzorka (0.05g po ml ekstrakta), koji je mešan 30 s na mešaču i centrifugiran (1600 x g, 4 °C, 10 min). Alikvot od 8 ml je prenošen u staklene posudice i uparen do suha.

Upareni ostatak je rastvaran u 0.5 ml rastvarača B (10 mM amonijum format u 50/50=MeOH/ACN) uz dejstvo ultrazvuka (ultrazvučno kupatilo, 5 min) kako bi se komponente bolje rastvorile. Nakon toga je vršeno filtriranje ekstrakta kroz PTFE filter (0.2 μm) u LC posudice i injektirano 10 μl u HPLC-MS/MS sistem.

3.5.2. Priprema uzoraka za analizu pomoću GC

Uzorci hrane za analizu tropanskih alkaloida pomoću GC su pripremljeni na isti način kao za analizu pomoću HPLC, izuzev poslednjeg koraka. Nakon uparavanja 8 ml prečišćenog ekstrakta suvi ostatak je rastvoren u 0.5 ml etilacetata, rastvarača kompatibilnog sa GC sistemom. Za gasno-hromatografsku analizu korišćena je alikvot od 1 μl .

3.5.3. Priprema uzoraka za analizu pomoću LSC, biološkog uređaja za oksidaciju i

EA-IRMS

Pojedini delovi biljke (seme, listovi i stabljika) su nakon uzorkovanja samleveni i sušeni u peći na 70 °C 24 sata, a za analizu je korišćeno 100 mg tako pripremljenog uzorka. Uzorku je dodavano 6 ml rastvora (0.5% mravlja kiselina u acetonitrilu/vodi=75/25, v/v). Smeša je mešana na mešaču 30 min a zatim centrifugirana (10 min, 3500 rpm, 4 °C). 1 ml alikvota je prenošen u LSC posudice, kojima je dodavano 18 ml LSC koktela. Intenzitet emitovanog zračenja je meren na LSC.

Zemljište (5 g) je vagano u plastične posudice za ekstrakciju kojima je potom dodavano 20 ml rastvora (0.5% mravlja kiselina u acetonitrilu/vodi=75/25, v/v). Smeša magnezijum sulfata (MgSO_4 , 2 g), natrijum hlorida (NaCl , 0.5 g), natrijum citrata dihidrata ($\text{C}_6\text{H}_8\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g) i natrijum hidrogencitrata šesthidrata ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g) je dodana uzorku. Uzorci su ručno mućkani 1 min a potom centrifugirani (2600 x g, 4 °C, 10 min). Alikvot (1 ml) ekstrakta je dodavan u 12 ml LSC koktela i analiziran pomoću LSC.

Voda sakupljena u toku eksperimenta (4 ml) je dodavana u 12 ml LSC koktela i analizirana pomoću LSC.

Ukupno vreme trajanja analize za sve uzorke je iznosilo 5 min.

Preostali (neekstrahovani) atropin ^{14}C u zemljištu i biljkama je analiziran pomoću biološkog uređaja za oksidaciju. Ekstrahovani uzorci biljaka i zemljišta su sušeni 64 h na sobnoj temperaturi (20 °C). Osušeni uzorci su prenešeni u posudice za spaljivanje koje su zatim postavljane u komoru za analizu.

Biljke uzgajane na nekontaminiranom zemljištu su sušene u peći (70 °C, 24h). Nakon toga su usitnjene u mlinu, a 10 mg je vagano u metalne kapsule (8x5 mm) i analizirano pomoću EA-IRMS.

3.5.4. Spajkovanje uzoraka za eksperiment validacije

Prethodno samljeveni uzorci žitarica (pšenica, raž, soja, kukuruz, laneno seme) (5 g) su spajkovani sa tri različite koncentracije standarda (5, 10 i 40 ng/g, za svaki od alkaloida) dodavajući 25, 50, 200 µl standarda sadržaja µg/ml standarda i 40 µl rastvora untrašnjeg standarda (scopolamine-d₃) sadržaja 5 µg/ml. Potpuna validacija je izvođena za pšenicu i soju u tri različita dana isedam ponavljanja za svaku spajkovanu koncentraciju. Kod raži, kukuruza i lanenog semena validacija je izvođena samo za najnižu spajkovanu koncentraciju (5 ng/g).

3.6. Određivanje alkaloida hromatografskim tehnikama

3.6.1. Određivanje tropanskih i glikoalkaloida pomoću HPLC-MS/MS

Konačno hromatografsko razdvajanje alkaloida je vršeno sa hiralom kolonom (Chirobiotic V) pomoću Waters Alliance HPLC 2695 serije. Razdvajanje je postignuto sa mobilnom fazom sastavljenom od 10 mM amonijum formata u voda/acetonitril (90:10, v/v, mobilna faza A) i metanol/acetonitril (50:50 v/v, mobilna faza B), mešanim u odnosu 20:80 (v/v, A:B). Ukupno vreme trajanja analize je iznosilo 16 min, uz temperaturu kolone 45 °C (±5) i protokom mobilne faze od 1 ml/min. Da bi se smanjila količina uzorka koja se unosi u maseni spektrometar, korišćen je split mod u odnosu 7:3, tako da je 0.3 ml/min bio dotok mobilne faze u maseni spektrometar.

Temperatura autosamplera je održavana na 20 (±2) °C a injektirano je 10 µl rastvora. Detekcija i kvantifikacija je izvođena na Micromass Quattro Micro trostrukom kvadropolnom masenom spektrometru. MS/MS detekcija je izvođena u pozitivnom elektrosprej jonizacionom modu, korišćenjem reakcionog višestrukog monitoring (MRM-multiple reaction monitoring) akvizicionog moda sa među-scan i među-kanalskim kašnjenjem od 0.1 i 0.02 s, redom. Azot je korišćen kao desolvacioni (protok od 600 l/h i 50 l/h, redom) a argon kao kolizionni gas (0.6 bar na regulatoru pritiska). Rezultati su obrađeni koristeći TargetLynx software (Waters, USA).

3.6.2. Određivanje tropanskih alkaloida pomoću GC-MS

Razdvajanje tropanskih alkaloida je postignuto pomoću kapilarne kolone HP-5MS UI, dužine 30 m, unutrašnjeg prečnika 0.25 mm, sa slojem stacionarne likvidne faze od 0.25 μm . Kao gas nosač korišćen je helijum, a odgovarajući protok je iznosio 54.8 mL/min. Maseni spektri su snimani SCAN i SIM tehnikom, u intervalu m/z 50–550 a.m.u. Vreme kašnjenja rastvarača (solvent delay time) je iznosilo 6.25 min. Temperatura injektora je iznosila 230 °C, masenog jonizatora 230 °C a kvadrupola 150 °C.

Analize na gasnom hromatogramu su izvedene primenom sledećeg temperaturnog programa: početna temperatura kolone od 50 °C održavana je 1.5 min, nakon čega je sledio porast temperature brzinom od 40 °C/min do konačne temperature od 300 °C koja je održavana narednih 5 min. Ukupno vreme trajanja analize je iznosilo 12.75 min. U GC je injektirana zapremina prečišćenog ekstrakta od 1 μl .

3.7. Analiza uzoraka pomoću LSC, biološkog uređaja za oksidaciju i EA-IRMS

Pripremljeni uzorci za LSC analizu se postavljani u ležište, nakon čega su se mehanički spuštali u komoru za analizu gde se izvodilo brojanje fotona u toku 5 min (ukupno vreme trajanja analize). Za automatski proračun je korišćen kalkulacioni dpm mod. Preciznost brojanja bila je podešena na nivo poverenja od 95 %.

Analiza uzoraka pomoću biološkog uređaja za oksidaciju je započinjala spaljivanjem uzoraka u struji kiseonika (100 ml/min) na 900 °C u komori za analizu, a nastali gasni produkti su se unosili u redukcionu komoru (680 °C) u kojoj se izvodila oksidacija preostale količine organskog materijala koja nije prethodno oksidovana. Nastali CO_2 se apsorbovao u LSC posudicama punjenim sa 20 ml koktela i analizirao pomoću LSC brojača. Ukupno vreme trajanja analize je iznosilo 4 min. Koktel korišćen za apsorpciju CO_2 je pripremljen od 2,5-dipheniloxazolyl (PPO) (5 g) i 1,4 bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene (POPOP) (50 mg) rastvorenih u 1 litar toluena (50%) i etanolamina pripremljenog u metanolu (12.5% etanolamin i 87.5% metanol) (50%). Azot je korišćen kao gas za stabilizaciju sistema (hlađenje sistema) sa protokom od 300 ml/min.

Pripremljeni uzorci za analizu pomoću EA-IRMS su se sagorevali u atmosferi kiseonika u reakcionoj koloni na temperature od 1020 °C. Oksidacioni produkti su se unosili strujom helijuma (100 ml/min) kroz redukcionu kolonu (650 °C). Nastali gasovi (CO_2 ,

N₂) su se propuštali kroz stub magnezijum perhlorata, razdvajali u pakovanoj hromatografskoj koloni i detektovali na detektoru toplotne provodljivosti. Njihovim ulaskom u IRMS se merio odnos izotopa uzorka i referentnog gasa poznatog izotopskog sastava. Sadržaj azota i ugljenika u uzorku se određivao iz kalibracione krive koja je konstruisana analizom referentnog standarda definisanjem zavisnosti intenziteta signala (površine pika) CO₂ i N₂ i koncentracije. Kao referentni standardi za ugljenik je korišćen Vienna PeeDee Belemnite (VPDB), a za azot atmosferski azot.

3.8. Eksperimentalni dizajn praćenja procesa apsorpcije i translokacije atropina

¹⁴C u pšenici

Da bi se utvrdila mogućnost apsorpcije toksičnih supstanci iz zemljišta od strane pšenice, izveden je eksperiment sa atropinom ¹⁴C u strogo kontrolisanim uslovima u stakleniku. Zemljište (pesak/Seibersodrf zemljište, 50/50) je spajkovano sa atropinom ¹⁴C u dve različite koncentracije 15332.3 dpm/g i 37202.7 dpm/g, u 4 ponavljanja za svaku koncentraciju. Paralelno je pšenica uzgajana u 4 posude bez spajkovanja (blank), a zemljište na kome pšenica nije uzgajana je spajkovano u 2 ponavljanja. Pšenica je uzgajana 5 dana na 25 °C u petri posudicama u inkubatoru. Proklimala biljka je nakon toga zasadena u zemljište spajkovano i nespajkovano sa atropinom ¹⁴C.

U toku uzgoja pšenice korišćen je amonijum sulfat (0.357 g po kg zemljišta) za djubrenje zemljišta, a voda je u toku uzgoja pšenice dodavana po potrebi (ista količina u sve posude). Analiza zemljišta, vode i pojedinih delova biljke (listova, stabljike i semena) je izvođena posle 15, 30, 60 i 90 dana, pomoću tečnog scintilacionog brojača i biološkog uređaja za oksidaciju. Zbog jako komplikovane analize korena pšenice uzgajane na obogaćenom zemljištu sa atropinom ¹⁴C i visoke doze očekivane radioaktivnosti, koncentracija atropina ¹⁴C u korenu je određena na osnovu prethodno utvrđenog odnosa ugljenika ¹²C u korenu i ostalim delovima biljke. Određivanje ugljenika ¹²C je izvedeno pomoću EA-IRMS u korenu i ostalim delovima biljke uzgajane pri istim uslovima, ali bez obogaćivanja zemljišta sa atropinom ¹⁴C. Na osnovu odnosa mase pojedinih delova biljke kao i količine ugljenika ¹²C, proračunati su odnosi (koren/ostatak biljke) mase i ugljenika ¹²C. Izračunati odnosi su korišćeni za proračun količine apsorbovanog atropina ¹⁴C u korenu pšenice uzgajane na obogaćenom zemljištu.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Optimizacija procesa ekstrakcije

Različite hemijske osobine i struktura tropanskih i glikoalkaloida su prouzrokovali poteškoće u optimizaciji postupka simultane ekstrakcije dve grupe jedinjenja. Složeni matriks analiziranih uzoraka, tj. žitarica, mahunarki, semena lana, voća i povrća, je dodatno usložnjavao postupak zbog velikog sadržaja šećera, proteina, masti i pigmenata koji su negativno uticali na određivanje alkaloida. Zbog toga je bilo neophodno da se u procesu razvoja metode obrati pažnja na moguće interferencije iz matriksa.

Prema literaturnom pregledu do sada nisu razvijene metode za simultano određivanje tropanskih i glikoalkaloida u žitaricama i mahunarkama. Objavljene metode od strane Bucher i sar. (1989) i Papadoyannis i sar. (1993) određivanja nekih tropanski alkaloida se mogu okarakterisati jako dugim i komplikovanim postupkom pripreme uz visoku granicu detekcije. Autori su ekstrahovali hiosciamin i skopolamin iz stočne hrane koristeći dihlormetan kao ekstragens, a detekcija je izvođena pomoću HPLC-UV.

Da bi se postigla efikasna ekstrakcija veoma je bitna odgovarajuća selektivnost rastvarača. Izbor rastvarača u velikoj meri zavisi od fizičko-hemijskih osobina određivanih jedinjenja. Tropanski i glikoalkaloidi sadrže tercijarni amin koji je protonovan pri nižim vrednostima pH (Dräger 2002; Jensen 2008). Relativno visoka rastvorljivost tropanskih alkaloida u vodi omogućava selektivnu ekstrakciju isključujući masne supstance (Dräger 2002). S druge strane, rastvorljivost glikoalkaloida u vodi je ograničena (Jensen i sar., 2007). U ovom slučaju, optimizacija metode pripreme koja bi obezbedila efikasnu ekstrakciju obe grupe alkaloida uz odgovarajući prinos postaje veoma složena.

U objavljenim ekstrakcionim metodama određivanja tropanskih i glikoalkaloida u biljkama, obično su korišćene tečno-tečna ekstrakcija (LLE) (Xu i sar., 1995; Miraldi i sar., 2001) ili čvrsto-tečna ekstrakcija (SPE) (Balikova 2002; Chen i sar., 2006). Upotrebljavane su smeše različitih organskih rastvarača (metanol, acetonitril, dihlormetan itd.) i vode, u koje su često dodavane različite soli i kiseline (Eltayeb i sar., 2003/4; Matsuda i sar., 2004; Kodamatani i sar., 2005; Abreu i sar., 2007; Machado i sar., 2007). U ovom radu je po prvi put do sad, kao najoptimalniji rastvarač za ekstrakciju obe grupe alkaloid korišćena smeša 0.5 % mravlje kiseline u acetonitrilu/vodi (75:25, v/v). Takođe da bi se poboljšalo izdvajanje analita iz matriksa, smeša soli MgSO₄, NaCl, Na₂H-citrata šesthidrata i Na₃-citrata dihidrata

je dodavana uzorku nakon dodatka rastvarača. Pšenica je korišćena kao reprezentativna vrsta žitarica pri razvoju i optimizaciji ekstrakcione metode, a uzorci su analizirani pomoću HPLC-MS/MS.

U toku razvoja metode, prva isprobana smeša kao ekstrakcioni rastvarač je podrazumevala upotrebu MeOH-0.25% H₃PO₄, pri čemu je korišćeno 5g uzorka i 20 ml rastvarača. Nakon dodatka rastvarača, smeša je mešana na mešaču 30 min, a potom centrifugirana 10 min. Dobijeni ekstrakt je filtriran i direktno injektovan u HPLC-MS/MS. Ekstrakciona procedura je izvođena sa uzorcima spajkovanim smešom standarda (tropanskih i glikoalkaloida) koncentracije 200 ng/g. Proračuni su izvođeni korišćenjem kalibracione krive koja je dobijena injektovanjem standarda pripremljenih u blank ekstraktu dobijenom istom ekstrakcionom procedurom. Primenjeni ekstrakcioni postupak je prouzrokovao prisustvo velike količine interferirajućih komponenti u ekstraktu i veoma nizak prinos (recovery) (oko 20 % za glikoalkaloide).

Pojedinačni koraci opisanog metoda ekstrakcije su optimizovani korišćenjem obeleženog ¹⁴C atropina. Jedinstvena prednost radioizotopa je u njihovom ponašanju u prirodnoj sredini (npr. vodi, zemljistu, biljkama) koje je identično ponašanju njihovog stabilnog izotopa. Takođe, oni mogu biti identifikovani veoma lako sa visokom osetljivošću zbog njihove radioaktivnosti, čak i u nečistim ekstraktima (Aysal i sar., 2007). Korišćenje atropina ¹⁴C je omogućilo praćenje efikasnosti svakog pojedinačnog ekstrakcionog koraka. U Tabeli 2 je prikazan proces optimizacije ekstrakcionog postupka korišćenjem atropina ¹⁴C. U optimizaciji ekstrakcionog rastvarača su korišćene smeše različitog odnosa acetonitrila (ACN) i vode, sa i bez dodatka kiselina i amonijum formata.

Tabela 1. Prinos (R) atropina ¹⁴C u spajkovanim uzorcima pšenice i soje prilikom optimizacije ekstrakcionog postupka (voda/rastvarač/kiselina) i prečišćavanja ekstrakta.

Rastvarač % (v/v)	Pšenica*		Soja		
	Ekstrakcija R (%)	Celi proces	Ekstrakcija	Prečišćavanje sa MSPD C ₁₈	Celi proces
ACN (50)	82 ± 12	81 ± 3			
ACN/CH ₂ O ₂ (50 + 0.5)	56 ± 9	52 ± 6			
ACN (75)	83 ± 5	81 ± 12			
ACN/CH ₂ O ₂ (75 + 0.25)	85 ± 5	81 ± 11			
ACN/CH ₂ O ₂ (75 + 0.5)	94 ± 4	94 ± 2	93 ± 3	96 ± 5	95 ± 5
ACN/CH ₂ O ₂ (90 + 1)	88 ± 3	87 ± 9			
ACN (100)	42 ± 3	25 ± 3			

* Uzorci su analizirani pomoću LSC (prinos ± SD, n=3).

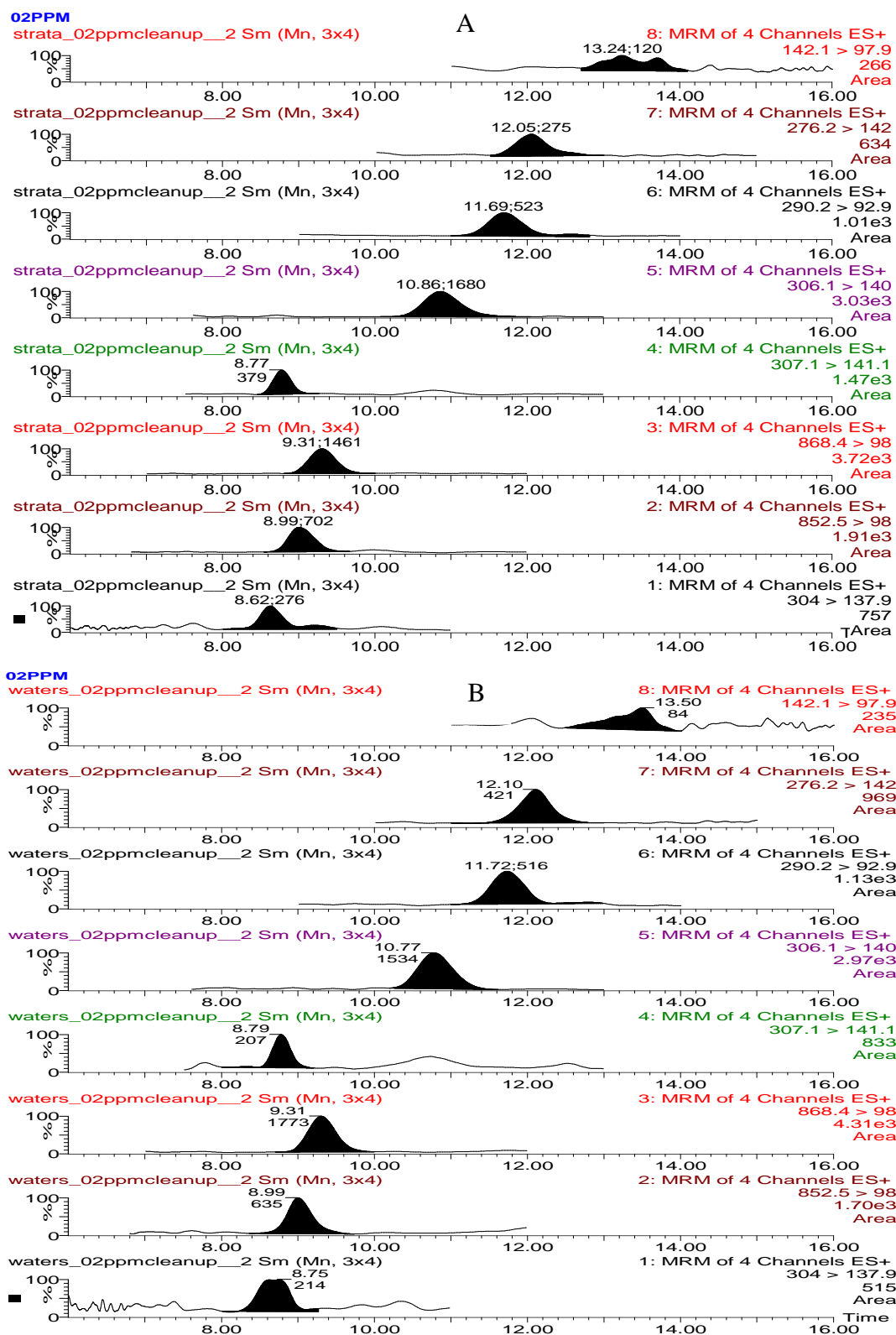
Postupak prečišćavanja ekstrakata disperzivnom ekstrakcijom na čvrstoj fazi uz dodatak soli je prethodno korišćen u analitici pesticida pri anlizi uzoraka sa većim sadržajem masnih komponenti (Aysal i sar., 2007; Payá i sar., 2007). Osnovna uloga ovih soli ($MgSO_4$, $NaCl$, Na_2H -citrat šestihidrata i Na_3 -citrat dihidrata) je povećanje koeficijenta raspodele zbog smanjivanja rastvorljivosti u vodenoj fazi i poboljšavanje razdvajanja organske i vodene faze, obezbeđujući mogućnost većeg alikvota ekstrakta. Na taj način se poboljšava osetljivost metode i postižu niže granice kvantifikacije. Primenom navedenog postupka u spajkovanom uzorku pšenice je postignut prihvatljiv prinos od 78-106% potvrđujući visoku efikasnost ekstrakcionog metoda. Metod je uspešno primenjen za analizu ostalih žitarica bez značajnih promena u prinosu.

Table 2. Prinos alkaloida određen pomoću HPLC-MS/MS u spajkovanim uzorcima pšenice pri optimizaciji ekstrakcionog rastvarača, smeša vode/rastvarača/kiseline (prinos \pm SD, n=3).

Rastvarač % (v/v)	ACN 50	ACN/CH ₂ O ₂ 50 + 0.5	ACN 75	ACN/CH ₂ O ₂ 75 + 0.25	ACN/CH ₂ O ₂ 75 + 0.5	ACN/CH ₂ O ₂ 90 + 1	ACN 100
tropin	30 \pm 0	45 \pm 3	18 \pm 4	36 \pm 4	82 \pm 4	74 \pm 6	81 \pm 6
homatropin	116 \pm 2	94 \pm 4	97 \pm 3	58 \pm 7	108 \pm 2	109 \pm 6	100 \pm 6
atropin	112 \pm 2	93 \pm 4	106 \pm 3	57 \pm 4	108 \pm 3	101 \pm 6	90 \pm 4
skopolamin	114 \pm 3	76 \pm 5	113 \pm 4	72 \pm 5	107 \pm 4	102 \pm 4	105 \pm 4
anisodamin	84 \pm 3	65 \pm 2	70 \pm 5	52 \pm 5	108 \pm 5	78 \pm 3	83 \pm 5
α -solanin	73 \pm 4	65 \pm 4	16 \pm 6	33 \pm 3	84 \pm 4	29 \pm 4	30 \pm 1
α -kakonin	118 \pm 2	76 \pm 8	80 \pm 4	58 \pm 7	107 \pm 2	49 \pm 4	36 \pm 4

Dalje prečišćavanje ekstrakta uzoraka pšenice, raži i kukuruza, nije bilo neophodno što se potvrdilo izgledom hromatograma. Ekstrakti soje i lanenog semena su sadržavali značajne količine masnih komponenti tako da je bilo neophodno dalje prečišćavanje.

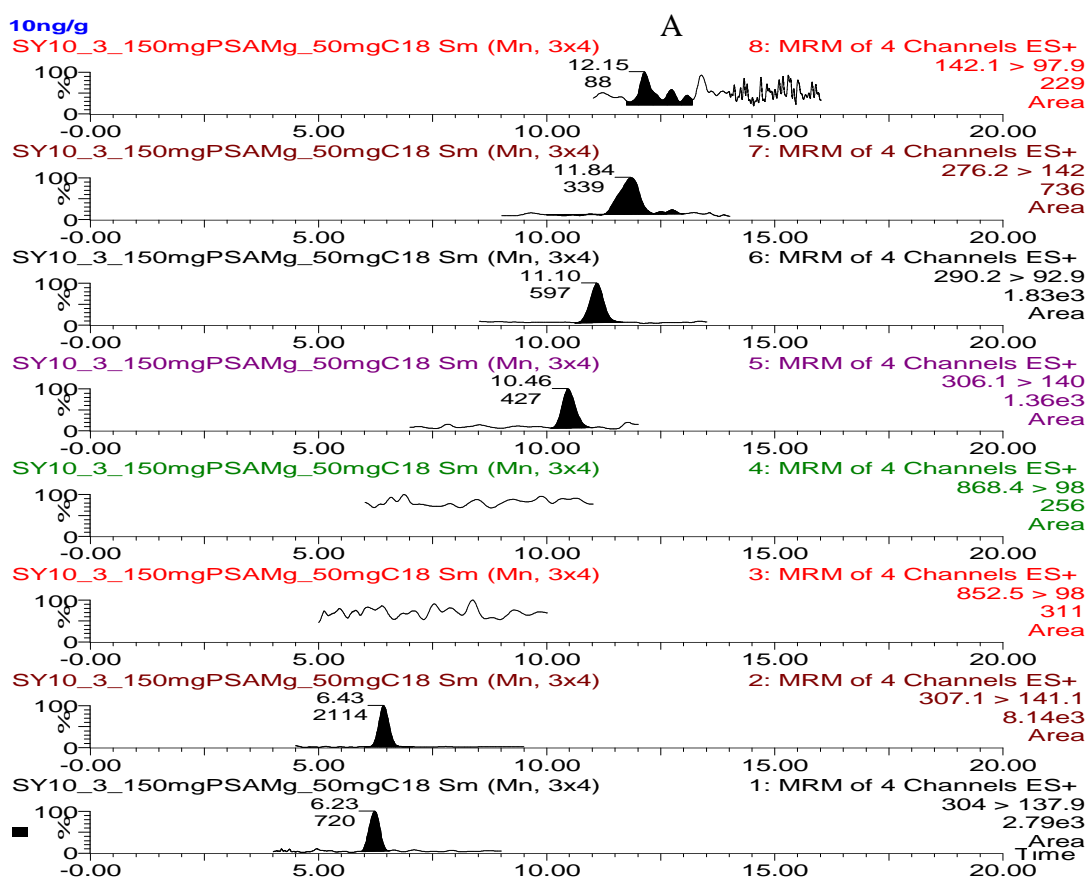
Optimizacija druge faze prečišćavanja ekstrakta je izvedena spajkovanjem matriksa sa standardnom smešom alkaloida koncentracije 0.16 μ g/ml, koja je odgovarala koncentraciji od 40 ng/g alkaloida u žitaricama. Za dodatno prečišćavanje ekstrakata soje i lanenog semena su primenjeni SPE kertridži (ekstrakcija na čvrstoj fazi) i to hidrofilno-lipofilno reverzno-fazni (Oasis, HLB, 200 mg) i polimerni reverzno-fazni (Strata-X 33 μ , 500 mg). Rezultati su pokazali nizak prinos tropina, skopolamina, α -solanina, α -kakonina i unutrašnjeg standarda scopolamina-d₃ (Slika 18). Na Slici 18 se može primetiti da su abundance smanjene za navedene alkaloidne. Odziv određivanja jedinjenja je bio jako nizak (blizu LOQ), dok je za tropin bio ispod LOQ metoda. Ovo može biti posledica nedovoljnog prečišćavanja matriksa pomoću kertridža kao i nepotpunog eluiranja suspcijansi iz kertridža.

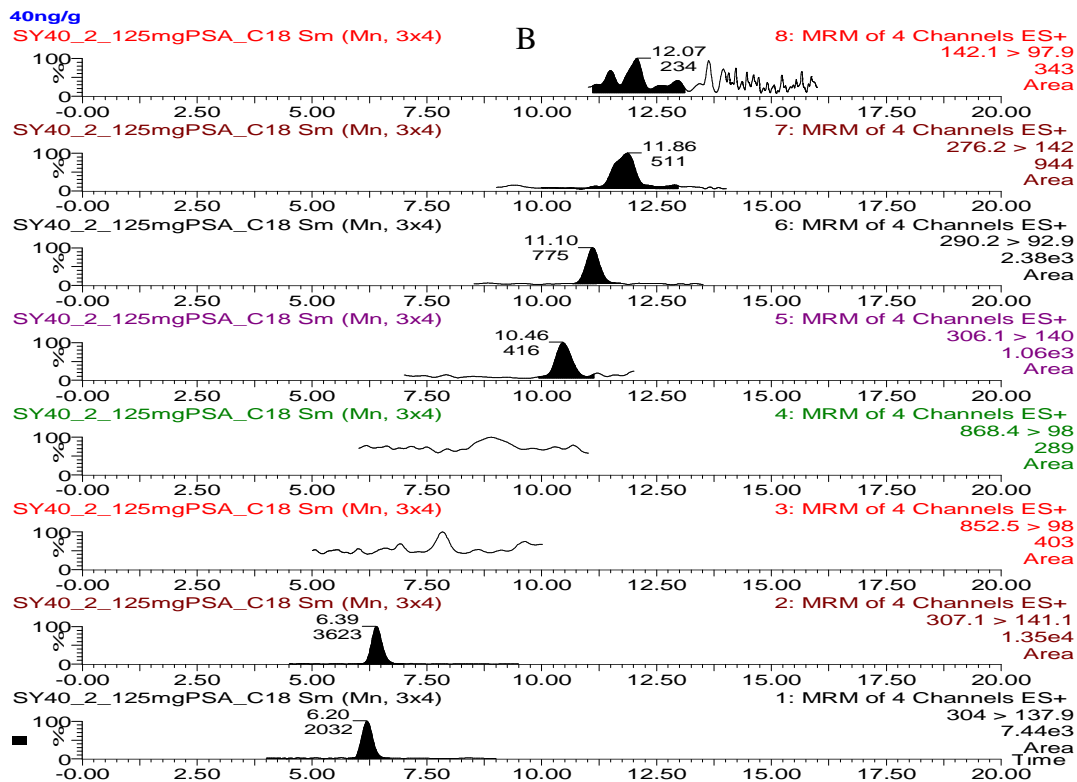


Slika 18. Hromatogrami ekstrakta soje prečišćenih pomoću Strata-X (A) i Oasis-HLB (B) kertridža. Od vrha ka dnu: tropin, homatropin, atropin, anisodamin, scopolamin-d₃, α-solanin, α-kakonin i skopolamin.

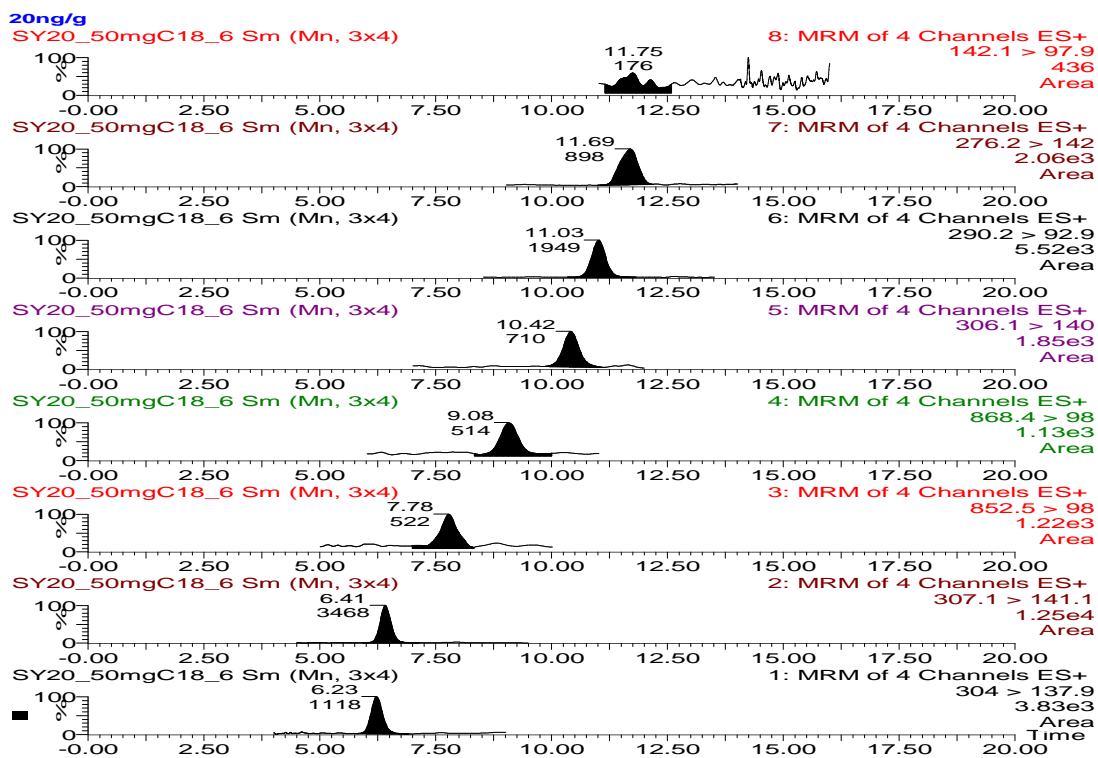
S obzirom da ekstrakcija na čvrstoj fazi nije obezbedila dovoljno prečišćavanje ekstrakata soje i lana, primenjene su različite kombinacije soli i ekstrakcionih čvrstih faza koje

su uključile i primarni sekundarni amin (PSA) u postupku disperzivne ekstrakcije na čvrstoj fazi. Prečišćavanje ekstrakta sa $MgSO_4$ i PSA je uzrokovalo vrlo loš prinos ekstrakcije glikoalkalida, najverovatnije usled njihove adsorpcije na solima svojim ugljenohidratnim delom (Slika 19). Primenom samo C-18 sorbenta postignuto je uklanjanje masnih komponenti i prinos preko 60% svih alkaloida. Na Slici 20 je prikazan hromatogram dobijen nakon prečišćavanja matriksa sa C-18 sorbentom za nivo koncentracije od 20 ng/g. Može se primetiti da je odziv signala za većinu jedinjenja bio 2-3 puta veći nego odziv kad su se koristili kertridži iako je koncentracija alkaloida bila dva puta viša. Prečišćavanje ekstrakta primenom disperzivne ekstrakcije na čvrstoj C-18 fazi je omogućilo optimizovanje metoda u cilju postizanja što nižeg nivoa kvantifikacije. U ovom slučaju, DSPE sa C-18 materijalom je omogućila brzo i efikasno prečišćavanje ekstrakta uzoraka bez dodatnog utroška vremena za prečišćavanje ekstrakta, kodincioniranje i eluiranje analita, što je neophodno u slučaju kada se koriste SPE kertridži.





Slika 19. Hromatogrami uzoraka soje prečišćenih pomoću smeše soli MgSO₄, PSA i C18 (A) i smeše PSA i C18 (B). Od vrha ka dnu: tropin, atropin, homatropin, anisodamin, α-solanin, α-kakonin, scopolamin-d₃ i skopolamin.



Slika 20. Hromatogrami uzoraka soje prečišćenih pomoću C18 materijala. Od vrha ka dnu: tropin, homatropin, atropin, anisodamin, α-solanin, α-kakonin, scopolamin-d₃ i skopolamin.

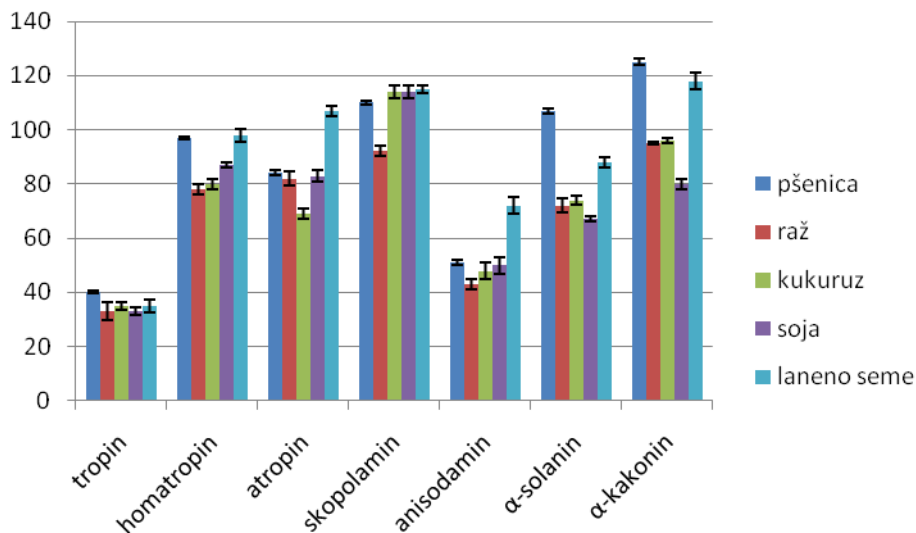
4.2. Uticaj matriksa na proces analize

Nepoželjne komponente matriksa mogu da se izdvoje u toku procesa ekstrakcije i da povećaju ili smanje intenzitet signala jona analita i na taj način utiču na reproduktivnost i tačnost metode (Mastuzewski i sar., 2003). Da bi se procenio uticaj matriksa na maseno spektrometrijsku detekciju određivanih analita, blank ekstrakti pšenice, raži, kukuruza, soje i lanenog semena su spajkovani sa smešom alkaloida u 7 različitih koncentracionih nivoa u opsegu od 2.5 do 80 ng po g matriksa uz dodatak 40 ng/g internog standarda u dva ponavljanja. Rezultati linearne kalibracije supstanci pripremljenih u blank matriksu (nagib krive korigovan za interni standard) su poređeni sa rastvorima supstanci pripremljenim u mobilnoj fazi B. Kalibraciona kriva je konstruisana definisanjem odnosa intenziteta signala (povišina pika) analita i internog standarda (skopolamin-d₃) i koncentracije analita.

Proračun povećanja/smanjenja signala (SSE - signal suppression/enhancement) je izvođen koristeći sledeću formulu (Sulyok i sar., 2006):

$$\text{SSE (\%)} = 100 \times \text{nagib}_{\text{standardi u ekstraktu}} / \text{nagib}_{\text{standardi u organskom rastvaraču}} \quad (3)$$

Rezultati su prikazani na dijagramu 1.



Dijagram 1. SSE u pšenici, raži, kukuruzu, soji i lanenom semenu.

Prikazani rezultati pokazuju da je matriks uticao na intenzitet signala određivanih analita najviše u slučaju tropina i anisodamina. Visoke varijacije signala od 100 % (smanjenje signala do 57% za anisodamin, 67% za tropin) pokazuju značajan uticaj komponenti matriksa na određivanje ovih analita. U ovom slučaju supstanca najniže molekulske mase (tropin) je

bila pod najvećim uticajem matriksa. Ovo može biti posledica ograničenog naelektrisanja molekula sa niskom molekulskom masom pri čemu se supstance iz matriksa jonizuju u većoj meri i prekrivaju jonizaciju određivanog analita. Ovo potvrđuje i prisustvo raznih abunantnih jona matriksa u niskom opsegu masenog spektra. Ipak zbog visokog odziva signala i odgovarajućeg prinosa, metod je još uvijek zadovoljavao najznačajnije analitičke parametre (linearnost, osetljivost, prinos) za ove komponente u analiziranom koncentracionom opsegu. Koristeći kalibraciju sa standardima pripremljenim u blank matriksu, metod se može koristiti za jako veliki broj različitih matriksa baziranih na žitaricama, semenkama i mahunarkama.

4.3. Optimizacija uslova određivanja tropanskih alkaloida pomoću GC–MS

4.3.1. Podešavanje rada masenog spektrometra

Za podešavanje rada masenog spektrometra, odnosno njegovu kalibraciju korišćena je standardna supstanca perfluorotributilamin. Startovanjem opcije „autotune“ koja se nalazi u sastavu softvera instrumenta ChemStation, automatski se proveravaju pojedini parametri i na kraju štampa izveštaj sa rezultatima. Vrednosti ocenjivanih parametara služe kao provera trenutnog stanja instrumenta i negove spremnosti za upotrebu. Rezultujuće optimalne vrednosti karakterističnih veličina autotune-a date su u Tabeli 6.

Tabela 6. Primer „autotune“ izveštaja

Misc Info: Perfluorotributilamine						
Instrument: 5975						
Ion Pol	Pos	Filament 1	DC Pol	Pos	Wid219 -0.003	Samples 8
Emission	34.6	Repeller 26.10	MassGain	-712	HEDEnab On	Averages 3
EIEnergy	69.9	IonFcus 90.2	MassOffs	-40	EMVolts 1750	Stepsize
MS Source	230	EntLens 22.0	AmuGain	1829	TurboSpd 100	
MS Quad	150	EntOffs 19.07	AmuOffs	118.1	HiVac Off	
PFTBA	Open					
Mass	Abund	Rel Abund	Iso Mass	Iso Abund	Iso Ratio	
69.00	347776	100.00	70.00	3789	1.09	
219.00	225728	64.91	220.00	10084	4.47	
502.00	29016	8.34	503.00	2965	10.22	

Prema dijagnostičkim kriterijumima napon detektora (elektronmultiplikatora) ukazuje na stanje celog masenog spektrometra, pri čemu je optimalna vrednost ovog napona 1500–

1800 V. Iz Tabele 6. se vidi da je napon elektronmultiplikatora iznosio 1750 V što je u okviru optimalnih vrednosti. Mase jona koji se posmatraju pri kalibraciji (69, 219 i 502) ne bi trebale da odstupaju od ovih vrednosti za više od ± 0.2 (HP5975 MS ChemStation Handbook). Relativne abundance ovih jona takođe odgovaraju dijagnostičkim kriterijumima, odnosno abundanca jona mase 69 je najviša (relativna abundanca=100%), a relativne abundance pikova mase 219 i 502 su veće od 35%, odnosno 1%. Izotopski odnosi pikova mase 70, 220 i 503 takođe zadovoljavaju dijagnostičke kriterijume, odnosno vrednosti su im veoma bliske 1%, 4% i 10%, redom. Svi podaci koji se nalaze u autotune testu ukazuju da se instrument nalazio u optimiziranom stanju.

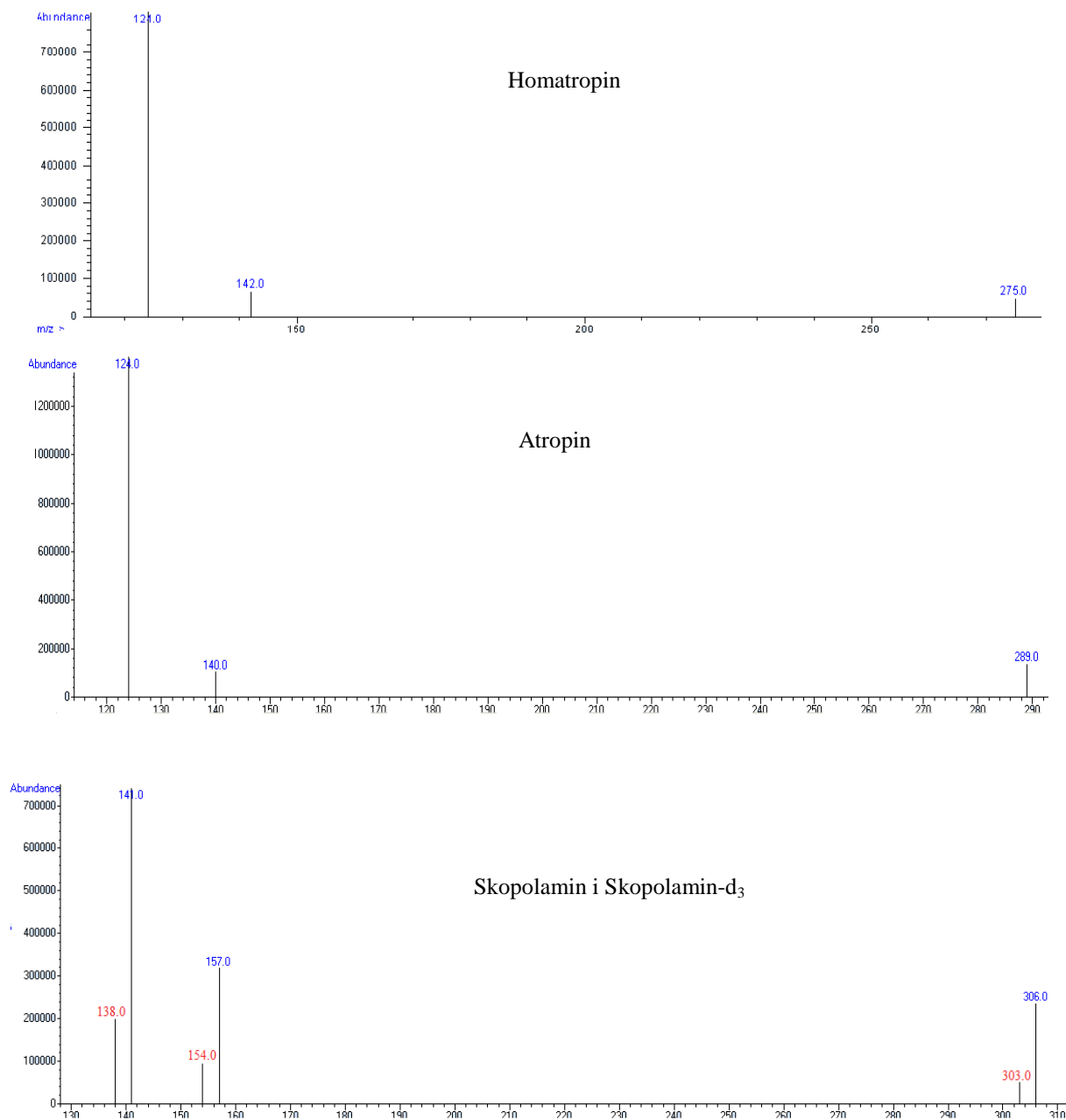
4.3.2. Optimizacija temperaturnog programa

Poteškoće u toku određivanja tropanskih alkaloida pomoću GC se javljaju zbog izlaganja jedinjenja visokim temperaturama u injektoru što može dovesti do njihovog raspadanja. Zbog toga se često vrši derivatizacija supstanci, najčešće sa silanima pri čemu se poboljšava toplotna stabilnost supstanci (Miraldi i sar., 2001; Namera i sar., 2002). Međutim proces derivatizacije je uglavnom jako dug, komplikovan, osetljiv na pojedine parametre kao što je temperatura i zahteva puno vremena da se optimizira. Uzimajući u obzir nedostatke alternativnih metoda derivatizacije i imajući u vidu činjenicu da je cilj ovoga rada bio razvoj jednostavne metode koja bi se mogla koristiti kao rutinska metoda za određivanje tropanskih alkaloida u prehrambenim proizvodima, pokušano je da se razvije i optimizira jednostavan postupak koji je isključio prethodnu derivatizaciju. Ovakav postupak je mnogo kraći i jeftiniji, radni uslovi su znatno blaži u odnosu na derivatizacione postupke, a razvijena metoda bi se mogla primeniti i za rad sa gasnim hromatografom sa FID detektorom.

Zbog visoke molekulske mase, glikoalkaloidi (α -solanin i α -kakonin), čak i njihovi aglikoni se teško određuju gasnom hromatografijom. Zbog male isparljivosti glikoalkaloidi se gasnom hromatografijom određuju uz prethodnu derivatizaciju ili nakon njihove hidrolize do aglikona, solanidina, pri čemu se proces njihovog određivanja usložnjava. Zbog nemogućnosti nabavke standarada solanidina, određivanje glikoalkaloida nije izvedeno.

Maseni spektri snimljeni injektiranjem standarda pojedinačnih tropanskih alkaloida pripremljenih u etilacetatu (5 $\mu\text{g/ml}$) su poređeni sa komercijalnom bazom podataka NIST i prikazani su na Slici 29. Standardi su pripremani razblaživanjem rastvora pojedinačnih analita (100 $\mu\text{g/ml}$) u metanolu. Masene spektre tropanskih alkaloida karakteriše prisustvo

molekulskog jona i jona koji nastaje kao rezultat gubitka tropanskog prstena (m/z 124 za atropin i homatropin, 138 za skopolamin i 141 za skopolamin- d_3).



Slika 29. Maseni spektri tropanskih alkaloida dobijeni pomoću GC-MS

Razdvojene komponente su skenirane u određenim vremenskim periodima sa jonima karakterističnim za svaki analit što je prikazano u Tabeli 6.

Tabela 6. MS akvizicioni parametri

<i>Analit</i>	<i>Vreme početka skeniranja (min)</i>	<i>(m/z)</i>			<i>Vreme skeniranja (s)</i>
homatropin	6.25	275	142	124	0.09
atropin	8.30	289	140	124	0.09
skopolamin	8.70	303	154	138	0.07
skopolamin-d ₃	8.70	306	157	141	0.07

S obzirom na osetljivost supstanci na visoke temperature, neophodno je bilo posebnu pažnju posvetiti optimizaciji uslova hromatografskog razdvajanja tropanskih alkaloida, odnosno definisanju optimalnog temperaturnog programa, u cilju dobijanja potpuno razdvojenih pikova. Protok gasa u toku razvoja metode je održavan konstantan.

Osnova za optimizaciju temperaturnog programa bila su prethodna istraživanja, odnosno prethodno definisan temperaturni program za određivanje nekih tropanskih alkaloida (Vitale i sar., 1995):

- temperatura injektora: 250°C,
- početna temperatura: 60 °C (1 min),
- porast temperature: 10 °C/min i
- krajnja temperatura: 290°C (5 min).

Optimizacija temperaturnog programa je izvedena korišćenjem smeše tropanskih alkaloida (tropina, homatropina, atropina, hiosciamina, skopolamina i skopolamina-d₃) pripremljenih u etilacetatu, koncentracije 5 µg/ml. Ova smeša je pripremljena razblaživanjem rastvora pojedinačnih analita (100 µg/ml) u metanolu.

Analize su izvedene SCAN i SIM tehnikom pri sledećim uslovima:

- vreme kašnjenja zbog rastvarača (solvent delay time): 6.25 min,
- vreme uravnoteženja uslova rada gasnog hromatografa između analiza: 0.30 min,
- raspon snimanih masa: 50–550 a.m.u.,
- brzina skeniranja: 1.19 scan/s,
- temperatura masenog jonizatora (MS Source): 230°C,
- temperatura masenog kvadrupola (MS Quad): 150°C.

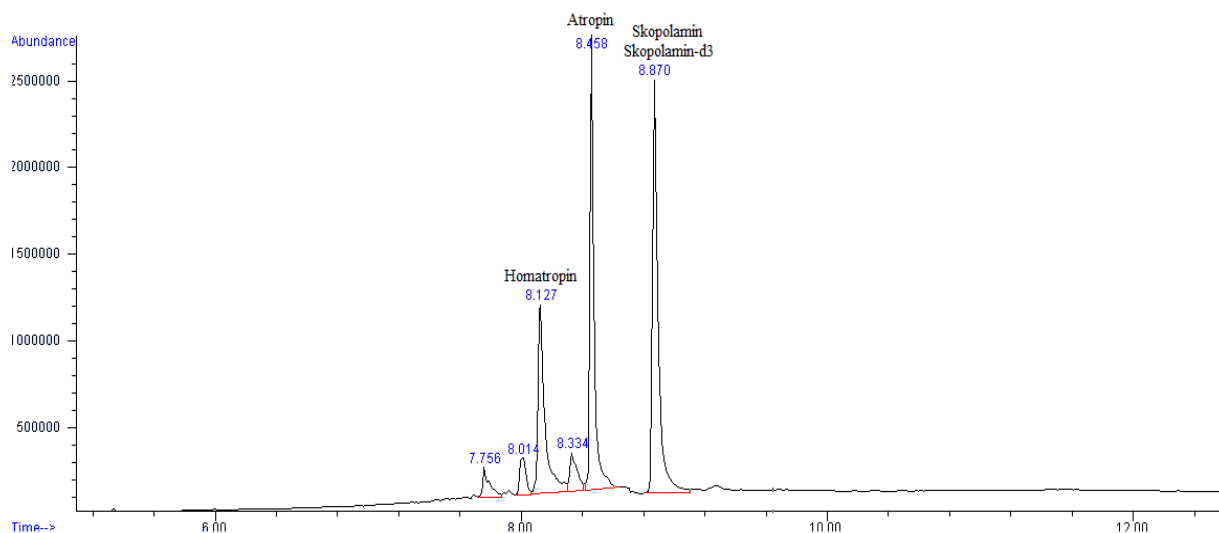
Korišćenjem ovog temperaturnog programa nije postignuto zadovoljavajuće razdvajanje analita pa su isprobani i drugi temperaturni programi. Ispitivanjem različitih temperaturnih programa, ustanovljeno je da se dobro razdvajanje (4 iz smeše od 6) komponenata tropanskih alkaloida, dobija primenom sledećeg temperaturnog programa:

- temperatura injektora: 230°C,

- početna temperatura: 50 °C (1.5 min),
- porast temperature: 40 °C/min,
- krajnja temperatura: 300°C (5 min) i
- vreme trajanja analize: 12.75 min.

U ovom slučaju nije postignuto razdvajanje izomera atropina kao ni detekcija tropina i anisodamina. U slučaju tropina i anisodamina pretpostavljeno je da je došlo do njihovog raspada u injektoru. Pokušano je da se smanji temperatura injektora i vrši injektiranje supstanci pojedinačno. Ovaj postupak nije omogućio detekciju tropina i anisodamina, dok su abundance ostalih analita bile smanjene. Pošto je odziv i razdvajanje ostalih komponenti bilo zadovoljavajuće zadržan je opisani temperaturni program pri daljoj optimizaciji metode. Skopolamin i skopolamin-d₃ (interni standard) takođe nisu razdvojeni ali to nije predstavljalo problem jer oni prilikom fragmentacije daju različite karakteristične produkt jone (skopolamin (303, 154 i 138), skopolamin-d₃ (306, 157 i 141)). U slučaju izomera atropina neophodno je bilo koristiti hiralnu kolonu.

Pri ovim uslovima postignuto je dobro razdvajanje određivanih tropanskih alkaloida i stoga je navedeni temperaturni program usvojen kao optimalan. Na Slici 30 je prikazan originalan zapis TIC dobijenog analizom standardne smeše sa 4 komponente.



Slika 30. TIC hromatogram standardne smeše tropanskih alkaloida (5 µg/ml)

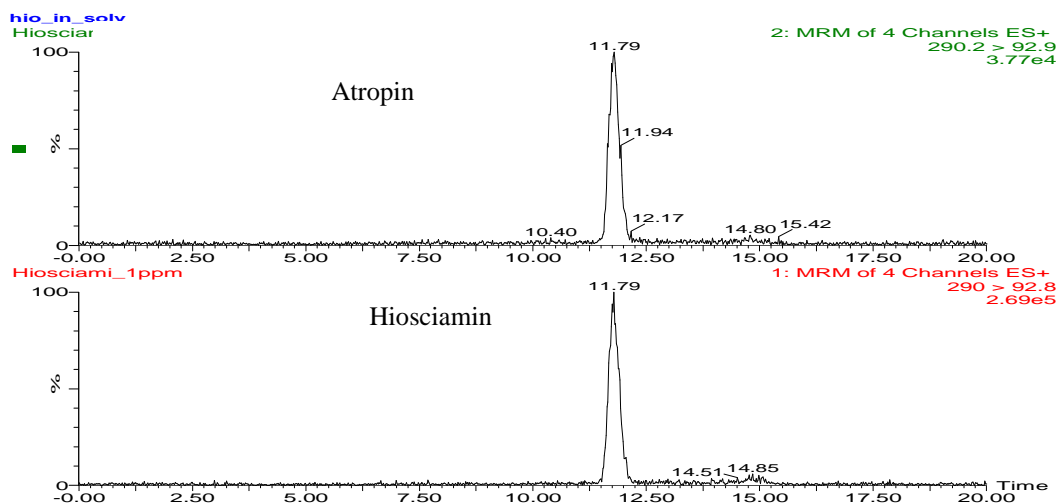
4.4. Optimizacija uslova određivanja tropanskih i glikoalkaloida pomoću HPLC-MS/MS

4.4.1. Optimizacija hromatografskog razdvajanja

Tropanski i glikoalkaloidi su uspešno razdvajani na koloni sa C18 stacionarnom fazom. Korišćene su mobilne faze različitog sastava sa izokratskim i gradijentnim razdvajanjem (Xu i sar., 1995; Matsuda i sar., 2004; Chen i sar., 2006; Abreu i sar., 2007). Razdvajanje optičkih izomera atropina (d- i l-hiosciamina) je moguće upotrebom kolona sa hiralnim punjenjem. Enantioselektivnost uglavnom zavisi od tipa hiralne stacionarne faze i sastava mobilne faze. Razdvajanje d- i l-hiosciamina je postignuto na sledećim kolonama: Chirobiotic T2, Chirobiotic V, Chiral-AGP) (Cieri 2005; Breton i sar., 2005; Siluk i sar., 2007). Siluk i sar. (2007) su prikazali uspešno razdvajanje enantiomera atropina na Chirobiotic V koloni (25 cm) pomoću LC-MSD sa enantioselektivnom rezolucijom $\alpha = 1.07$ i vremenom trajanja analize od 30 min. Oni su takođe isprobali i druge kolone kao Chirobiotic T i Cyclobond I 2000 DNP, ali bez uspešnog razdvajanje enantiomera.

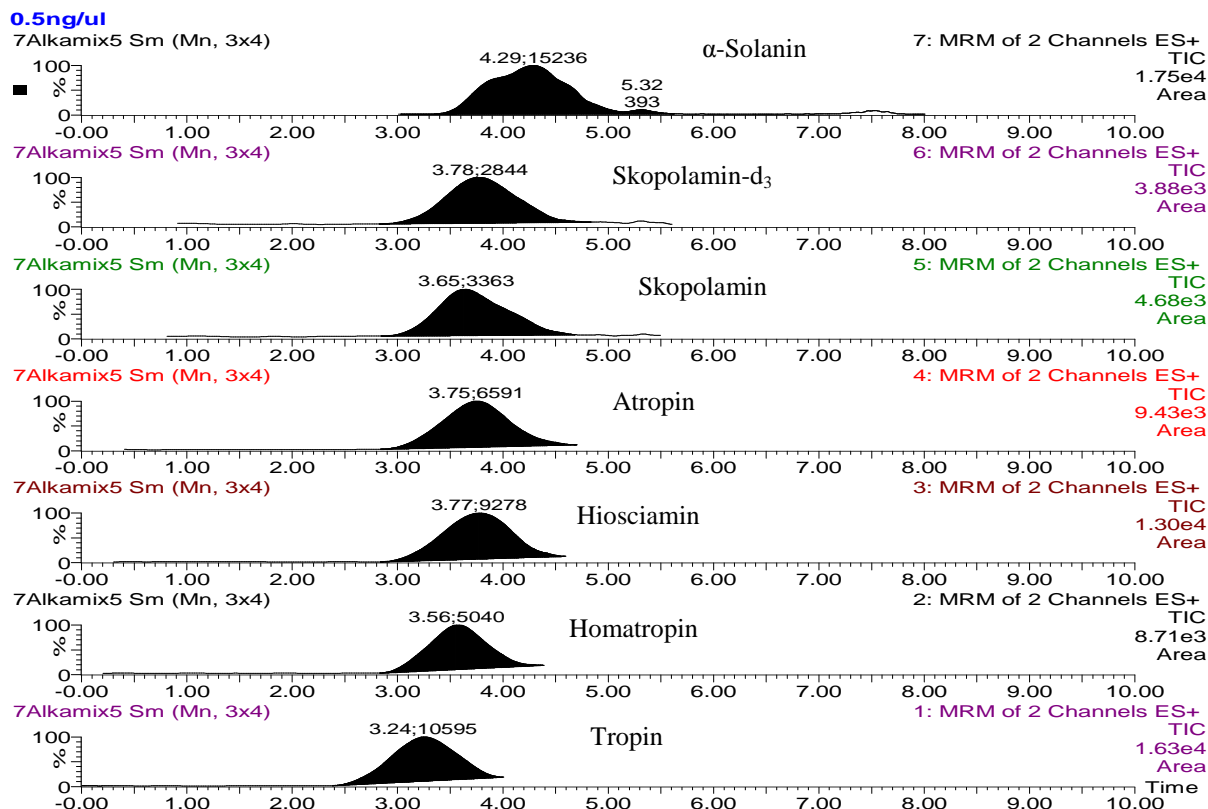
S obzirom na izuzetno složen cilj ovog istraživanja koji je podrazumevao razdvajanje hiralnih i nehiralnih supstanci, primenjena je Chirobiotic V kolona. Efikasnost razdvajanja je definisana pri upotrebi mobilnih faza različitog sastava organskih rastvarača i vode sa dodatkom kiselina i soli.

Razdvajanje d- i l-hiosciamina nije bilo postignuto ni pri jednom odnosu ispitane smeše trietilamina (TEA i sirćetne kiseline (HOAc) (TEA:HOAc=1:1, 1:2, 1:3, 1:4, i obrnuto) a ukupno 1 ml u metanolu (100%). Na Slici 21 su prikazani hromatogrami injektirane smeše hiosciamina i atropina za jone 92.9 (atropin) i 92.8 (hiosciamin). Takođe je primećeno da su intenziteti signala (abundance) drugih određivanih jedinjenja u poređenju sa drugim mobilnim fazama bili smanjeni u MS, verovatno usled baznih osobina trietilamina.

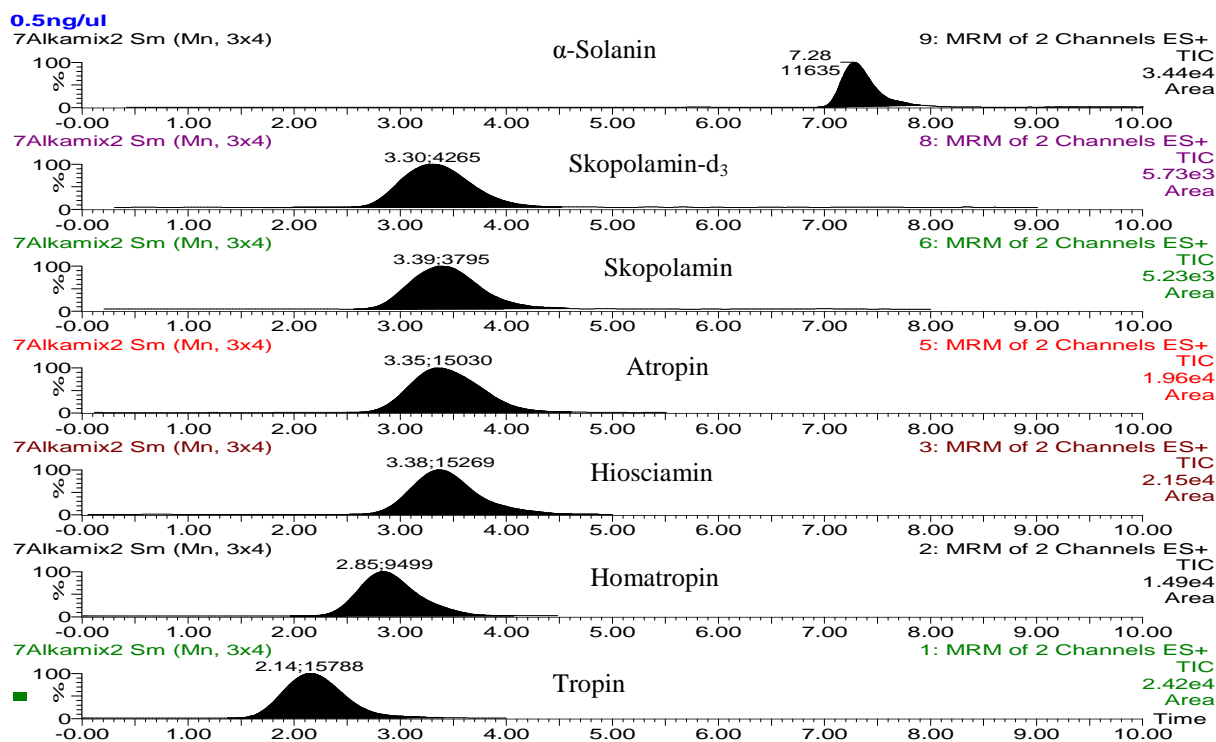


Slika 21. Hromatogrami atropina i hiosciamina na Chirobiotic V koloni pri neoptimizovanim uslovima koji ne omogućavaju njihovo razdvajanje

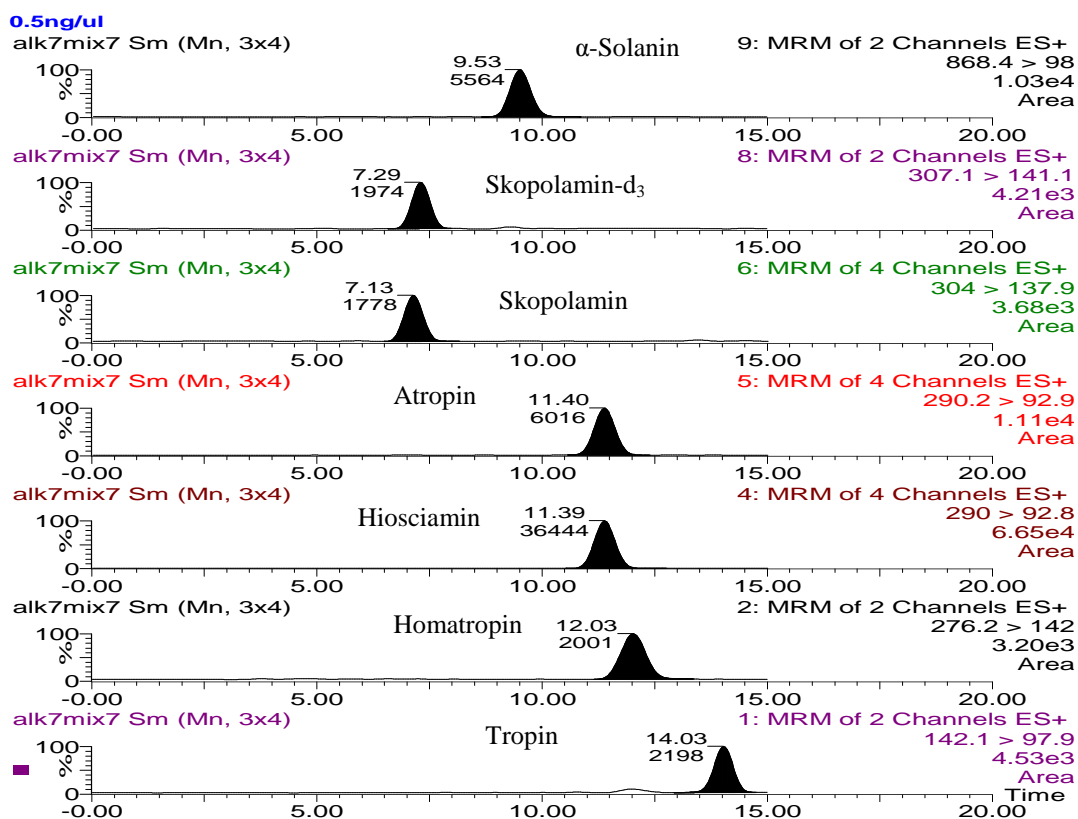
S ciljem razdvajanja dva enantiomera, kao i ostalih alkaloida, ispitane su i druge mobilne faze: acetonitril/voda=65/35 (v/v) (1), metanol/voda=50/50 (v/v) (2), 0.1 i 1 % mravlja kiselina u metanolu/voda=70/30 (v/v) (3), 1% sirćetna kiselina pripremljena u acetonitril/metanol/voda=60/30/10 (v/v) (4), 10 mM amonijum format u vodi/metanol=50/50 (v/v) (5), 20 mM amonijum format u vodi/metanol=50/50 (v/v) (6) i 10 mM amonijum formata u voda/acetonitril=90/10 (v/v) (rastvarač A) i metanol/acetonitril=50:50 (v/v) (rastvarač B) (7). Korišćenjem mobilnih faza 1-3 i 6 nije postignuto efikasno razdvajanje tropanskih i glikoalkaloida (Slika 22), dok je upotrebom mobilnih faza 4 i 5 dobijeno razdvajanje ove dve grupe alkaloida ali ne i razdvajanje svih analita (Slika 23). Korišćenjem mobilne faze 7 je postignuto hromatogramfsko razdvajanje svih određivanih alkaloida izuzev enantiomera atropina (Slika 24). Može se primetiti da kisela sredina (mobilne faze pripremljene sa dodatkom kiselina) nije bila pogodna pri optimizaciji razdvajanja ove dve grupe alkaloida.



Slika 22. Hraomatografsko razdvajanje smeše tropanskih i glikoalkaloida upotrebom mobilne faze metanol/voda=50/50

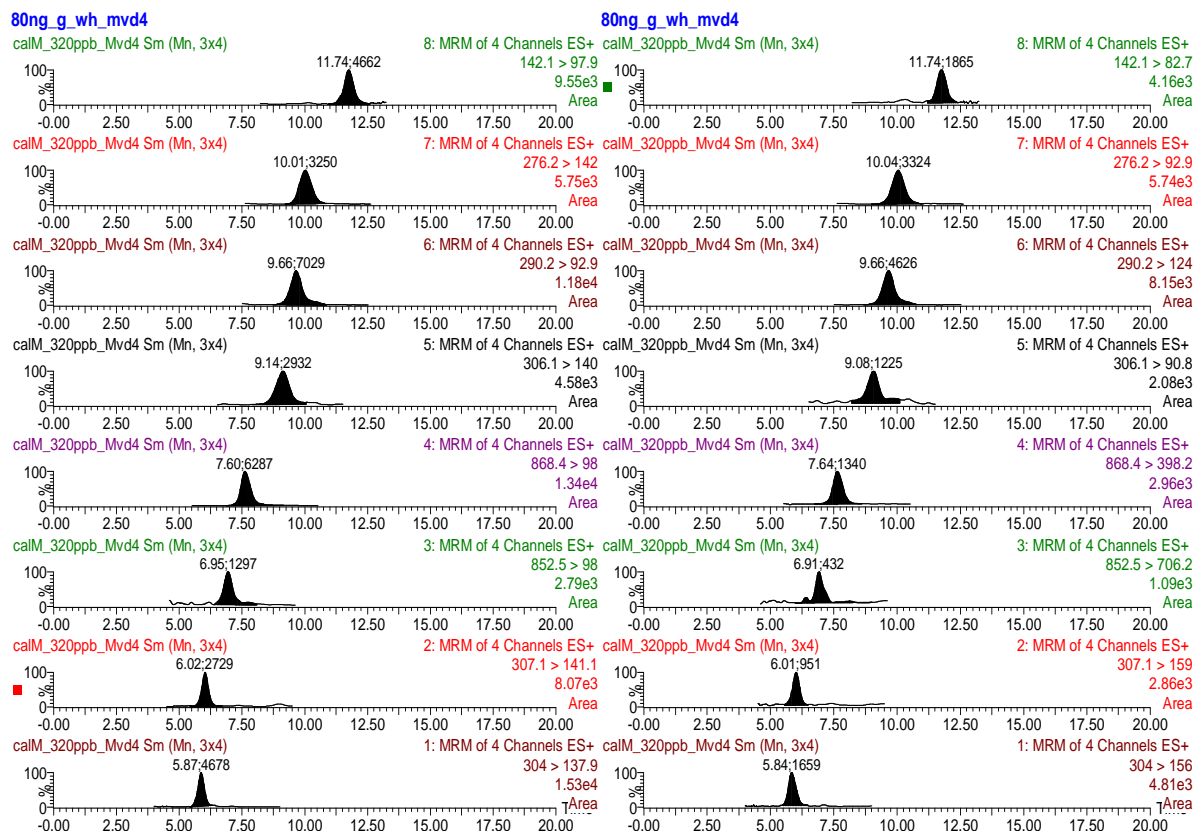


Slika 23. Hraomatografsko razdvajanje smeše tropanskih i glikoalkaloida upotrebom mobilne faze 10 mM amonijum format u vodi/metanol=50/50 (v/v)



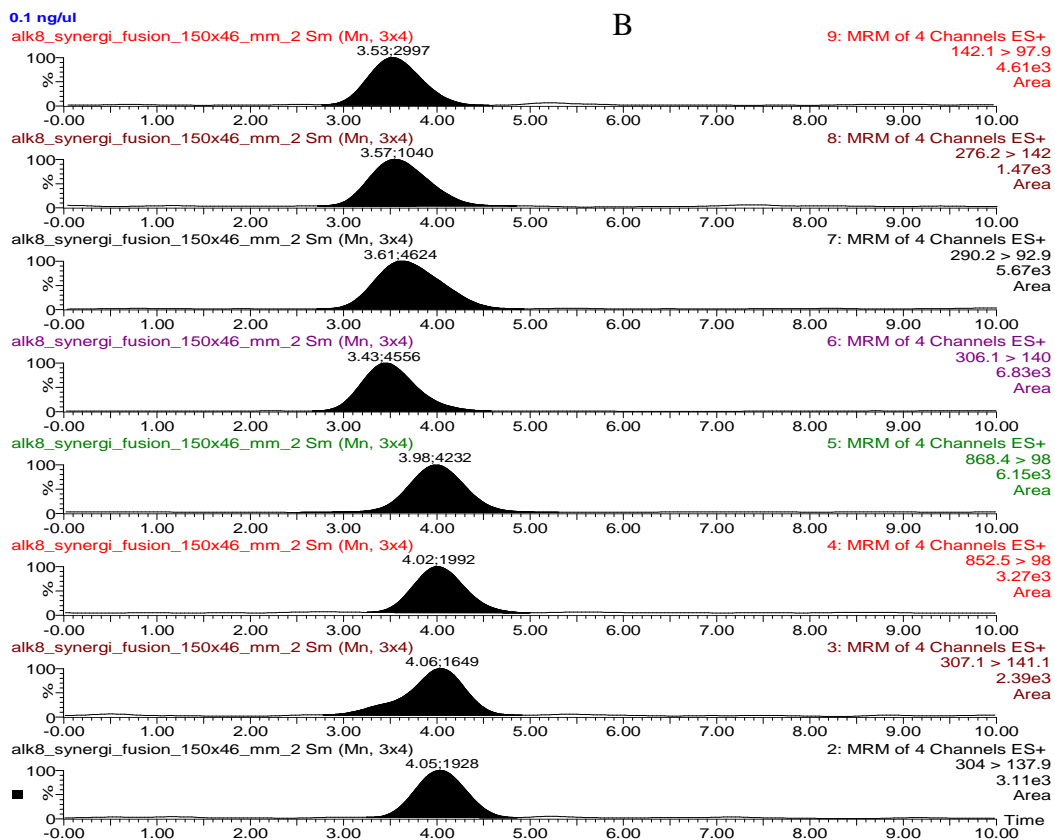
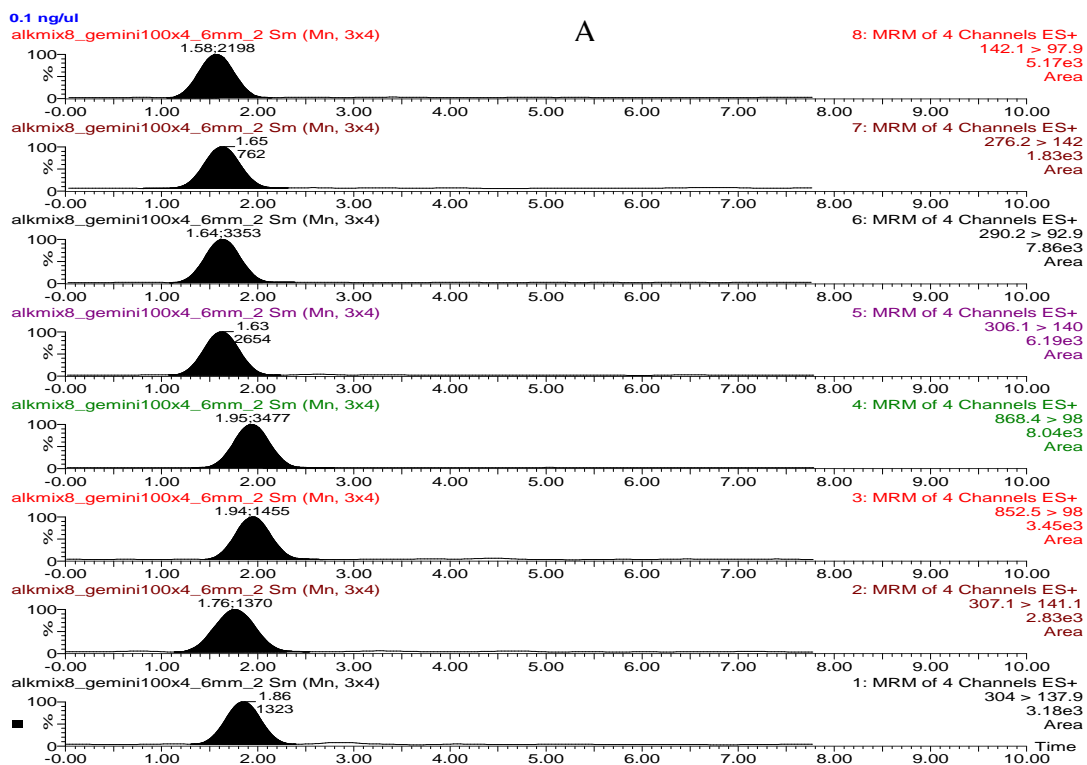
Slika 24. Hraomatografsko razdvajanje smeše tropanskih i glikoalkaloida upotrebom mobilne faze 10 mM amonijum formata u voda/acetonitril=90/10 (v/v) (rastvarač A) i metanol/acetonitril=50:50 (v/v) (rastvarač B)

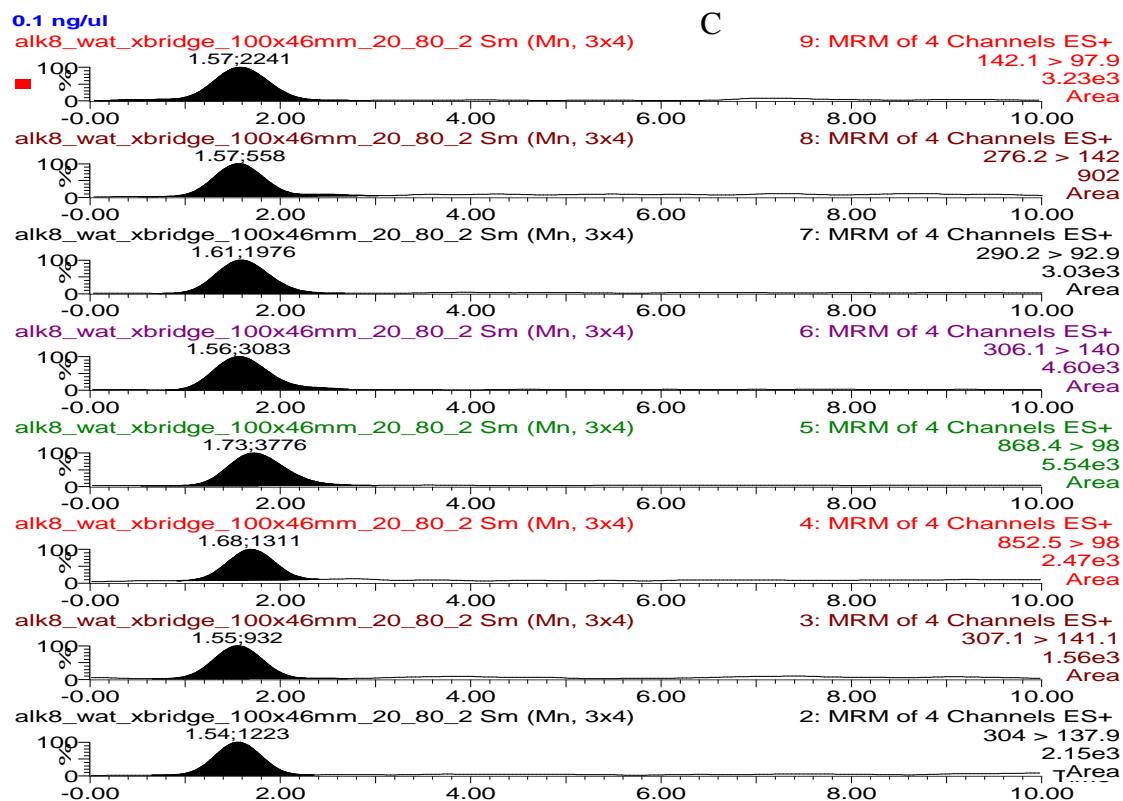
Mobilna faza, sastavljena od 10 mM ammonium formata (kao jonizacionog reagensa) u smeši voda/acetonitril i metanol/acetonitril je omogućila dobro razdvajanje ostalih određivanih jedinjenja, visoku osetljivost ali bez separacije enantiomera atropina. Ova mobilna faza je korišćena u daljoj optimizaciji metode. Zbog nemogućnosti razdvajanja enantiomera atropina u daljem razvoju analitičke metode korišćen je samo standard atropina. Optimizovani MRM hromatogram smeše alkaloida (80 ng/g) pri ESI⁺ HPLC-MS/MS je prikazan na Slici 25.



Slika 25. ESI⁺ HPLC-MS/MS MRM hromatogram fragmentiranih jona (2 produkt jona za svaki analit) dobijenih fragmentacijom određenih jedinjenja koncentracije 80 ng/g. Od vrha ka dnu: tropin, homatropin, atropin, anisodamin, α -solanin, α -kakonin, skopolamin-d₃ (IS) i skopolamin

Poznato je da su hiralne kolone mnogo skuplje od kolona sa C-18 punjenjem. Pošto nije postignuto uspešno razdvajanje enantiomera atropina, pokušano je optimizovati hromatografski metod primeniti na konvencionalnim C 18 kolonama različitih proizvođača (Phenomenex Gemini, Synergy Fusion-RP i Waters XBridge). Rezultati dobijeni na ovim kolonama su pokazali loše razdvajanje između pojedinačnih tropanskih i glikoalkaloida i smanjene abundance pikova. Hromatografsko razdvajanje tropanskih i glikoalkaloida koristeći C-18 kolone je prikazano na Slici 26.





Slika 26. Hroamtografskog razdvajanja tropanskih i glikoalkaloida na Gemini (A), Synergy Fusion-RP (B) i Xbridge (C). Od vrha ka dnu: tropin, homatropin, atropin, anisodamin, α -solanin, α -kakonin, skopolamin- d_3 i skopolamin.

Hiralne kolone su obezbedile znatno bolju osetljivost određivanja alkaloida u odnosu na sve tri ispitane C 18 kolone što se može objasniti specifičnošću supstanci koje se nalaze u sastavu hiralnog punjenja ovih kolona (macrociklični glikopeptidi ili β -ciclodextrini). Iako obezbeđuju veću osetljivost određivanja zbog ograničenog kapaciteta hiralne kolone su izuzetno osetljive na nedovoljno prečišćene injektirane uzorke kao i na sastav mobilne faze. Međutim u ovom radu, Chirobiotic V kolona je pokazala dobru stabilnost, dobro definisane pikove jedinjenja i robusnost koja se prvenstveno ispoljavala u nepromenjenoj osetljivosti u toku rada. Iz svih navedenih razloga je odlučeno nastaviti istraživanje sa ovom kolonom.

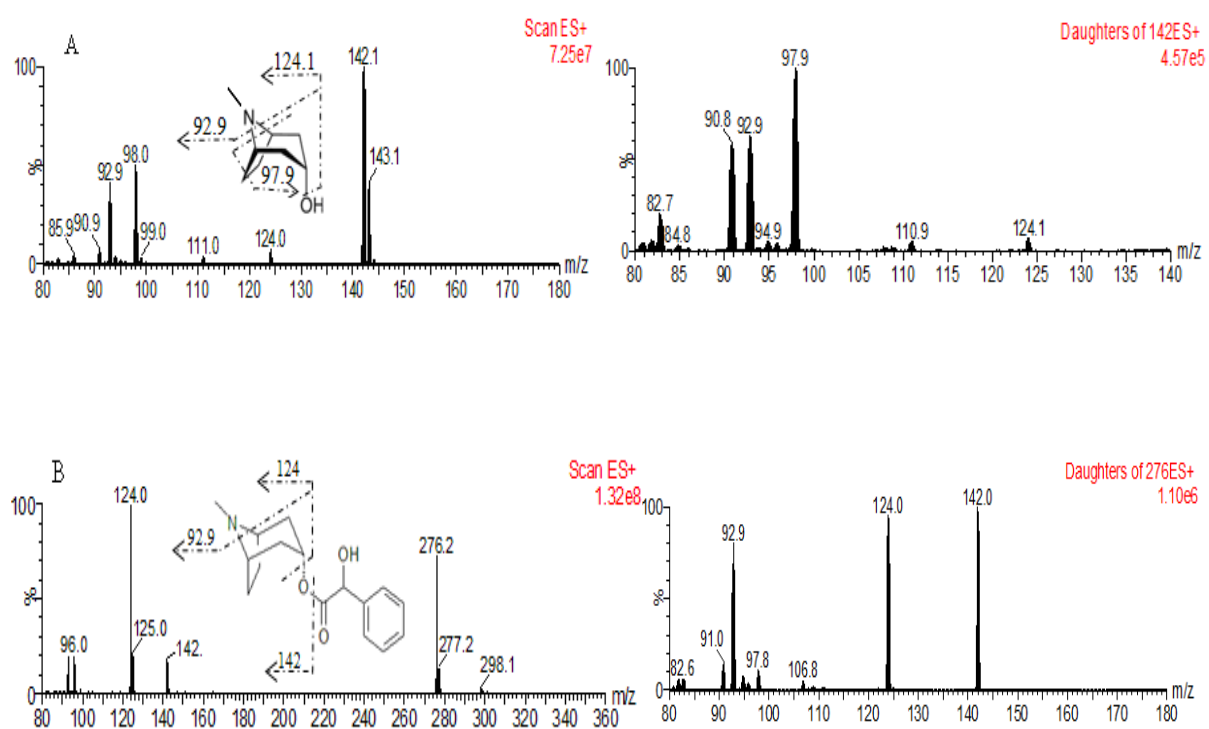
4.4.2. Optimizacija MS/MS

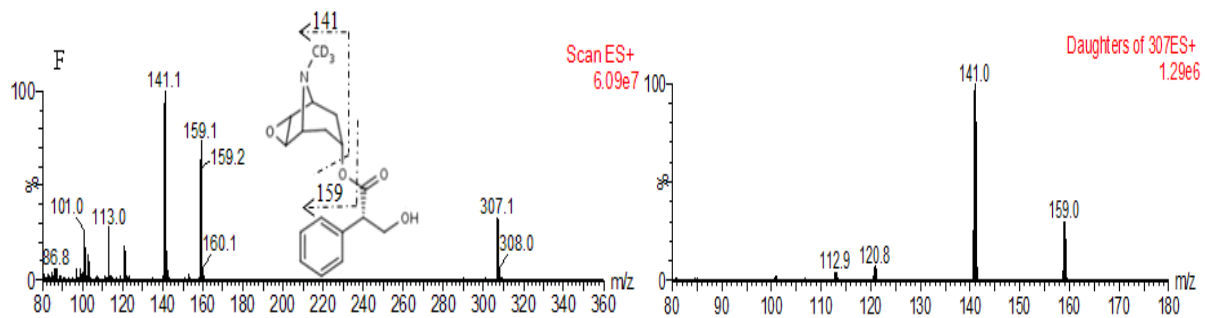
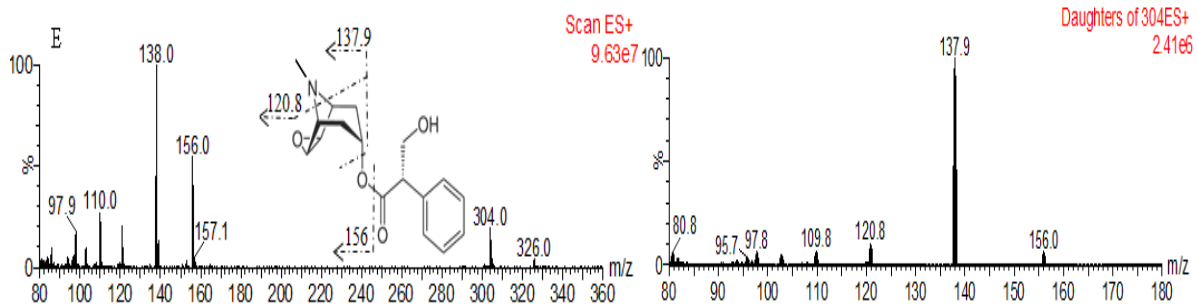
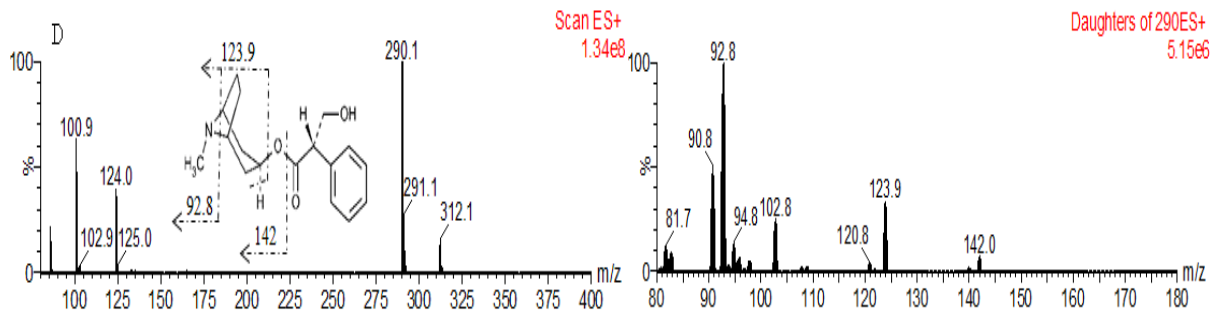
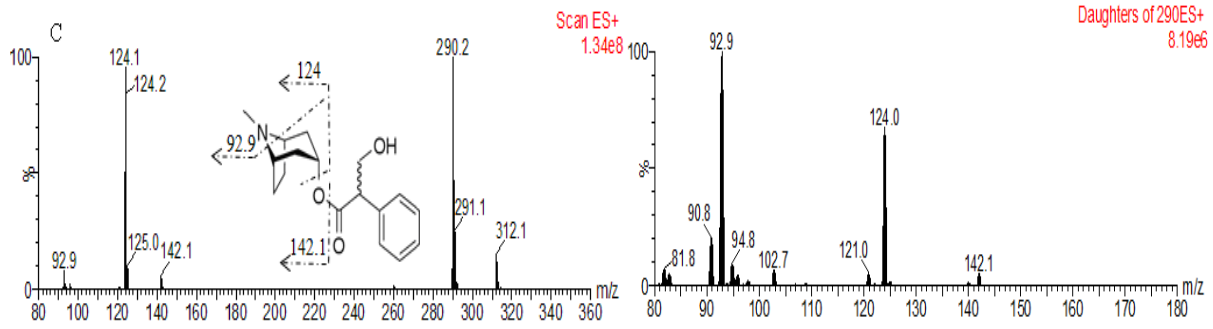
Maseno spektrometrijski uslovi (MRM) su optimizovani direktnim injektiranjem (infuzijom) kalibracionih standarda koncentracije 10 $\mu\text{g/ml}$ pripremljenih u metanolu u maseni spektrometar. Protok pri injektiranju je iznosio 30 $\mu\text{l/min}$. Određivane supstance su analizirane u oba elektrosprej moda: ESI^- i ESI^+ , da bi se optimizovali najpovoljniji uslovi jonizacije. Intenzivniji signali za sve analite su primećeni u ESI^+ nego u ESI^- .

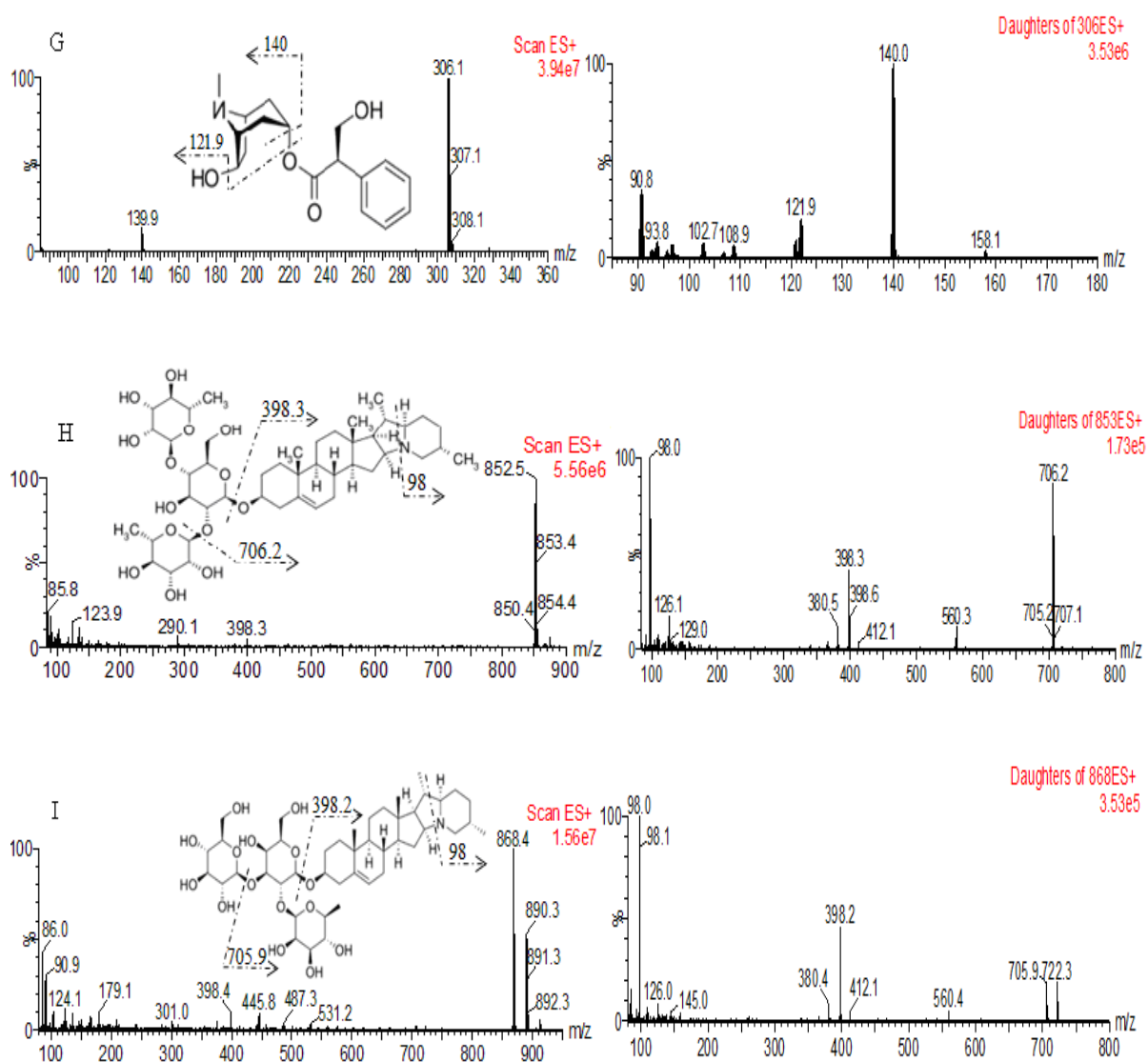
Optimizovani spektrometrijski uslovi su bili sledeći:

- Napon kapilare 2.99 kV,
- Ekstraktor 4 V,
- RF Lens 0.3 V,
- LM 1 Resolution 14.4,
- HM 1 Resolution 15.2,
- Ion Energy 1 0.2,
- Ulaz -1, izlaz 2,
- LM 2 Resolution 13.6,
- HM 2 Resolution 14.8,
- Ion Energy 2 0.7,
- Temperatura jonizatora 120 °C,
- Multiplikator 650 V,
- Desolvaciona temperatura 400 °C.

Na Slici 27 je prikazan maseni spektar dobijen nakon fragmentacije prekursor jona svih određivanih analita.







Slika 27. Maseno-maseni spektri (MS/MS) tropanskih alkaloida i glikoalkaloida analiziranih u elektrosprej modu (ES^+): tropin (A), homatropin (B), atropin (C), hiosciamin (D), skopolamin (E), skopolamin- d_3 (IS) (F), anisodamin (G), α -kakonin (H) i α -solanin (I)

MRM tranzicije sa optimizovanim parametrima za svaki analit su prikazane u Tabeli 3. Najstabilniji i najintenzivniji fragment je korišćen kao jon za kvantifikaciju, dok sledeći jon sa najvećom abundancom je korišćen za potvrdu jedinjenja (identifikacioni jon).

Tabela 3. MRM tranzicije sa optimizovanim parametrima

<i>Analit</i>	<i>Vreme (min)</i>	<i>Prekursor jon [M + H]⁺</i>	<i>Produkt jon (m/z)</i>	<i>Kon napon (V)</i>	<i>Koliziona energija (eV)</i>	<i>Vreme skeniranja (s)</i>
skopolamin	4.0 - 9.0	304	137.9 ^a	40	26	0.01
			156 ^b	40	17	0.01
skopolamin-d ₃	4.5 - 9.5	307.1	141.1 ^a	40	26	0.01
			159 ^b	40	16	0.01
α -kakonin	4.6 - 9.6	852.5	98 ^a	40	51	0.01
			706.2 ^b	40	44	0.01
α -solanin	5.5 - 10.5	868.4	98 ^a	54	60	0.05
			398.2 ^b	54	55	0.05
anisodamin	7.0 - 12.0	306.1	140 ^a	26	24	0.01
			90.8 ^b	26	27	0.01
atropin	8.6 - 13.6	290.2	92.9 ^a	45	32	0.05
			124 ^b	45	23	0.05
homatropin	9.0 - 14.0	276.2	142 ^a	39	21	0.05
			92.9 ^b	39	35	0.05
tropin	10.5 - 15.5	142.1	97.9 ^a	37	23	0.01
			82.7 ^b	37	22	0.01

^a kvantifikacioni jon^b kvalifikacioni jon

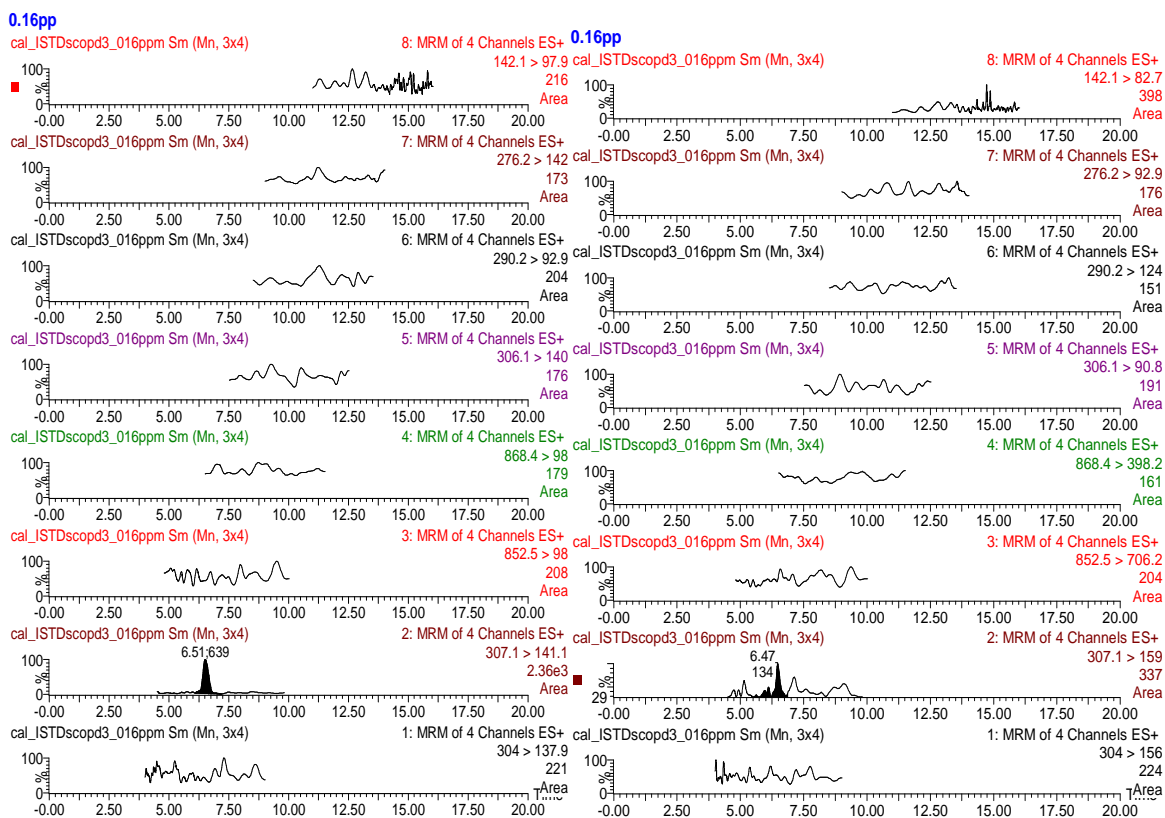
4.5. Validacija metode

4.5.1. Selektivnost i specifičnost

Selektivnost i specifičnost metoda su određeni analiziranjem ekstrakta uzoraka (pšenica, raž, kukuruz, soja i laneno seme). Kod retencionog vremena karakterističnog za određivane analite nisu primećeni dodatni pikovi koji bi mogli poticati od matriksa. Selektivnost analitičkog postupka je ispitana identifikacijom analita u uzorku, baziranoj na prekursor jonu, produkt jonima (kvantifikacionom i kvalifikacionom) i retencionom vremenu, poređenjem sa injektovanim standardima.

U spajkovanim uzorcima selektivnost je dalje testirana integraljenjem kvantifikacionog i kvalifikacionog jona pojedinačno za svaki analit. Nivo tolerancije od $\pm 20\%$ je bio usvojen za praćenje odnosa intenziteta signala kvantifikacionog i kvalifikacionog jona za svaki analit u uzorku u poređenju sa odnosom istih jona u standardima pripremljenim u blank ekstraktu (EC 2002). Kako bi se selektivnost što bolje definisala posmatrano je ukrštanje ("cross-talk") između MS/MS kanala korišćenih za praćenje određivanih analita i unutrašnjeg standarda. Posebno su injektovani analiti i praćen je odziv u kanalu unutrašnjeg

standarda, a zatim je injektovan unutrašnji standard uz praćenje odziva u kanalu analita. Ukrštanje analita nije primećeno, što se može videti i na Slici 28.



Slika 28. MRM hromatogram unutrašnjeg standarda skopolamina-d3 koncentracije 40 ng/g

4.5.2. Granice detekcije i kvantifikacije

Granice detekcije (limit of detection, LOD) i kvantifikacije (limit of quantification, LOQ) su određene injektovanjem standardnih rastvora jako niske koncentracije pripremljenih u blank ekstraktu. Pri tome je praćen intenzitet signala, a koncentracija je postepeno povećavana da se dobije odnos signal-šum (signal-to-noise, S/N) ≥ 3 i ≥ 10 , za LOD i LOQ redom. Koristeći ovaj metod, LOD za sve alkaloida je bio u opsegu od 0.74 do 0.79 ng/g a LOQ od 2.17 do 2.46 ng/g u svim žitaricama, izuzev za tropin u soji i lanenom semenu (LOD = 1.55 i LOQ = 4.91 ng/g).

Kvantifikacija svih tropanskih i glikoalkaloida je izvedena sa unutrašnjim standardom. U ovom radu unutrašnji izotop standard (skopolamin-d₃), zajedno sa standardima pripremljenim u blank matriksu, je korišćen da bi se smanjio mogući uticaj matriksa na određivanje supstance. Kalibraciona kriva je bila u opsegu od 10–320 ng/ml ($r^2 > 0.998$), što je odgovaralo 2.5–80 ng alkaloida po g uzorka.

4.5.3. Prinos metode (recovery)

Prinos je određen spajkovanjem uzoraka pšenice, raži, kukuruza soje i lanenog semena. U Tabeli 4 su prikazane srednje vrednosti prinosa tropanskih i glikoalkaloida nakon ekstrakcije uzoraka spajkovanih do koncentracija od 5, 10, 40 ng/g za pšenicu i soju, i 5 ng/g za raž, kukuruz i laneno seme. Eksperiment je izveden na ovaj način jer se u toku razvoja metode pokazalo da pšenica može biti reprezentativan uzorak za raž i kukuruz a soja za laneno seme. Zbog sličnih fizičko-hemijskih karakteristika između ove dve grupe kultura, za pšenicu i soju je izveden kompletan proces validacije u tri validaciona nivoa. Za ostale kulture je izvršena potvrda transfera prihvatljivosti metoda pri čemu je validiran samo najniži koncentracioni nivo (5 ng/g). Prinos je bio u opsegu 61-111%, i koeficijent varijacije u opsegu od 1-5%. U ovom slučaju prinos je bio nezavisan od analita i matriksa ukazujući na činjenicu da metod može da se primeni i na druge uzorke (raž, kukuruz, laneno seme) nakon potvrde na najnižem spajkovanom nivou.

Tabela 4. Pregled prinosa (recovery) i koeficijenta varijacije (CV) za svaki analit u pšenici i soji za 3 spajkovana koncentraciona nivoa (5, 10 i 40 ng/g) tokom 3 dana validacije (n=7). Za raž, kukuruz i laneno seme, vrednosti su prikazane za najniži spajkovani nivo.

	Spajkovani nivo (ng/g)	tropin		homotropin		atropin		skopolamin		anisodamin		a-solanin		a-kakonin		
		R	CV	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV	R	CV	
<i>Pšenica</i>	dan 1	5	78.6	2.0	104.6	1.5	102.9	2.0	99.0	2.0	95.8	1.6	79.0	2.9	75.8	1.2
		10	78.5	3.1	105.5	1.3	103.2	1.4	96.6	1.6	99.8	1.8	80.1	2.8	72.7	2.4
		40	79.2	2.6	107.0	1.7	100.6	1.5	105.7	1.8	105.3	2.0	82.0	2.8	86.4	2.2
	<i>svi nivoi dan 1, %</i>		78.8	2.5	105.7	1.5	102.2	1.6	100.4	1.8	100.3	1.8	80.4	2.8	78.3	1.9
	dan 2	5	78.3	2.6	106.2	1.3	104.5	2.1	99.4	1.5	95.0	2.5	78.7	1.9	78.6	1.2
		10	77.7	2.1	108.2	0.5	104.3	1.4	96.6	1.8	103.1	1.1	82.0	1.9	80.8	1.4
		40	78.3	3.4	106.8	1.7	103.2	1.7	106.9	2.1	105.5	2.0	80.9	2.0	86.5	2.5
	<i>svi nivoi dan 2, %</i>		78.1	2.7	107.1	1.2	104.0	1.7	101.0	1.8	101.2	1.9	80.5	2.0	82.0	1.7
	dan 3	5	78.0	3.4	102.9	1.3	104.9	2.1	99.9	2.1	96.0	1.8	80.1	2.6	80.7	1.6
		10	78.0	2.7	106.8	1.3	104.9	2.2	99.2	2.7	100.7	1.6	78.9	2.4	74.9	2.1
40		79.4	2.9	104.9	1.9	105.7	1.6	104.8	3.8	105.5	1.1	79.5	2.7	85.0	1.2	
<i>svi nivoi dan 3, %</i>		78.5	3.0	104.9	1.5	105.2	2.0	101.3	2.9	100.7	1.5	79.5	2.6	80.2	1.6	
<i>svi dani 1-3, %</i>		78.5	0.4	105.9	1.0	103.8	1.4	100.9	0.4	100.7	0.5	80.1	0.7	80.2	2.3	
<i>Soja</i>	dan 1	5	80.2	4.6	104.5	2.4	102.9	1.8	101.3	1.6	99.1	1.5	62.7	3.9	70.7	4.6
		10	82.0	4.6	102.9	2.1	106.0	2.0	103.6	2.8	103.4	1.7	61.8	2.2	73.7	3.4
		40	82.0	1.5	106.3	2.2	106.5	1.7	106.9	2.2	104.4	2.2	71.5	4.0	82.7	4.9
	<i>svi nivoi dan 1, %</i>		81.4	3.6	104.5	2.2	105.1	1.8	103.9	2.2	102.3	1.8	65.3	3.4	75.7	4.3
	dan 2	5	78.8	1.9	105.6	2.2	101.6	2.4	105.7	2.8	102.2	1.3	63.2	5.6	73.2	4.8
		10	84.0	4.6	104.0	3.1	103.6	2.7	105.4	2.9	101.8	1.2	62.6	3.4	75.7	3.0
		40	82.0	4.7	106.1	2.2	103.6	2.8	102.6	2.2	104.4	2.9	63.2	3.2	81.7	2.6
	<i>svi nivoi dan 2, %</i>		81.6	3.7	105.2	2.5	102.9	2.6	104.6	2.6	102.8	1.8	63.0	4.1	76.9	3.5
	dan 3	5	83.0	3.8	104.4	3.1	102.0	3.0	101.5	2.2	104.7	2.9	63.9	4.4	75.6	3.2
		10	78.0	5.1	104.3	3.5	101.5	3.2	106.5	2.4	104.8	2.9	61.8	3.0	73.0	2.8
40		81.0	5.2	105.0	3.1	103.4	3.4	105.2	2.4	102.9	1.3	62.6	3.1	83.3	4.0	
<i>svi nivoi dan 3, %</i>		80.7	4.7	104.6	3.2	102.3	3.2	104.4	2.3	104.1	2.4	62.8	3.5	77.3	3.3	
<i>svi dani 1-3, %</i>		81.2	0.6	104.8	0.4	103.4	1.5	104.3	0.3	103.1	0.9	63.7	2.2	76.6	1.1	
<i>Raž</i>	dan 1	5	78.4	0.9	100.3	2.6	99.8	2.8	102.1	1.4	78.3	3.5	84.3	2.8	101.9	2.9
	dan 2	77.2	2.5	103.8	1.9	105.4	1.6	106.1	0.6	80.4	2.3	81.1	3.2	102.1	2	
	dan 3	76.5	1.5	102.1	0.7	102.3	1.1	107.4	0.8	79.2	4.2	82.9	2	103.7	1.5	
	<i>svi dani 1-3, %</i>		77.4	1.2	102.1	1.7	102.5	2.7	105.2	2.6	79.3	1.3	82.8	1.9	102.6	1.0
<i>Kukuruz</i>	dan 1	5	78.5	1.8	105.3	1.5	105.1	2.8	100.9	2.4	76.9	1.2	100.1	0.8	103.5	1.8
	dan 2	79.1	1.6	105.8	2.1	103.5	1.8	101.5	1.8	79.1	3.4	99.3	2.4	105.8	0.8	
	dan 3	79.9	2.6	106.5	1.9	104.4	2.1	102.4	3.4	77.5	1.5	102.3	1.7	104.6	1.1	
	<i>svi dani 1-3, %</i>		79.2	0.9	105.9	0.6	104.3	0.8	101.6	0.7	77.8	1.5	100.6	1.5	104.6	1.1
<i>Laneno seme</i>	dan 1	5	71.8	3.4	100.2	2.4	108.8	4.5	100.6	1.5	98.4	2.1	60.4	1.9	80.9	4.5
	dan 2	78.2	4.7	106.6	3.5	100.3	3	102.8	3.4	99.1	3.9	62.2	0.9	84.5	3.6	
	dan 3	76.3	4.8	104.6	4.2	104.4	4.8	98.3	2.6	102.3	1.9	61.1	2.2	78.3	4.9	
	<i>svi dani 1-3, %</i>		75.4	4.4	103.8	3.2	104.5	4.1	100.6	2.2	99.9	2.1	61.2	1.5	81.2	3.8

4.5.4. Robusnost metoda

Robusnost analitičkog postupka predstavlja meru stabilnosti metode pri uticaju malih promena nekih parametara u toku svakodnevne upotrebe metode (Heyden i sar., 2001). U ovom radu za određivanje kritičnih tačaka metode primenjen je Youdenov frakcionalni faktorijski eksperimentalni dizajn (Youden i sar., 1975). Prema ovom načinu određivanja robustnosti neophodno je da se odredi nekoliko kritičnih parametara koji mogu da variraju i značajno utiču na rezultate u toku vremena. Faktori, čiji uticaj na ovaj definisani analitički postupak bio najizraženiji su prikazani u Tabeli 5.

Tabela 5. Dizajn eksperimenta za određivanje robustnosti

Faktor	Kombinacije ocenjivanih faktora							
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8
A ^a (ekstrakcioni pH, 2.81)/ a ^b (2.86)	A	A	A	A	a	a	a	a
B (brzina centrifuge, 1600 x g)/ b (1590 x g)	B	B	b	b	B	B	b	b
C (temperatura uparavanja, 40 °C)/ c (44 °C)	C	c	C	c	C	c	C	c
D (koncentracija pufera, 10 mM)/ d (10.03)	D	D	d	d	d	d	D	D
E (temperatura kolone, 45 °C)/ e (40 °C)	E	e	E	e	e	E	e	E
F (protok mobilne faze, 1 ml/min)/ f (0.9)	F	f	f	F	F	f	f	F

^a velika slova pokazuju optimizovane vrednosti metoda

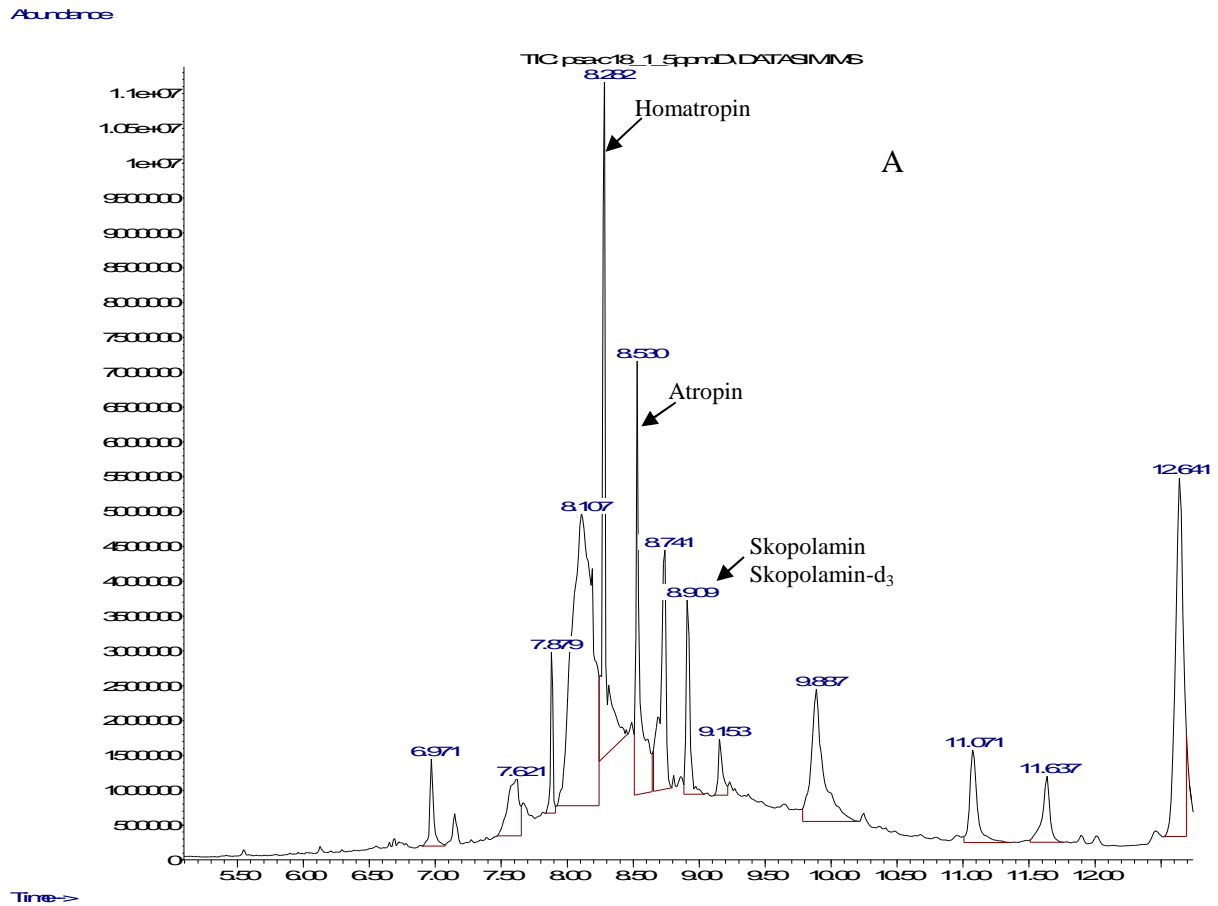
^b mala slova pokazuju ocenjivane vrednosti

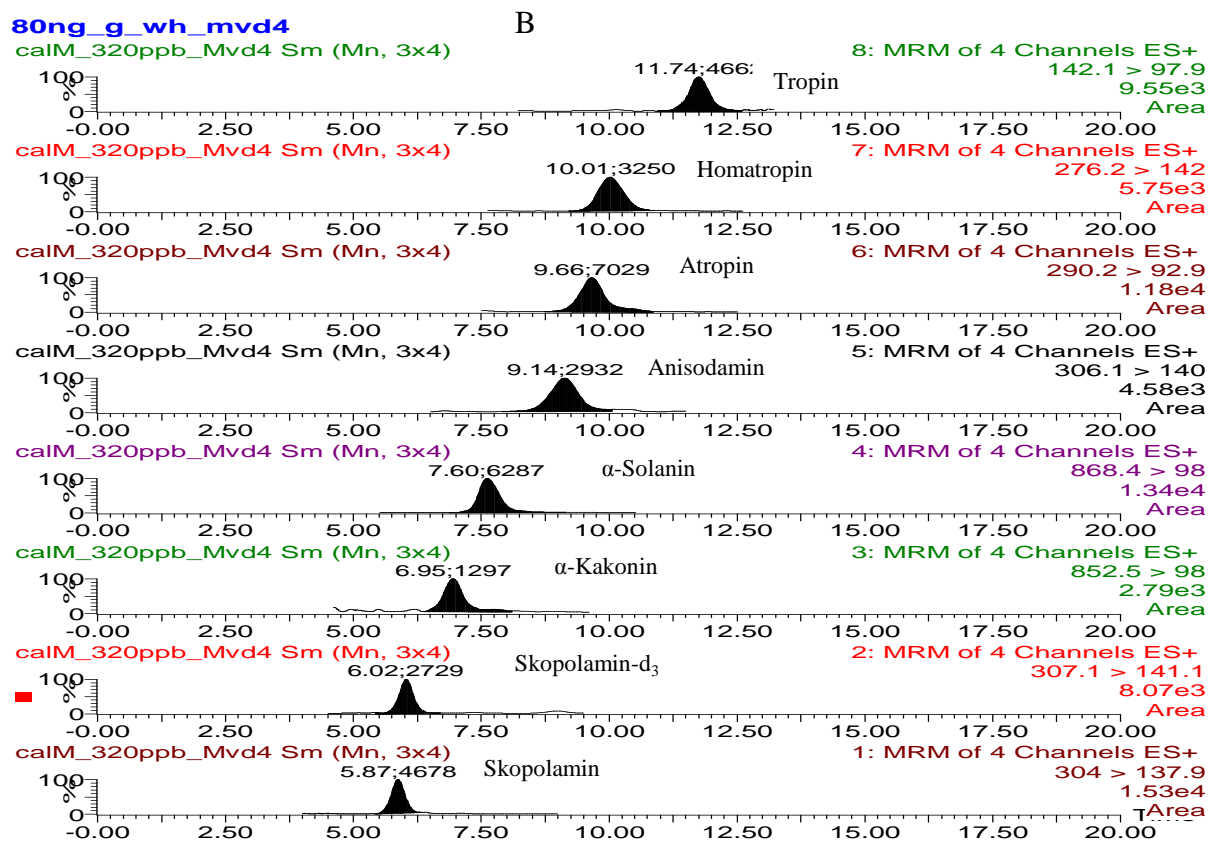
Uzorci korišćeni za ovaj eksperiment su spajkovani smešom alkaloida koncentracije 20 ng/g. Testom je potvrđeno da manje varijacije pojedinih parametara nisu značajno uticale na metod i da se metod može smatrati robusnim.

4.6. Poređenje GC-MS i HPLC-MS/MS metoda pri određivanju tropanskih i glikoalkaloida

Osnovni nedostatak GC-MS metoda je visoka granica kvantifikacije određivanja tropanskih alkaloida kao i nemogućnost direktnog određivanja glikoalkaloida. Granica kvantifikacije GC-MS metode određena u model rastvorima je iznosila 1 µg/ml ili 240 ng/g. Prilikom analize uzoraka hrane korišćen je optimizovani proces ekstrakcije tropanskih i glikoalkaloida i određivanje pomoću HPLC-MS/MS (poglavlje 3.5.1) s obzirom da je u slučaju gasne hromatografije dobijen jako nizak odziv alkaloida čak i pri jako visokim koncentracijama (1000 ng/g), što se može uočiti i na Slici 31. Pojava velikog broja pikova na GC hromatogramu je ukazivala na veliki uticaj interferencija (proteini, boje, jako polarna

jedinjenja ili masnoće i druga nepolarna jedinjenja) iz matriksa koje su maskirale i smanjile odziv određivanih analita. Osnovna razlika u pripremi uzoraka pre primene dve hromatografske tehnike je bila u rastvaranju krajnjeg suvog ostatka koji je u slučaju gasne hromatografije rastvaran u etilacetatu.





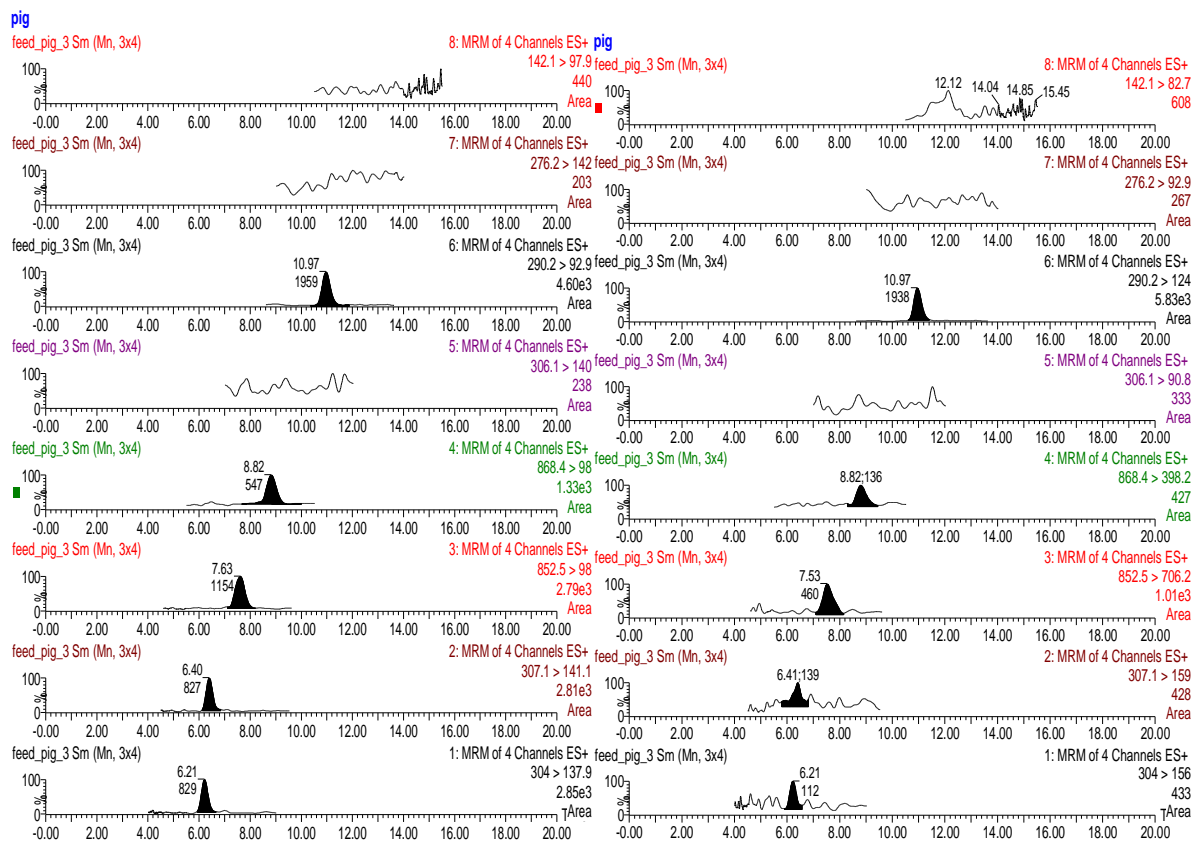
Slika 31. GC-MS (A) i HPLC-MS/MS (B) hromatogrami dobijeni pri analizi ekstrakta pšenice

Korišćenjem HPLC-MS/MS metode, sve određivane komponente su bile potpuno razdvojene i analizirane pomoću posebnih MRM kanala, bez ukrštanja pojedinačnih jona analita. Zbog toga je odlučeno da se validira robusniji i osjetljiviji HPLC-MS/MS metod, pri kome je bilo moguće određivanje obe grupe alkaloida (tropanskih i glikoalkaloida) uz visoku osjetljivost definisanu granicom detekcije od 2.17 do 4.91 ng/g za dve grupe alkaloida, redom.

4.7. Određivanje tropanskih i glikoalkaloida u uzorcima sa tržišta

Koristeći optimizovani metod HPLC-MS/MS analizirani su sledeći uzorci sa tržišta: žitarice, stočna hrana, proizvodi na bazi žitarica, voće i povrće. Rezultati (n=3) su pokazali da je stočna hrana korišćena za ishranu svinja i peradi bila najviše kontaminirana sa atropinom (srednja vrednost \pm SD, 12.7 \pm 0.7 i 6.8 \pm 0.2 ng/g, redom), skopolaminom (12.1 \pm 1.1 i 2.5 \pm 0.2 ng/g, redom), α -solaninom (6.1 \pm 0.5 i 3.6 \pm 0.7 ng/g, redom) i α -kakoninom (21.7 \pm 1.5 i 9.6 \pm 0.8 ng/g, redom). U stočnoj hrani korišćenoj za ishranu krava i zečeva detektovani su atropin (6.5 \pm 0.6 i 2.8 \pm 0.2 ng/g, redom) i skopolamin (9.8 \pm 0.7 i 8.9 \pm 0.9 ng/g, redom). Dok u hrani

korišćenju za ishranu konja i divljih životinja alkaloidi nisu detektovani. Na Slici 32 je prikazan MRM hromatogram prirodno kontaminirane stočne hrane namenjene ishrani svinja.



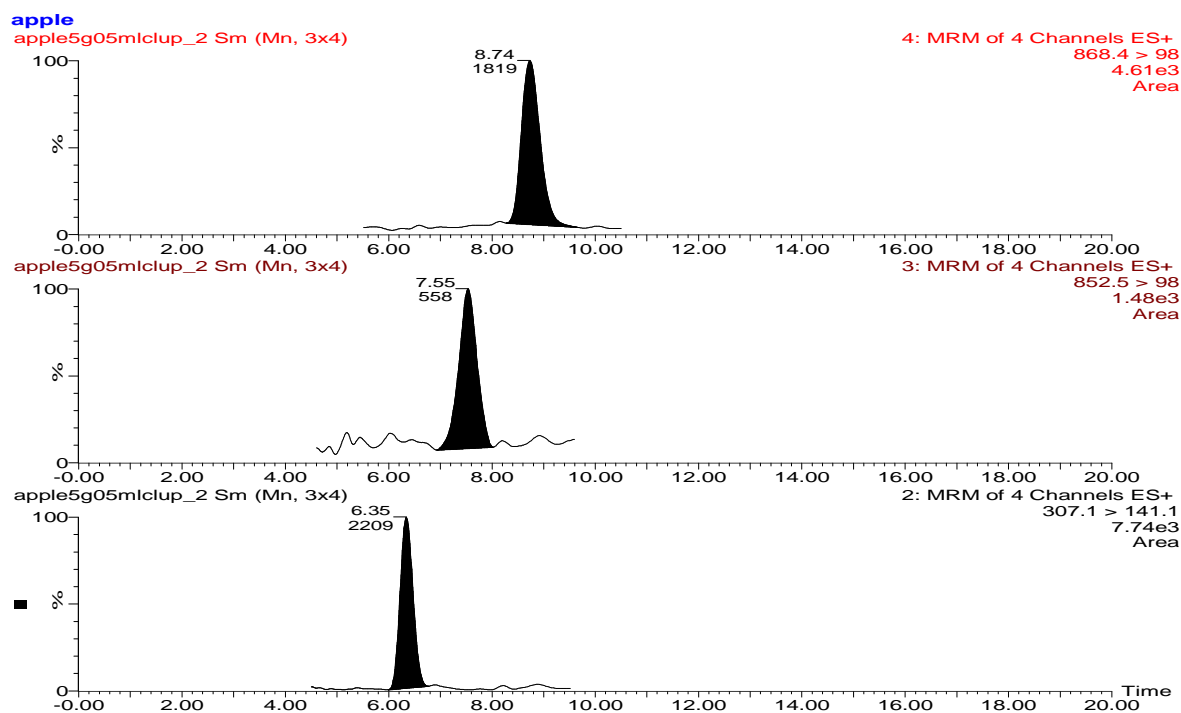
Slika 32. MRM hromatogram prirodno kontaminirane hrane namenjene ishrani svinja: atropin (12.7 ng/g), α -solanin (6.1 ng/g), α -kakonin (21.7 ng/g), skopolamin- d_3 (IS) (40 ng/g) i skopolamin (12.1 ng/g) (2 produkt jona svakog od alkaloida – od vrha ka dnu)

Analizirani uzorci hrane su obuhvatili proizvode na bazi žitarica (brašno od mešanih žitarica, kukuruzno brašno, biskvit i krekeri) u kojima se moglo očekivati prisustvo tropanskih i glikoalkaloida. Međutim alkaloidi nisu detektovani u ovim proizvodima kao ni u analiziranim kulturama (pšenica, raž, kukuruz, lan i soja). U krompirovom čipsu su detektovani α -solanin (8708.9 ± 3.5 ng/g) i α -kakonin (9047.9 ± 3.5 ng/g).

Za glikoalkaloide je karakteristično da su veoma stabilne supstance i da procesi obrade hrane (pečenje, kuhanje i prženje) ne utiču na njihovu razgradnju (Friedman, 2004; Švarc-Gajić, 2011). Na sadržaj glikoalkaloida u biljkama, odnosno povećanje njihove koncentracije, mogu uticati spoljašnji faktori kao što su sunčeva svetlost, radijacija, mehanička oštećenja i skladištenje (Friedman, 2004). Većina radova objavljenih do sada sadrži informacije o

glikoalkaloidima (α -solanin i α -kakonin) proizvedenim od strane biljka kao što su krompir i patlidžan (Bodart i sar., 2000; Coxon i sar., 1979; Nikolić i Stanković, 2003; Roddick i Melchers, 1985; Simonovska i Vovk, 2000). Kako glikoalkaloidi predstavljaju jedan od proizvoda biosinteze biljke, pretpostavilo se i da bi neke druge vrste voća i povrća mogle da prizvedu ovu vrstu glikoalkaloida. Uzimajući u obzir ovu pretpostavku analizirane su različite vrste voća i povrća kao što su jabuka, kruška, avokado, mrkva, limun, nektarine, krastavac i paprika.

Po prvi put u ovom radu α -solanin i α -kakonin su detektovani u biljkama kao što su jabuka, kruška, avokado, mrkva, krastavac i paprika (Slika 33), ali u mnogo nižoj koncentraciji u poređenju sa krompirom. U Tabeli 7 se može primetiti da je najviša koncentracija oba glikoalkaloida registrovana u kruški a najniža u krastavcu. Glikoalkaloidi nisu detektovani u uzorcima limuna i nektarina. Sadržaj glikoalkaloida u krompiru i čipsu se nalazio u okviru preporučenog ukupnog sadržaja glikoalkaloida od 200 mg/kg (sirova odvaga) (FAO/WHO, 1999).



Slika 33. MRM hromatogram α -solanina, α -kakonina i scopolamina- d_3 u uzorku jabuke

Tabela 7. Sadržaj glikoalkaloida u analiziranim uzorcima voća i povrća (izraženo u ng/g uzorka)

Analit	jabuka	kruška	avokado	mrkva	krastavac	paprika	patlidžan	krompir
	Koncentracija ± SD (ng/g)							
α -solanin	5.9±1.2	15±2.3	6.4±2.1	9.8±3.0	1.7±0.3	0.3±0.05	21.6±2.2	17586.7±5.6
α -kakonin	5.8±0.9	14.9±2.7	5.3±1.9	9.7±2.1	n.d.	2.2±0.6	9.2±1.1	18794.7±3.5

n.d. nije detektovan

Kako su glikoalkaloidi proizvod normalne sinteze biljaka (sekundarni metaboliti koji nastaju u toku njihovog rasta) iz porodice *Solanaceae*, u ovom radu je prikazano da i biljke koje potiču iz drugih porodica (*Cucurbitaceae*, *Apiaceae*, *Rosaceae*, *Lauraceae*) također mogu sintetisati glikoalkaloide kao što su α -solanin i α -kakonin. Unoseći glikoalkaloide u organizam kroz razne vrste voća i povrća (ne samo kroz krompir, paradajz i patlidžan) povećava se njihova ukupna koncentracija i opasnost od štetnog uticaja na zdravlje čoveka. Preporučeni bezbedni sadržaj ukupnih glikoalkaloida od 200 mg/kg (FAO/WHO, 1999) se odnosi uglavnom na ukupne glikoalkaloide koji su do sada detektovani u krompiru, paradajzu i patlidžanu. Detekcijom glikoalkaloida (α -solanina i α -kakonina) u različitim vrstama voća i povrća, trebalo bi da se obrati pažnja i na analizu ovih vrsta uzoraka kao i ukupnu koncentraciju glikoalkaloida koja se dnevno unese u organizam, prvenstveno zbog toga jer se voće i povrće smatraju visoko nutritivnom hranom za koju se preporučuje dnevni unos u većim količinama.

4.8. Apsorpcija i translokacija atropina ^{14}C u pšenici

Žitarice (pšenica, raž, kukuruz) i druge biljke (soja, lan) mogu biti kontaminirane sa alkaloidima u toku žetve s obzirom na korovski karakter biljaka koje ih proizvode. Drugi mogući način kontaminacije alkaloidima je iz zemljišta, njihovom apsorpcijom i translokacijom u pojedine delove biljke. Biljke iz porodice *Solanaceae* proizvode različite količine alkaloida i svi delovi biljke a posebno seme su toksični. Tako npr. jedna biljka može da proizvede 50 ili više kapsula sa 30000 ili više semenki. U toku životnog ciklusa biljke seme se raspršava i do 1-4 metra iz kapsule i kontaminira zemljište. Ovo je jedan od najčešćih mehanizama kontaminacije zemljišta alkaloidima. A obzirom da se alkaloidi mogu naći i u drugim delovima biljke, toksikanti mogu dospeti u zemljište i na druge načine kao npr. razgradnjom pojedinih delova biljke i izlučivanjem supstanci iz korena. Često se ovaj način

prirodne kontaminacije zemljišta sa toksikantima smatra opasnijim od kontaminacije sa poljoprivrednim hemikalijama (npr. pesticidi). Tokom prirodne kontaminacije, koncentracija toksikanata ostaje neodređena a supstance ostaju u zemljištu godinama akumulirajući se na taj način. Pri povećanim koncentracijama se takođe povećava i mogućnost njihove apsorpcije od strane biljaka koje se uzgajaju na ovako kontaminiranom zemljištu.

Upotrebom radio-izotopskih ^{14}C tehnika moguće je odrediti količinu ^{14}C komponente koja se transportuje iz zemljišta u biljku u određenom vremenskom periodu. Na ovaj način se može pratiti sudbina pojedinih toksičnih supstanci u životnoj sredini, pri čemu se takođe utvrđuje i način kontaminacije biljke u sistemu zemljište-biljka.

Da bi se utvrdila moguća apsorpcija alkaloida od strane biljke, izveden je eksperiment sa atropinom ^{14}C i pšenicom. Pšenica je uzgajana na zemljištu obogaćenom atropinom ^{14}C i bez atropina (blank) u toku 3 meseca. Da bi se utvrdila sudbina atropina ^{14}C , analizirani su voda, zemljište i biljka (pojedinačno svi delovi) u određenim vremenskim intervalima (15, 30, 60 i 90 dana). Na bazi utvrđenog ponašanja atropina u sistemu zemljište-biljka, može se pretpostaviti i sudbina ostalih alkaloida koje imaju slične fizičko-hemijske osobine a koje proizvode biljke iz familije Solanaceae.

Nakon uzgoja biljaka na zemljištu obogaćenom atropinom ^{14}C pojedini delovi biljke (list, stabljika, seme) su analizirani pomoću LSC. Zbog velike očekivane doze radioaktivnosti količina apsorbovanog atropina u korenu je preračunata na osnovu prethodno utvrđenog odnosa težine i ugljenika ^{12}C u korenu i ostalim delovima biljke uzgajanoj na nespajkovanom zemljištu (Tabela 8). Ovakav način proračuna je omogućio smanjivanje greške usled intenzivnije adsorpcije atropina ^{14}C u odnosu na njegov ^{12}C izotop.

Pri proračunu količine radioaktivne supstance u korenu korišćena je sledeća formula:

$$k_{\text{atropin } ^{14}\text{C u korenu}} = k_{\text{atropin } ^{14}\text{C u ostatku radioaktivne biljke}} \times \text{CK/CO} \times \text{TK/TO} \quad (4)$$

gde su:

k- količina adsorbovane supstance (%)

CK- količina ugljenika u korenu (%)

CO- količina ugljenika u ostatku biljke (%)

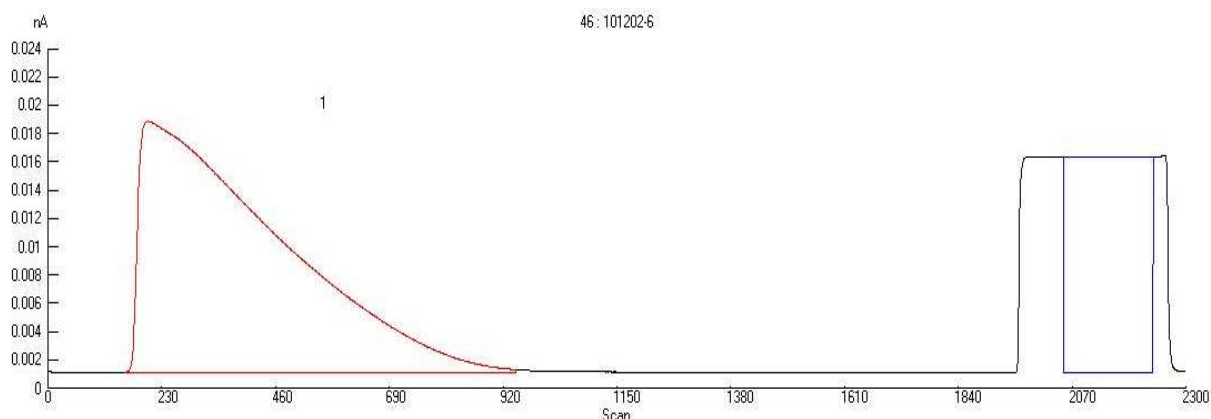
TK- težina korena (g)

TO- težina ostataka biljke (g)

Može se primetiti da je količina ugljenika bila ista u korenu i ostatku biljke (odnos oko 1) dok je težina korena bila oko 10 puta manja od ostatka biljke. Ugljenik ^{12}C je određen pomoću EA-IRMS a tipičan hromatogram ugljenika je prikazan na Slici 34.

Tabela 8. Odnos ugljenika ^{12}C (CK) i težine (TK) korena i ugljenika ^{12}C (CO) i težine (TO) ostatka pšenice određen pomoću EA-IRMS u različim vremenskim periodima životnog ciklusa biljke.

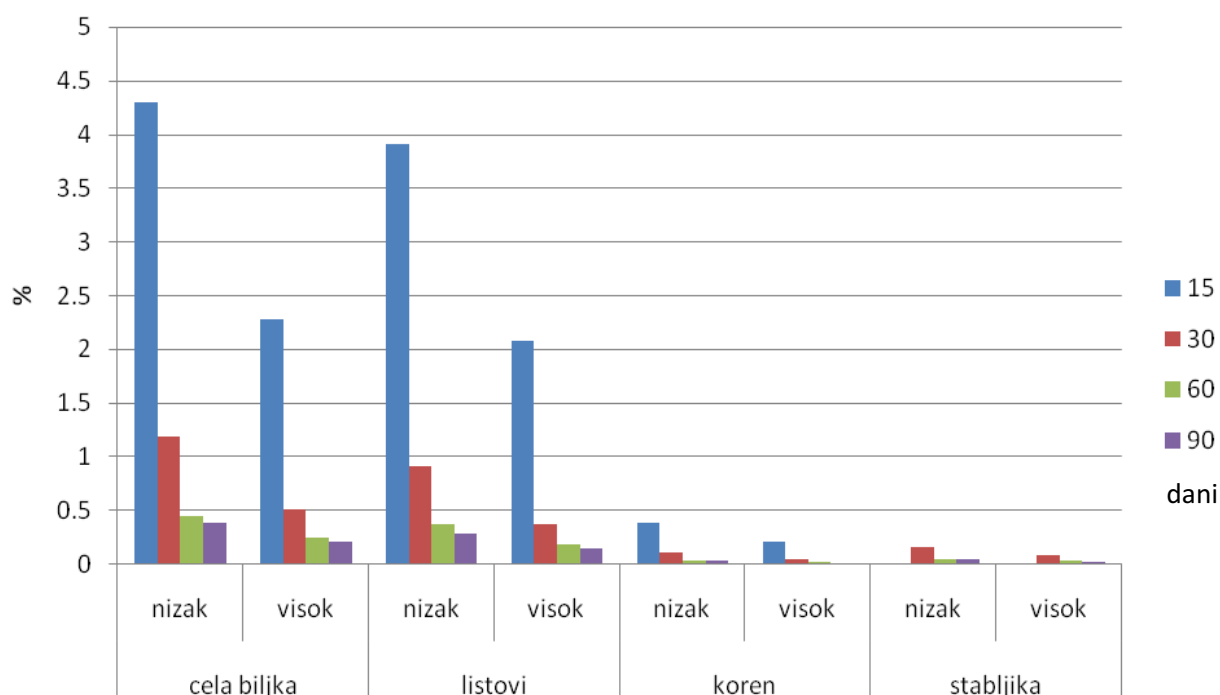
<i>Dani</i>	<i>Odnos</i>	
	<i>CK/CO</i>	<i>TK/TO</i>
15	0.998	0.103
30	1.003	0.087
60	0.938	0.092
90	0.913	0.090



Slika 34. Hromatogram ugljenika ^{12}C dobijen analizom standarda (prvi pik) i uzorka (drugi pik) pomoću EA-IRMS

Utvrđivanje načina translokacije toksične supstance i raspodele u pojedinim delovima biljke je izvedeno uzorkovanjem biljke u različitim vremenskim periodima. Mlada biljka uzgajana na zemljištu spajkovanom nižim (13676 dpm/g zemljišta) nivoom koncentracije je apsorbirala 4.3% a višim (37203 dpm/g zemljišta) 2.28% posmatrano u odnosu na ukupnu količinu supstance dodate u zemljište na početku eksperimenta. Dalje povećanje koncentracije supstance u zemljištu nije uticalo na povećanu apsorpciju supstance od strane biljke

(Dijagram 2) što se moglo objasniti specifičnošću metabolizma biljke i mogućnošću pšenice da apsorbira atropin ^{14}C do određene koncentracije. Analiza pojedinačnih delova pšenice je potvrdila translokaciju atropina ^{14}C u listove, stabljiku i seme. Ukupna radioaktivnost prisutna u biljci se smanjivala tokom vremena i na kraju eksperimenta je iznosila 0.38 % (list 0.29 %, stabljika 0.048 %, koren 0.034 % i seme 0.012 %) za niži spajkovani nivo i 0.21 % (list 0.16 %, stabljika 0.031 %, koren 0.019 % i seme 0.006 %) za viši spajkovani nivo. Sa rastom biljke apsorbirana koncentracija se smanjivala usled povećanja biomase biljke. Međutim takođe je moguće da se apsorbirana supstanca metabolizovala od strane biljke.



Dijagram 2. Raspodela atropina ^{14}C u celoj biljci i pojedinim delovima pšenice određena pomoću LSC nakon 15, 30, 60 i 90 dana i dva koncentraciona nivoa (nizak, 13676 dpm/g i visok 37203 dpm/g zemljišta)

Apsorpcija toksičnih supstanci od strane biljke u velikoj meri zavisi i od njihovih hemijskih osobina (Collins i sar., 2006, 2010; Li i sar., 2005). Iz Tabele 9 se može primetiti da je akumulacija atropina bila najviša u listovima u toku celog eksperimenta. Nagomilavanje atropina u delovima biljke sa većim sadržajem vode (u listu je koncentracija bila oko 83 %) se može objasniti njegovom dobrom rastvorljivošću u vodi. Koncentracija atropina u delu biljke sa većim sadržajem ugljenih hidrata, masti, proteina itd. je bila mnogo niža, dok je u semenu iznosila oko 4 %.

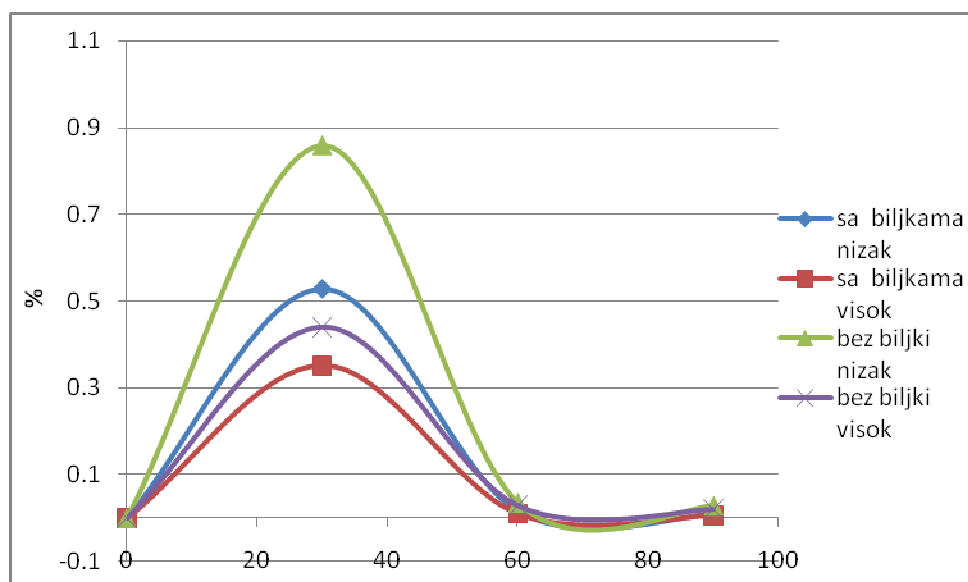
Tabela 9. Raspodela apsorbovanog atropina ^{14}C (%) u pojedinim delovima biljke

<i>Dani</i>	<i>Nivo</i>	^{14}C -Atropin (%)				
		<i>list</i>	<i>stabljika</i>	<i>koren</i>	<i>seme</i>	<i>cela biljka</i>
15	<i>nizak</i>	90.7		9.3		100.0
	<i>visok</i>	90.7		9.3		100.0
30	<i>nizak</i>	77.8	14.2	8.0		100.0
	<i>visok</i>	74.7	17.3	8.0		100.0
60	<i>nizak</i>	86.9	4.7	8.4		100.0
	<i>visok</i>	81.8	9.8	8.4		100.0
90	<i>nizak</i>	83.2	4.2	8.6	4.1	100.0
	<i>visok</i>	83.0	4.7	8.6	3.9	100.0

Analiza uzoraka zemljišta je vršena pomoću LSC (ekstrahovani atropin C^{14}) i biološkog uređaja za oksidaciju (preostali, čvrsto-vezani atropin C^{14}) da bi se utvrdila adsorpcija atropina na zemljištu tokom vremena. Nakon 15 dana je ustanovljena značajna adsorpcija radioaktivne komponente na zemljištu. Upotrebom optimizovanog metoda pripreme uzoraka 40 % prisutnog atropina je bilo moguće ekstrahovati i odrediti pomoću LSC, dok je preostalih 60 % neekstrahovane supstance (čvrsto-vezani atropin) određeno pomoću biološkog uređaja za oksidaciju. Količina atropina čvrsto vezanog za zemljište se povećala do 70 % nakon 60 dana i ostala stabilna do kraja eksperimenta.

Uzorci vode koja je poticala od ispiranja zemljišta su sakupljeni i analizirani nakon 30, 60 i 90 dana. Najviša koncentracija atropina C^{14} (0.5 %) je detektovana nakon 30 dana, da bi u toku vremena došlo do smanjenja ispiranja ove supstance (Dijagram 3). Ovim je potvrđeno

da u realnim uslovima može doći do ispiranja alkaloida iz zemljišta i do kontaminacije vode zavisno od njihove koncentracije u zemljištu. Na Dijagramu 3 se može primetiti da je veće ispiranje bilo u posudama koje nisu sadržavale biljke nego u posudama sa biljkama. To može da bude posledica apsorpcije određene količine supstance od strane biljaka. Nakon 60 i 90 dana detektovana količina atropina je bila jako niska u oba eksperimenta (oko 0.02 i 0.01 %).



Dijagram 3. Atropin C^{14} detektovan u vodi izdvojenoj iz posuda (sa i bez biljki) obogaćenih sa atropinom u 2 nivoa koncentracije (nizam-13676 dpm/g i visok-37203 dpm/g zemljišta) i određen pomoću LSC

5. ZAKLJUČAK

1. U radu su razvijeni i optimizovani postupci pripreme uzoraka hrane i stočne hrane, kao i simultano određivanje tropanskih i glikoalkaloida primenom gasne i tečne hromatografije uz maseno-spektrometrijsku detekciju.
2. Razvijena je i validirana HPLC–MS/MS metoda koja se može primeniti u analizi uzoraka hrane i stočne hrane u cilju određivanja tropanskih alkaloida (tropin, l-hiosciamin, atropin, skopolamin, homatropin i anisodamin) i glikoalkaloida (α -solanin i α -kakonin).
3. Razvoj metode razdvajanja alkaloida gasnom hromatografijom je izveden na kapilarnoj koloni (HP-5MS UI), uz detekciju sa kvadrupolnom masenom spektrometrijom SIM tehnikom, u intervalu m/z 50–550 a.m.u. Pri optimizovanim uslovima postignuto je razdvajanje homatropina, atropina i skopolamina u vremenu od 12.75 min, dok tropin i anisodamin nisu mogli biti detektovani. Glikoalkaloide nisu mogli biti određivani zbog njihove visoke molekulske mase i nemogućnosti direktnog određivanja gasnom hromatografijom bez upotrebe derivatizacionih tehnika.
4. Optimizacija uslova hromatografskog razdvajanja alkaloida tečnom hromatografijom je postignuta na hiraloj Chirobiotic V koloni. Detekcija komponenti je izvedena sa kvadrupolnom masenom spektrometrijom (MS/MS) u pozitivnom elektrosprej modu (ESI^+) korišćenjem reakcionog višestrukog monitoring akvizicionog moda (MRM). Ukupno vreme trajanja analize je iznosilo 16 min.
5. U cilju skraćivanja vremena pripreme uzoraka ispitana je mogućnost primene disperzivne čvrsto-fazne ekstrakcije, umesto uobičajno korišćenih metoda ekstrakcije na čvrstim fazama u kertridž modifikaciji. Optimizovani uslovi prečišćavanja ekstrakta su podrazumevali primenu magnezijum sulfata, natrijum hlorida, natrijum citrat dihidrata i natrijum hidrogencitrat šestihidrata i C_{18} sorbenta. Efikasnost optimizovanog procesa pripreme uzoraka za pojedine alkaloida se kretala u intervalu od 61-111%.
6. Optimizovana tečno-hromatografska metoda je podrazumevala brz i jednostavan proces ekstrakcije, linearnost u relativno širokom koncentracionom intervalu (5-80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $r^2=0.998$), dobru selektivnost, robusnost i preciznost ($CV < 5\%$). Granica detekcije (LOD) za sve alkaloida je bila u opsegu od 0.74 do 0.79 ng/g dok se granica

kvantifikacije (LOQ) kretala od 2.17 do 2.46 ng/g u svim žitaricama, izuzev za tropin u soji i lanenom semenu (LOD = 1.55 i LOQ = 4.91 ng/g).

7. Granica kvantifikacije GC-MS metode određena u model rastvorima je iznosila 1 µg/ml odnosno 240 ng/g. Poređenjem HPLC-MS/MS i GC-MS metoda je ustanovljeno da je osnovni nedostatak GC-MS metoda nestabilnost tropanskih alkaloida pri visokim temperaturama i visoke granice kvantifikacije, kao i nemogućnost direktnog određivanja glikoalkaloida. Upotrebom HPLC-MS/MS je postignuta mnogo niža granica kvantifikacije u različitim analiziranim matriksima i mogućnost određivanja većeg broja alkaloida. Iz navedenih razloga je u analizi svih realnih uzoraka primenjena optimizovana HPLC-MS/MS metoda.
8. U cilju određivanja sadržaja alkaloida u realnim uzorcima sa tržišta, analizirani su uzorci žitarica, prehrambenih proizvoda na bazi žitarica, voće, povrće i stočna hrane. Alkaloidi nisu detektovani u pšenici, raži, kukuruzu, brašnu od mešanih žitarica, kukuruznom brašnu, biskvitu i krekerima. U krompirovom čipsu su detektovani α -solanin (8708.9 ± 3.5 ng/g) i α -kakonin (9047.9 ± 3.5 ng/g). Stočna hrana namenjena ishrani svinja i peradi je sadržala atropin (12.7 ± 0.7 i 6.8 ± 0.2 ng/g, redom), skopolamin (12.1 ± 1.1 i 2.5 ± 0.2 ng/g, redom), α -solanin (6.1 ± 0.5 i 3.6 ± 0.7 ng/g, redom) i α -kakonin (21.7 ± 1.5 i 9.6 ± 0.8 ng/g, redom). U stočnoj hrani namenjenoj ishrani krava i zečeva detektovani su atropin (6.5 ± 0.6 i 2.8 ± 0.2 ng/g, redom) i skopolamin (9.8 ± 0.7 i 8.9 ± 0.9 ng/g, redom), dok u hrani nemenjenoj ishrani konja i divljih životinja alkaloidi nisu detektovani.
9. U analiziranim uzorcima voća i povrća (jabuka, kruška, avokado, mrkva, krastvac i paprika) po prvi put u ovom radu su detektovani glikoalkaloidi, α -solanin i α -kakonin. Koncentracija oba glikoalkaloida se kretala u opsegu od 0.3 do 15 ng/g. Sadržaj glikoalkaloida u krompiru i čipsu (8708.9-18794.7 ng/g) se nalazio u okviru preporučenog ukupnog sadržaja glikoalkaloida od 200 mg/kg (sirova odvaga) (FAO/WHO, 1999).
10. Upotrebom atropina ^{14}C ustanovljeno je da se komponenta apsorbuje od strane pšenice i translocira u koren, listove, stabljiku i seme. Utvrđeno je da mlada biljka (15 dana) apsorbuje 4.30 % i 2.28 % atropina ^{14}C za niži (13676 dpm/g zemljišta) i viši (37203 dpm/g zemljišta) sadržaj standarda, redom. Količina apsorbovanog atropina se smanjivala tokom rasta biljke. Za biljku starosti od 90 dana je ustanovljeno da apsorbuje 0.38 % i 0.21 % atropina ^{14}C za niži i viši sadržaj standarda, redom.

11. Povećanje koncentracije supstance u zemljištu (obogaćivanje sa nižim i višim sadržajem standarda) nije uticalo na povećanu apsorpciju supstance od strane biljke. Do nagomilavanja supstance je došlo u listovima (83 %) dok su niže koncentracije zabilježene u korenu (8.6 %), stabljici (4.2 %) i semenu (4.1 %).
12. U analiziranim uzorcima vode, koja je poticala od ispiranja zemljišta obogaćenog atropinom ^{14}C , nakon 30 dana supstanca je detektovana u koncentraciji od 0.5 %. Tokom vremena je ustanovljeno smanjenje ispiranja ove supstance (0.01% nakon 90 dana). Analiza uzoraka zemljišta nakon 30 i 60 dana je pokazala značajne adsorpcione osobine zemljišta tako da je količina čvrsto adsorbovanog atropina iznosila 60 % i 70 %, redom. Zaostali atropin je bio stabilan i nakon 90 dana.
13. Rezultati analize uzoraka sa tržišta, kao i apsorpcije i translokacija atropina iz kontaminiranog zemljišta uz ispiranje supstance iz zemljišta u vodu, ukazuju da tropanski i glikoalkaloidi predstavljaju mogući rizik za zdravlje korisnika i ukazuju na značaj njihovog određivanja i praćenja.

6. LITERATURA

Abreu P, Relva A, Matthew S, Gomes Z, Morais Z, Morais Z. 2007. High-performance liquid chromatography determination of glycoalkaloids in potatoes from conventional, integrated, and organic crop systems. *Food Control* 18:40-44.

AOAC. 2000. AOAC Official Method 997.13 Glycoalkaloids (α -solanine and α -chaconine) in potato tubers. *Journal of Aoac International*. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, W. Horwitz (Ed.), 17th Edn, Vol. 2, pp. 62–64, Gaithersburg, MD.

Amdouna R, Khelifi L, Khelifi-Slaoui M, Amroune S, Benyoussef E-H, Dao Vu Thi C, Assaf-Ducrocq E. 2009. Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the in vitro biochemical response. *Plant Science* 177:81-87.

Arnvist L, Dutta PC, Jonsson L, Sitbon F. 2003. Reduction of cholesterol and glycoalkaloid levels in transgenic potato plants by overexpression of a type 1 sterol methyltransferase cDNA. *Plant Physiology* 131:1792-1799.

Aysal P, Ambrus Á, Lehotay SJ, Cannavan A. 2007. Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. *Journal of Environmental Science Health B* 42:481-490.

Bacigalupo MA, Ius A, Longhi R, Meroni G. 2000. Quantification of glycoalkaloids in tomato plants by time-resolved fluorescence using a europium chelator entrapped in liposomes. *Analyst* 125:1847-1850.

Basey K, Woolley J. 1973. Biosynthesis of the tigloyl esters in *Datura*: The role of 2-methylbutyric acid. *Phytochemistry* 12:2197-2201.

Balikova M. 2002. Collective poisoning with hallucinogenous herbal tea. *Forensic Science International* 128:50-52.

Beresford P, Woolley J. 1974. 6-[2-Methylbuta- noyloxy]tropane-3 α -ol, a new alkaloid from *Datura ceratocaula*. *Phytochemistry* 13:2511-2513.

Bergenstråhle A, Tillberg E, Jonsson L. 1992. Characterization of UDP glucose:solanidine glucosyltransferase and UDP-galactose:solanidine galactosyltransferase from potato tuber. *Plant Science* 84:35-44.

Bianco G, Schmitt-Kopplin P, De Benedetto G, Kettrup A, Cataldi TR. 2002. Determination of glycoalkaloids and relative aglycones by nonaqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis* 23:2904-2912.

Bodart P, Kabengeru C, Noirfalise A, Hubert P, Angenot L. 2000. Determination of α -solanine and α -chaconine in potatoes by high performance thin layer chromatography/densitometry. *Journal of AOAC International* 83:1468-1473.

Brachet A, Mateus L, Cherkaoui S, Christen P, Gauvrit J-Y, Lantéri P, Veuthey JL. 1999. Application of central composite designs in the supercritical fluid extraction of tropane alkaloids in plant extracts. *Analisis* 27:772-778.

Bramley A, Goulding R. 1981. Laburnum "poisoning". *Br Med J (Clin Res Ed)*. Nov 7 1981, 283(6301):1220-1221.

Breton D, Buret D, Clair P, Lafosse M. 2005. Chiral separation of atropine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1088:104-109.

Bucher E, Tischler J, Ludsteck M. 1989. HPLC-Bestimmung der Alkaloide (Scopolamin und Hyoscyamine) von Stechapfelsamen (*Datura spec.*) in Futtermittel. *Landwirtschaftliche Forschung* 42:293-309.

Buech U, Isenberg E, Buech HP. 1994. HPLC assay for atropine in serum and protein solutions after in vivo addition of the tropane alkloids. *Pharmacology* 16(5):361-365.

Bunke A, Jira T, Beyrich T, Tsui R, Shiralagi K, Shen J. 1996. Growth of resonant interband tunneling diodes using trimethylamine alane. *Journal of Crystal Growth* 164(1):491-495.

Bushan R, Martens J, Arora M. 2001. Direct resolution of (+)-ephedrine and atropine into their enantiomers by impregnated TLC. *Biomedical Chromatography* 15:151-154.

Bushway RJ, Barden ES, Bushway AW, Bushway AA. 1979. High performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids. *Journal of Chromatography* 178:533-541.

Bushway RJ, Bureau JL, Stickney MR. 1985. A new efficient method for extracting glycoalkaloids from dehydrated potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33:45-46.

Carman ASJr, Kuan SS, Ware GM, Francis OJJr, Kirschenheuter GP. 1986. Rapid high performance liquid chromatographic determination of the potato glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34:279-282.

Caporael LR. 1976. Ergotism: The Satan Loosed in Salem? *Science* Vol. 192.

Center for disease control and prevention. 1984. *Datura* poisoning from hamburger - Canada. *MMWR* 33(20):282-283.

Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Jimsonweed Poisoning Associated with a Homemade Stew - Maryland, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 59(4):102–103.

Chang SS WM, Deng JF. 1999. Poisoning by *Datura* leaves used as edible wild vegetables. *Veterinary Human Toxicology* 41(4):242-245.

Chen H, Chen Y, Du P, Han F, Wang H, Zhang H. 2006. Sensitive and specific liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for atropine and its eleven metabolites in rat urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40:142-150.

Cherkaoui S, Mateus L, Christen P, Veuthey JL. 1997. Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of atropine, homatropine and scopolamine in ophthalmic solutions. *Journal of Chromatography B Biomedicaal Science Applications* 696(2):283-290.

Cherkaoui S, Mateus L, Christen P, Veuthey JL. 1999. Nonaqueous versus aqueous capillary electrophoresis for the dosage of N-butylscopolamine in various pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analisis* 21(1):165-174.

Cherkaoui S, Rudaz S, Varesio E, Veuthey JL. 2001. On-line capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry for the stereoselective analysis of drugs and metabolites. *Electrophoresis* 22:3308-3315.

Chuda Y, Tsuda S, Ohara-Takada A, Kobayashi A, Suzuki K, Ono H, Yoshida M, Nagata T, Kobayashi S, Mori M. 2004. Quantification of light-induced glycoalkaloids, α -solanine and α -chaconine, in four potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) distributed in Japan by LC/MS. *Food Science and Technology Research* 10:341-345.

Cieri UR. 2005. Identification and estimation of the levo isomer in raw materials and finished products containing atropine and /or hyoscyamine. *Journal of AOAC International* 88(1):1-4.

Collins C, Freyer M, Grosso A. 2006. Plant uptake of non-ionic organic chemicals. *Environmental Science Technology*, 40:45-52.

Collins CD, Finnegan E. 2010. Modeling the plant uptake of organic chemicals, including the soil-air-plant pathway. *Environmental Science Technology*, 44:998-1003.

Coxon DT, Price KR, Jones PG. 1979. A simplified method for the determination of total glycoalkaloids in potato tubers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 30:1043-1049.

Coxon DT. 1984. Methodology for glycoalkaloid analysis. *American Potato Journal* 61:169-183.

Distl M, Sibum M, Wink M. 2009. Combination of on-line solid-phase extraction with LC-MS for the determination of potentially hazardous glycoalkaloids in potato products, *Potato Research* 52:39-56.

Driedger DR, LeBlanc RJ, LeBlanc EL, Sporns P. 2000a. A capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for analysis of potato glycoalkaloids based on a solution-phase immunoassay. 1. Separation and quantification of immunoassay products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1135-1139.

Dräger B. 2002. Analysis of tropane and related alkaloids: Review, *Journal of Chromatography A* 978:1-35.

Đarmati Š. 1985. Posledice hemijske kontaminacije životne sredine, Privredapublik, Beograd.

Edwards EJ, Cobb AH. 1996. Improved high-performance liquid chromatographic method for the analysis of potato (*Solanum tuberosum*) glycoalkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:2705-2709.

Edwards EJ, Cobb AH. 1998. Current methods of potato glycoalkaloid analysis: problems and potential. *Aspects of Applied Biology* 52:331-337.

EFSA. 2008. Tropane alkaloids (from *Datura* sp.) as undesirable substances in animal feed. *EFSA Journal* 691:1-55.

EFSA. 2009. EFSA Compendium of botanicals that have been reported to contain toxic, addictive, psychotropic or other substances of concern. *EFSA Journal* 7(9):281.

Eltayeb EA, Al-Sinani SS, Khan IA. 2003/4. Determination of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine levels in 18 varieties of potato (*Solanum tuberosum* L.) grown in Oman. *Potato Research* 46:57-66.

European Community. 2002. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of the 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Off J Eur Union L* 140, 30.5.2002, p. 10-21.

European Community. 2002. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C (2002) 3044). *Off J Eur Union L* 221, 17.8.2002, p. 8-36.

FAO/WHO. 1999. Summary of evaluations performed by the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). ILSI Press, Washington.

Ferreira F, Moyna P, Soule S, Vázquez A. 1993. Rapid-determination of solanum glycoalkaloids by thin-layer chromatographic scanning. *Journal of Chromatography A* 653:380-384.

Forrester RM. 1979. "Have you eaten laburnum?". *Lancet*. May 19 1979 313(8125):1073.

Freye E. 2009. Pharmacology and Abuse of Cocaine, Amphetamines, Ecstasy and Related Designer Drugs, Springer Netherlands pp 217-218.

Fretz R, Schmid D, Brueller W, Girsch L, Pichler AM, Riediger K, Safer M, Allerberger L. 2007. Food poisoning due to Jimson weed mimicking *Bacillus cereus* food intoxication in Austria, 2006. *The International Journal of Infectious Diseases* 11(6):557-558.

Friedman M, Levin CE. 1992. Reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids and hydrolysis products on acidic columns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:2157-2163.

Friedman M, McDonald GM. 1995a. Acid-catalyzed partial hydrolysis of carbohydrate groups of the potato glycoalkaloid α -chaconine in alcoholic solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:1501-1506.

Friedman M., Mc Donald G.M. 1997. Potato glycoalkaloids: chemistry analysis, safety and plant physiology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16:55–132.

Friedman M, Bautista FF, Stanker LH, Larkin KA. 1998. Analysis of potato glycoalkaloids. by a new ELISA kit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:5097-5102.

Friedman M, McDonald GM. 1999. Steroidal glycoalkaloids. In: *Naturally occurring glycosides*, Ikan, R. (ed.). John Wiley & Sons Ltd. pp. 311-343.

Friedman M, Roitman JN, Kozukue N. 2003b. Glycoalkaloid and calystegine contents of eight potato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2964-2973.

Friedman M. 2004. Analysis of biologically compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Chromatography A* 1054:143-155.

Friedman M. 2006. Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the Plant and in the Diet. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54:8655-8681.

Goodwin TW, Mercer El. 1988. *Introduction to Plant Biochemistry*, Ed 2. Pergamon Press, Oxford, pp 477-479, 577-578, 618.

Gregory P, Sinden SL, Osman SF, Tingey WM, Chessin DA. 1981. Glycoalkaloids of wild, tuberbearing *Solanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 29:1212-1215.

Griffiths DW, Bain H, Deighton N, Robertson GW, Dale MFB. 2000. Photo-induced synthesis of tomatidenol-based glycoalkaloids in *Solanum phureja* tubers. *Phytochemistry* 53:739-745.

Hamilton RJ, Perrone J, Hoffman R. 2000. A descriptive study of an epidemic of poisoning caused by heroin adulterated with scopolamine. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 38(6):597-608.

Heftmann, E. 1983. Biogenesis of steroids in *Solanaceae*. *Phytochemistry*, 22:1843-1860.

Hellenäs KE, Nyman A, Slanina P, Löf L, Gabriëlsson J. 1992. Determination of potato glycoalkaloids and their aglycone in blood serum by high-performance liquid chromatography –Application to pharmacokinetic studies in humans. *Journal of Chromatography* 573:69-78.

Herb SF, Fitzpatrick TJ, Osman SF. 1975. Separation of potato glycoalkaloids by gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23:520-523.

Heyden YV, Nijhuis A, Smeyers-Verbeke J, Vandeginste BGM, Massart DL. 2001. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24:723-753.

Hooper RG, Conner CS, Rumack BH. 1979. Acute poisoning from over-the-counter sleep preparations. *Journal of the American College of Emergency Physicians* 8:98-100.

Houben RJ, Brunt K. 1994. Determination of glycoalkaloids in potato tubers by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 661:169-174.

International Atomic Energy Agency (IAEA). 1991. Laboratory training manual on the use of Nuclear and Associated Techniques in pesticide research, Technical Reports series No. 329.

Jadhav SJ, Salunkhe DK, Wyse RE., Dalvi RR. 1973. *Solanum* alkaloids: biosynthesis and inhibition by chemicals. *Journal of Food Science* 38:453-455.

Jensen PH, Harder BJ, Strobel BW, Svensmark B, Hansen HCB. 2007. Extraction and determination of the potato glycoalkaloid α -solanine in soil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 87(12):813-824.

Jensen PH. 2008. Analysis and Fate of Toxic Glycoalkaloids from *Solanum tuberosum* in the Terrestrial Environment [dissertation]. [Copenhagen (DK)]: University of Copenhagen.

Jonker HH, Koops AJ, Hoogendoorn JC. 1992. A rapid method for the quantification of steroidal glycoalkaloids by reversed phase HPLC. *Potato Research* 35:451-455.

Juvik JA, Stevens MA, Rick CM. 1982. Survey of the genus *Lycopersicon* for variability in α -tomatine content. *HortScience* 17:764-766.

Kaneko K, Watanabe M, Taira S, Mitsushashi H. 1972. Conversion of solanidine to jerveratrum alkaloids in *Veratrum grandiflorum*. *Phytochemistry* 11:3199-3202.

Kaneko K, Tanaka MW, Mitsushashi H. 1976. Origin of nitrogen in the biosynthesis of solanidine by *Veratrum grandiflorum*. *Phytochemistry* 15:1391-1393.

Kaneko K, Tanaka MW, Mitsushashi H. 1977a. Dormantinol, a possible precursor in solanidine biosynthesis, from budding *Veratrum grandiflorum*. *Phytochemistry* 16:1247-1251.

Kaneko K, Tanaka MW, Takahashi E, Mitsushashi H. 1977b. Teinemine and isoteinemine, two new alkaloids from *Veratrum grandiflorum*. *Phytochemistry* 16:1620-1622.

Kaneko K, Kawamura N, Kuribayashi T, Tanaka M, Mitsushashi H. 1978. Structures of two cevanine alkaloids, shinonomenine and veraflorizine, and a cevanidane alkaloid, procevine, isolated from illuminated *Veratrum*. *Tetrahedron Letters* 48:4801-4804.

Kartal M, Kurucu S, Altun L. 2002. Quantitative Analysis of l-Hyoscyamine in *Hyoscyamus reticulatus* L. by GC-MS. *Turkish Journal of Chemistry* 27:565-569.

Keukens EAJ, Hop MECM, Jongen WMF. 1994. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantification of α -tomatine in tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:2475-2477.

Kikuchi Y, Hida W, Chonan T, Shindoh C, Sasaki H, Takishima T, 1991. Decrease in functional residual capacity during inspiratory loading and the sensation of dyspnea. *Journal of Applied Physiology* 71:1787-1794.

King RR. 1980. Analysis of potato glycoalkaloids by gas-liquid chromatography of alkaloid components. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 63:1226-1230.

Kodamatani H, Saito K, Niina N, Yamazaki S, Tanaka Y. 2005. Simple and sensitive method for determination of glycoalkaloids in potato tubers by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography* 1100:26-31.

Korpan YI, Nazarenko EA, Skryshevskaya IV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, El'skaya A. 2004. Potato glycoalkaloids: true safety or false sense of security? *Trends in Biotechnology* 22(3):147-151.

Kuhn R, Löw I, Trischmann H. 1955a. Die Konstitution des α -Chaconins. *Chemische Ber* 88, 1690-1693.

Kuhn R, Löw I, Trischmann H. 1955b. Die Konstitution des Solanins. *Chemische Ber* 88:1492-1507.

Kuronen P, Väänänen T, Pehu E. 1999. Reversed phase high performance liquid chromatographic separation and simultaneous profiling of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. *Journal of Chromatography A* 863:25-35.

Lai MW, Klein-Schwartz W, Rodgers GC, Abrams JY, Haber DA, Bronstein AC. 2005. Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' national poisoning and exposure database. *Clinical Toxicology (Phila)*. 2006; 44(6-7):803-932.

Laurila J, Laakso I, Väänänen T, Kuronen P, Huopalahti R, Pehu E. 1999. Determination of solanidine- and tomatidine-type glycoalkaloid aglycones by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:2738-2742.

Laurila J. 2004. Interspecific hybrids of potato: determination of glycoalkaloid aglycones and influence of bacterial infection. University of Helsinki, Department of Applied Biology, Section of Crop Husbandry, Helsinki. Publication no 22.

Lawson DR, Erb WA, Miller AR. 1992. Analysis of *Solanum* alkaloids using internal standardization and capillary gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:2186-2191.

Leete E, Loudon ML. 1962. The Biosynthesis of tropic acid. *Journal of American Chemistry Society* 84:1510-1511.

Leete E, Nelson SJ. 1969. Biosynthesis of the teloidine moiety of meteloidine in *Datura meteloides*. *Phytochemistry* 8(2):413-418.

Li H, sheng G, Chiou CT, Xu O. 2005. Relation of organic contaminant equilibrium sorption and kinetic uptake in plants. *Environmental Science Technology*, 39:4864-4870.

Mahato SB, Ganguly AN, Sahu NP. 1982. Steroid saponins. *Phytochemistry* 21:959-978

Machado RMD, Toledo MCF, Garcia LC. 2007. Effect of light and temperature on the formation of glycoalkaloids in potato tubers. *Food Control* 18:503-508.

Mariotti A. 1983. Atmospheric Nitrogen is a Reliable Standard for Natural ¹⁵N Abundance Measurements. *Nature* 303:685-687.

Marjanović N. 2001: Instrumentalne metode analize I/1. Metode razdvajanja, Univerzitet u Banjoj Luci, Banja Luka.

Marsel J. 1977. Advanced Course in Mass Spectrometry, Introductory Lectures, Portorož, Institut „J. Stefan“ Univerza Ljubljana.

Mateus L, Cherakoui S, Christen P, Veuthey JL. 2000. Enantioseparation of atropine by capillary electrophoresis using sulfated β-cyclodextrin: application to a plant extract. *Journal of Chromatography A* 868:285-294.

Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. 2003. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC. *Anal. Chem.* 75:3019-3030.

Matsuda F, Morino K, Miyazawa H, Miyashita M, Miyagawa H. 2004. Determination of potato glycoalkaloids using high-pressure liquid chromatography-electrospray ionisation/mass spectrometry. *Phytochemistry Analysis* 15:121-124.

McMillan M, Thompson JC. 1979. An outbreak of suspected solanine poisoning in schoolboys: Examination of criteria of solanine poisoning. *Q J Med* 48:227-243.

Milić BLj, Đilas S, Čanadović-Brunet JM. 1998. Alkaloidi. Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki Fakultet.

Miraldi E, Masti A, Ferri S, Comparini IB. 2001. Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia* 72:644-648.

Morgan MR, Mc Nerney R, Matthew JA, Coxon DT, Chan HW. 1983. An enzymelinked immunosorbent assay for total glycoalkaloids in potato tubers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34:593-598.

Morgan MRA, Coxon DT, Bramham S, Chan HWS, van Gelder WMJ, Allison MJ. 1985. Determination of the glycoalkaloid content of potato tubers by three methods including enzymelinked immunosorbent assay. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36:282-288.

Morris SC, Lee TH. 1984. The toxicity and teratogenicity of Solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*): A review. *Food Austr* 36(3):118-124.

Mountain WL. 1987. Jimsonweed, *Datura Stramonium* L. Solanaceae Regulatory Horticulture, Weed Circular No.12.

Namera A, Yashiki M, Hirose Y, Yamaji S, Tani T, Kojima T. 2002. Quantitative analysis of tropane alkaloids in biological materials by gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic Science International* 130:34–43.

Naudé TW. 2007. *Veterinary Toxicology-Basic and Clinical Principles*. Oxford (UK): Elsevier-Academic Press. Chapter 70, *Datura* spp. and other related plants; p. 892-906.

Nikolic NC, Stankovic MZ. 2003. Solanidine hydrolytic extraction and separation from the potato (*Solanum tuberosum* L.) vines by using solidliquidliquid systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:1845-1849.

Nikolić NČ, Stanković MZ, Cakić MD. 2003. Čvrsto-tečni sistemi za hidrolizu glikoalkaloida iz klica krompira (*Solanum tuberosum* L) i izolovanje solanidina. *Hemijska industrija* 57(6):288-292.

Norby FL, Ren J. 2002. Anisodamine inhibits cardiac contraction and intracellular Ca²⁺ transients in isolated adult rat ventricular myocytes. *European Journal of Pharmacology* 439: 21–25.

Oertel R, Richter K, Ebert U. 1996. Determination of scopolamine in human serum by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 682(2):259-264.

Osman SF, Sinden SL. 1977. Analysis of mixtures of solanidine and demissidine glycoalkaloids containing identical carbohydrate units. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25:955-957.

Osman SF, Herb SF, Fitzpatrick TJ, Schmiediche P. 1978. Glycoalkaloid composition of wild and cultivated tuberbearing *Solanum* species of potential value in potato breeding programs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 26:1246-1248.

Osman SF, Zacharius RM, Naglak D. 1980. Solanidine metabolism in potato tuber tissue slices and cell suspension cultures. *Phytochemistry* 19:2599-2601.

Papadoyannis IN, Samanidou VF, Theodoridis GA, Vasilikiotis GS, Van Kempen GJM, Beelen GM. 1993. A simple and quick solid phase extraction and reversed phase HPLC analysis of some tropane alkaloids in feedstuffs and biological samples. *Journal of Liquid Chromatography* 16(5):975-998.

Papadoyannis IN. 2006. Determination of datura alkaloids by using chromatographic techniques: A review. *Natural Toxins* 3(4):310-316.

Paseshnikchenko VA, Guseva AR. 1956. Quantitative determination of potato glycoalkaloids and their preparative separation. *Biochemistry-Moscow* 21:606-611.

Payne J, Hamill JD, Robins RJ, Rhodes M-JC. 1987. Production of hyoscyamine by "Hairy Root" cultures of *Datura stramonium*. *Planta Medica* 53:474–478.

Payá P, Anastassiades M, Mack D, Sigalova I, Tasseln B, Oliva J, Barba A. 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS)

pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 16(7):1610-1617.

Perharic L. 2005. Mass tropane alkaloid poisoning due to backwheat flour contamination. *Clinical Toxicology* 43:413. Breton D, Buret D, Clair P, Lafosse M. 2005. Chiral separation of atropine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1088:104-109.

Pereira CA NSdD. 1994. Poisoning by the use of *Datura* leaves in a homemade toothpaste. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 32(3):329-331.

Petersen HW, Mølgaard P, Nyman U, Olsen CE. 1993. Chemotaxonomy of the tuberbearing *Solanum* species, subsection *Potatoe* (Solanaceae). *Biochemistry System Ecology* 21:629-644.

Pietsch J, Koch I, Hermanns-Clausen M, Huller G, Wagner R, Dressler J. 2008. Pediatric plant exposures in Germany, 1998-2004. *Clinical Toxicology (Phila)* 46(7):686-691.

Piva G, Piva A. 1995. Anti-nutritional factors of *Datura* in feedstuffs. *Natural Toxins* 3:238-241.

Plhak LC, Sporns P. 1992. Enzyme immunoassay for potato glycoalkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:2533-2540.

Plhak L, Sporns P. 1994. Development and production of monoclonal antibodies for the measurement of solanidine potato glycoalkaloids. *American Potato Journal* 71:297-314.

Puri R, Wong TC, Puri RK. 1994. ¹H and ¹³C NMR assignments and structural determination of a novel glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*. *Journal of Natural Products* 57:587-596.

Radeglia R, Adam G, Ripperger H. 1997. *Solanum* alkaloids. Part CIV. Carbon 13 NMR spectroscopy of *Solanum* steroid alkaloids. *Tetrahedron Lett* 11:903-906.

Ramirez M RE, Ereu C. 1999. Fifteen cases of atropine poisoning after honey ingestion. *Veterinary Human Toxicology* 41(1):19-20.

Reist M, Testa B, Carrupt PA. 1997. The racemization of anantiopure drugs: helping medicinal chemists to approach the problem. *Enantiomer* 2:147-155.

Ripperger H, Schreiber K. 1981. *Solanum* steroid alkaloids. In: The alkaloids; chemistry and physiology, Volume XIX, Manske, R.H.F. & Rodrigo, R.G.A. (eds.). Academic Press, New York. pp. 81-192.

Roddick JG. 1976. Intracellular distribution of the steroidal glycoalkaloid α -tomatine in *Lycopersicon esculentum* fruit. *Phytochemistry* 15:475-477.

Roddick JG. 1977. Subcellular localization of steroidal glycoalkaloids in vegetative organs of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 16:805-807.

Roddick JG. 1979. Complex formation between solanaceous steroidal glycoalkaloids and free sterols in vitro. *Phytochemistry* 18:1467-1470.

Roddick JG. 1982. Distribution of steroidal glycoalkaloids in reciprocal grafts of *Solanum tuberosum* L. and *Lycopersicon esculentum* Mill. *Experientia* 38:460-462.

Roddick JG, Melchers G. 1985. Steroidal glycoalkaloid content of potato, tomato and their somatic hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 70:655-660.

Roddick JG. 1989. The acetylcholinesterase inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycons. *Phytochemistry* 28:2631-2634.

Rouessac F, Rouessac A. 2007. *Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, p.41.

Rubinson KA, Rubinson J.F. 2000. *Contemporary Instrumental Analysis*, New York: Prentice-Hall.

Saito K, Horie M, Hoshino Y, Nose N, Nakazawa H. 1990. High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids in potato products. *Journal of Chromatography* 508:141-147.

Schreiber von K, Aurich O, Osske G. 1963b. *Solanum* Alkaloids. XVIII. Thin layer chromatography of *Solanum* steroidal alkaloids and steroidal sapogenins. *Journal of Chromatography* 12:63-69.

- Schreiber K. 1968. Steroid alkaloids. *Solanum* group. *Alkaloids* (Academic Press) 10:1192.
- Shervette RE, Schydlower M, Lampe RM, Fearnow RG. 1979. Jimson "loco" weed abuse in adolescents. *Pediatrics* 63:520-523.
- Siluk D, Mager DE, Gronich N, Abernethy D, Wainer IW. 2007. HPLC-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric method for enantioselective determination of R,S-propranolol and R,S-hyoscyamine in human plasma. *Journal of Chromatography B* 859:213-221.
- Silverstein RM, Webster FX. 1997. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc.
- Simonovska B, Vovk I. 2000. High-performance thin-layer chromatographic determination of potato glycoalkaloids. *Journal of Chromatography* 903:219-225.
- Sotelo A, Serrano B. 2000. High performance liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids R-solanine and R-chaconine in 12 commercial varieties of Mexican potato. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48:2472-2475.
- Speroni JJ, Pell EJ. 1980. Modified method for tuber glycoalkaloid and leaf glycoalkaloid analysis. *American Potato Journal* 57:537-542.
- Steenkamp V, Mathivha E, Gouws MC, Rensburg CEJ. 2004. Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Afr. *Journal of Ethnopharmacology* 95:353-357.
- Stobiecki M, Matysiak-Kata I, Franski R, Skaa J, Szopa J. 2003. Monitoring changes in anthocyanin and steroid alkaloid glycoside content in lines of transgenic potato plants using liquid chromatography/mass spectrometry. *Phytochemistry* 62:959-969.
- Sulyok M, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20:2649-2659.
- Švarc-Gajić J. 2011. *Nutritional Insights and Food Safety*. Chapter 2. Švarc-Gajić J. *Naturally Occurring Food Toxicants*. Novascience Publishers, New York pp 39-98.

Valverde M, Lavaud C, Boustie J, El Badaoui H, Muguet B, Henry M. 1993. Solamargine: the main glycoalkaloid from the fruits of *Solanum paludosum*. *Planta Medica* 59:483-484.

Verpoorte R. 2000. Secondary metabolism. In: Verpoorte R, Alfermann AW (eds) *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 1–29.

Vitale AA, Acher A, Pomilio B. 1995. Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 49(2):81-89.

Van Gelder WMJ. 1984. A new hydrolysis technique for steroid glycoalkaloids with unstable aglycones from *Solanum* spp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35:487-494.

Van Gelder WMJ, Scheffer JJC. 1991. Transmission of steroidal glycoalkaloids from *Solanum vernei* to the cultivated potato. *Phytochemistry* 30:165-168.

Wang SL, Bedford CL, Thompson NR. 1972. Determination of glycoalkaloids in potatoes (*S. tuberosum*) with a bisolvent extraction method. *American Potato Journal* 49:302-308.

Ward CM, Franklin JG, Morgan MR A. 1988. Investigations into the visual assessment of ELISA end points: application to determination of potato total glycoalkaloids. *Food Additives and Contaminants* 5:621-627.

Ware GM, Price G, Carter L Jr, Eitenlimer RR. 2000. Liquid chromatographic preparative method for isolating ergot alkaloids, using a particle-loaded membrane extracting disk. *Journal of AOAC International* 83:1395-1399.

Waters Corporation. 2002. USA Application Note for Food Analysis by LC-MS.

Weston RJ, Gottlieb HE, Hagaman EW, Wenkert E. 1977. Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally occurring substances. LI. *Solanum* glycoalkaloids. *Australian Journal of Chemistry* 30: 917-921.

Xu A, Havel J, Linderholm J, Hulse J. 1995. Development and validation of an LC/MS/MS method for the determination of L-hyoscyamine in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 14:33-42.

Youden WJ, Steiner E H. 1975. Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists, The Association of Official Analytical Chemists ed.; Arlington p.33-36, 70-71, 82-83.

Zhao J, Camire ME, Bushway RJ, Bushway AA. 1994. Glycoalkaloid content and *in vitro* glycoalkaloid solubility of extruded potato peels. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42:2570-2573.

Zywicki B, Catchpole G, Draper J, Fiehn O. 2005. Comparison of rapid liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for determination of glycoalkaloids in transgenic field grown potatoes. Analytical Biochemistry 336:178-186.

Prilog: Fotografije



Slika 35. GC-MS



Slika 36. LC-MS/MS



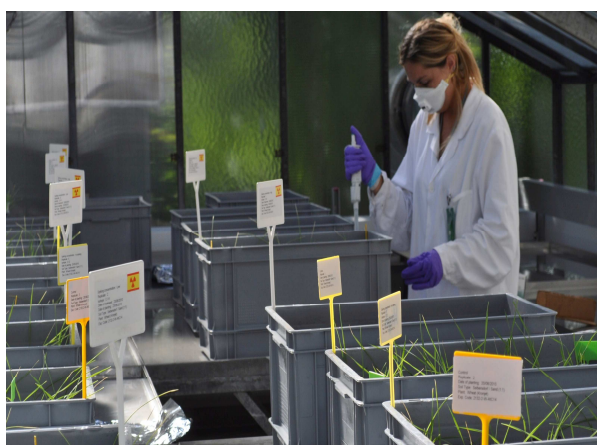
Slika 37. EA-IRMS



Slika 38. LSC



Slika 39. Biološki uređaj za oksidaciju



Slika 40. Spajkovanje zemljišta sa atropinom ^{14}C