

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HELENA BRODNJAK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJE

LJUBLJANA, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HELENA BRODNJAK

**ANALIZA LUPANINSKIH ALKALOIDOV V IZBRANIH
RASTLINSKIH VRSTAH Z UPORABO PLINSKE
KROMATOGRAFIJE**

**LUPIN ALKALOID ANALYSIS OF SELECTED PLANT SPECIES
USING GAS CHROMATOGRAPHY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJE

LJUBLJANA, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Damjanu Janešu, mag. farm za vodenje pri izdelavi naloge, pomoč, nasvete in potrpežljivost. Prav tako se zahvaljujem doc. dr. Nini Kočevar Glavač, mag. farm. za prikaz praktičnega dela in vsem iz Katedre za farmacevtsko biologijo za pomoč in prijazne besede.

Posebej se zahvaljujem družini za stalno podporo in zaupanje. Za vse koristne napotke pri izdelavi naloge gre zahvala Majdi in Boštjanu. Hvala tudi sošolcem, prijateljem za spodbude in lepe spomine iz študijskih dni.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Ljubljana, 2016

Helena Brodnjak

Komisija:

Predsednica: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Mentor: izr. prof. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

Član: izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
KAZALO SLIK	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO GRAFOV	VIII
1 UVOD	1
1.1 ALKALOIDI	1
1.1.1 Splošno o alkaloidih	1
1.1.2 Lastnosti in kemizem alkaloidov	2
1.1.3 Razširjenost alkaloidov v naravi	3
1.1.4 Alkaloidi v farmaciji in njihovi učinki	3
1.2 LUPANINSKI ALKALOIDI	5
1.2.1 Struktura lupaninskih alkaloidov	5
1.2.2 Biosinteza kinolizidinskih alkaloidov	6
1.2.3 Vsebnost kinolizidinskih alkaloidov v rastlinah	8
1.2.4 Analitika kinolizidinskih alkaloidov	8
1.2.5 Prisotnost kinolizidinskih alkaloidov v prehrani	11
1.2.6 Farmakološki učinki in vloga kinolizidinskih alkaloidov	13
1.2.7 Toksičnost kinolizidinskih alkaloidov	13
1.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO (GC-MS)	14
1.3.1 Plinska kromatografija	14
1.3.2 Masna spekrometrija	15
2 NAMEN DELA	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Rastlinski material	18
3.1.2 Reagenti	20
3.1.3 Naprave in laboratorijska oprema	21
3.2 METODE	22

3.1.1	Izolacija, ločba in identifikacija lupaninskih alkaloidov	22
3.1.2	Metoda analize hlapnih spojin	24
4	EKSPERIMENTALNO DELO	25
4.1	PRIPRAVA VZORCEV	25
4.1.1	Priprava ekstraktov lupaninskih alkaloidov iz posušenih zeli	25
4.1.2	Tehtanje in dodatek HCl	25
4.1.3	Raztapljanje in ekstrakcija	25
4.1.4	Centrifugiranje	26
4.1.5	Naalkaljenje	26
4.1.6	Ekstrakcija tekoče-tekoče	26
4.1.7	Shranjevanje in prenos vzorcev na GC-MS	26
4.2	IDENTIFIKACIJA ALKALOIDOV	27
4.3	KVANTIFIKACIJA ALKALOIDOV	27
4.3.1	Priprava raztopin standarda za umeritveno krivuljo	27
4.3.2	Umeritvena premica	30
4.3.3	Meja detekcije in kvantifikacije	30
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	31
5.1	IDENTIFIKACIJA ALKALOIDOV V RASTLINAH Z GC-MS.	31
5.2	KONCENTRACIJE ALKALOIDOV	32
5.2.1	Izračun koncentracij lupaninskih alkaloidov	32
5.2.2	Primerjava vsebnosti QA v istovrstnih rastlinah	34
5.3	POZITIVNI VZORCI	35
5.4	MOREBITNA PRISOTNOST DRUGIH ALKALOIDOV IN TOKSIČNOST SPOJIN V VZORCIH	50
5.5	PREDLOGI ZA IZBOLJŠANJE UČINKOVITOSTI EKSTRAKCIJE QA	54
5.5.1	Zunanji dejavniki	54
5.5.2	Izvedba metode	56
6	SKLEP	58
7	LITERATURA	60
8	PRILOGE	67

POVZETEK

Lupaninski alkaloidi se od drugih alkaloidov ločijo po tem, da imajo namanj en kinolizidinski obroč, ki je sestavljen iz dveh 6-členskih obročev, ki si delita dušikov atom. Ti alkaloidi so toksični za ljudi in živali, nekateri izkazujejo tudi zanimive farmakološke aktivnosti. Pripisujejo jim antiaritmijske, hipotenzivne in hipoglikemijske učinke, na CŽS delujejo zaviralno. Delujejo lahko tudi teratogeno (anagirin, amodendrin). Lupaninski alkaloidi so zaradi grenkosti in toksičnosti nezaželeni v prehrani ljudi in živali, ker pa je možno alkaloidne odstraniti, se določene rastline, na primer volčji bob, uporabljajo v prehrani ljudi in živali. V Sloveniji so razni volčji bobi sicer poznani kot okrasne rastline, v živilih pa je njihova semena možno zaslediti v kavnih nadomestkih, pekovskih izdelkih brez glutena ter v nadomestkih mesa in soje, kamor jih dodajajo zaradi ugodne aminokislinske sestave in majhne vsebnosti ogljikohidratov. Ker so lupaninski alkaloidi eden izmed možnih vzrokov za občasne zastrupitve lipicancev, je bil namen te raziskave z ustrezno metodo kvantitativno in kvalitativno vrednotiti morebitne lupaninske alkaloidne, prisotne v rastlinah s travišč, ki so izvor krme lipicancev. Analizirali smo vzorce posušenih rastlin, ki bi lahko vsebovale lupaninske alkaloidne. Za analizo lupaninskih alkaloidov smo uporabili plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS). Lupaninske alkaloidne smo zaznali v petih vzorcih, od teh bi štiri lahko predstavljali izvor lupanina in hidroksilupanina v krmi. V teh vzorcih smo našli še druge lupaninske alkaloidne, med njimi tudi teratogene (amodendrin). Izguba estrov lupaninskih alkaloidov je pri uporabljeni metodi predstavljala največjo težavo, najverjetneje so hidrolizirali med ekstrakcijo pod vplivom NaOH. Primerjava literarnih podatkov o vsebnosti lupaninskih alkaloidov v istovrstnih rastlinah z rezultati te raziskave je težka, saj obstaja možnost obstoja podvrst, močnega vpliva okolja, možno je tudi križanje rastlin. Zato je zlasti za rod *Lupinus* znano, da botanična določitev rastline ni dovolj za določitev morebitne toksičnosti rastline. V takšnih primerih je pomembna kvalitativna in kvantitativna analiza alkaloidov, na podlagi katere se določi tveganje.

Ključne besede: lupaninski alkaloidi, plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS), lipicanci, toksičnost

ABSTRACT

Lupin alkaloids differ from other alkaloids in at least one quinolizidine ring. It is composed of two 6 atoms carbon rings, sharing nitrogen. These alkaloids possess toxic and also pharmacological activity in humans and animals. To lupin alkaloids are attributed antiarrhythmic, hypotensive and hypoglycemic effects, on CNS they have inhibitory effects. Some of them can also have teratogenic effects (anagyrene, ammodendrine). Because of bitterness and toxicity lupin alkaloids are undesirable in food. Despite the fact that lupin seeds contain alkaloids, they are edible after debittering and are used in human and animal nutrition. In Slovenia, various lupins are known as ornamental flowers. Seeds of some species can be found in coffee substitutes, gluten free bakery products, and also in meat and soy substitutes due to favourable amino acid composition and low carbohydrate content. Since lupin alkaloids are one of the possible causes for the occasional poisoning of Lipizzan horses, the purpose of this work was to qualitatively and quantitatively determine with appropriate method the potential lupin alkaloids present in pasture plants, which are the source of the Lipizzaner fodder. Samples of dried plants that could contain lupin alkaloids were analysed employing gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Lupin alkaloids were detected in five samples, four of them might be the source of lupanine and hydroxylupanine in hay fodder. In positive samples other lupin alkaloids were also found, among them one teratogen (ammodendrine). The major problem of the analytical method was the loss of lupin esters, probably due hydrolysis with sodium hydroxide during extraction. The comparison of sample data on lupin alkaloid content with literature data in plants of the same kind it is difficult because assumptions about the existence of subspecies, strong environmental influences and possible hybridisations are made. Therefore, mainly for the genus *Lupinus* botanical determination is not sufficient for the conclusion of the potential toxicity of the plant. In such cases, qualitative and quantitative determination of alkaloids is important to determine the risk.

Keywords: lupin alkaloids, gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC- MS), Lipizzaners, toxicity

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP – adenzintrifosfat

CoA – koencim A

CŽS – centralni živčni sistem (angl.: Central Nervous System)

DO – diamin-oksidaža

ECT – *O-p*-kumaroiltransferaza

EFSA – Evropska agencija za varnost hrane (angl.: European Food Safety Authority)

GC-MS – plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (angl.: Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry)

HMT/HLT – (-)-13 α -hidroksimultiflorin/(+)-13 α -hidroksilupanin-*O*-tigloiltransferaza

i. m. – intramuskularna aplikacija

LDL – lipoproteini nizke gostote (angl.: Low Density Lipoprotein)

m/z – razmerje masa nabojev

mesh – ameriška merska enota za velikost delcev

MF – mobilna faza

NIST – podatkovna baza Nacionalnega inštituta standardov in tehnologije (angl.: National Institute of Standards and Technology)

NPAA – neproteinske aminokisliline

PLP – piridoksalfosfat

QA – kinolizidinski alkaloidi (angl.: quinolizidine alkaloids)

pr. n. št. – pred našim štetjem

R_f – retardacijski faktor

R_i – retencijski indeks (angl.: Kovats retention index)

rpm – obrati na minuto (angl.: revolution per minute)

SF – stacionarna faza

SFE – ekstrakcija s superkritičnim fluidom (angl.: Supercritical Fluid Extraction)

t-RNA – prenašalna RNA (angl.: transfer RNA)

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura morfina [8].	2
Slika 2: Struktura kapsaicina [9].	3
Slika 3: Struktura meskalina [10].	3
Slika 4: Strukturna podobnost med nevrotitrmiterjem acetilholinom ter amodendrinom in nikotinom [13], [14], [15].	4
Slika 5: Mesta delovanja sekundarnih presnovkov v živalski celici [12].	5
Slika 6: Kinolizidin (levo), lupanin (na sredini), lupan (desno).	5
Slika 7: Diagram sinteze lupinina, lupanina, sparteina, citizina [5], [22], [23].	7
Slika 8: Shema dokazne reakcije z Dragendorffovim reagentom [25].	10
Slika 9: Prigrizek iz semena volčjega boba v slanici [32].	11
Slika 10: Skrivenčene tace, značilne za »crooked calf disease« (levo) [37].	12
Slika 11: Razklano nebo goveda (desno) [38].	12
Slika 12: Shema GC-MS [50].	16
Slika 13: Vzorec mnogolistnega volčjega boba (B) pred mletjem.	20
Slika 14: Zmleti vzorci, nakisani s HCl.	25
Slika 15: Shema celotnega postopka ekstrakcije lupaninskih alkaloidov.	26
Slika 16: Shema postopka priprave raztopin standardov s koncentracijami.	27
Slika 17: Graf umeritvene premice (Lupanoidi 1).	30
Slika 18: Strukture lupaninskih alkaloidov iz naših vzorcev, ugotovljenih z GC-MS.	32

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Podatki o vzorcih.	18
Preglednica II: Injicirane raztopine.....	29
Preglednica III: Primerjani retencijski indeksi.	31
Preglednica IV: Vsebnost lupaninskih alkaloidov v vzorcih (v ppm suhe mase rastline). 33	
Preglednica V: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v <i>G. sagittalis</i> .36	
Preglednica VI: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v <i>G. tinctoria</i>	37
Preglednica VII: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v <i>L. albus</i>	39
Preglednica VIII: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v <i>G. sericea</i>	42
Preglednica IX: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v <i>L.</i> <i>polyphyllus</i>	45
Preglednica X: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v <i>C. supinus</i> ...	47
Preglednica XI: Vsebnost morebitnih toksičnih sekundarnih presnovkov v vzorčnih rastlinah.	50

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Primerjava vsebnosti QA (v %) v <i>G. tinctoria</i>	38
Graf 2: Primerjava vsebnosti QA (v %) v <i>L. albus</i>	41
Graf 3: Primerjava vsebnosti QA (v %) v <i>G. sericea</i>	43
Graf 4: Primerjava vsebnosti QA (v %) v <i>L. polyphyllus</i>	45

1 UVOD

1.1 ALKALOIDI

1.1.1 Splošno o alkaloidih

Beseda alkaloid izvira iz arabske besede *al qali* in se nanaša na rastlinski pepel, ki vsebuje kalijev karbonat, ki je kot večina alkaloidov bazična spojina. Tradicionalno so alkaloidi definirani kot heterociklični obroči, ki vsebujejo enega ali več atomov dušika, so bazični in nastanejo iz aminokislin [1]. Večina alkaloidov je fiziološko aktivnih, velikokrat delujejo toksično na živali in ljudi. Med alkaloide pa prištevamo tudi spojine, ki niso skladne s to definicijo, ampak jih zaradi njihove preteklosti uvrščamo med alkaloide. Francoski kemik Pelletier je leta 1983 podal moderno definicijo alkaloidov: »Alkaloid je ciklična organska spojina, ki vsebuje dušik v negativni oksidacijski stopnji in ima omejeno razširjenost v živem svetu« [2].

Alkaloidi predstavljajo eno izmed večjih skupin naravnih presnovkov, do leta 2009 je bilo poznanih več kot 12.000 različnih spojin [1], [3]. Predvidevajo, da so se alkaloidi razvili že zelo zgodaj, prisotni naj bi bili že pred 200 milijoni let. Alkaloide najpogosteje najdemo v višjih rastlinah, vsebuje jih okoli 15 % rastlin, najdemo pa jih tudi v bakterijah (*Pseudomonas aeruginosa*), glivah (*Psilocybe*) in živalih (krastače, spužve, insekti) [2], [4].

Začetek uporabe alkaloidov sega v čas nastanka civilizacij, ko so rastline z alkaloidi pred več kot 4000 leti začeli uporabljati v zdravilne namene, pri verskih obredih, njihove toksične učinke pa so spretno izkoriščali za lov in bojevanje. Že v Mezopotamiji (2000 pr. n. št.) so uporabljali uspavalni mak (*Papaver somniferum*), v antični Indiji so poznali konopljo (*Cannabis sativa*) [5], v Južni Ameriki pa so za lov uporabljali puščice in sulice, namočene v kurare¹, izvleček več rastlin, ki je povzročil paralizo žrtve [2].

Kljub stalni uporabi alkaloidov pa so se prvi poskusi izolacije začeli komaj v začetku 19. stoletja. Friedrich Sertürner je leta 1805 prvič izoliral morfin. Prav izolacija in proučevanje alkaloidov je močno pospešilo razvoj organske kemije. Prva uporaba termina alkaloid sega v leto 1819, ko je farmacevt Carl Friedrich Wilhelm Meißner proučeval alkaloid in jih zaradi njihovih lastnosti, podobnih alkalijam, poimenoval alkaloidi [5].

¹ Vsebuje več alkaloidov, izmed katerih je najstrupenejši tubokurarin, ki zasede acetilholinske receptorje ter s tem blokira živčnomišični prenos. Posledica je miorelaksanten učinek na žrtev [2].

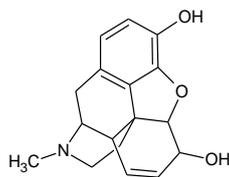
Alkaloidi so sekundarni presnovki rastlin, njihov nastanek in vloga še nista povsem razjasnjena. Nekateri menijo, da gre za terminalne presnovke, da so brez koristi [1]. Dandanes najbolj prepriča trditev, da imajo alkaloidi obrambno vlogo v rastlinah, živalih in mikroorganizmih pred drugimi organizmi, saj imajo odganjalni in/ali strupeni učinek na morebitne škodljivce, k čemur pripomore tudi grenak okus večine alkaloidov [5], [6]. V rastlinah alkaloidi delujejo še kot atraktanti za opraševalce, so zaloga dušika, lahko so rastni faktorji ali inhibitorji [2], [5].

1.1.2 Lastnosti in kemizem alkaloidov

Molska masa alkaloidov znaša od 100 do 900 g/mol. Večina alkaloidov je kristalnih (vsebujejo kisik), redkeje so pa v tekočem stanju (brez kisika) [1]. V naravi navadno tvorijo soli s kislinami v rastlinah, ki so topne v vodi, čeprav so prisotni tudi kot proste baze ali dušikovi oksidi. Za proste baze navadno velja, da so bolj topne v organskih topilih, slabše pa v vodnih raztopinah [1]. Navadno so alkaloidi bazični, obstajajo pa tudi izjeme, saj imajo nekateri alkaloidi nevtralne ali šibko kisle lastnosti; piperin, alkaloid iz popra je nevtralen, ricinin pa šibko kisel [5], [7].

Zaradi strukturne pestrosti, širokega spektra delovanja ter različnih poti sinteze obstaja tudi mnogo različnih delitev alkaloidov [1]. Hegnauer je pri delitvi upošteval tako biokemijsko pot kot stanje, v katerem je dušik. Na ta način je alkaloidne razdelil v tri skupine: **pravi alkaloidi**, **protoalkaloidi** in **pseudoalkaloidi** [7].

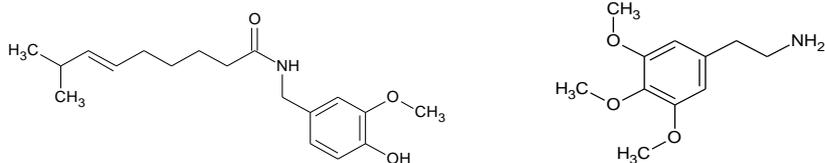
Pravi alkaloidi izhajajo iz aminkoislina in imajo heterociklični obroč z dušikom. Za vse je značilen grenak okus. Izolirane spojine so navadno v obliki belega prahu ali kristalov, izjema je na primer nikotin, ki je pri sobni temperaturi tekoč. Zanje je značilen močan farmakološki učinek že v nizkih odmerkih. Tipični predstavniki te skupine so: morfin (slika 1), kokain, kinin [5].



Slika 1: Struktura morfina [8].

Obroč **psevdoalkaloidov** ne izhajajo iz aminokislin, temveč iz terpenoidov ali steroidov, lahko je tudi poliacetatnega izvora. Nato se lahko v obroč še naknadno vgradi dušikov atom, ki je lahko tudi aminokislinskega izvora. Predstavniki te skupine so: pinidin, kofein, teobromin, solanidin [5].

Pri **protoalkaloidih** izvira dušik iz aminokislina, vendar ni vključen v obroč. Za njih je značilen zaprt obroč in preprosta struktura. Predstavljajo majhen del alkaloidov. Predstavniki: kapsaicin, meskalin (slika 2 in 3), muskarin, johimbin [5].



Slika 2: Struktura kapsaicina [9].

Slika 3: Struktura meskalina [10].

1.1.3 Razširjenost alkaloidov v naravi

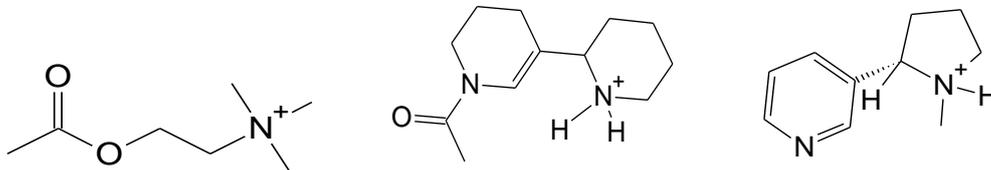
Približno 20 % vseh vrst rastlin vsebuje okoli 0,01% ali več alkaloidov na suho maso [11]. Alkaloid se nikoli ne pojavi sam, vedno jih je prisotnih več različnih hkrati. Prisotni so kot zmes več prevladujočih alkaloidov ter tistih spremljajočih, v sledovih [12]. V rastlinah so prisotni v nizkih koncentracijah (0,1-2 % suhe mase) [2]. Za ustrezno obrambo morajo biti alkaloidi skoncentrirani v obrobni celični strukturi, ki jih plenilci najprej napadejo in v delih, ključnih za preživetje (korenine, seme, cvet, mlado rastoče tkivo) [4].

1.1.4 Alkaloidi v farmaciji in njihovi učinki

Sekundarni presnovki lahko imajo mnogo tarč na celici, posledica tega je nespecifično delovanje. Alkaloidi imajo navadno bolj specifično delovanje in interagirajo z eno določeno tarčo. S tarčami tvorijo nespecifične ali specifične interakcije. Primeri tarč različnih alkaloidov v živalski celici so vidni na sliki 5 [12].

Specifične interakcije. Veliko alkaloidov se je skozi evolucijo prilagodilo in veliko med njimi jih tudi posnema endogene ligande, hormone ali substrate napadalcev rastlin. Nevrotransmiterji izhajajo iz aminokislin, večina jih je aminov in se v fizioloških razmerah protonirajo. Pogosto alkaloidi izhajajo iz istih aminokislin kot nevrotransmiterji, zato so tudi

podobne strukture. Takšni strukturni analogi lahko z vezavo na receptor le-tega aktivira ali inaktivira [12]. S spodnjih struktur (slika 4) se razbere podobnost v nabitem kvarternem dušiku, ki je pomemben za vezavo na nikotinski receptor.



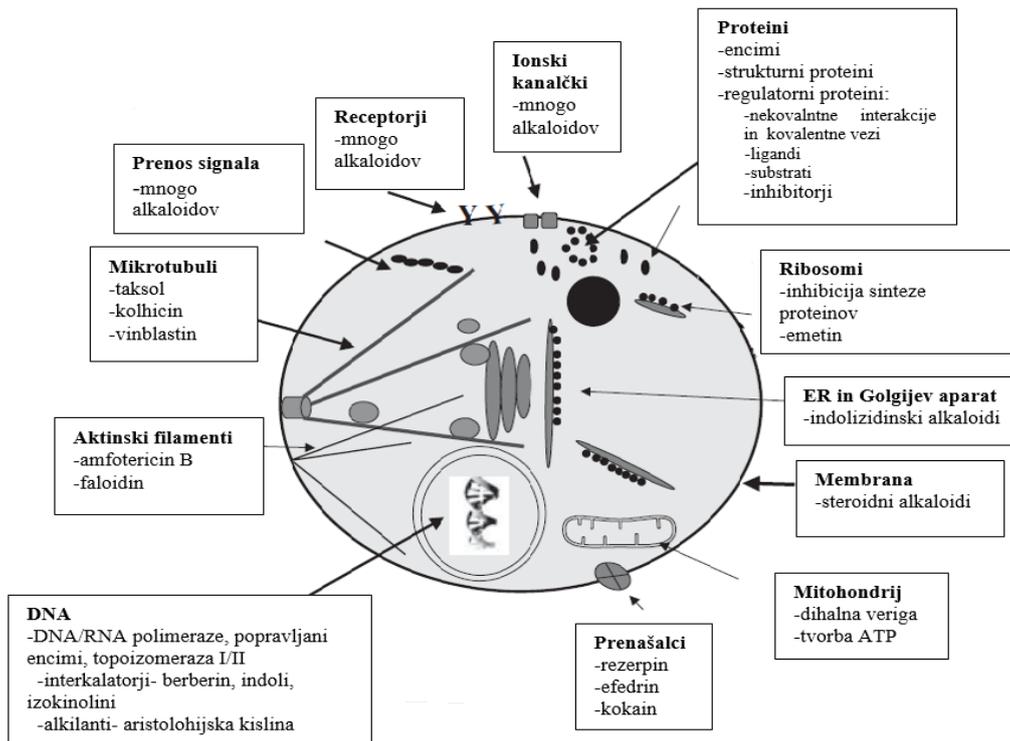
Slika 4: Strukturna podobnost med neurotransmiterjem acetilholinom ter amodendrinom in nikotinom [13], [14], [15].

Toksičnost je sekundarna funkcija alkaloidov, saj so neškodljivi za rastline, ki jih sintetizirajo [5]. Povezana je z lokacijo alkaloidov v rastlinski celici [4]. Alkaloidi niso toksični, ko so shranjeni v vakuoli, temveč zunaj nje. Zaradi spremembe pH se zunaj vakuole spremeni njihova oblika in s tem biološka aktivnost [5]. Saponinski ali steroidni alkaloidi lahko delujejo citotoksično, ker lahko povečajo prepustnost membran [12].

Spojine vodnice. Medicina še danes uporablja nekatere alkaloidne spojine, ki so lahko strukturno enake kot v naravi bodisi so modificirani [5]. Tako mnogi alkaloidi danes služijo kot modelne spojine za sintezo novih učinkovin. Hiosciamin in skopolamin sta osnovi za parasimpatolitike, tubokurarin za mišične relaksante, kokain za lokalne anestetike [2]... Na trgu so alkaloidi prisotni kot antimalariki (kinin in klorokin), protitumorne učinkovine (taksol), antihipertenzivi (nekdaj rezerpin), midriatiki (atropin) [1], [5]...

Rastlinske droge. Rastline se velikokrat uporabljajo za izolacijo čistih alkaloidov. Izvlečki alkaloidnih drog so osnova za izdelavo fitofarmakov [16]. Alkaloidi v drogah so najstarejša uporabljena zdravila [5]. Ker pa so učinki alkaloidov lahko zelo močni, navadno v drogah niso zaželeni. Zato so bolj pomembni izolirani alkaloidi, kjer odmerke lažje nadziramo. V homeopatskih pripravkih je količina alkaloidov tako majhna (oziroma nezaznavna), da ni neželenih učinkov [1].

Homeopatija. V homeopatiji so homeopatske surovine lahko izdelane iz rastlin, ki vsebujejo alkaloidne spojine. Primeri nekaterih pripravkov na trgu v Sloveniji: *Belladonna*, *Chelidonium majus*, *Conium maculatum*, *Nux vomica*, *Nicotiana tabacum*, *Datura stramonium* ... [17]

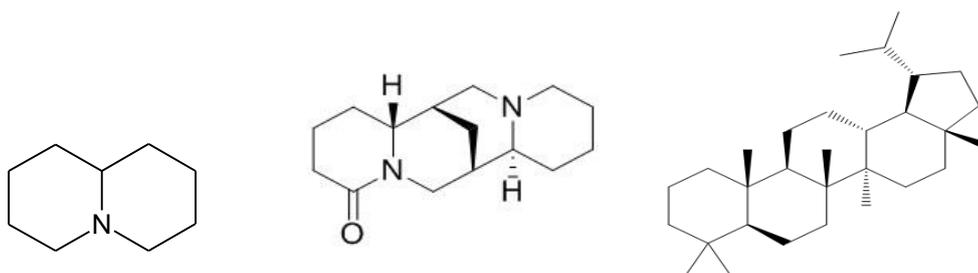


Slika 5: Mesta delovanja sekundarnih presnovkov v živalski celici [12].

1.2 LUPANINSKI ALKALOIDI

1.2.1 Struktura lupaninskih alkaloidov

Lupaninski alkaloidi se od drugih alkaloidov ločijo po tem, da imajo (vsaj) en kinolizidinski obroč (slika 7). Ta obroč je sestavljen iz dveh 6-členskih obročev, ki si delita dušikov atom. Po njem jih lahko imenujemo tudi kinolizidinski alkaloidi² [11].



Slika 6: Kinolizidin (levo), lupanin (na sredini), lupan (desno).

² Najpogostejše in najboljše študije teh alkaloidov so narejene na rastlinah iz rodu *Lupinus*, zato je angleško ime *lupin alkaloids* = lupaninski alkaloidi, če pa upoštevamo strukturo, je pravilno ime lupaninski alkaloidi, ki so podskupina kinolizidinskih alkaloidov. Ime lupanski alkaloidi je nepravilno, saj je lupan triterpen [2].

Kinolizidinski alkaloidi (QA) so toksični za ljudi in živali, nekateri izkazujejo zanimive farmakološke aktivnosti [18]. Poleg obrambne vloge je stranska naloga teh alkaloidov prenos dušika preko floema in skladiščenje le tega v semenih [2].

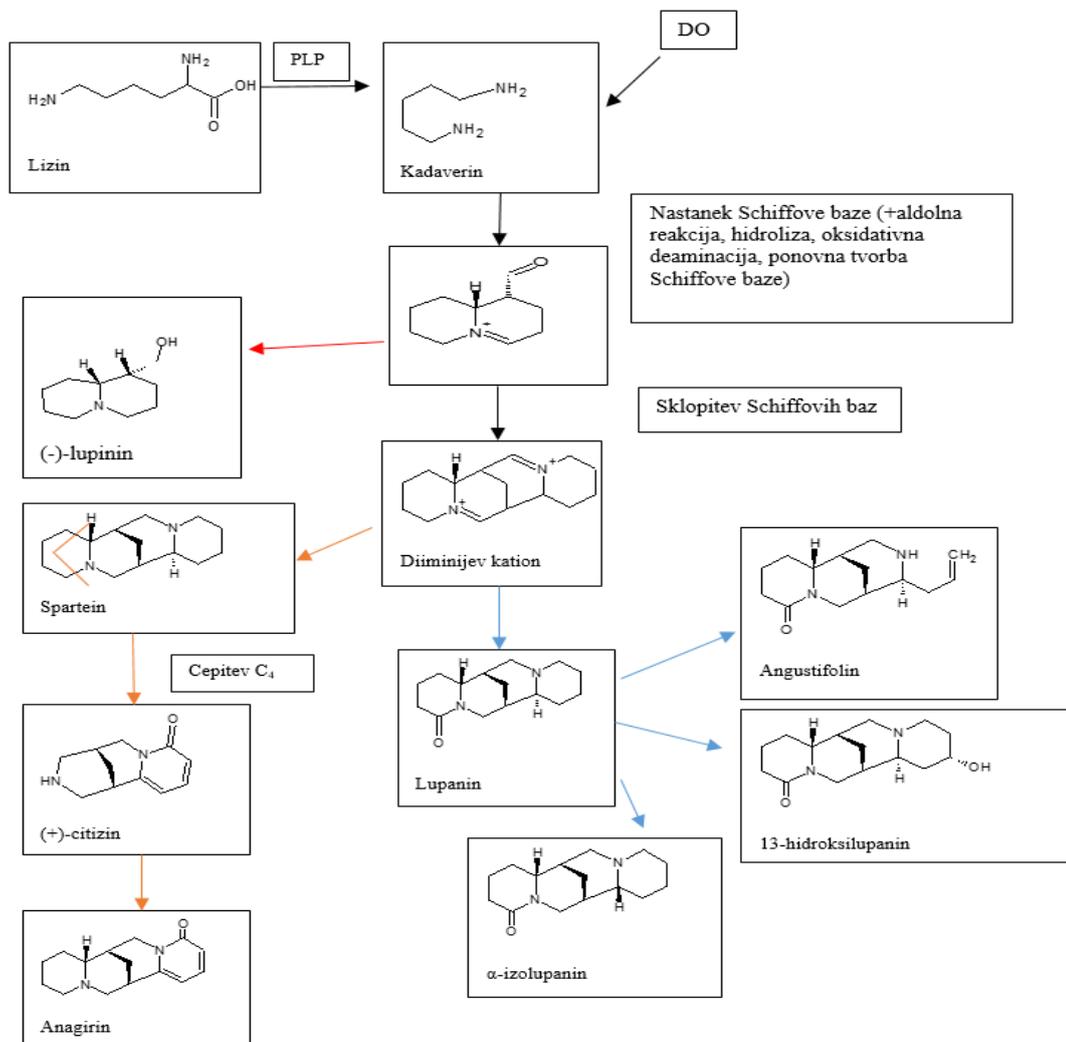
Poznanih je približno 200 različnih lupaninskih alkaloidov [19]. Najpogosteje se pojavljajo v družini metuljnic (Fabaceae). Najdemo jih tudi v številnih drugih nesorodnih družinah (Berberidaceae, Chenopodiaceae, Ranunculaceae ...) [11]. Sledi lupaninov so našli tudi v rastlinah [5] ali celičnih kulturah rastlin, ki navadno ne tvorijo tovrstnih presnovkov. To odkritje in pojavnost QA v nesorodnih zvrsteh rastlin, podaja hipotezo, da so geni, ki nosijo zapis za encime, ki sodelujejo pri strukturi kinolizidinskega ogrodja, veliko bolj razširjeni med rastlinami, vendar se ne izražajo, aktivni so le v določenih vrstah, ki jih uporabljajo za odganjanje herbivorov [2], [11].

1.2.2 Biosinteza kinolizidinskih alkaloidov

Osnovo (prekursor) za nastanek lupaninskih alkaloidov predstavlja aminokislina L-lizin, ki se pod vplivom koencima piridoksalfosfata (PLP) pretvori z dekarboksilacijo v kadaverin (intermediat). Ta tvori pod vplivom encima diamin-oksidade (DO) Schiffovo bazo (imin), ki se z aldolno reakcijo med enaminom in iminom pretvori v imin (Δ^1 -piperidein). Nato poteče hidroliza imina do aldehida (ali amina). Po oksidativni deaminaciji sledi ponovna tvorba Schiffove baze. Tako nastane kinolizidinsko jedro, ki je osnova za nastanek drugih alkaloidov. Tukaj se sintezna pot razcepi. Z redukcijo nastane (-)-lupinin, biciklični alkaloid. Glavna sintezna pot pa vodi do sklopitve Schiffove baze s substratom [5]. Štiriobročno jedro kinolizidinskih alkaloidov se tvori s sklopitvijo dveh kinolizidinskih jeder [20]. Tukaj lahko poteče tvorba (-)-sparteina ali pa (+)-lupanina. Možna je tudi pretvorba (-)-sparteina do (+)-citizina, tricikličnega alkaloida s piridonskim skeletom [5]. Z nastankom (+)-lupanina se odpre tudi sintezna pot za tvorbo njegovih derivatov: angustifolina, α -izolupanina, 13 α -hidroksilupanina (slika 7). Po tvorbi skeleta lahko potečejo nadaljnje reakcije: dehidrogenacija, hidroksilacija ali esterifikacija, ki pripomorejo k strukturalni pestrosti alkaloidov [20].

Lupaninski alkaloidi so lahko v vseh delih rastline, njihova sinteza pa poteka v nadzemnih zelenih delih rastlin, v kloroplastih mezofilnih celic, navadno stebel in listov [11], [21]. Njihov nastanek je podvržen dnevno-nočnemu ciklu; stimulira ga dnevna svetloba [21], ki sproži sintezo, če:

- je na voljo dovolj lizina (tvori se čez dan),
- pride do spremembe pH v stromi (optimalni pH za encime, ki sodelujejo pri tvorbi QA skeleta, je ravno 8),
- se zmanjša koncentracija tioredoksina, kar posledično aktivira od svetlobe odvisne encime v kloroplastih [4].



Slika 7: Diagram sinteze lupinina, lupanina, sparteina, citizina [5], [22], [23].

Preko floema QA prehajajo v druge rastlinske organe. Najpogosteje se skladiščijo v epidermalnih in subepidermalnih plasteh celic [21]. Med kaljenjem se QA premestijo iz kličnega lista v novonastala tkiva, kjer delno poteče njihova razgradnja. Zlasti so s QA bogata semena, kjer lahko delež doseže tudi do 8 % suhe mase [21]. Znotraj celice se QA shranjujejo v vakuole, kamor jih prečrpa poseben, selektiven transportni sistem [21]. Ker gre največkrat za polarne, nabite molekule, njihovo sproščanje poteka s pomočjo prenašalcev.

V njeni notranjosti je tudi kisel pH (3-6) zaradi prisotnosti H⁺ (vir so protonske ATPaze in pirofosfataze) [4], [21].

1.2.3 Vsebnost kinolizidinskih alkaloidov v rastlinah

QA predstavljajo glavne sekundarne presnovke v rodovih *Lupinus*, *Genista*, *Cytisus*, *Baptisia*, *Thermopsis*, *Sophora*, *Ormosia* [2]. Velikokrat se sočasno s QA pojavljajo tudi dipiperidinski amodendrinski alkaloidi, ki tudi nastajajo iz lizina [21]. V različnih rodovih ali celo istovrstnih rastlinah je vsebnost alkaloidov lahko različna. V 20. stoletju so v Nemčiji vzgajali rastline rodu *Lupinus* z nizko vsebnostjo QA (0,01 %). Tovrstne rastline so poimenovali »sladke« [6].

Rastline iz rodu *Lupinus* pogosto vsebujejo zaestrene QA. Vloga zaestrenih alkaloidov ni natančno znana, predvideva se, da so končni produkt biosinteze in so skladiščna oblika QA [18]. Rastline iz rodu *Lupinus* tvorijo tetraciklične (lupin) in biciklične alkaloidne (lupinin), ki jih navadno hranijo zaestrene s tiglino kislino, *p*-kumarno, osetno in ferulno kislino. Pri zaestrenju sodelujeta dve aciltransferazi: HMT/HLT ((-)-13 α -hidroksimultiflorin/(+)-13 α -hidroksilupanin-*O*-tigloiltransferaza) in *O*-*p*-kumaroiltransferaza (ECT). HMT/HLT, ki prenaša tigloilno skupino iz tigloil-CoA na 13 α -hidroksimultiflorin in 13 α -hidroksimultiflorin ali na 13 α -hidroksilupanin. Druga aciltransferaza ECT prenaša *p*-kumaroilno skupino (iz *p*-kumaroil-CoA) na hidroksilno skupino (+)-epilupinina. Nekatere vrste ne vsebujejo aciltransferaz [20].

Na suho maso vsebujejo rastline od 0,1 do 15 % QA [6]. Glede na količino QA v rastlini, jih lahko razdelimo na glavne in tiste v sledovih, ti se navadno ločijo le po vrsti in mestu vezave substituentov. Kombinacija QA se razlikuje tudi glede na rastlinske organe, zato lahko govorimo o različnem »profilu« QA. Profil QA pa se ne razlikuje le glede na organe, temveč tudi na rastno dobo, dnevno-nočni cikel, glede na posamezne rastline. Te kemijske spremembe v vsebnosti otežujejo adaptacijo herbivorov [21].

1.2.4 Analitika kinolizidinskih alkaloidov

Razvoj tehnologije je sčasoma pripeljal preproste metode vrednotenja QA do vedno bolj občutljivih in selektivnih metod izolacije in ugotavljanja QA. Kronološko je sledila uporaba naslednjih metod: dokaz z jodom, pokušanje, barva semena, Dragendorffov reagent,

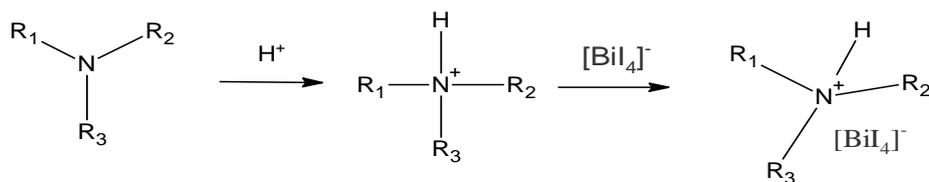
fluorescenca, kolorimetrija, spektrometrija, papirna kromatografija, tankoplastna kromatografija, visokoločljivostna tekočinska kromatografija, plinska kromatografija, plinska kromatografija sklopljena z masno sprektrometrijo, NMR, X-žarki, encimsko imunska metoda na trdnem nosilcu (ELISA) ... Vedno pogostejša je tudi uporaba tekočinske kromatografije visoke zmogljivosti (HPLC), kapilarne elektroforeze (CE) ter druge imunokemijske metode [24].

Prva metoda za dokazovanje QA izvira iz leta 1927, gre za **dokazovanje z jodom** (zmes I_2 in I^-). Prvič so lupaninske alkaloidne izolirali iz celih semen ali listov z vročo vodo in z reagentom »iodine-quicksilver potash« (kalijev tetrajodomerkurat(II)). Za »sladke« vrste lupinov³ so kasneje razvili metodo, kjer je vročo vodo nadomestila raztopina HCl. Prisotnost alkaloidov je povzročila rdeče-rjavo obarvanje. Obsoletno nekemijsko metodo je predstavljala tudi **pokušnja rastlin**, ki izvira že iz antike. Preizkuševalci so bili moški ali živali. Pri tem preizkusu je šlo za povezavo grenkega okusa z vsebnostjo QA. Gre za zelo subjektiven test. Tudi živali različno zaznavajo QA, na primer ovce in zajci jih slabše zaznajo. Ljudje zaznajo QA kot grenke, vendar je težava v tem, da grenkost dajejo tudi druge spojine v rastlinah, na primer nekateri flavonoidi [5].

Na podlagi **barve semen** so sklepali, da svetlejša semena vsebujejo manj QA, temnejša pa več. Metoda je nezanesljiva, saj so na primer pri belem volčjem bobu vsa semena bela in vsa vsebujejo velike količine QA [5].

Vsebnost QA se lahko dokaže tudi z **Dragendorffovim reagentom** (po predhodnem nakisanju), ki vsebuje KI in obarva kvarterne dušikove spojine ter nekatere sekundarne amine [5]. Pozitivna reakcija z Dragendorffovim reagentom poteče med kvarternim N^+ kinolizidinskega alkaloida in $[BiI_4]^-$ [5]. Do obarvanja pride zaradi nastanka oborine $[BiI_4]^- [HNR_3]^+$ (slika 8). Gre za hitro, preprosto indikatorsko metodo, ki z intenziteto barvne lise pokaže celotno količino QA, ne pa posameznih QA. Metoda je torej uporabna za ugotavljanje, če rastlina vsebuje QA ali ne [5].

³ Lupin - rastlina iz rodu *Lupinus*, poimenovanje smo prevzeli iz angleščine (angl. *lupin*), kjer je ta termin pogosto v uporabi [19].



Slika 8: Shema dokazne reakcije z Dragendorffovim reagentom [25].

Dragendorffov reagent še dandanes uporabljajo pridelovalci lupinov za identifikacijo grenkih tipov rastlin. Test poteka tako, da rastlinski sok nanesejo na testni papir, prepojen z reagentom. Pozitivna reakcija obarva indikatorski papir oranžnorjavo. Pomanjkljivost testa je meja detekcije, ki je 3 g/kg semena, kar je nezadostno za rutinsko ugotavljanje v sladkih lupinih, ki vsebujejo manj kot 500 mg/kg QA [26].

Pred razvojem plinske kromatografije (GC) so QA torej ugotavljali **kolorimetrijsko**. Kot indikator so pogosto uporabili tudi bromkrezolno vijolično [26]. Kislinsko bazično titracijo s *p*-toluensulfonsko kislino in tetrabromofenoltalein etilnim estrom kot indikatorjem za analizo QA uporabljamo pri sladkih tipih rastlin. Meja detekcije je 100 mg/kg semen, kar je bilo ustrezno za presejalni test za identifikacijo sladkih vrst, ki bi lahko vsebovale nesprejemljive koncentracije alkaloidov [26].

Klasične kolorimetrijske in titrimetrijske metode so zamenjale kromatografske metode. **Kapilarna plinska kromatografija** sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS): gre za občutljivo orodje z visoko resolucijo, kjer posameznih komponent ni treba ločeno izolirati. Zato so GC-MS na 6. Mednarodni konferenci lupinov uradno razglasili kot metodo izbora za ugotavljanje QA. Omogoča tudi ločbo diastereoizomerov [24]. GC-MS je uporabna pri QA, ker so stabilni tudi pri visokih temperaturah in ker nimajo kromofora. Včasih se pojavijo težave pri ugotavljanju estrov; nekaterim estrom hidrosilupanina ni bilo mogoče zaznati molekulskega iona [27].

Tankoplastna kromatografija (TLC): Retardacijski faktorji mnogih alkaloidov v mobilnih fazah TLC so dokumentirani in se lahko uporabljajo za identifikacijo in semi kvantifikacijo alkaloidov. S TLC lahko identificiramo izomere alkaloidov, ki se ne ločijo po retencijskih časih ali masnih spektrih (na primer lupinin, epilupinin imata podobna retencijska časa na 3 % OV17 koloni in identična masna spektra, razlikujeta pa se po vrednostih R_f na TLC). Možna je tudi detekcija z metodo **ELISA**, ki omogoča ugotavljanje QA v nanogramih.

Slabost te metode je daljši časovni potek ugotavljanja QA (priprava konjugatov z visoko specifičnostjo) [26].

1.2.5 Prisotnost kinolizidinskih alkaloidov v prehrani

V hrani so QA nezaželeni, vzrok sta njihova grenkoba in toksičnost. Kljub temu, da semena vsebujejo lupaninske alkaloidne, to ni bila ovira za uživanje semen rastlin rodu *Lupinus*. Že predniki v Andih in v Sredozemlju so QA znali izločiti iz semen in jih narediti užitne. Semena so do tri dni [28] namakali v vodi in potem še kuhali. Ekstrakte lupinov s QA so zavrgli [29]. Okus neobdelanega semena je bil zelo grenek, po tem postopku pa je postal sladek. Isti postopek še danes uporabljajo v sredozemskih državah in semena vrste *Lupinus albus* na tak način naredijo užitna [6].

Ljudje danes uživajo semena »sladkih lupinov« (slika 9) in jedi z moko iz semen lupinov. To moko mešajo s pšenično in s tem povečajo vsebnost proteinov. V Južni Evropi in na Bližnjem vzhodu v ljudski medicini uporabljajo prevreta semena kot zdravilo proti diabetesu [29]. Nekatere raziskave kažejo na hipoglikemijski učinek. Zanimivo je tudi to, da je izvleček belega volčjega boba brez QA tudi deloval hipoglikemijsko [21]. V nekaterih študijah na podganah so pri uživanju proteinov belega lupina poročali tudi o ugodnem učinku na zmanjšanje skupnega in LDL holesterola [30].

Pri manjšem deležu populacije se lahko pojavi tudi alergija na lupine, pogostejša je pri tistih z alergijo na arašide. [30] Zato je Evropska komisija volčji bob uvrstila na listo prehranskih alergenov, ki jih je nujno označevati na deklaraciji [31]. Alergija pri lupinih po nekaterih študijah naj ne bi potekala tako burno kot pri arašidih [30].



Slika 9: Prigrizek iz semena volčjega boba v slanici [32].

QA so prisotni tudi v kavni nadomestkih iz praženih semen volčjega boba (*Lupinus pilosus*, *Lupinus albus*). Volčji bob se vedno pogosteje pojavlja tudi v nadomestkih mesa, saj ima

visok delež beljakovin ter kakovostno aminokislinsko sestavo; primerljiv je s sojo⁴ [33]. Ti izdelki naj ne bi vsebovali več kot 200 mg/kg QA na končni izdelek po smernicah iz Avstralije, Velike Britanije, Francije ter Nove Zelandije [34].

QA v živinoreji. V ZDA so po letu 1800 opazili škodljivi učinek sena iz lupinov. Poginilo je ogromno goveda in ovac. V petdesetih letih 20. stoletja se je za skeletne deformacije zarodka, povzročene s QA, pojavil izraz »crooked calf disease«, ki se je pojavil pri mladičih krav, med brejostjo, hranjenimi s krmo s QA. Kasneje so ugotovili, da teratogeno deluje alkaloid anagirin [29]. Teratogeni učinki na fetus se kažejo kot deformacije sklepov, slab razvoj mišic, kit in deformacija ustne votline. Spremembe nastanejo zaradi zavrtega gibanja zarodka. Na sliki 10 se vidijo skrivenčene tace, po katerih je bolezen dobila ime [5], slika 11 pa prikazuje deformacije neba. Prisotnost QA v krmi torej ni zaželeno. Pri pašnih živalih je smiselno spremljanje QA v krmi, saj prevelike koncentracije povzročajo neješčnost in akutno zastrupitev [27]. Lupine kultivirajo v Avstraliji, Južni Ameriki, Vzhodni Evropi in v Sredozemlju kot dodatek krmi za živino, kjer je vsebnost QA v krmi omejena na 200 mg/kg krme⁵ [29].

QA iz rodu *Lupinus* delujejo bakteriostatično, spartein inhibira tudi rast fitopatogenih gliv [2]. Od hranjenja odvrčajo številne herbivore (nematode, insekte, polže, zajce, krave) [21]. Odganjanje škodljivcev je tudi glavni razlog, da pridelovalci lupinov v Zahodni Avstraliji skušajo obdržati koncentracijo alkaloidov med 0,5 in 1 mmol/kg. Pri manjši koncentraciji se namreč škoda zaradi uši močno poveča [26].



Slika 10: Skrivenčene tace, značilne za »crooked calf disease« (levo) [37].

Slika 11: Razklano nebo goveda (desno) [38].

⁴ Semena predstavnikov rodu *Lupinus* vsebujejo 30-50 % proteinov, do 20 % lipidov in 2-8 % alkaloidov, zelo malo škroba in veliko vlaknin [35], [36].

⁵Ta podatek se nanaša na varen vnos za sladke lupine, ki so namenjeni prehrani živali, po nekaterih starejših smernicah je bila meja v krmi manj kot 0,05 %, sodobnejše smernice pa priporočajo vsebnost tudi manj kot 0,02 %, ker novejša sladke vrste vsebujejo manj kot 0,01 % alkaloidov [39].

1.2.6 Farmakološki učinki in vloga kinolizidinskih alkaloidov

QA imajo antiaritmčne, hipotenzivne učinke, na CŽS delujejo zaviralno [3], [21]. Toksičnost in nekatere farmakološke učinke lahko razlagamo preko inhibicije Na⁺ in K⁺ kanalčkov ter interakcije z nikotinskimi in muskarinskimi acetilholinskimi receptorji. Zastrupitev se kaže na začetku s slabostjo in bruhanjem, krči in paralizo. Do smrti pride zaradi zastoja dihanja [2], [3], [39].

V moderni medicini QA ne igrajo vidnejše vloge. Izjema je **spartein**, ki se v obliki sparteinijevega sulfata uporablja kot antiaritmik pri srčnem popuščanju. Uporaba v porodništvu za induciranje materničnih kontrakcij se opušča, saj 10-15 % ljudi ne presnavlja sparteina [2]. Zaradi preproste izolacije sparteina iz navadnega reličnika (*Cytisus scoparius* L.) so ga že od nekdaj uporabljali tudi kot antiaritmik [21]. Uporabljali so ga tudi kot diuretik, kar je najverjetneje povezano s pozitivnim inotropnim učinkom, namreč v navadnem reličniku so prisotni tudi diurezni flavonoidi [2]. Spartein deluje na Na⁺ kanalčke, tako da zavre transport Na⁺ preko membrane, ter aktivira muskarinske antiholinergične receptorje in na tak način poveča prevodnost v srčni mišici [2]. V telesu se spartein presnavlja z *N*-oksidacijo, ki ji sledi premestitev do 2- in 5-dehidrosparteina. Pacienti, ki ne presnavljajo sparteina, ga več kot 90 % izločijo nespremenjenega v 24 urah. Pri tistih, ki ga presnavljajo, se 55 % odmerka izloči v 24 urah v urin, približno 30 % odmerka kot nespremenjenga, 7 % kot 5-dehidrosparteina in 18 % kot 2-dehidrosparteina. Razpolovni čas v plazmi je približno 3 ure pri posameznikih s hitro presnovo in približno 7 ur pri posameznikih s počasno presnovo ksenobiotikov. Uporablja se sparteinijev sulfat v odmerku 150 mg i. m. [40].

V Vzhodni Evropi (Bolgarija) uporabljajo tudi **citizin** (lastniško ime Tabex) kot pomoč pri odvajanju od kajenja. Citizin je namreč zaradi podobne strukture kot nikotin delni agonist na nikotinskih antiholinergičnih receptorjih in povzroča podobne farmakološke učinke. Ker se v času odvajanja citizin veže na nikotinske receptorje, se zmanjšajo učinki odtegnitvenega sindroma [41] [42]. Citizin in *N*-metilcitizin imata halucinogene učinke [43]. Zgoraj naštetе učinke lahko pojasnimo z vplivom na acetilholinske receptorje ter Na⁺/K⁺ kanalčke [21].

1.2.7 Toksičnost kinolizidinskih alkaloidov

QA ob zaužitju izkazuje širok spekter toksičnosti, delujejo agonistično na **acetilholinski receptor**. Nekateri QA izkazujejo večjo afiniteto do nikotinskih, drugi pa do muskarinskih

receptorjev. Na primer citizin, lupanin, amodendrin, delujejo na nikotinske acetilholinske receptorje z večjo afiniteto [12]. QA se že dolgo uporabljajo v ljudski medicini. Ti najverjetneje izkazujejo kronično toksičnost, za kar pa ni dovolj dokazov [5].

Nekateri QA (na primer spartein, lupanin) ne delujejo zgolj na acetilholinske receptorje, temveč tudi na **Na⁺ in K⁺ kanalčke**. Teratogeno delujejo anagirin, citizin [11], baptifolin [44] ter bipiperidinski alkaloid amodendrin [4]. Lupaninski alkaloidi so v *in vitro* študiji **zavirali tudi biosintezo proteinov v ribosomu**, kar tudi prispeva k toksičnosti. Natančneje so odkrili, da preprečuje sklapljanje t-RNA z aminokislinami. Ni pa vpliva na sintezo proteinov v rastlini, kjer se alkaloidi tvorijo. QA z učinki na biosintezo proteinov so spartein, lupanin, angustifolin, 13-tigloiloksilupanin in 13-hidroksilupanin [6], [11].

1.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO (GC-MS)

Kombinacija GC-MS (slika 12) v enem instrumentu omogoča ločevanje kompleksnih zmesi spojin do posameznih komponent, njihovo identifikacijo ter ugotavljanje vsebnosti in kvalitativne podatke o strukturi komponent. Sklopitev tehnik poveča občutljivost [45].

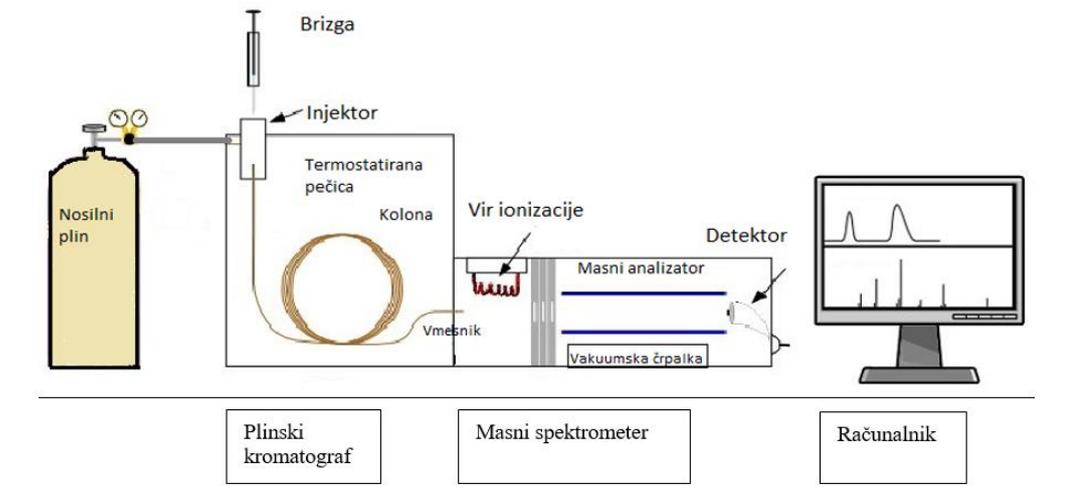
1.3.1 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je analizna metoda za ločitev in vrednotenje zmesi hlapnih spojin in plinov, ki pa morajo biti termično stabilni. Uparjeni vzorec vodimo na kapilarno kolono, navadno prevlečeno s tekočo fazo, ki predstavlja stacionarno fazo (SF). Mobilno fazo (MF), ki prenaša vzorec skozi kolono, predstavlja inerten plin, ki se ne veže na SF. Hitrost MF in difuzija vzorca vanj vplivata na hitrost analize in učinkovitost kolone [46]. V injektorju vzorec izpareva. Pri načinu razdelitve plina (»split«) vstopa na kolono le manjši del vzorca, večji del pa zavržemo. S tem preprečimo preobremenjenost kolone. V primerih, ko je analit prisoten v sledovih, pa se vzorec injicira brez razdelitve plina (»splitless«) [47]. Kolona predstavlja glavni del aparata za GC, ker se v njej loči plinska zmes. Injektor in kolona sta lahko ogrevana z namenom, da bi ločba molekul boljše potekala, saj vse injicirane molekule niso hlapne pri sobni temperaturi. Poznamo več temperaturnih programov, od izotermalnega do linearno gradientnega, kjer temperatura enkomerno raste. Slednjega uporabljamo pri tistih zmesih, kjer se retencijski časi spojin močno razlikujejo [45]. Na koncu sistema je detektor, ki zazna spojino v nosilnem plinu in daje znak, sorazmeren njeni koncentraciji. Na voljo je veliko različnih detektorjev: plamenski ionizirajoči detektor (FID), detektor na

zajetje elektronov (ECD), detektor na osnovi toplotne prevodnosti (TCD), argonov ionizacijski detektor [46], [47]... V primeru sklopitve GC-MS pa ima masni spektrometer vlogo detektorja [45].

1.3.2 Masna spektrometrija

Masni spektrometer je instrument, ki proizvaja in analizira zmesi ionov. Z njim lahko ugotovimo molekulsko maso spojine, elementno sestavo ter strukturo spojine, ki nam jo poda preko razpada molekul. Osnovni deli masnega spektrometra so vir ionizacije, masni analizator in detektor [48]. Ločene spojine se iz GC prenesejo v MS preko vmesnika v ionizacijski prostor, kjer se molekule vzorca ionizirajo. Za identifikacijo spojin se kot vir ionizacije uporablja groba ionizacija (EI), kjer pride do fragmentacije, za določanje molekulske mase pa mehkejša oblika – kemijska ionizacija (CI). Molekule se ionizirajo zaradi toka elektronov, ki poteka od katode proti anodi in je pravokoten glede na smer potovanja vzorca. Do ionizacije pride zaradi trka molekul z elektroni, ki izbijejo molekuli elektron, nastanejo pozitivno nabiti delci, ki se po izhodu iz ionizacijskega prostora pospešijo. Delci potujejo v analizator, kjer je vakuum, da ne pride do trkov v molekule plina. Tukaj poteka ločba delcev glede na razmerje mase in naboja (m/z). V analizatorju je tudi magnetno polje. Na delce deluje sila, ki je pravokotna na smer magnetnega polja in smer nabitih delcev, zato se tir potovanja delcev ukrivi. Lažji ioni potujejo po krajši krožnici do zbirala ionov, težji pa po daljši. Rezultat meritve je masni spekter [49]. Ob vstopu ionov v ionski detektor se ti odbijejo na kaskadno ploščo, kjer pride do pomnožitve signala in do pošiljanja podatkov v podatkovni sistem. Podatki se zapisujejo kot ionski tok proti m/z proti času. V enakem ali podobnem instrumentu pri enakih razmerah ima spojina vedno enak fragmentacijski vzorec, zato je lahko spojino identificiramo s primerjavo z znanimi fragmenti spojin (v podatkovnih knjižnicah fragmentov) [45].



Slika 12: Shema GC-MS [50].

2 NAMEN DELA

Lupaninski alkaloidi so eden izmed možnih vzrokov za občasne zastrupitve lipicancev. Namen diplomskega dela je z ustrežno metodo kvantitativno in kvalitativno vrednotiti morebitne lupaninske alkaloidne, prisotne v rastlinah s travišč, ki so izvor krme lipicancev. Analizirali bomo celotne posušene rastline, za katere domnevamo, da vsebujejo lupaninske alkaloidne. Za ugotavljanje koncentracije lupaninskih alkaloidov bomo uporabili plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS). Ta metoda nam omogoča potrditev identitete alkaloidov v vzorcu kot tudi kvantitativno vrednotenje. Ekstrakcijo bomo izvedli po prilagojenem uveljavljenem postopku, ki ga je uporabljal Wink [43]. Po identifikaciji bomo izmerili koncentracijo s pomočjo umeritvene premice referenčne spojine. Referenčna spojina za vse alkaloidne bo spartein, saj so referenčne spojine drugih lupaninskih alkaloidov nedostopne. Iz literature bomo poiskali podatke o vsebnosti QA v istovrstnih rastlinah in jih primerjali z rezultati analiziranih vzorcev. Predvidevamo, da bomo QA našli v nekaterih izmed analiziranih rastlin.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Rastlinski material

Rastlinski vzorci izvirajo iz različnih travišč, od koder izhaja tudi krma za lipicance v Lipici. Travišča so razsejana po vsej Sloveniji, največ pa jih je v okolici Krasa. Le tri preiskovane rastline so bile gojene (beli in mnogolistni volčji bob). Največ rastlin sodi v rod metuljnic, manjšina je iz rodov mlečkovk, zlatičevk, črnobinovk, broščevk.

Rastline je nabral in identificiral prof. dr. Franc Batič, univ. prof. biol. iz Biotehniške fakultete v Ljubljani. Nabrane so med majem in avgustom v letu 2013 ter maja in junija v letu 2014. Večina vzorcev zajema celo rastlino, skupaj s koreninami. Nekaj je bilo nabranih tudi cvetočih rastlin ali pa rastline s semeni (na primer mnogolistni volčji bob). Skupno je 35 vzorcev, nekateri so vzorci istovrstnih rastlin z različnih rastišč. Podatki o rastiščih, času nabiranja in o stanju nabranih rastlin so v preglednici I.

Preglednica I: Podatki o vzorcih.

Št. vz.	Vrsta rastline		Rastišče	Datum nabiranja	Deli rastlin
	Latinsko ime	Slovensko ime			
1.	<i>Trifolium montanum</i> L.	gorska detelja	Ogradeva	27. 5. 2013	N
2.	<i>Genista sericea</i> Wulf.	svilnata košeničica	Ogradeva	27. 5. 2013	CR, C
3.	<i>Genista sylvestris</i> Scop.	gozdna košeničica	Žnidarca	25. 7. 2013	CR
4.	<i>Genista tinctoria</i> L.	barvilna košeničica	Žnidarca	25. 7. 2013	CR, C
5.	<i>Chamaespartium sagittale</i> L. P. E. Gibbs	navadna prevezanka	Studenci	27. 5. 2013	CR, C
6.	<i>Genista pilosa</i> L.	dlakava košeničica	Ljubljana-Brdo	2. 7. 2014	N, C, S
7.	<i>Lathyrus linifolius</i> (Reich.) Baessler	gorski grahor	Studenci	27. 5. 2013	CR
8.	<i>Vicia villosa</i> Roth	kuštrava grašica	Slatna	27. 5. 2013	CR, C
9.	<i>Vicia cracca</i> L.	ptičja grašica	Črnotiče, suhi travniki, med grmovjem	2. 7. 2013	N, C
10.	<i>Medicago minima</i> (L.) Grufb.	drobna meteljka	Orešje	27. 8. 2013	CR, C
11.	<i>Dorycnium germanicum</i> (Gremli) Rouy	malocvetna španska detelja	Ovčja gorica	27. 5. 2013	CR, C
12.	<i>Coronilla varia</i> L.	pisana šmarna detelja	Slatna	27. 5. 2013	CR, C
13.	<i>Coronilla varia</i> L.	pisana šmarna detelja	Črnotiče, gozdni rob	2. 7. 2013	CR, C, malo korenin

14.	<i>Lupinus albus</i> L.	beli volčji bob	kultivirano - laboratorijsko polje pri BF	5. 7. 2013	N, S, SE
15.	<i>Lupinus polyphyllus</i> Lindl. // A	mnogolistni volčji bob	Podivjano, Košenjak pri Dravogradu	ni podatka	N, C
16.	<i>Lupinus polyphyllus</i> Lindl. // B	mnogolistni volčji bob	gojeno	17. 7. 2013	N, C, S
17.	<i>Lembotropis nigricans</i> (L.) Griseb	navadna kozja detelja	Črnotiče, suh pašnik - zaraščanje, Ob cesti,	2. 7. 2013	N, C
18.	<i>Lathyrus latifolius</i> L. // A	širokolistni grahor	Črnotiče, gozdni rob	2. 7. 2013	N, C, S, SE
19.	<i>Lathyrus latifolius</i> L. // B	širokolistni grahor	Šembije (Ilirska Bistrica)	16. 7. 2013	N, C, S
20.	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	navadna robinija	Dobrič	12. 7. 2014	N
21.	<i>Astragalus carniolicus</i> Kern.	kranjski grahovec	Črnotiče, pašnik,	2. 7. 2013	N, C, SE
22.	<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.	sladki grahovec	Tacen, borov gozd, ob Savi, poseka	10. 5. 2014	CR, C
23.	<i>Chamaecytisus purpureus</i> Scop.	rdeča relika	Tacen, borov gozd	10. 5. 2014	N, C
24.	<i>Chamaecytisus supinus</i> L. // R	nizka relika	Rašica, gozdni rob	4. 7. 2014	N, S, SE
25.	<i>Chamaecytisus supinus</i> L. // A	nizka relika	Postojna	3. 7. 2014	N, C, S
26.	<i>Chamaecytisus supinus</i> L. // B	nizka relika	Postojna	3. 7. 2014	N, S
27.	<i>Chamaecytisus supinus</i> L. // C	nizka relika	Postojna	3. 7. 2014	N, S
28.	<i>Chamaecytisus supinus</i> L. // D	nizka relika	Postojna	3. 7. 2014	N, S
29.	<i>Inula salicina</i> L.	vrbovolistni oman	Predbrestovnica	27. 5. 2013	CR
30.	<i>Euphorbia cyparissias</i> L.	cipresasti mleček	Gorenje njive	27. 5. 2013	CR, C
31.	<i>Thalictrum minus</i> L.	mali talin	Ogradeva	27. 5. 2013	CR
32.	<i>Ranunculus illyricus</i> L.	ilirski zlatičevka	Predbrestovnica	27. 5. 2013	CR, C
33.	<i>Pseudolysimachion barrelieri</i> Schott ex Roem. & Schult	Barrelierov pajetičnik	Ovčja Gorica	27. 5. 2013	CR
34.	<i>Rhinanthus glacialis</i> Personnat	resasti škrobotec	Ogradeva	27. 5. 2013	CR, C
35.	<i>Galium mollugo</i> L.	navadna lakota	Mašence	27. 5. 2013	CR, C

* Legenda družin: rdeče metuljnice (Fabaceae)
zeleno nebinovke (Asteraceae)
sivo mlečkovke (Euphorbiaceae)
rumeno zlatičevke (Ranunculaceae)
turkizno črnobinovke (Scrophulaceae)
vijolično broščevke (Rubiaceae)

Legenda oznak: CR- cela rastlina
C - cvetovi
N - nadzemni deli
S - stroki
SE - semena

Priprava in shranjevanje rastlinskih vzorcev

Vzorci so posušeni na zraku, pri sobnih razmerah, shranjeni v papirnatih vrečicah. Hranimo jih v omari na Katedri za farmacevstvo biologijo pri sobnih razmerah in zaščitene pred svetlobo. Videz enega izmed vzorcev predstavlja slika 13.



Slika 13: Vzorec mnogolistnega volčjega boba (B) pred mletjem.

3.1.2 Reagenti

Kemikalije

- NaOH, natrijev hidroksid, min. 99 %, p. a., (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- HCl, klorovodikova kislina, 37 %, p. a. (Carlo Erba, Milano, Italija),
- CH₂Cl₂, diklorometan, stabiliziran z amilenom, p. a. (Panreac, Barcelona, Španija).

Topila

- prečiščena voda (FFA, Univerza v Ljubljani).

Referenčne spojine

- C₁₅H₂₆N₂ · H₂SO₄, (–)-sparteinijev sulfat, min. 99,0 %, (Fluka, Buchs, Švica),
- *n*-alkani (C₁₀-C₃₃) za določitev retencijskih indeksov (R_i) - FFNSC *n*-alkanes mix (Restek, Bellefonte, PA, ZDA).

Na trgu je bil kot referenčna spojina dosegljiv le spartein, zato smo vse alkaloidne preračunali na spartein.

Raztopine

- 6 M raztopina NaOH: 12 g NaOH raztopimo v vodi v 50 mL bučki,
- 0,5 M raztopina HCl: 2,1 mL 37 % HCl smo prenesli v 50 mL bučko in dopolnili do oznake.

3.1.3 Naprave in laboratorijska oprema

Mletje

- laboratorijski mlinček z vodnim hlajenjem IKA A10 (IKA-Werke, Staufen, Nemčija).

Tehtanje

- analizna tehtnica (Mettler Toledo, XS205, Greifensee, Švica),
- precizna tehtnica Sartorius M-pact Ax4202 (Sartorius, Göttingen, Nemčija),
- precizna tehtnica Kern PCB (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija).

Raztapljanje, ekstrakcija

- ultrazvočna kadička SONOREX Digitec (Bandelin, Berlin, Nemčija),
- plastične konusne centrifugirke z navojem, 10 mL (TPP, Trasadingen, Švica),
- mikrocentrifugirka, 2 mL, (Eppendorf, Hamburg, Nemčija).

Centrifugiranje

- centrifuga Centric 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- centriuga Centric 200R (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

Plinska kromatografija sklopljena z masnim detektorjem (GC-MS)

- sistem: GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska),
- kolona: Restek RTX-1 FF (100 % polidimetilsiloksan) ($l = 30$ m, $d = 0,25$ mm, $df = 0,25$ μ m, Restek, Bellefonte, PA, ZDA),
- računalniški program: GCMS Solution 2.3 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska),
- knjižnica masnih spektrov: NIST 08 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska).

Drugi pribor

- steklena bučka s steklenim zamaškom, 100 mL, 10 mL ,
- polnilne pipete Qualicolor 10 mL, 5 mL, 2 mL, 1 mL (Auxilab, Navarra, Španija),

- avtomatske mikropipete Proline (1000-5000 μL , 100-1000 μL , (Sartorius-Biohit, Göttingen, Nemčija),
- ustrezne konice za mikropipete (Sartorius-Biohit, Göttingen, Nemčija),
- pH lističi 0-14 (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- Pasteurjeva pipeta (Brand, Wertheim, Nemčija),
- temne vialke za GC z ustreznim zamaškom,
- drugi pribor (steklene čaše, plastični čolniki, plastične žličke, steklene palčke).

Shranjevanje vzorcev:

- hladilnik ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Liebherr, Bulle, Švica).

3.2 METODE

Za ekstrakcijo QA iz posušenih, nadzemnih delov rastlin se največkrat uporablja postopek z nakisanjem in naalkaljenjem, čemur sledi ekstrakcija z organsko fazo in analiza z GC-MS. V literaturi so tovrstno izolacijo QA največkrat izvedli po spodaj navedenih postopkih. Glede na vzorec (semena/zel/posušen/svež) se navadno razlikuje postopek ekstrakcije lupaninskih alkaloidov.

3.1.1 Izolacija, ločba in identifikacija lupaninskih alkaloidov

Nossack s sodelavci [51] je primerjal dve metodi ekstrakcije lupaninskih alkaloidov iz semen *Lupinus* spp. Semena so najprej posušili in nato zmleli. Pri konvencionalni ekstrakciji so vzorec (1 g) najprej mešali v raztopini z etanolom, nato sonicirali (1 min) in centrifugirali (2500 rpm, 40 min). Supernatantu so še dodali toliko vodne raztopine, da je bil končen volumen 25 mL. Z NaOH so uravnali $\text{pH} > 11$. Naalkaljen vzorec (20 mL) so nato ekstrahirali na 2 načina:

1. Konvencionalna metoda

- A) Pri ekstrakciji trdno-tekoče je sledilo predkoncentriranje z Extrelut-20 kolono. Vzorec so eluirali s CH_2Cl_2 ($4 \times 25\text{ mL}$). Diklorometan so na koncu odstranili pri znižanem tlaku.
- B) Ekstrakcija tekoče-tekoče; vzorcu so dodali CH_2Cl_2 ($3 \times 10\text{ mL}$), združili organske faze in odstranili CH_2Cl_2 pri znižanem tlaku.

Pri obeh načinih ekstrakcije je sledila analiza s HRGC-FID in HRGC-MS.

2. Ekstrakcija s superkritičnim fluidom (SFE)

Uporabili so 0,5 g vzorca za 20 minutno ekstrakcijo s fluidom CO₂ ali CO₂ modificiran z drugimi topili (EtOH).

Vse ekstrakte so še potem očistili s perkolacijo z MeOH, ki so ga spustili skozi Pasteurjevo pipeto, napolnjeno s silikagelom (0,5 g), in aktivnim ogljem (0,5 g).

Klasični ekstrakciji sta pokazali primerljive izplene, ki so bili v večini primerov manjši od ekstrakcije s SFE. SFE je tudi veliko hitrejša metoda kot klasična.

Resta s sodelavci [34] je izolirala lupaninske alkaloidne iz semen in izdelkov, narejenih iz semen vrst *Lupinus albus* in *Lupinus angustifolius*. Semena so oluščili, zmelili in presejali skozi sito (60 mesh). Razmastili so jih s heksanom v Soxhletovem aparatu (6 h). Posušenemu vzrocu (1 g) so dodali 0,1 M HCl, ter mešali pri sobni temperaturi 17 ur. Zmes so centrifugirali (10.000 rpm, 50 min, 4 °C). Ločili so supernatant od trdnega preostanka, ki so še ga dvakrat sprali s 5 mL HCl. Združene vodne faze so naalkalili z NH₃ (aq) (5 %) do pH = 10-11 in prenesli na Extrelut NT 20 kolono. Za eluiranje so uporabili CH₂Cl₂ (4 × 20 mL), ki so ga odparili pri znižanem tlaku. Preostanek so redčili z CH₂Cl₂ in analizirali z GC-MS.

Lee s sodelavci [52] je še sveže rastline (*Lupinus leucophyllus*, *L. sulfureus*, *L. sericeus*) liofiliziral, zmelil in presejal skozi sito. Vzorec (100 mg) so prenesli v stekleno epruveto z navojem, kamor so dodali 1 M HCl (4 mL) in CHCl₃ (4 mL), in pustili stati 15 minut na rotatorju. Po centrifugiranju (5 min) so fazi ločili, trdnemu preostanku pa so še dodali 2 mL kisline in CHCl₃. Sledilo je mešanje, centrifugiranje in ločitev faz. Združene nakisane faze so naalkalili z NH₃ (aq) (14,8 M) do pH 9,0-9,5. Bazično raztopino so še dvakrat ekstrahirali s CHCl₃ (4 mL in 2 mL). Združili so organsko fazo, jo prefiltrirali čez brezvodni Na₂SO₄. Po odstranitvi topila so vzorcu dodali MeOH in še interni standard – kofein.

Wink s sodelavci [53] je ugotavljal lupaninske alkaloidne v 56 vrstah rodu *Lupinus* s kislom-bazično ekstrakcijo. Zmlet vzorec so namakali v HCl pri sobni temperaturi. Čez pol ure so vzorec centrifugirali (10 min, 10.000 × g). Supernatant so naalkalili z 2 M NaOH in prenesli na Extrelut kolono, ki so jo spirali s CH₂Cl₂. Sledilo je odparevanje topila pri znižanem tlaku.

Belsito s sodelavci [54] je poleg kislom bazične in alkoholne ekstrakcije izvedel še bazično brezvodno ekstrakcijo QA iz vrste *Spartium junceum*. Cvetove (60 g) so homogenizirali v etanolni raztopini KOH (2 % m/V). Suspenzijo so še 2 uri mešali pri sobni temperaturi,

filtrirali in odparili topilo. S kloroformom (3×25 mL) so ekstrahirali trdni preostanek. Organsko fazo so sušili z Na_2SO_4 , temu je sledilo odparevanje topila pod znižanim tlakom.

3.1.2 Metoda analize hlapnih spojin

Kromatografske razmere

- temperaturni program: $150\text{ }^\circ\text{C}$ (3 min), $150\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 300\text{ }^\circ\text{C}$ ($10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$), $300\text{ }^\circ\text{C}$ (2 min),
- $T_{\text{injektorja}} = 250\text{ }^\circ\text{C}$,
- $T_{\text{vmesnika}} = 300\text{ }^\circ\text{C}$,
- $T_{\text{ionskega izvora}} = 200\text{ }^\circ\text{C}$,
- volumen injiciranja: $1\ \mu\text{L}$,
- način injiciranja: - »splitless« (M_3),
 - »split«: 1:100 (M_2),
 - »split«: 1:25 (M_1),
 - »split«: 1:1 (M_4),
- nosilni plin: He ($1\text{ mL}/\text{min}$),
- R_i smo določili z injiciranjem referenčnih spojin linearnih alkanov ($\text{C}_{10}\text{-C}_{33}$).

MS razmere

- napetost na detektorju: 1 kV,
- energija ionizacije: -70 eV ,
- hitrost zajemanja podatkov: 5 Hz,
- območje zajemanja m/z: 50-500,
- celotni čas analize: 20 min.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

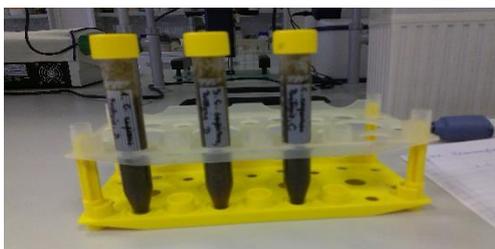
4.1 PRIPRAVA VZORCEV

4.1.1 Priprava ekstraktov lupaninskih alkaloidov iz posušenih zeli

Rastline smo uprašili v mlinčku z vodnim hlajenjem. Na ta način smo dobili fino uprašene vzorce, pri katerih je vodno hlajenje poskrbelo, da se niso pregrevali. Trudili smo se zajeti količinsko približno enake dele rastlin – stebela, cvetove, liste, semena in korenine, če so bile te prisotne. Najprej smo vzorce uprašili v terilnici, vendar smo tak način kasneje opustili, ker smo z mlinčkom dobili bolj drobne delce, uprašili smo tudi trše dele rastlin, ki jih v terilnici nismo uspeli zmleti in s tem tudi pospešili postopek.

4.1.2 Tehtanje in dodatek HCl

Na plastični čolniček smo natehtali 1 g uprašenega vzorca. V plastično epruveto s konusnim dnom smo dodali 5 mL HCl (0,5 M), nato smo dodali še uprašen vzorec in še dodatnih 5 mL HCl (slika 14). Klorovodikovo kislino smo dodali v dveh delih zato, da se je vzorec lepo omočil in se ni zbil v koničastem dnu centrifugirke. Če se vzorci niso omočili, smo jih pretresli in premešali s stekleno palčko. Preostale rastline in ostanek zmletih vzorcev smo shranili v omaro (sobne razmere).



Slika 14: Zmleti vzorci, nakisani s HCl.

4.1.3 Raztapljanje in ekstrakcija

Vzorci smo potem prenesli v ultrazvočno kadičko za 30 minut. Ker so se vzorci pogosto pregreli (povprečna temperatura je bila od 30-50 °C), smo jih za kratek čas vzeli iz kadičke in stresali, da so se ohladili. (Filtriranje smo opustili, saj so vzorci popili ogromno HCl in smo na koncu dobili premajhen volumen filtrata).

4.1.4 Centrifugiranje

Sledil je prenos vzorcev v centrifugo, kjer smo jih pustili 2 minuti pri 5000 rpm ($3500 \times g$). Zgornjo plast je predstavljal bister, navadno rahlo obarvan supernatant. Potem smo z avtomatsko pipeto odpipetirali 1 mL supernatanta in ga prenesli v 2 mL mikrocentrifugirko.

4.1.5 Naalkaljenje

Vzorci smo nato naalkalili s 100 μL NaOH (6 M). pH vsakega vzorca smo tudi preverili s pH-lističi. Vrednost pH vzorcev je morala biti višja od 12. Pri naalkaljenju so se vzorci obarvali temneje in intenzivneje, postali so tudi viskoznejši.

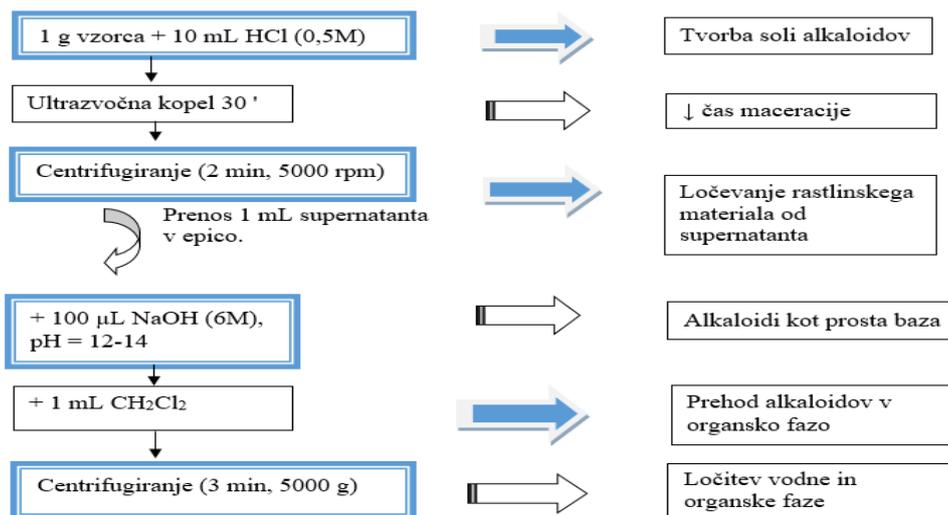
4.1.6 Ekstrakcija tekoče-tekoče

Po naalkaljenju smo v mikrocentrifugirko dodali še 1 mL diklorometana. Ker je velikokrat nastala emulzija, smo vzorce ponovno centrifugirali (pri 5000 rpm za 3 min). Dobili smo dve lepo ločeni plasti. Zgornja plast je bila vodna, alkalna faza, spodnja pa diklorometanska.

4.1.7 Shranjevanje in prenos vzorcev na GC-MS

Spodnjo, diklorometansko fazo smo s Pasteurjevo pipeto prenesli v vialo za GC (najmanj 500 μL vzorca). Če vzorci niso šli takoj v analizo, smo jih shranili v hladilniku. Sledil je prenos vzorcev na GC-MS. Končno razmerje droga:ekstrakt je bilo 1:10.

Celoten postopek priprave vzorcev predstavlja slika 15.



Slika 15: Shema celotnega postopka ekstrakcije lupaninskih alkaloidov.

4.2 IDENTIFIKACIJA ALKALOIDOV

Spojine smo identificirali s pomočjo retencijskih indeksov, ki smo jih primerjali z literaturnimi podatki, z referenčno spojino (spartein) ter s primerjavo masnih spektrov alkaloidov (EI) iz podatkovne zbirke (NIST 08).

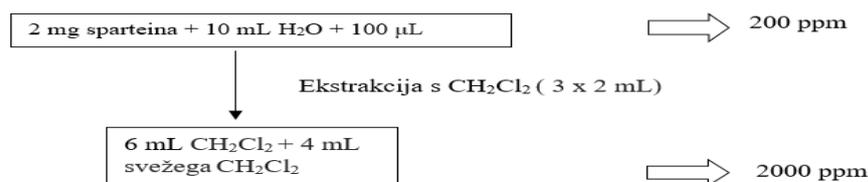
V večini vzorcev so bile prisotne nečistote, furani so lahko posledica vnosa s topilom, ftalate pa lahko odpušča plastičen pribor (konusne epruvete). V nekaj vzorcih so bili prisotni tudi različni produkti razpada beta karotena (dihidroaktinidiolid), ki je naravno prisoten v rastlinah. Identiteto alkaloidov smo potrdili tudi z retencijskimi indeksi R_i (ang. *Kovats retention index*), ki se določijo z injiciranjem zmesi linearnih alkanov.⁶

4.3 KVANTIFIKACIJA ALKALOIDOV

Kvantitativno vrednotenje lupaninskih alkaloidov je potekalo z GC-MS in eksternim standardom sparteina.

4.3.1 Priprava raztopin standarda za umeritveno krivuljo

Sparteinijev sulfat smo uporabili kot eksterni standard za pripravo umeritvene krivulje. Postopek priprave standarda je enak kot pri vzorcih (slika 16). Edina razlika je, da smo kot topilo namesto HCl uporabili vodo, saj je spartein že v obliki soli in ga ni bilo potrebno nakisati.



Slika 16: Shema postopka priprave raztopin standardov s koncentracijami.

⁶ Pri plinski kromatografiji se pogosto uporablja sistem retencijskih indeksov, ki pretvarja retencijske čase (t_r) v od kromatografskega sistema neodvisne konstante. Retencijski indeks (R_i) je dobil ime po madžarskem kemiku Ervinu Kovatsu, ki je sistem razvil za raziskovanje sestave eteričnih olj [55]. Vrednosti se izračunajo s pomočjo enačb, ki jih je razvil Kovats za izotermaalno analizo leta 1958, ali pa z enačbami van den Doola in Kratzs (1963) pri uporabi temperaturnega programa. Retencijski indeks alkana je 100-kratna vrednost števila ogljikovih atomov, ki jih vsebuje [56]. R_i označujejo vedenje retencije vzročnih spojin po enotni skali, ki jo določimo z aplikacijo serije homolognih n -alkanov. Sistem temelji na tem, da lahko analit vrednotimo, če imamo dva sosednja n -alkana, ki imata vlogo reference [57] [58]. Medtem ko so retencijski časi odvisni od kromatografskega sistema (dolžina kolone, debelina SF, premer, hitrost MF, tlak, ničelni čas), so izpeljane vrednosti R_i bolj neodvisne od teh parametrov.

Prilagojen t_r je linearno proporcionalen s številom ogljikovih atomov. S to zvezo lahko intrapoliramo t_r neznane spojine na premico, v povezavi z retencijskima časoma referenc, od katerih se eden eluira pred vzorčeno snovjo, drugi pa za njo [59]. Sistem retencijskih indeksov je torej namenjen primerjavi rezultatov med laboratoriji in omogoča identifikacijo analita s primerjavo R_i z znanimi vrednostmi [55].

1. Tehtanje in raztapljanje referenčne spojine

Na analizni tehtnici smo natehtali 28,44 mg sparteinijevega sulfata (SS) in ga kvantitativno prenesli v epruveto. S polnilno pipeto smo dodali 10 mL H₂O in počakali, da se kristali sparteinijevega sulfata raztopijo.

Računanje ustrezne mase sparteinijevega sulfata

Ustrezno maso sparteinijevega sulfata (SS), ki ustreza 2 mg sparteina smo izračunali:

$$\begin{aligned}n_{(\text{spartein})} &= m_{(\text{spartein})} \text{ v g} / M_{(\text{spartein})} \text{ v g/mol} \\ &= 0,002 \text{ g} / 234,4 \text{ g/mol} \\ &= \underline{8,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}m_{(\text{SSP})} &= n_{(\text{spartein})} \cdot M_{(\text{SS})} \\ &= 8,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot 332,5 \text{ g} \\ &= 0,00284 \text{ g} = \underline{2,844 \text{ mg}}\end{aligned}$$

Ker bomo uporabili 10 mL bučko, preračunamo, da za masno koncentracijo 2,84 mg/ml potrebujemo 28,44 mg natehte SS.

2. Naalkajenje

Z avtomatsko pipeto smo v epruveto dodali 100 µL 6 M NaOH.

3. Ekstrakcija z diklorometanom

Sledila je ekstrakcija z diklorometanom (2 mL). Po dodatku smo epruveto stresli, počakali nekaj minut, da sta se fazi ločili in s Pasteurjevo pipeto prenesli spodnjo plast v stekleno bučko (10 mL). Pri tem smo bili pozorni, da smo zajeli le CH₂Cl₂ fazo in da vmes ni bilo kapljic vode. Postopek ekstrakcije smo ponovili še dvakrat. Bučko z združenimi diklorometanskimi fazami (skupno 6 mL) smo dopolnili še z CH₂Cl₂ do oznake (10 mL). Dobili smo matično raztopino sparteina s koncentracijo 2000 ppm (MR).

4. Redčenje

Izvedli smo serijo treh redčenj, da smo dobili raztopine z naslednjimi koncentracijami (preglednica II):

Matična raztopina (MR): 2,00 mg /10,0 mL (= 2000 ppm).

Prvo redčenje: 5,00 mL raztopine MR smo redčili s 5,00 mL CH₂Cl₂. Dobimo raztopino (R₁) s koncentracijo 1,00 mg/10,0 mL (= 1000 ppm).

Drugo redčenje: 5,00 mL raztopine R₁ smo redčili s 5,00 mL CH₂Cl₂ in dobili raztopino (R₂) s koncentracijo 0,500 mg/10,0 mL (= 500 ppm).

Tretje redčenje: K 1,00 mL raztopine R₁ smo dodali 9,00 mL CH₂Cl₂ in dobili raztopino (R₃) s koncentracijo 0,100 mg/10,0 mL (= 100 ppm).

Četrto redčenje: 1,00 mL raztopine R₂ smo prenesli v 10-mL bučko in dopolnili s CH₂Cl₂ do oznake. Dobili smo raztopino R₄ s koncentracijo 0,0500 mg/10,0 mL (= 50,0 ppm).

Peto redčenje: 1,00 mL raztopine R₃ smo prenesli v 10-mL bučko in dopolnili do oznake s CH₂Cl₂. Dobili smo raztopino R₅ s koncentracijo 0,0100 mg/10,0 mL (= 10,0 ppm).

Šesto redčenje: 5,00 mL raztopine R₂ smo prenesli v 10-mililitrsko bučko in dopolnili do oznake s CH₂Cl₂. Dobili smo raztopino R₆ s koncentracijo 0,250 mg/10,0 mL (= 250 ppm).

Sedmo redčenje: 2,00 mL raztopine R₂ smo razredčili s 8,00 mL CH₂Cl₂. Dobili smo raztopino R₇ s koncentracijo 0,100 mg/10,0 mL (= 100 ppm).

Osmo redčenje: K 5,00 mL raztopine R₃ smo dodali 5,00 mL in dobili raztopino R₈ s koncentracijo 0,0500 mg/10,0 mL (= 50,0 ppm).

Deveto redčenje: 1,00 mL raztopine R₇ smo v 10-mililitrski bučki dopolnili do oznake s CH₂Cl₂. Dobili smo raztopino R₉ s koncentracijo 0,0100 mg/10,0 mL (= 10,0 ppm).

Deseto redčenje: 1,00 mL raztopine R₈ smo v 10-mililitrski bučki dopolnili do oznake s 0,0100 mg/ 10,0 mL (=10 ppm). Dobili smo raztopino R₁₀ s koncentracijo 0,00500 mg/10,0 mL (= 5,00 ppm).

Preglednica II: Injicirane raztopine.

Metoda M ₁	Metoda M ₂	Metoda M ₃
500 ppm	1000 ppm	5,00 ppm
250 ppm	500 ppm	
100 ppm	100 ppm	
50,0 ppm	50,0 ppm	
10,0 ppm	10,0 ppm	
5,00 ppm		

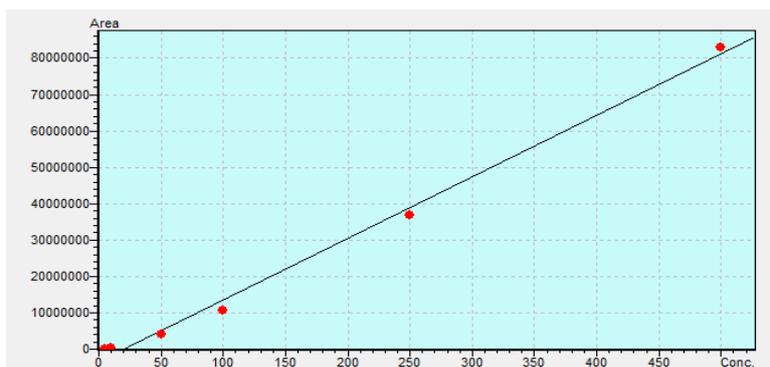
Legenda: M₁ = split, 1:25, M₂ = split, 1:100, M₃ = splitless, M₄ = split 1:1, nimamo umeritvene krivulje

Za kvantifikacijo vseh alkaloidov smo zaradi dosegljivosti uporabljali le referenčno spojino sparteina. V primeru dosegljivosti drugih referenčnih spojin bi se še lahko vrednotenje vsebnosti izboljšalo, dobljene vrednosti so torej približek.

Ker smo delali z močno hlapnim topilom (diklorometan), bi nam tudi uporaba internega standarda izničila napako zaradi odhlapevanja topila.

4.3.2 Umeritvena premica

Za umeritveno krivuljo smo uporabili podatke iz metode Lupanoidi 1 (M_1). Umeritvena premica je za druge alkaloidne (razen sparteina) približna, saj smo vse vrednosti preračunali na spartein. Zajeli smo šest točk, ki so v linearnem območju ($R^2 > 0,995$). Rahlo odstopata tretja (100 ppm) ali zadnja točka (5,00 ppm). Enačba premice: $y = 169297,2x - 3383166$ (slika 17).



Slika 17: Graf umeritvene premice (Lupanoidi 1).

V primerjavi s prvo umeritveno premico je imela druga manjši naklon (v prilogi), kar pomeni manjšo občutljivost. Tudi linearnost je bila tam slabša ($R^2 = 0,993$), v dveh točkah je premica odstopala približno 30 %.

4.3.3 Meja detekcije in kvantifikacije

Mejo detekcije in kvantifikacije smo izračunali s pomočjo raztopine standarda. Pri izračunu meje detekcije in kvantifikacije smo si pomagali s koncentracijo, površino sparteinijevega sulfata in z razmerjem signal/šum (S/N) v vzorcu.

$$\text{LOD} = 0,0296 \text{ ppm (S/N} = 3)$$

$$\text{LOQ} = \text{LOD} \times 3,33 = 0,0986 \text{ ppm (S/N} = 10)$$

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 IDENTIFIKACIJA ALKALOIDOV V RASTLINAH Z GC-MS.

Preglednica III: Primerjani retencijski indeksi.

Alkaloid	RI-Rtx-1	RI-referenčni	Vir*
spartein	1795	1785	[60]
amodendrin	1877	1865	[61]
kaulofilin	1978	1950	[62]
citizin	2016	1990	[63]
angustifolin	2106	2083	[64]
lupanin	2197	2165	[65]
termopsin ⁷	2423	2310	[66]
13- α -hidroksilupanin	2446	2402	[67]

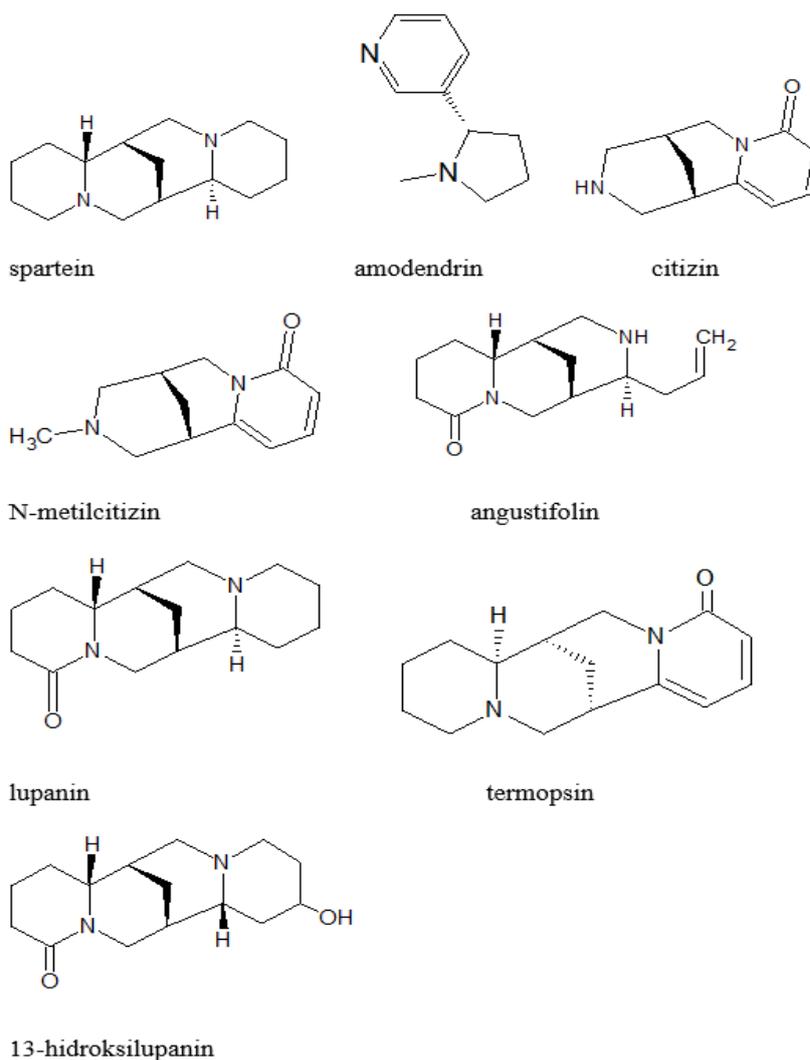
Legenda: RI-»Kovats retention index«, * DB-1 kolona.

Identiteto spojin smo potrdili s pomočjo retencijskih indeksov (R_i) in primerjavo masnih spektrov s spektri iz knjižnic. V zgornji preglednici III je primerjava retencijskih indeksov, dobljenih na koloni, ki smo jo uporabili (Rtx-1) in primerjava z retencijskimi indeksi iz drugih literaturnih virov. Odstopanja med retencijskimi indeksi so majhna, do njih je, kljub neodvisnosti od sistema, ki jo zagotavlja uporaba R_i , prišlo zaradi uporabe druge vrste kolon (v literaturi navajajo uporabo DB-1 kolone, ki pa je podobna Rtx-1 koloni, saj je pri obeh SF polidimetilsikolksan) [68].

Do odstopanj lahko privede uporaba drugačnega temperaturnega programa, tako kot je bilo to v našem primeru. Retencijski indeksi so bili prvotno razviti za izotermalne ločbe, pri linearno spreminjajočem programu pa lahko pride do drugačnih vrednosti R_i . Razlike med tema programoma pa navadno vseeno niso velike [69].

Strukture alkaloidov, ki smo jih zaznali v vzorcih, so predstavljene na sliki 18.

⁷ Termopsin je v nekaterih virih naveden kot termospin (angl. *thermospine* in tudi *thermopsine*), gre za optični izomer anagirina [70]. Ne smemo pa ga zamenjati z encimom z istim imenom.



Slika 18: Strukture lupaninskih alkaloidov iz naših vzorcev, ugotovljenih z GC-MS.

5.2 KONCENTRACIJE ALKALOIDOV

5.2.1 Izračun koncentracij lupaninskih alkaloidov

Koncentracije lupaninskih alkaloidov v vzorcih smo ugotovili s pomočjo zunanega standarda. Spojine smo izrazili kot spartein, ker ima primerljiv odziv kot drugi kinolizidinski alkaloidi. Koncentracijo smo dobili s primerjavo razmerij površin pod vrhovi zunanega standarda in zaznanih alkaloidov (preglednica IV).

Chamaespartium sagittale:

Za izračun smo uporabili rezultate metode M₂. Pri računanju koncentracije smo uporabili standard sparteina 50,0 ppm. Podatki za druge vzorce so v prilogi.

Primer izračuna za kaulofilin:

$$\text{AUC}_{(\text{kaulofilin})} = 1251135$$

$$\text{AUC}_{(\text{citizin})} = 1101465$$

$$\text{AUC}_{(\text{standard})} = 3383118$$

$$(\text{AUC}_{(\text{kaulofilin})} / \text{AUC standarda M}_2_{(\text{spartein})}) \cdot c_{(\text{standarda})} \cdot \text{Faktor redčenja (10 } \times \text{)} =$$

$$(1251135 / 3383118) \cdot 50,0 \text{ ppm} \cdot 10 = 184,9 \text{ ppm}$$

Preglednica IV: Vsebnost lupaninskih alkaloidov v vzorcih (v ppm suhe mase rastline).

Vzorec	spartein	amo- dendrin	kaulofilin **	citizin	angusti- folin	lupanin	termopsin	13- α - hidroksi- lupanin
<i>C. sagittale</i>	-	-	185	163	-	-	-	*
<i>G. tinctoria 1</i>	-	-	3775	367	-	-	107	-
<i>L. albus</i>	104	115	-	-	-	236	-	109
<i>G. sericea 2</i>	-	-	-	-	-	69,6	-	146
<i>G. sericea 4</i>	-	-	-	-	-	104	-	92,3
<i>L. polyphyllus A</i>	-	-	-	-	996	21491	-	2229
<i>L. polyphyllus B</i>	96,5	-	-	-	1325	14091	-	2366
<i>C. supinus 2, R</i>	-	-	-	-	-	164	-	-
<i>C. supinus 2, A</i>	191	-	-	-	-	138	-	-
<i>C. supinus 2, B</i>	-	-	-	-	-	823	-	-
<i>C. supinus 2, C</i>	-	-	-	-	-	241	-	-
<i>C. supinus 2, D</i>	-	31,0	-	-	-	1109	-	-

* v sledovih

**kaulofilin = *N*-metilcitizin

Alkaloide smo našli v navadni prevezanki (*Chamaespartium sagittale*), svilnati košeničici (*Genista sericea*), barvilni košeničici (*Genista tinctoria*), nizki relikci (*Chamaecytisus supinus*), belem volčjem bobu (*Lupinus albus*) ter mnogolistnem volčjem bobu (*Lupinus polyphyllus*). Največ jih je v obeh vrstah volčjega boba in barvilni košeničici. V drugi seriji

vzorcev smo alkaloidne našli v vseh vzorcih nizke relike iz obeh rastišč (Rašica, Postojna) in mnogolistnem volčjem bobu. Opazna je razlika v vsebnosti lupanina v vzorcih nizke relike B, D iz Postojne. Mogoče je na višjo vsebnost vplivala tudi večja količina semen v vzorcu (kljub temu, da smo poskušali v vzorcu čim bolj enakomerno zajeti vse dele rastline). Večina rastlin vsebuje lupanin, ki je prevladujoč v obeh vrstah vočjega boba. Izjemi sta le navadna prevezanka ter barvilna košeničica, kjer lupanina nismo zaznali.

5.2.2 Primerjava vsebnosti QA v istovrstnih rastlinah

Za primerjavo vsebnosti istovrstnih rastlin iz istih ali različnih lokacij bi potrebovali več vzorcev, mi smo jih imeli premalo.

Vsebnost alkaloidov je pri istovrstnih rastlinah iz različnih najdišč različna. Svilnata košeničica (*Genista sericea* 2 in 4) vsebujeta lupanin ter 13- α -hidroksilupanin, prvega je več v vzorcu 4, drugega pa v vzorcu 2.

Tudi pri mnogolistnem volčjem bobu prihaja do različnih koncentracij QA. Prvi vzorec (*Lupinus polyphyllus* A) vsebuje lupanin (21491 ppm), angustifolin (996 ppm), 13- α -hidroksilupanin (2229 ppm). V drugem primeru (*L. polyphyllus* B), ki je gojen, smo tudi zaznali lupanin (14091 ppm), angustifolin (1325 ppm), 13- α -hidroksilupanin ter dodatno še spartein (995 ppm), ki ni prisoten v prvem, divje rastočem mnogolistnem volčjem bobu.

Zanimiv je tudi primer nizke relike, kjer smo imeli vzorce več rastlin iz dveh rastišč. V različnih koncentracijah vse te relike vsebujejo lupanin, dokaj primerljive koncentracije so v vzorcu *C. supinus* R, A in C (164 / 138 / 241 ppm). Zelo visoke koncentracije lupanina pa so v vzorcu *C. supinus* B in D (823 / 1109 ppm). V vzorcu A je prisoten še spartein, v D pa v majhnih koncentracijah teratogen amodendrin (31,0 ppm).

Termopsin je bil prisoten le v barvilni košeničici (*G. tinctoria*), v njej sta še citizin in v visokih koncentracijah tudi kaulofilin (3775 ppm), ki je presnovek citizina. V vzorcu *C. sagittale* najdemo prav tako citizin in kaulofilin, vendar v manjših koncentracijah, v sledovih je prisoten 13- α -hidroksilupanin.

Nenavadno je, da je pri vzorcih *C. supinus* 2R, 2B in 2C prisoten le en alkaloid (lupanin). Alkaloid se navadno ne pojavi en sam, ampak je prisotnih več hkrati, zato je malo verjetno, da vsebuje le lupanin. To lahko morda pomeni, da so bili prisotni estri lupanina in so se

razgradili med ekstrakcijo in je zato prisoten le lupanin. Ali pa so drugi prisotni alkaloidi navzoči pod mejo detekcije.

Seznam rastlin, kjer alkaloidi niso prisotni oziroma so pod mejo detekcije (0,0296 ppm):

1. Barrelierov pajetičnik (*Pseudolysimachion barrelieri* Schott ex Roem. & Schult),
2. Cipresasti mleček (*Euphorbia cyparissias* L.),
3. Dlakava košeničica (*Genista pilosa* L.),
4. Drobna meteljka (*Medicago minima* (L.) Grufb.),
5. Gorska detelja (*Trifolium montanum* L.),
6. Gozdna košeničica (*Genista sylvestris* Scop.),
7. Gorski grahor (*Lathyrus linifolius* (Reich.) Baesler),
8. Ilirska zlatica (*Ranunculus illyricus* L.),
9. Kranjski grahovec (*Astragalus carniolicus* Kern.),
10. Kuštrava grašica (*Vicia villosa* Roth),
11. Mali talin (*Thalictrum minus* L.),
12. Malocvetna španska detelja (*Dorycnium germanicum* (Gremli) Rouy),
13. Navadna kozja detelja (*Lembotropis nigricans* (L.) Griseb.),
14. Navadna lakota (*Galium mollugo* L.),
15. Navadna robinija (*Robinia pseudoacacia* L.),
16. Nizka relika (*Chamaecytisus purpureus* Scop.),
17. Pisana šmarna detelja (*Coronilla varia* L.), Slatna, A,
18. Pisana šmarna detelja (*Coronilla varia* L.), Črnotiče, B,
19. Ptičja grašica (*Vicia cracca* L.),
20. Resasti škrobotec (*Rhinanthus glacialis* Personnat),
21. Sladki grahovec (*Astragalus glycyphyllos* L.),
22. Širokolistni grahor (*Lathyrus latifolius* L.), A,
23. Širokolistni grahor (*Lathyrus latifolius* L.), B,
24. Vrbovolistni oman (*Inula salicina* L.).

5.3 POZITIVNI VZORCI

Nekatere rastline (zlasti iz rodu *Lupinus*) so v preteklosti pogosto analizirali, zato bomo primerjali literaturne podatke o vsebnosti QA z rezultati analize. Pri primerjavi vzorcev z literaturnimi podatki se moramo zavedati, da se ti podatki nanašajo na rastline iz drugih

lokacij (tudi kontinentov) in podnebij kot naše, za rast so imele drugačne razmere kot naše in je te podatke težko primerjati med sabo. Zatorej je primerjava namenjena bolj prikazu raznovrstnosti alkaloidnih profilov med istovrstnimi rastlinami in pestro vsebnostjo med posameznimi organi.

Navadna prevezanka (*Chamaespartium sagittale* L. P. E. Gibbs)

Podatkov o vsebnosti lupaninskih alkaloidov v tej vrsti je malo. Le v eni študiji je bilo moč najti podatke o vsebnosti alkaloidov (preglednica V) [71]. Hagers pa omenja, da je *G. sagittalis* L. (to je sinonim) iz rodu *Genista*, kjer prevladujejo alkaloidi anagirinskega tipa (vsebnost posameznega alkaloida, večja od 5 %: anagirin, citizin, *N*-metilcitizin). Možna je še prisotnost baptifolina in drugih α -piridonskih alkaloidov [72]. Ekstrakcija iz nadzemnih delov cvetoče rastline je potekala na več načinov s pomočjo MeOH, HCl ali obojega skupaj v kombinaciji z ultrazvočno kadičko. Nadaljnja analiza je potekala s HPLC [71].

Preglednica V: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v *G. sagittalis*.

	<i>G. sagittalis</i> (iz literature) [mg/g suhe mase]	<i>G. sagittalis</i> (vzorec) [mg/g suhe mase]
citizin	0,04488**	0,163
spartein	0	/
<i>N</i> -metilcitizin	ni podatka	0,185
13-hidroksilupanin	ni podatka	*
Celotna vsebnost QA	ni podatka	0,348

* prisoten v sledeh

** Opomba: V tabeli so podatki o vsebnosti, dobljeni s postopkom s HCl. Najvišjo vsebnost so dobili pri namakanju suhe rastline v HCl in MeOH (0,06588 mg/g suhe mase). Povzeto po [71].

Pri nas je potekala izolacija iz celotne rastline (tudi cvetov in korenin), ki so mogoče vzrok za prisotnost 13-hidroksilupanina. Po Hagersu še lahko vsebuje amodendrin in histrin (dipiperidin), ki ga pa mi nismo zaznali [72].

Wink je zaznal tudi vsebnost sparteina [73]. Prevladujoč alkaloid v listih gojenih rastlin je citizin, celotna količina alkaloidov je 0,800 mg/g sveže mase [43]. Ponekod so zaznali tudi ester citizina (citizin-12-karboksi-eter) [74].

Barvilna košeničica (*Genista tinctoria* L.)

Po Hagersu vsebuje barvilna košeničica kinolizidinske in piperidinske alkaloidne [72]. Največ QA je pričakovanih v semenu (preglednica VI) [75]. S TLC in GC-MS so v nadzemnih, cvetočih delih zaznali: anagirin, baptifolin, citizin, *N*-formilcitizin, *N*-metilcitizin [76].

Zeleni nadzemni deli vsebujejo 0,5 mg/g alkaloidov na svežo maso rastline. Droga (*Genistae Tinctoriae Herba*) vsebuje od 0,3-0,8 % alkaloidov. V njej prevladujejo anagirin, citizin, *N*-metilcitizin s sopojavnostjo 5,6-dehidrolupanina, lupanina, rombifolina, 17-oksosparteina, sparteina, tinktorina ter piperidinskega amodendrina [72].

Dokument Evropske agencije za varnost hrane (EFSA) navaja tudi morebitno detekcijo lupinina v nadzemnih delih, ki ga mi nismo zaznali, vsebnost citizina pa poda od 0,7-0,8 % [77].

Preglednica VI: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v *G. tinctoria*.

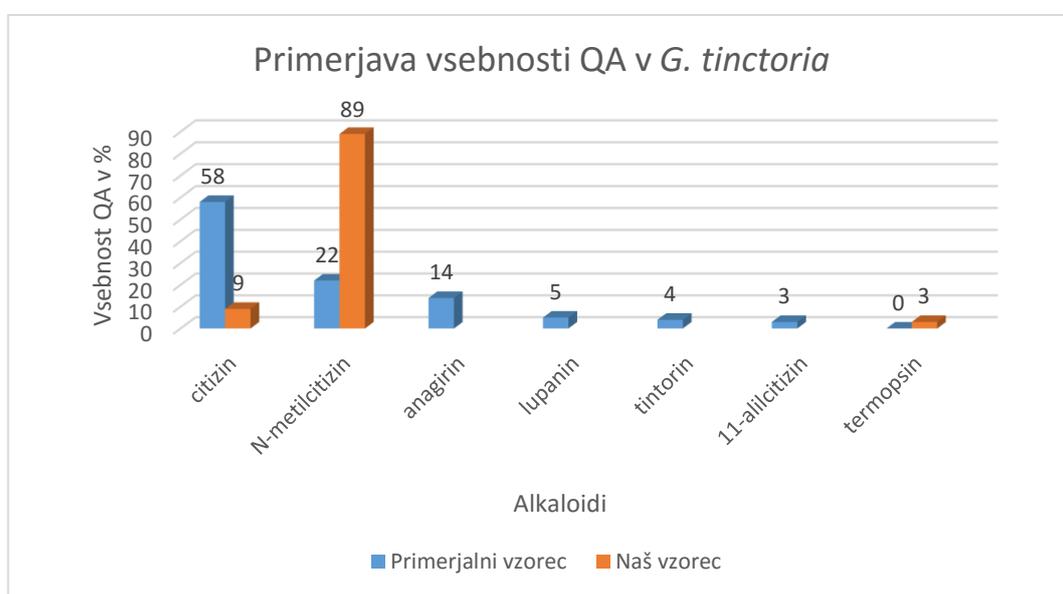
	Primerjalni vzorec		Naš vzorec	
	<i>G. tinctoria</i> (A) vsebnost [%]	Vsebnost [mg/g suhe mase] (B)	<i>G. tinctoria</i> 1 [mg/g suhe mase]	Vsebnost [%]
citizin	58	0,0235	0,367	8,63
<i>N</i> -metilcitizin	22	/	3,78	88,8
anagirin	14	/	/	/
lupanin	5	/	/	/
tinktorin	4	/	/	/
11-alilcitizin	3	/	/	/
amodendrin	*	/	/	/
5,6-dehidrolupanin	*	/	/	/
α -izolupanin	*	/	/	/
17-oksosparteina	*	/	/	/
rombifolin	*	/	/	/
sparteina	*	0,00015	/	/
baptifolin	*	/	/	/
tetrahidrorombifolin	*	/	/	/
termospin	/	/	0,107	2,52
Celotna vsebnost [mg/g suhe mase]	ni podatka	0,02365	4,25	/

* v sledovih (<1 %)

A Vsebnost se nanaša se le na zelene dele. Suha droga vsebuje od 0,3-0,8 % kinolizidinskih alkaloidov [72].

B Ekstrakcija citizina je potekala v zmesi HCl in MeOH, spartein pa so ekstrahirali v MeOH s segrevanjem pod refluksom. Analiza ekstraktov je potekala s HPLC. Vzorci: posušene, cvetoče rastline iz Romunije [71].

Ti rezultati so težko primerljivi, saj pri *G. tinctoria A* nimamo podane celotne vrednosti, pri *G. tinctoria B* pa sta ekstrakcija in analiza potekali drugače kot pri nas, preiskovali so le citizin in spartein (graf 1). Vrednosti zanju smo izbrali na podlagi čim višje vsebnosti. V našem primeru nismo zaznali anagirina, lupakanina, tinktorina, 11-alilcitizina, amodendrina, 5,6-dehidrolupakanina, α -izolupakanina, 17-oksosparteina, rombifolina, baptifolina, tetrahidrorombifolina. Mogoče so pod mejo detekcije ali pa niso prisotni v vzorcih. Smo pa zaznali termospin, ki ga po poročanju v dostopani literaturi o *G. tinctoria* niso zaznali.



Graf 1: Primerjava vsebnosti QA (v %) v *G. tinctoria*.

Beli volčji bob (*Lupinus albus* L.)

Beli volčji bob vsebuje QA v vseh delih rastline, največ pa v **semenih** [78], ki lahko vsebujejo do 5 % (suhe mase) [43], po nekaterih podatkih pa tudi do 8 % alkaloidov (preglednica VII) [79].

Navadno je v prevladi lupakanin, spremlja ga hidroksilupakanin z drugimi QA [80]. V **grenkem** *L. albus*, je celotna vsebnost kinolizidinskih alkaloidov nad 15 mg/g (1,5 %). V teh vrstah je bil delež lupakanina 88-92 % vseh QA, delež drugih alkaloidov pa pada v naslednjem redu: albin, angustifolin, α -izolupakanin, lupakanin, 13 α -hidroksilupakanin, 13 α -angeloiloksilupakanin in 13 α -tigloiloksilupakanin. Niso pa zasledili estrov 13 α -hidroksilupakanina. »**Polgrenke vrste**« vsebujejo 1,00-2,00 mg/g. V vrstah, **revnih z alkaloidi**, je bilo največ prisotnega lupakanina,

sledil je albin, 13 α -anguloiloksilupanin, 13 α -hidroksilupanin. V nekaterih vzorcih so zaznali tudi sledove angustifolina, 13 α -tigloiloksilupanina in α -izolupanina [81].

Preglednica VII: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v *L. albus*.

	Listi sladkega <i>L.</i> <i>albus</i> [mg/g ss] A	Nadzemni deli sladkega <i>L.albus</i> [% // mg/g] B	Listi grenkega <i>L.</i> <i>albus</i> [mg/g ss] A	Nadzemni deli grenkega <i>L. albus</i> [% // mg/g] B	Celotna rastlina (naš vzorec) [% // mg/g]
spartein	0,003	/	0,05	0,28 % (0,011)	18,4 % (0,104)
β -izo-sparteina	/	/	/	/	/
11,12-dehidrospartein	/	/	/	1,31 % (0,051)	/
albin	/	/	0,08	/	/
<i>N</i> -metilalbin		1,89 % (0,01)	/	0,74 % (0,029)	/
amodendrin	/	/	0,04	1,05 % (0,041)	20,4 % (0,115)
tetrahidrorombifolin	0,002	6,98 % (0,037)	0,05	2,10 % (0,082)	/
angustifolin	/	/	0,06	/	/
izolupanin	0,004	/	0,05	/	/
lupanin	0,12	6,04 % (0,032)	1,95	83,15 % (3,243)	41,7 % (0,236)
multiflorin	0,03	/	0,19	8,21 % (0,320)	/
13- α -OH-lupanin	0,006	72,26 % (0,383)	0,04	1,102 % (0,043)	19,3 % (0,109)
tigloiloksilupanin	0,04	13,02 % (0,069)	0,16	4,41 % (0,172)	/
izoangustifolin	/	/	/	/	/
dehidrolupanin	/	/	/	/	/
oksolupanin	/	/	/	/	/
Skupaj	0,21	0,53	2,68	3,99	0,565

A Pred klasično kislno bazično ekstrakcijo so tukaj liste predhodno ekstrahirali v Soxhletovem aparatu z MeOH [82].

B Pred kislno bazično ekstrakcijo so tukaj vzorce namakali še v MeOH in pri naalkaljenju je bil pH manjši [83].

Vsebnost QA v belem volčjem bobu je dobro raziskana, na voljo so celo podatki o vsebnosti QA v posameznih organih. V celotni rastlini prevladujejo (več kot 5 % vseh alkaloidov): albin, 13 α -hidroksilupanin, multiflorin, lupanin, 13-tigloiloksilupanin. Spremljajoči alkaloidi so amodendrin, angustifolin, 5,6-dehidrolupanin, 11,12-dehidrolupanin, 5,6-

dehidromultiflorin, 11,12-dehidrospartein, 13-epihidroksilupanin, izoangustifolin, α -izolupanin, lupanin-*N*-oksid, 17-oksolupanin, 17-oksosparteina, 11,12-seko-12,13-dehidromultiflorin, spartein, tetrahydrocizin, tetrahidrorombifolin, različni estri 13-hidroksilupanina in 13-hidroksimultiflorina [79].

V listih je skupno od 1-3 mg alkaloidov na svežo maso. Prevladujejo lupanin (72 %), multiflorin (12,4 %), albin (2,7 %), 13-tigloiloksilupanin (3,8 %).

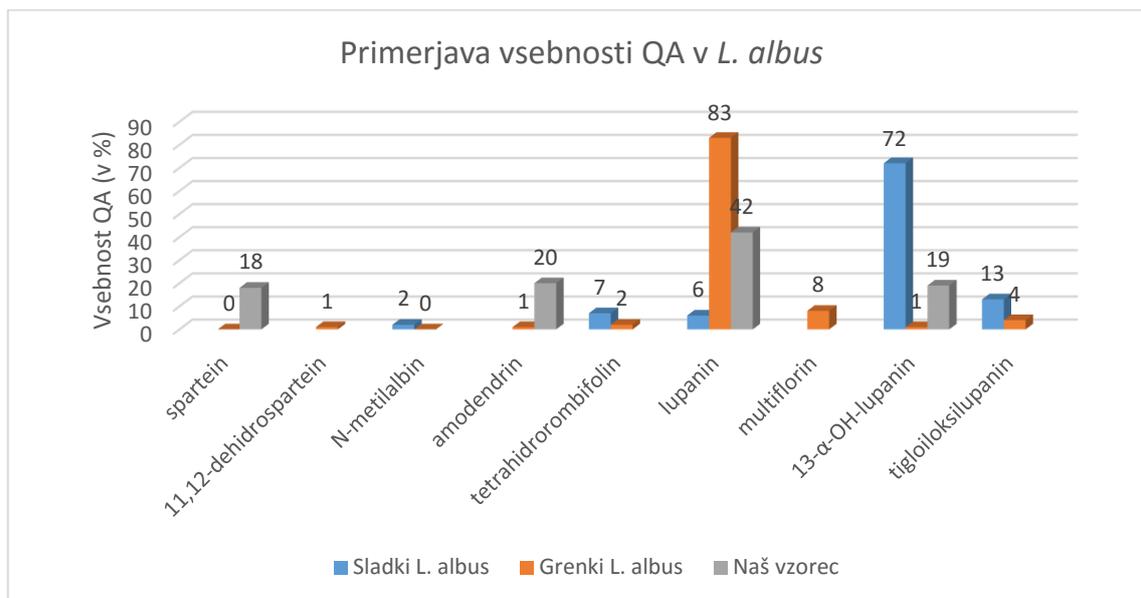
Stebila (0,7 mg/g sveže mase): lupanin (74,5 %), 13-tigloiloksilupanin (10,2 %), multiflorin (8,1 %), 13-hidroksilupanin (4,2 %), albin (1,2 %), 11,12-seko-12,13-dehidromultiflorin (1,1 %).

Korenine (0,4 mg/kg sveže mase): izrazito prevladuje lupanin (94,8 %), multiflorin (3,6 %), 13-tigloiloksilupanin (1,3 %).

Cvetovi (4,1 mg/g sveže mase): lupanin (66,5 %), multiflorin (28,5 %), 13-tigloiloksilupanin (3,2 %), albin (1,6 %).

Semena (3,1 mg/g sveže mase): lupanin (71,2 %), multiflorin (12,4 %), albin (6,6 %), 6-15 %), 13-hidroksilupanin (4,4 %), 13-tigloiloksilupanin, α -izolupanin (2,7 %), 11,12-seko-12,13-dehidromultiflorin (1,4 %), 13-angeloiloksilupanin (1-3 %). V manjših količinah so navzoči tudi amodendrin, angustifolin, 5,6-dehidrolupanin, izoangustifolin, 17-oksolupanin, 11,12-seko-12,13-dehidromultiflorin, spartein, tetrahydrocizin, tetrahidrorombifolin, estri 13-hidroksilupanina in 13-hidroksimultiflorina. **Semena sladkih vrst** vsebujejo pod 0,05 % alkaloidov, najboljše vrste celo pod 0,005 % [79].

Naš vzorec volčjega boba sodi med sladke sorte, saj je vsebnost alkaloidov pod 1,00 mg/g. To smo tudi pričakovali, nabran je bil na njivi. Iz primerjanih vzorcev se vidi (preglednica VII in graf 2), da se alkaloidni profil razlikuje glede na organe in glede na vrsto (grenki/sladki volčji bob).



Graf 2: Primerjava vsebnosti QA (v %) v *L. albus*.

Svilnata košeničica (*Genista sericea* Wulf.)

Za svilnato košeničico so značilne kvantitativne razlike QA med rastlinskimi organi (listi, cvet, seme, korenine) (preglednica VIII). Dominantni sekundarni presnovki so 13-hidroksilupanin v **semenih** in njegovi estri (ki so v rodu *Genista* vedno enkrat zaestreni), medtem ko listi vsebujejo več zaestrenih alkaloidov tigloil-13-hidroksilupanina in cineverina [84].

Preglednica VIII: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v *G. sericea*.

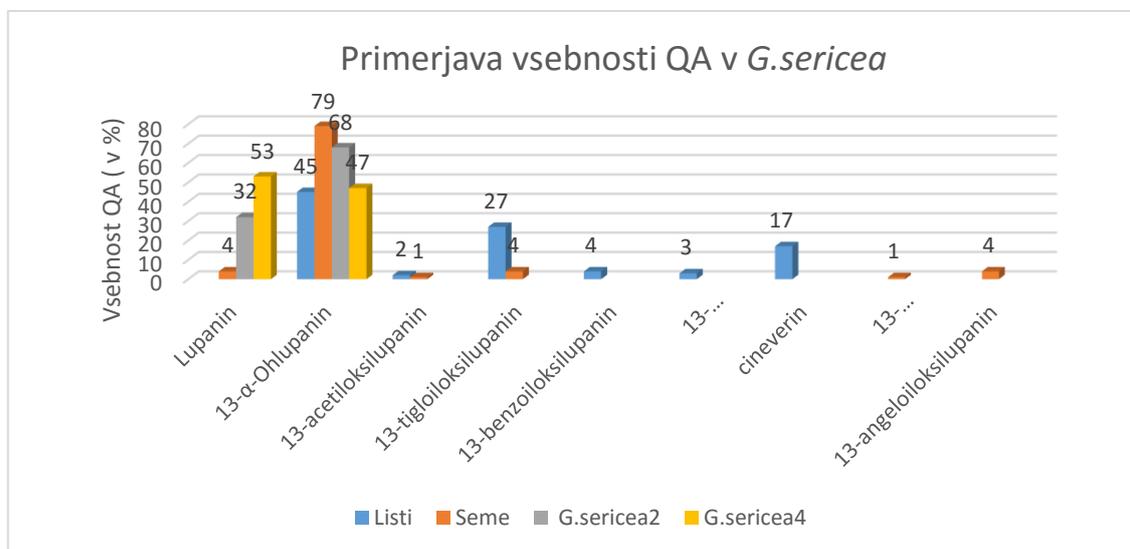
	Primerjalni vzorec		Naš vzorec	
	<i>G. sericea</i> - listi [% // mg/g vseh alkaloidov]	<i>G. sericea</i> - seme [% // mg/g vseh alkaloidov]	<i>G. sericea</i> 2 [% // mg/g suhe snovi]	<i>G. sericea</i> 4, %, [mg/g suhe snovi]
lupanin	*	4 (0,176)	32,3 (0,0696)	52,9 (0,104)
13- α -OH-lupanin	45 (0,117)	79 (3,476)	67,8 (0,146)	47,1 (0,0923)
13-acetiloksilupanin	2 (0,0052)	1 (0,044)	/	
13-tigloiloksilupanin	27 (0,0702)	4 (0,176)	/	
13-benzoiloksilupanin	4 (0,0104)	*	/	
13- fenilacetiloksilupanin	3 (0,0078)	/	/	
13- propioniloksilupanin	*	1 (0,044)	/	
13- metilbutiriloksulupanin	*	*	/	
13-angeloiloksilupanin	*	4 (0,176)	/	
cineverin	17 (0,0442)	/	/	
11, 12-dehidrospartein	*	/	/	
amodendrin	*	/	/	
tetrahidrorombifolin	*	/	/	
izocinevanin	*	/	/	
α -izolupanin	/	*	/	
5,6-dehidrolupanin	/	*	/	
Skupno [mg/g s. m.]	0,26	4,4	0,216	0,196

* v sledovih

Vir tabele [84].

Naš vzorec je zajemal celotno rastlino s cvetovi, temu primerna je tudi celotna vsebnost QA, ki je po skupni vsebnosti QA bližje listom. Semena vsebujejo približno 20-krat več alkaloidov kot naš vzorec (*G. sericea* 2). V tem primeru bode v oči razlika v vsebnosti lupanina našega vzorca ter literaturnih podatkov, kjer je prisoten le v sledovih (graf 3). Pri nas pa predstavlja kar 32 % alkaloidov (*G. sericea* 2), estrov pa sploh ni navzočih. Predvidevamo, da je v našem primeru prišlo do hidrolize lupaninskih estrov, zaradi česar je

vsebnost lupanina tako povečana. Če seštejemo delež zaestrenega lupanina s prostim v literaturnem vzorcu (v listih), je primerljiv (~36 %) z našim vzorcem.



Graf 3: Primerjava vsebnosti QA (v %) v *G. sericea*.

Mnogolistni volčji bob (*Lupinus polyphyllus* Lindl.)

Tudi pri mnogolistnem volčjem bobu prihaja do različnih koncentracij QA med primerjanimi rastlinami. Primerjali smo gojen in divje rastoč primerek z literaturnimi vrednostmi. Kljub manjši raznovrstnosti alkaloidnega profila naši vzorci vsebujejo mnogo večje količine QA kot vzorci iz literature. Na primer že angustifolin iz naših vzorcev je prisoten v 10-krat višji koncentraciji kot v listih *L. polyphyllus* iz literaturnih podatkov. Če primerjamo lupanin v semenih in v vzorcu *L. polyphyllus* B. je v slednjem 2-krat višja vrednost. K temu vsekakor pripomorejo stroki s semeni prisotni v našem vzorcu. Na prvi pogled ponovno estrov ni opaziti, ampak so skriti v za približno 30 % (oziroma od 2- do 82-krat) višji vsebnosti lupanina, kot pa ga zasledimo v literaturnih podatkih (preglednica IX). Ker smo mi uporabljali celo zel, smo uporabili za primerjavo liste in semena, ter tiste vrednosti rastline, z lupaninom v prevladi.⁸ Pričakovali smo, da bodo naše vrednosti zaradi analize celotne rastline v grobem najverjetneje nekje vmes med literaturnimi podatki. Dehidrolupanina v semenih ni, zato ga niso zaznali [85].

Z alkaloidi so najbogatejša **semena** (2-8 % suhe mase, ~3,8 mg/g sveže mase), kar velja za vrste, bogate z alkaloidi in nadzemni zeleni deli rastline. Droga: v semenih iz evropskega

⁸ Obstaja še *L. polyphyllus* z izredno visokimi vrednostmi 13- α -hidroksilupanina in 13- α -hidroksilupaninskimi estri.

mnogolistnega vočjega boba je vsebnost alkaloidov 3-4 % suhe mase. V **semenih** prevladuje: 13-hidroksilupanin (41 % celotne količine alkaloidov), lupanin (27 %), angustifolin (19 %), tetrahidrorombifolin (7 %). V manjšini (< 1 %) so prisotni amodendrin, albin, 13-angeloiloksilupanin, 11,12-dehidrolupanin, 3-hidroksilupanin, 13-epihidroksilupanin, izoangustifolin, α -izolupanin, multiflorin, 17-oksolupanin, 17-oksosparteina, sparteina, tigloiloksilupanin⁹ (graf 4) [53], [79].

Vsebnost sparteina v *L. polyphyllus B* je lahko primerljiva z vsebnostjo sparteina v semenih in je posledica prisotnosti stročkov. Iz celokupnih vrednostih spodnje tabele je razvidno, da obe naši vzorčni rastlini sodita med grenke. *L. polyphyllus A* je iz divjega rastišča in je pričakovano grenak, *L. polyphyllus B* pa je gojen in smo pričakovali manjšo vsebnost QA. Iz literature smo ugotovili, da *L. polyphyllus* ni pomembna krmna rastlina in se ne goji sladka različica.

⁹ V semenih z alkaloidi revnega mnogolistnega volčjega boba so ugotovili celotno količino alkaloidov v semenih, ki je bila od 226 mg/kg suhe mase – 366 mg/kg suhe mase [86].

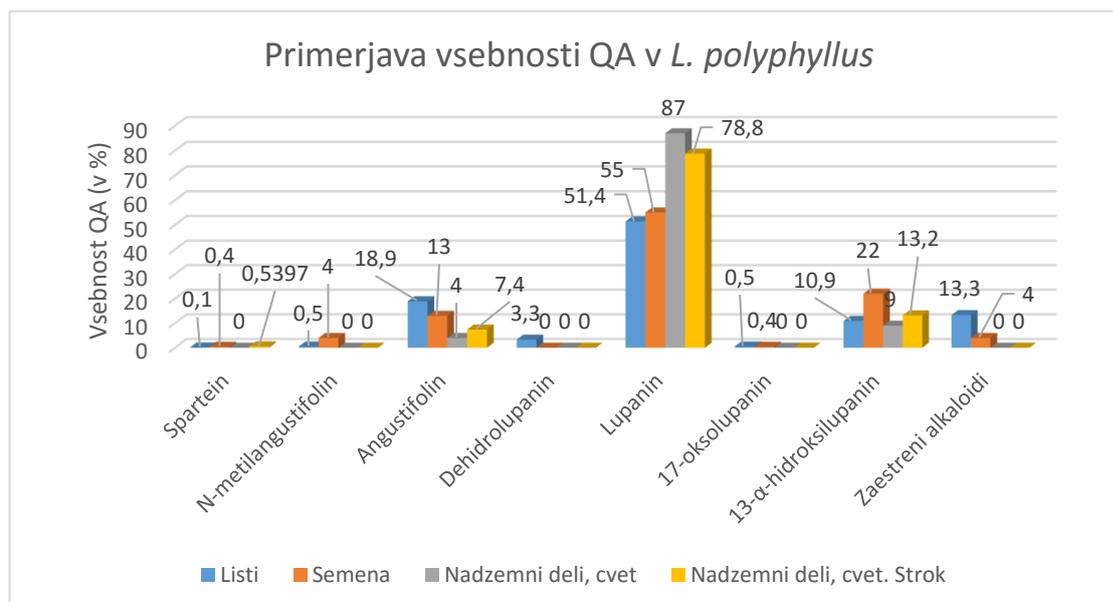
Preglednica IX: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v *L. polyphyllus*.

	<i>L. polyphyllus</i> (literatura) [% // mg/g vseh alkaloidov]	<i>L. polyphyllus</i> (literatura) [% // mg/g vseh alkaloidov]	<i>L. polyphyllus</i> A [% // mg/g vseh alkaloidov]	<i>L. polyphyllus</i> B [% // mg/g vseh alkaloidov]
del rastline	list	semena	nadzemni deli s cvetovi	nadzemni deli, cvetovi, stroki
spartein	0,1 (0,00051)	0,4 (0,0435)	/	0,540 (0,0965)
N-metilangustifolin	0,5 (0,00255)	4 (0,435)	/	/
angustifolin	18,9 (0,0964)	13 (1,414)	4,03 (0,996)	7,41 (1,33)
dehidrolupanin	3,3 (0,0168)	/	/	/
lupanin	51,4 (0,262)	55 (5,982)	87,0 (21,5)	78,8 (14,1)
17-oksolupanin	0,5 (0,0964)	0,4 (0,0435)	/	/
13- α - hidroksilupanin	10,9 (0,0556)	22 (2,393)	9,02 (2,23)	13,2 (2,37)
zaestreni alkaloidi***	13,3 (0,0678)	4 (0,435)	/	/
Celotna vsebnost [mg/g suhe mase]	0,51*	10,876**	24,7	17,9

* Nanaša se na svežo rastlino

** suha semena

*** zaestreni alkaloidi so: 13-tigloiloksilupanin, 13-angeloiloksilupanin, 13-benzoiloksilupanin, 13-cinamoiloksilupanin
Vir literaturnih podatkov [87].



Graf 4: Primerjava vsebnosti QA (v %) v *L. polyphyllus*.

V zelenih delih je lahko tudi tetrahidrorombifolin (več kot 5 %), 4-hidroksilupanin [88] in tudi lupinin v zaznavnih količinah [89]. **V manjšini** pa so prisotni še amodendrin, albin, 11,12-dehidrolupanin, 11,12-dehidrospartein, 3-hidroksilupanin, 3-epihidroksilupanin, izoangustifolin, α -izolupanin, β -izosparteina, multiflorin, 17-oksolupanin, 17-oksosparteina, sparteina, estri 13-hidroksilupanina (13-*cis*- in 13-*trans*-cinamoiloksilupanina, 13-benzoiloksilupanina, hidroksitetrahidrorombifolin, *N*-formilangustifolin. **V listih** (0,5-4 mg/g alkaloidov sveže mase) se v količinah večjih od 2 % pojavijo: lupanin (30-40 %), 13 α -tigloiloksilupanin (10-20 %), 13-hidroksilupanin (7-20 %), tetrahidrorombifolin (2-10 %), 13 α -angeloiloksilupanin (4 %). **V sledeh** se še pojavijo tudi α -izosparteina, tetrahydrocizin, 7-hidroksi- β -izosparteina, 5,6-dehidro- α -izolupanin, 5,6-dehidrolupanin, 3- β -hidrolupanin, multiflorin, 13- α -acetiloksilupanin, 13-izovaleroiloksilupanin, 13-valeroiloksilupanin, 7-hidroksilupanin, 3-angeloiloksilupanin, 13-metoksilupanin, *N*-karboksietilangustifolin, *N*-karboksimetilangustifolin [53]. Poleg zgoraj navedenih estrov so v preteklosti v listih zaznali še prisotnost 13-(2-metilbutiril)-oksilupanina, 13-vaniloiloksilupanina [85].

Nizka relika (*Chamaecytisus supinus* L.)

Za primerjavo smo vzeli vzorec *C. supinus*¹⁰, nabranega meseca junija, naši so bili nabrani julija. Eden od *C. supinus* iz literature je bil nabran maja in vseboval različna razmerja alkaloidov, raziskovalci tudi niso zaznali sparteina, ter 17-oksolupanina. Tudi celokupna vsebnost alkaloidov je bila pri literaturnem vzorcu manjša, zato smo za primerjavo izbrali junijski vzorec. Ekstrakt so predhodno namakali z MeOH, sledila je kislo bazična ekstrakcija QA, analiza je potekala z GC [90].

Zadnji vzorec *C. supinus* 2, D vsebuje še amodendrin, ki je v semenu. Zanimivo je, da so bili pri vseh vzorcih odvzeta semena, amodendrin pa smo zaznali le v enem vzorcu od petih. Vzorec iz literature vsebuje poleg neidentificiranih alkaloidov 17-oksosparteina ter 17-oksolupanin. Raziskava je narejena 1978, samo z GC, takrat knjižnice niso bile izpopolnjene, raziskave QA pa so bile v polnem razmahu, zato so drugi QA neidentificirani. Literaturni vzorec je bil nabran 1 mesec prej, na drugi lokaciji (Bolgarija), kar verjetno pomembno prispeva k vsebnosti QA. Ker v raziskavi ni navedeno, predvidevamo, da je bila rastlina

¹⁰ Nekateri uporabljajo ime *C. supinus* kot sinonim za *C. hirsutus*, mi se na vsebnost QA v slednjem nismo osredotočali.

takrat ocvetena, v tem stadiju pa vsebuje količinsko in zvrstno največ alkaloidov. Ob tvorbi semen navadno že poteka razgradnja alkaloidov, vsebnost QA zato pada (preglednica X).

Preglednica X: Primerjava vsebnosti med literaturnimi in našimi podatki v *C. supinus*.

	Primer. vzorec	Naši vzorci <i>C. supinus</i>				
		2, R, [% // mg/g s. m.]	2, A [% // mg/g s. m.]	2, B [% // mg/g s. m.]	2, C [% // mg/g s. m.]	2, D [% // mg/g s. m.]
spartein	0,9	/	58,1 (0,191)	/	/	/
17- oksosparteina	18	/	/	/	/	/
lupanin	74	100 (0,164)	41,9 (0,138)	100 (0,823)	100% (0,24100)	97,3 (1,11)
17- oksolupanin	2,3	/	/	/	/	
amodendrin	/	/	/	/	/	2,72 (0,0310)
C ₁ *	0,9	/	/	/	/	/
neznani alkaloidi	3,9	/	/	/	/	/
Skupno [mg/g s. m.]	/	0,164	0,328	0,823	0,241	1,14

* C₁ je neidentificiran alkaloid

Nadzemni deli vsebujejo 0,6-1,8 % alkaloidov (celotne mase) vseh alkaloidov: spartein (0,9-2 %), 17-oksosparteina (18-25 %), lupanin (69-78 %), 17-oksolupanin (2,3 %), v sledovih pa: 11-12-dehidrosparteina, amodendrin, izolupanin, 11-12-dehidrolupanin in hidroksilupanin. **Semena** vsebujejo 1,5 % vseh alkaloidov, od tega največ lupanina (84 %, je glavni alkaloid v semenih), spartein, 11-11-dehidrosparteina, amodendrin, izolupanin, 11-12-dehidrolupanin, hidroksilupanin [91] in hametin (ki se reducira do hidroksisparteina) [92]. V nemški flori navajajo še vsebnost anagirina (0-16 %) [93].

Izvor lupanina in hidrosilupanina v konjskem tkivu bi lahko predstavljale naslednje rastline, pri katerih smo zaznali lupanin:

- beli volčji bob (*Lupinus albus* L.),
- mnogolistni volčji bob (*L. polyphyllus* Lindl.) z obeh rastišč,
- nizka relika (*Chamaecytisus supinus* L.) z vseh rastišč,
- svilnata košeničica (*Genista sericea* Wulf.).

5,6-dehidrolupanina, ki so ga zaznali v urinu poginulega lipicanca [94], pa nismo zaznali v nobenem vzorcu.

Po literaturnih podatkih obstaja velika verjetnost, da bi QA zaznali še:

- v gozdni košeničici (*Genista sylvestris* Scop.),
- v dlakavi košeničici (*Genista pilosa* L.),

Obe košeničici sodita v skupino iz rodu *Genista*, kjer prevladujejo alkaloidi anagirinskega tipa. Prevladujejo (vsebnost 5 %): anagirin, citizin, *N*-metilcitizin. Vsebujeta lahko še lupanin in spartein. Najbolj zastopan v obeh košeničicah je retamin [72]. Čeprav v novejših raziskavah **listov in semen** *G. pilosa* niso zaznali retamina, po tem sklepajo, da je šlo za napačno identifikacijo alkaloida retamina, ki naj ne bi bil prisoten v tej zvrsti [88].

V drugi raziskavi so v *G. pilosa* s TLC potrdili vsebnost baptifolina [76].

V *G. pilosa*, revni z alkaloidi (skupno 0.01% alkaloidov [95]), je spartein v prevladi, predstavlja 70 % vseh alkaloidov **v listih** [88]. Greinwald pa je spartein zaznal v majhnem deležu, kar nakazuje na prisotnost razlik znotraj vrste, lahko pa je vzrok temu tudi različen čas nabiranja [84]. Po količini sledi 17-oksosparteina (10 %), 11, 12-dehidrosparteina, *N*-metilcitizina, lupanina, citizina so v sledovih [95]. **V listih** je še amodendrin, *N*-metilcitizin, citizin (prevladuje), lupanin, *N*-formilcitizin, anagirin, v sledovih pa α -izolupanin, 5,6-dehidrolupanin in *N*-acetilcitizin. Celotno je v listih zelo malo alkaloidov (0,01 mg alkaloidov na g suhe mase [84]). V listih so poleg zgoraj naštetih našli 11,12-dehidrosparteina, *N*-metilcitizina, 17-oksosparteina, lupanina [88].

V **semenih** so našli *N*-metilcitizin, citizin (prevladuje), v sledovih α -izolupininin 5,6-dehidrolupanin, lupanin, *N*-formilupanin, *N*-acetilcitizin, v eni od rastlin tudi anagirin. Celotno je v semenih bilo od 5,4-7,4 mg alkaloidov na g mase suhe droge [84].

- v gorskem grahorju (*Lathyrus linifolius* (Reich.) Baessler = *L. montanus* Bernh.),

V literaturi smo našli le navedbo, da so prisotni QA. QA se v tej zvrsti ne pojavijo v vsaki rastlini, je pa pojavnost precej pogosta (več kot 50 % populacije) [5].

- v ptičji grašici (*Vicia cracca* L.),

- v kuštravi grašici (*Vicia villosa* Roth),

V nekaterih rastlinah so prisotni QA. V raziskavi, ki so jo naredili v arktičnem in subarktičnem pasu, so odkrili, da se QA pri ptičji grašici pojavljajo med 11-20 % populacije, pri kuštravi grašici pa med 21-30 % [5].

- v gorski detelji (*Trifolium montanum* L.),

V tej rastlini so v arktičnem in subarktičnem pasu opazili pojavnost QA med 31-50 % populacije [5].

- v pisani šmarni detelji (*Coronilla varia* L.),

Tudi za pisano šmarno deteljo so v arktičnem in subarktičnem podnebjem ugotovili, da so QA prisotni v tej vrsti, ampak s frekvenco 31-50 % [5].

- v sladkem grahovcu (*Astragalus glycyphyllos* L.),

V raziskavi o prisotnosti QA v rastlinah arktičnega in subarktičnega pasu so zaznali prisotnost QA v več kot 50 % primerkov rastlin [5].

- v rdeči relikii (*Chamaecytisus purpureus* Scop.),

Rastlina v majhnih količinah vsebuje kinolizidinske alkaloidne (0,001 – 0,05 % suhe mase): *N*-metilcitzin, lupanin, citzin in anagirin. Celične kulture tvorijo lupanin [96].

- v navadni kozji detelji (*Lembotropis nigricans* (L.) Griseb = *Cytisus nigricans* L.).

Zaznana vsebnost sparteinov/2-oksosparteina, ter alfapiridonskih alkaloidov, kot je citzin [97].

QA v zgoraj naštetih rastlinah nismo zaznali, možno je, da alkaloidi niso prisotni v teh nabranih rastlinah ali pa so prisotni pod mejo detekcije.

5.4 MOREBITNA PRISOTNOST DRUGIH ALKALOIDOV IN TOKSIČNOST SPOJIN V VZORCIH

Toksične spojine, ki so lahko prisotne v določenih rastlinah, so navedene v preglednici XI.

Preglednica XI: Vsebnost morebitnih toksičnih sekundarnih presnovkov v vzorčnih rastlinah.

Rastlina	Lupaninski alkaloidi	Druge spojine, ki lahko negativno vplivajo na ljudi in živali
<i>Trifolium montanum</i> L.	kinolizidinski alkaloidi**	cianogeni glikozidi
<i>Genista sericea</i> Wulf.	kinolizidinski in piperidinski alkaloidi	/
<i>Genista sylvestris</i> Scop.	kinolizidinski alkaloidi**	/
<i>Genista tinctoria</i> L.	kinolizidinski in piperidinski** alkaloidi	/
<i>Genista pilosa</i> L.	kinolizidinski in piperidinski alkaloidi	/
<i>Lathyrus latifolius</i> L.	/	NPAA
<i>Lathyrus linifolius</i> Reich. Baessler	kinolizidinski alkaloidi**	/
<i>Vicia villosa</i> Roth	kinolizidinski alkaloidi**	cianamid, pirimidinski derivati, NPAA, lektini
<i>Vicia cracca</i> L.	kinolizidinski alkaloidi**	pirimidinski glikozidi, (NPAA), lektini, cianamid
<i>Coronilla varia</i> L.	kinolizidinski alkaloidi**	kumarini, nitroglikozidi, NPAA, lektine, pirimidinski derivati
<i>Lupinus albus</i> L.	kinolizidinski in piperidinski alkaloidi	mikotoksini glive <i>Phomopsis leptostromiformis</i>
<i>Lupinus polyphyllus</i> Lindl.	kinolizidinski alkaloidi in piperidinski** alkaloidi	/
<i>Lembotropis nigricans</i> (L.) Griseb	kinolizidinski alkaloidi**	/
<i>Chamaespartium sagittale</i> L. P. E. Gibbs	kinolizidinski in piperidinski** alkaloidi	/
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	/	zmes lektinov (robin, fazin), NPAA (L-kanavin), cianamid
<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.	kinolizidinski**	/
<i>Chamaecytisus purpureus</i> Scop.	kinolizidinski**	izokinolidinski alkaloidi
<i>Chamaecytisus supinus</i> L.	kinolizidinski in piperidinski alkaloidi	alkaloidi
<i>Euphorbia cyparissias</i> L.	/	cianogene spojine, alkaloidi, forboidni diterpeni, evforbon, seskviterpenoidi
<i>Thalictrum minus</i> L.	/	izokinolidinski alkaloidi
<i>Ranunculus illyricus</i> L.	/	lakton ranunkulin
<i>Pseudolysimachion barrelieri</i> Schott ex Roem & Schult	/	iridoidni glikozidi
<i>Galium mollugo</i> L.	/	iridoidni glikozidi, kumarin (skopoletin)

*Velja za cel rod *Astragalus*

**literaturni podatki

Gorska detelja (*Trifolium montanum* L.)

Rastline iz rodu *Trifolium* navadno v nadzemnih delih poleg fenolnih spojin ter saponinov vsebujejo še cianogene glikozide (linamarin in lotaustralin) [98].

Kuštrava grašica (*Vicia villosa* Roth)

Pirimidinski derivati so najverjetneje vzrok zastrupitev živali z vrstami rodu *Vicia*. Obstaja zapis o fotosenzibilnosti zaradi vrste *Vicia villosa* (izpad las/dlak, srbeč dermatitis, konjunktivitis, pogosto driska, z visoko smrtnostjo) [80]. V nadzemnih delih vsebuje cianamid, ki naj bi v *V. villosa* subsp. *varia* imel vlogo zaviralca rasti. Največ ga **vsebujejo sveži listi, v stebelu in koreninah pa je v sledih** [99]. Od neproteinskih aminokislin (NPAA) [78] vsebuje kanavanin¹¹ [100]. Vsebuje tudi lektine [101]. Ob uživanju semen kuštrave grašice so opazili manjši prirast piščancev, puranov, ter več primerov smrti. Smrtnost prizadetih živali je 50 %. Prav tako je toksična za konje, pri katerih povzroča sistemsko granulomatozno vnetje, edem se pojavi okoli ust ter vek, prisotna sta tudi konjunktivitis in razjeda roženice [100].

Ptičja grašica (*Vicia cracca* L.)

Tudi ptičja grašica vsebuje pirimidinske glikozide, neproteinske aminokislino (NPAA)-kanavanin, lektine ter cianamid (~10-krat večja vsebnost kot v *V. villosa*) [78], [99], [101]. Pri ptičji grašici so zaznali primer zastrupitve krav z uživanjem rastline, je pa primerov manj kot pri kuštravi grašici [100].

Pisana šmarna detelja (*Coronilla varia* L.)

Za ta rod je značilna prisotnost glikozida koronilina in furanokumarina psoralena, predvsem v cvetovih in listih. Ovce rade jedo mlade rastline, po cvetenju postanejo strupene. Povzroča drisko, krče, ohromelost. Posušena krma je škodljivejša od sveže [102]. Vzrok zastrupitev so verjetno **nitroglikozidi** (glukozni estri 3-nitro-1-propanojske kisline in glikozidi 3-nitro-1-propanola). Za prežvekovalce so toksični, ker jih črevesna flora pretvori v 3-nitropropanojsko kislino in 3-nitropropanol. Nitropropanojska kislina ireverzibilno inaktivira sukcinat-dehidrogenazo in s tem tvorbo ATP. Nitropropanol ni toksičen, vendar se v jetrih pod vplivom dehidrogenaz pretvori v nitropropanojsko kislino [103]. V nadzemnih delih *C. varia* so našli sledeče nitroglikozide: karakin, cibarian [104], korolin, koronilin in koronarian in derivate nitropropanojske kisline. Kardiotonični glikozidi, kot sta hirkanozid in deglukohirkanozid, za katera je znano, da sta prisotna v rastlini (zlasti v **semenih**), se ob zaužitju absorbirata le v majhni meri in se akumulirata v majhnih količinah, zato jim lahko komajda rečemo, da sta strupena. Inhibirata Na⁺ in K⁺ ATPazo. Prisoten je še

¹¹ Analog arginina v semenu in γ -glutamyl-S-etenilcisteina.

kardenolid (v semenih) [105]. Alifatske nitro-spojine, v katerih je nitropropanojska kislina zaestrena z glukozo, so prisotne v vegetativnih delih rastline, ne pa v semenih. Otroci, ki so pojedli nekaj semen ali strok, so bruhalo in imeli bolečine v trebuhu [106]. V semenih so prisotni še kumarini: skopoletin (7-hidroksi-6-metoksikumarin), umbeliferon (7-hidroksi-kumarin) [107], dafnoretin [95].

Cipresasti mleček (*Euphorbia cyparissias* L.)

V mlečku so **forboidni diterpeni** z ingenanskim skeletom¹², ki so zaslužni za toksičnost. Forbolni estri aktivirajo protein kinazo C, ki je ključni encim v raznih signalnih poteh. So tudi pomembni ko-karcinogeni. **V mlečku** je evforbon (zmes α - in β -evforbola in C₃₀ steroida). Zunanje deluje kot iritant in je vzrok zastrupitev pri ljudeh in živini [78]. Mleček še vsebuje smole, kavčuk, evforbin, evforbijsko kislino, čreslovine, holin [102]. Mleček iritira avgusta in septembra, aprila in maja je neaktiven [108]. V času cvetenja so odkrili, da prevladujejo zlasti seskviterpenoidi, ki so prisotni **v vseh delih rastline**. Kariofilenoksid, kariofilen, β -elemen, betulin prevladujejo **v cvetovih**, v **stebelu** β -elemen, kariofilen, **v korenini** β -elemen [109]. Ekstrakt cipresastega mlečka vsebuje cianogene komponente **in 0,5 % alkaloidov** v dobi cvetenja [110].

Mali talin (*Thalictrum minus* L.)

Rod *Thalictrum* je znan po tem, da vsebuje izokinolinske alkaloidne, primer je izotalizopavin, ki je v *T. minus* v sledovih [111]. Pri tej rastlini niso zaznali toksičnih učinkov, vendar sodi v rod, kjer najdemo tudi nekatere toksične vrste [112]. Odkrili so tudi saponine (talikozid A1-A3), ki pa so prisotni v majhnih koncentracijah [113]. Bisbenzilizokinolinski alkaloidi v malem talinu so: talabadenzin, talfinin, talikberin, talidazin, talidezin, taligozin, taligrizin, talifilin, talirabin, taliracebin, talirugin, talisopin, talistin, talmetin, talmin, talmirabin, talrugozaminin [114], talfenin [115], talaktamin, talifolin [116], adiantifolin v koreninah in nadzemnih delih *T. minus* [117]. V nadzemnih delih so še odkrili *O*-metiltalikberin, *O*-metiltalmetin [118]. V *T. minus* so še: monomeri benzil-tetrahidroizokinolini, aporfini, protoberberini (zelo malo), ter dimeri bisbenzilizokinolini, aporfin-benzilizokinolin [119].

¹² Ingenani imajo štiriciklični obroč s ketonskim mostom med C₈ in C₁₀, A in B obroč vsebujeta dvojni vezi, obroč D je pa ciklopropanski. C₃, C₅, C₁₃, C₁₇ in C₂₀ mesta so lahko zaestrena. Acetilna skupina na C₂₀ zmanjša iritabilnost, enako je na C₅ [120].

Ilirska zlatica (*Ranunculus illyricus* L.)

Vsebuje **lakton ranunkulin**, ki se po poškodbi rastlinskega tkiva pretvori v protoanemonin in je lahko vzrok kontaktnega dermatitisa, je iritant, fototoksičen in povzroča hipersenzibilnost [121], [122].

Navadna lakota (*Galium mollugo* L.)

Poganjki navadne lakote vsebujejo skopoletin (kumarin). V sveži zeli so iridoidni glikozidi (skandozid in njegov metilni ester, dafilozid, asperulozid, monotropein, sekogaliozid, molugozid). Sveža korenina vsebuje 1,96 % antrakinonskih glikozidov ter 0,85 % prostih antrakinonov [96], [123].

Beli volčji bob (*Lupinus albus* L.)

Lupinoza je kronična bolezen, ki se pojavlja pri ovcah in konjih, sodi v kategorijo anoreksij, povzroča ikterus, nekrozo jeter in miopatijo. Lupinozo povzroči infekcija lupinov z glivo *Phomopsis leptostromiformis*. Ta tvori mikotoksine (fomopsine), ciklične heksapeptide, ki so hepatotoksični [80]. Poleg alkaloidov še v belem volčjem bobu najdemo oligosaharide, sledi saponinov, kondenzirane tanine, lektine, fitate. Ti sekundarni presnovki so prisotni v premajhnih koncentracijah, da bi povzročali nevšečnosti, glavni vzrok toksičnosti so lupaninski alkaloidi [124].

Širokolistni grahor (*Lathyrus latifolius* L.)

V listih, steblih in korenini širokolistnega grahorja so bili detektirali latirogene (neproteinogene aminokislina), kot so: α,γ -diaminobutanojska kislina, γ -*N*-oksalil- α,γ -diaminobutanojska kislina, β -*N*-oksalil- α,β -diaminopropanojska kislina, homoserin, *O*-oksalilhomoserin. Prva je homolog ornitina in je akutno nevrotoksična v podganah, saj inhibira cikel sečnine (preko encima ornitin karbamilaza) ter je vzrok nevrolatirizma¹³ [125].

Navadna robinija (*Robinia pseudoacacia* L.)

Glavna toksična snov v semenih je **zmes lektinov**, ki je poznana pod imenom robin [80]. V lubju se ta zmes imenuje fazin. V semenih sta prisotna lektina: RPA1 in RPA2, neproteinska aminokislina L-kanavin ter triterpenski glikozidi (robiniozidi A-D, kaikasaponin) [78], [127].

¹³ Kronična nevrološka bolezen, ki se pojavlja na indijskem podkontinentu, Kitajskem ter Etiopiji, kjer *L. latifolius* uporabljajo v prehrani [126].

V listih vsebuje **cianamid** [99]. Znanih je malo zastrupitev z robinijo. Te se pojavijo ob zaužitju 4-5 semen, iz katerih se po grizenju spustijo strupene snovi. Znane so zastrupitve konj z lubjem robinije, ti so umrli po 4 h [78]. Lektinski ekstrakti robinije imajo hemaglutinirajoče lastnosti in mitogene lastnosti in vodijo v motnje v koncentraciji glikogena v jetrnih in mišičnih celicah. Konji so po hranjenju z lubjem, listjem in odrezki lesa trpeli za kolikami, drisko in simptomi paralize [80].

Sladki grahovec (*Astragalus glycyphyllos* L.)

V rodu *Astragalus* so od toksičnih snovi izsledili indolizidinske alkaloidne in alifatske nitrokomponente ter selen [128]. Podatkov posebej za sladki grahovec v dostopani literaturi nismo zasledili.

Rdeča relika (*Chamaecytisus purpureus* Scop.)

Vsebuje še do zdaj neidentificirane alkaloidne, ki jih lahko štejemo k izokinolidinskim (dehidroliamin, bakebergin, salsolidin) [129].

5.5 PREDLOGI ZA IZBOLJŠANJE UČINKOVITOSTI EKSTRAKCIJE QA

Na rezultate o vsebnosti QA so vplivali zunanji dejavniki (na katere nimamo vpliva), ter izvedba metode za ugotavljanje vsebnosti, kjer je prisoten tudi človeški faktor.

5.5.1 Zunanji dejavniki

Veliko zunanjih dejavnikov lahko vpliva na vsebnost QA v rastlinah. Pri tem je nujno upoštevati, da se spremembe v QA profilu izražajo pri vsaki rastlini (tudi znotraj iste vrste) in celo pri posameznem rastlinskem organu na drugačen način. Velika razlika med alkaloidnimi profili rastlinskih organov je značilna za *Lupinus polyphyllus* [130].

Dejavniki, ki lahko prispevajo k različnim vsebnostim QA so:

- **podnebje**: sladki kultivarji vrste *L. albus* iz subkontinentalnega podnebja vsebujejo več QA kot istovrstne rastline iz Sredozemlja [131].
- **svetloba** (razlaga je v poglavju Biosinteza kinolizidinskih alkaloidov).
- **lega**: lupini iz nižje ležečih krajev (konkretnije *L. argentus*), so vsebovali več QA kot tisti iz višje nadmorske višine. Sklepajo, da za to, ker je v nižinah več plenilcev in rastlina se temu prilagodi s povečano tvorbo QA [132].

- **vpliv sestave prsti:** pri sladkem *Lupinus albus* so opazili, da se tvorba QA v semenu poveča s povišano vsebnostjo K v prsti in zmanjšano vsebnostjo P [133].
- **vpliv škodljivcev** oziroma poškodb na rastlinah v povezavi s tvorbo QA: pri vrsti *L. albus* so dokazali, da se po poškodbi tkiva poveča sinteza QA in s tem zmanjša užitnost rastline [134]. Povečana sinteza QA se začne nekaj ur po poškodbi ali celo nekaj dni kasneje. Pri sladkem belem lupinu se je vsebnost QA po poškodbi povečala za 130 %, pri grenkem pa za 70 %. *L. angustifolius* po napadu gosenic ni povečal tvorbe QA [83]. Pomembna je tudi vrsta škodljivcev in njihova pogostost pojavljanja [135].
- **generacije:** vsebnost se razlikuje med posameznimi rastlinami in tudi skozi čas in generacije [43]. V raziskavi sladkih kultivarjev vrste *Lupinus albus* so opazili, da so alkaloidi, prisotni v sledovih, zaznani navadno na isti lokaciji. To pa ne pomeni, da ti alkaloidi na drugih lokacijah niso prisotni, mogoče so le pod mejo detekcije. Sladke vrste lupinov se lahko oprašijo s pelodom grenkih vrst, na ta način se lahko skozi več generacij poveča vsebnost QA kot del naravne selekcije. Zaradi vseh teh možnih sprememb je nujno skrbno spremljati vsebnost alkaloidov v semenih, ne samo v proizvodnji, temveč tudi pri različnih stopnjah razvoja, razmnoževanja različic vrst in v različnem okolju [81].
- **rastno obdobje:** vsebnost se razlikuje tudi po rastlinskih organih, glede na rastno obdobje, v katerem je rastlina [136]. Pri vrstah *L. luteus* in *L. angustifolius* je najvišja vsebnost QA v času cvetenja, najmanjšo pa imajo starejši listi [137].

Različne profile lupaninskih alkaloidov je težko pojasniti. Pri rastlinah iz rodu *Lupinus* so v več primerih odkrili, da botanična določitev rastline ni zadostna za oceno morebitne toksičnosti oziroma teratogenosti rastline. Na primer pri *L. leucophyllus* in *L. sulfureus* so v istovrstnih primerkih odkrili različni alkaloidni profil. V takih primerih se omenjajo tudi možen obstoj podvrst z različnimi alkaloidnimi profili. Naslednja možnost je lahko podvrženost okoljskim vplivom (škodljivci). Tretja možnost pa omenja možnost križanja in s tem nastanek nove populacije s spremenjenim profilom. Zato se tukaj izkaže za zelo pomembno kvalitativno in kvantitativno analiziranje spojin, na podlagi katerega se potem določi tveganje. Pomembna je tudi porazdelitev lupinov in njihova gostota na neke območju [138]. Nekatere vrste imajo tudi bolj konstante alkaloidne profile, druge pa spremenljive [139]. Analiza je nujna pri vsaki populaciji, z namenom potrditve vsebnosti lupaninskih alkaloidov [52].

5.5.2 Izvedba metode

Izboljšanje postopka ekstrakcije QA

Do sprememb v strukturi lupaninskih alkaloidov lahko pride že med sušenjem rastlin, ko pogosto pride do hidrolize estrov. Da se izognemo encimski razgradnji in spremembi strukture, bi bilo bolje uporabljati sveže vzorce ali zamrznjene pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, lahko pa tudi liofilizirane [136]. Čeprav sprememba v vsebnosti QA verjetno niha različno od vrste do vrste. Za *Lupinus sulphureus* so dokazali, da dolgotrajna shramba pri sobni temperaturi (v herbariju) ni vplivala na vsebnost QA [138].

Delež ekstrahiranega materiala bi lahko povečali tudi s tem, da bi vzorec na začetku namakali v MeOH, saj sta v njem topni obe obliki alkaloida (prosta in ionizirana). Previdni in natančni smo morali biti tudi pri odstranjevanju uprašnega vzorca iz mlinčka, saj se QA navadno močno oprimejo površin. Na ta način bi lahko prišlo tudi do kontaminacije naslednjega vzorca.

Pri nas je največjo težavo predstavljala hidroliza estrov, saj med zaznanimi alkaloidi ne najdemo niti enega. Na hidrolizo bi lahko vplivala toplota, na primer pri soniciranju se je kadička segrela skoraj do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, vendar so QA termostabilni in tudi če je tukaj prišlo do hidrolize, je ta v majhni meri vplivala na vsebnost QA. Wink po naalkaljenju sicer priporoča ekstrakcijo trdno-tekoče. Alternativno predstavlja ekstrakcija tekoče-tekoče, ki smo jo uporabili tudi mi. V tem primeru se ekstrakcija z diklorometanom ponovi najmanj dvakrat [136]. Pri tem postopku je pogost tudi nastanek emulzije, ki ovira ekstrakcijo. Do nastanka pride zaradi alkaloidov z α -piridonskim jedrom, ki so topni v vodi in tvorijo vodikove vezi med vodo in aminske skupino alkaloida [54]. Tudi tukaj smo mogoče izgubili delež QA, vendar je raziskava med izplenom ekstrakcij tekoče-tekoče in tekoče-trdno pokazala, da ekstrakciji sicer dajeta različne rezultate, vendar so ti primerljivi [51]. Emulziji se lahko izognemo tudi z uporabo ekstrakcije trdno-tekoče [31]. Klasično ekstrakcijo pogosto zamenjuje ekstrakcija s superkritičnim fluidom, ki omogoča ekstrakcijo termolabilnih spojin v kratkem času, z večjim izplenom, lažje se avtomatizira, zaradi topil je prijaznejša ljudem in okolju. Analiza takih ekstraktov lahko poteka sklopljeno z GC [24].

Ker smo imeli posušene, zmlete vzorce, bi jim lahko pred ekstrakcijo podaljšali čas namakanja v kislem mediju (na primer 3 h z magnetnim mešalom ali namakanjem čez noč). Odločili smo se za polurno namakanje v ultrazvočni kadički in s tem pospešili izluževanje

snovi ter zmanjšali čas namakanja. Izplen bi lahko povečali še z večkratnim nakisanjem rastlinskega materiala in združitvijo supernatantov.

Ker semena vsebujejo veliko lipidov, se lahko predhodno izvede ekstrakcija na Soxhletovem aparatu z MeOH, kar bi bilo v našem primeru zamudno, pa še vzorec je zajemal celotno rastlino, ne le semen [136]. Razmastitev semen s heksanom v Soxhletovem aparatu zmanjša šum in poveča resolucijo [31]. Lahko se izvede tudi po nakisanju, na primer z diklorometanom [140].

Ekstrakcija s kislinami in bazami pa lahko v določenem primeru prikrije prisotnost QA, ki imajo dušik aciliran/metiliran/formiliran, kar zmanjša zmožnost njihove protonacije v kislini in zmanjša topnost v vodnem mediju. Zaradi tega lahko pride do izgub analita. Do težav pri protoniranju bi lahko prišlo tudi pri *N*-alkaloidih z α -piridonskim jedrom, ki so šibke baze ($pK_a = 1$, piperidin ima $pK_a = 11,22$). Pri uporabi H_2SO_4 pride do protonacije z bazičnim dušikom in do nastanka vodotopne oblike. Belsito s sodelavci [54] je pri bazični nevodni ekstrakciji (EtOH z 2 % KOH (m/V), etanol prispeva k ekstrakciji proste oblike) cvetov navadne žuke (*Spartium junceum* L.) odkril visoko vsebnost *N*-formilcitzina, ki ga pri klasični kislinsko bazični ekstrakciji sploh ni zaznal. Tudi izplen *N*-metilcitzina je pri bazični nevodni ekstrakciji večji. Bazična brezvodna ekstrakcija bi lahko prispevala tudi k boljšemu izplenu glikoziliranih in zaestrenih oblik alkaloidov ter njihovih soli.

Pri naalkaljenju z bazo bi lahko uporabili nižji pH (10-11) z NH_3 (aq.), da bi zmanjšali hidrolizo estrov [31]. V primeru, da se estri niso razgradili in jih mi nismo zaznali, bi mogoče lahko njihovo identifikacijo izboljšali z izbiro CI, FD-MS ali hitrega atomskega bombardiranja (FAB) [24].

6 SKLEP

Izvor lupanina in hidroksilupanina v konjskem tkivu bi lahko predstavljale naslednje rastline, pri katerih smo zaznali lupanin: **beli volčji bob** (*Lupinus albus* L.), **mnogolistni volčji bob** (*L. polyphyllus* Lindl.), **nizka relika** (*Chamaecytisus supinus* L.) in **svilnata košeničica** (*Genista sericea* Wulf.).

5-6-dehidrolupanina, ki so ga zaznali v urinu poginulega lipicanca, pa nismo zaznali. Lahko gre za presnovek, ki je nastal v konju. Ne moremo potrditi uboja konj v Lipici s temi rastlinami, tudi toksikoloških študij (akutnih, kroničnih) na konjih ni prisotnih v dostopani literaturi, so pa podatki o LD₅₀ vrednostih na drugih živalih. Dosegljivi so podatki o teratogenosti in poginu konj, kjer so sumili rastline s QA za njihovo smrt.

V barvilni košeničici (*Genista tinctoria* L.) smo zaznali alkaloid termopsin, o katerem dostopana literatura ne poroča v tej rastlini.

Količinsko in zvrstno se literaturni podatki o QA in naši rezultati v isti rastlini razlikujejo, saj je tovrstne primerjave težko delati zaradi mnogih vplivov na vsebnost QA. Primerjava je namenjena prikazu tega dejstva. Nabor vzorcev je bil velik. Glede na vrsto rastlin, bi se lahko lupaninski alkaloidi nahajali v večjih vzorcih, vsaj v literaturi smo našli pozitivne rezultate o vsebnosti lupaninskih alkaloidov pri istovrstnih rastlinah, ki so pa pri nas dajale negativne rezultate o vsebnosti lupaninskih alkaloidov. Razlogi temu so različni; lahko so bili primerki brez QA ali z zelo majhno vsebnostjo, frekvenca pojavnosti v istovrstnih rastlinah lahko močno niha. Takšne koncentracije bi lahko bile pod mejo detekcije. Vsekakor pa je nujno biti na te rastline pozoren in jih obravnavati, kot da vsebujejo QA (za varnost krme).

Z rahlo izboljšavo postopka bi preprečili hidrolizo estrov in bi na ta način dobili bolj pestre alkaloidne profile. Priporočljiva bi bila še analiza toksičnih rastlin v drugih razvojnih fazah rastlin, saj na vsebnost QA vpliva mnogo dejavnikov, med drugim tudi zrelost rastline.

Priporočamo izogibanje rastlinskih vrst s QA za krmljenje, saj bi bilo nujno vsako analizirati pred hranjenjem, kar je praktično nemogoče. Kontrola recimo ne bi bila nujna, če bi imeli le sladke vrste, ker vsebujejo majhne koncentracije QA. Kljub majhni vsebnosti QA lahko v posameznih primerkih pride do odstopanj in je določanje vsebnosti še vedno priporočljivo. Tudi druge rastline, ki vsebujejo tudi toksične presnovke, lahko delujejo sinergistično z alkaloidi. Prav tako ne poznamo kronične izpostavljenosti QA, samih ali v kombinaciji z drugimi sekundarnimi presnovki. Toksični so tudi izločki gliv, ki živijo na rastlinah rodu

Lupinus. Namen naloge je bil glede na izbrane metode, postopke in nabor rastlin uspešno realiziran.

7 LITERATURA

1. Evans C W: Trease and Evans' Pharmacognosy, Saunders Ltd., Edinburgh, 2009: 353-408.
2. Roberts M F, Wink M: Alkaloids : Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications, Springer Science Business Media, New York, 1998: 1-6, 71-6, 103-12, 242, 317-354, 423, 453.
3. Osbourn E A, Lanzotti V: Plant-derived Natural Products Synthesis, Function, and Application, Springer Science Business Media, 2009: 3-10.
4. Wink M: Encyclopedia of Food sciences and Nutrition Alkaloids: Properties and determination, 9, Academic Press, New York, 2003: 126-134, 142.
5. Aniszewski T: Alkaloids - Secrets of Life Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role, Elsevier Science, 2007: 1-15, 87-101, 122.169, 182, 194, 203-33.
6. Wink M: The Alkaloids Chemistry and Pharmacology, 43, Academic Press, New York, 1993: 55, 68, 86, 87, 93.
7. El Sakka M: Phytochemistry (3) Alkaloids,
<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=51282dcfe4f076e05c00001a&assetKey=AS%3A271832593174531%401441821348767> (dostopano 10. 6. 2015)
8. <https://en.wikipedia.org/wiki/Morphine> (dostopano: 27. 2. 2016)
9. <http://herbmuseum.ca/content/synthetic-compounds-similar-mescaline> (dostopano 27. 2. 2016)
10. <https://en.wikipedia.org/wiki/Capsaicin> (dostopano 27. 2. 2016)
11. Seigler D S: Plant Secondary Metabolism, Springer Science Business Media, New York, 1998: 506-59.
12. Fattorusso E, Tagliatela-Scafati O: Modern alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology, Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008: 9-16.
13. <https://en.wikipedia.org/wiki/Nicotine> (dostopano 27. 2. 2016)
14. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ammodendrine> (dostopano 27. 2. 2016)
15. <https://sl.wikipedia.org/wiki/Acetilholin> (dostopano 27. 2. 2016)
16. Umek A: Alkaloidi - zapiski s predavanj pri predmetu Farmakognozija, 2012.
17. <http://adriapharm.com/> (dostopano 10. 6. 2014)
18. Rahman A: Stereoselective synthesis (Part 1), Studies in Natural Products Chemistry, 1994; 15: 515-46.
19. Walker j, Hertel P, Parker P, Edwards J: Procrop Lupin growth & development, NSW Government
http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0006/516183/Procrop-lupin-growth-and-development.pdf (dostopano 25. 3. 2016)
20. Facchini P J: The Alkaloids Chemistry and Biology, Academic Press, Elsevier, 2006: 13-15.
21. Wink M: Allelopathy : chemistry and mode of action of allelochemicals, Cell Biochemistry & Function, 2005; 23: 149,183, 195.
22. Bunsupa S, Yamazaki M, Saito K: Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects,
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2012.00239/full> (dostopano 27. 2. 2016)

23. <http://www.epharmacognosy.com/2012/07/alkaloids-derived-from-lysine.html>. (dostopano 4. 4. 2016)
24. Muzquiz M: Alkaloids/gas chromatography. Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, 2000: 1938-1949.
25. https://www.uni-muenster.de/imperia/md/content/pharmaz_und_med_chemie/studieren/semester/8semester/ss_2011/farbreaktionen.pdf (dostopano 31. 3. 2016).
26. D'Mello J P F, Duffus C M, Duffus J H: Toxic substances in crop plants, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991: 166-75.
27. Verpoorte R, Schripsema J: Modern Methods in Plant Analysis: Alkaloids, Springer-Verlag, Berlin, 1994; 1: 4, 11, 111-20.
28. http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_lual22.pdf (dostopano 25. 3. 2016)
29. Barceloux D G: Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants and venomous animals, John Wiley & Sons, New Jersey, 2008: 733-85.
30. Arnoldi A, Resta D, Brambilla F, Boschin G, D'Agostina A, Sirtori E, O'Kane F: Parameters for the evaluation of the thermal damage and nutraceutical potential of lupin-based ingredients and food products, Molecular nutrition & food research, 2007; 51: 431-436.
31. Resta D, Boschin G, D'Agostina A, Arnoldi A: Evaluation of total quinolizidine alkaloids content in lupin flours, lupin-based ingredients, and foods, Molecular nutrition & food research, 2008; 52: 490-495.
32. Lapham F, Kraus M: Lupini Beans, Saveur : Bonnier Corporation Company, <http://www.saveur.com/article/Kitchen/Lupini-Beans> (dostopano 27. 2. 2016)
33. Koleva II, Beek van T, Soffers A E M, Dusemund B, I M Rietjens, Alkaloids in the human food chain, Natural occurrence and possible adverse effects, Molecular Nutrition & Food Research, 2012; 56: 35-37.
34. Resta D, Boschin G, D'Agostina A, Arnoldi A: Quantification of quinolizidine alkaloids in lupin seeds, lupin-based ingredients and foods, International Lupin Association, Fremantle, Western Australia, 2008.
35. Caballero B, Trugo F P M, Trugo L C: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Academic Press, 2003: 3623.
36. <http://www.lupins.org/feed/> (dostopano 12. 2. 2016)
37. Panter K, Motteram E, Cook D, Lee S, Ralphs M, Platt T, Gay C: Crooked calf syndrome: managing lupines on rangelands of the Channel Scablands of east-central Washington State, Rangelands, 2009; 31: 10-15.
38. Lee S, Panter K, Gay C, Pfister J, Ralphs M, Gardner D, Green B: Lupine-induced crooked calf disease: the last 20 years, Rangelands, 2008; 30: 13-18.
39. De Ron A, Grain legumes (Handbook of plant breeding), Springer, 2015: 184.
40. Moffat A, Osselton D, Widdop B: Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Pharmaceutical Press, London, 2011: 2064.
41. <https://www.tabex.net>. (dostopano 4. 3. 2016)
42. <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1407764> (dostopano 20. 3. 2016)
43. Wink M: Chemical defense of lupins. Mollusc-repellent properties of quinolizidine alkaloids, Z. Naturforsch., 1984; 39c: 553-558.
44. Garland T, Barr A C: Toxic plants and other natural toxicants, CAB International, Eastbourne, 1999: 297, 304-345, 465.
45. McMaster M C, GC/MS : a practical user's guide, Wiley-Interscience Hoboken, 2008: 10, 11, 31, 32, 61.

46. Vončina B D :Analizna kemija II (zbrano gradivo), FKKT, Maribor, 2006.
47. Trontelj J: Sklopljene tehnike, Izročki pri predmetu Instrumentalna farmacevtska analiza, 2011.
48. Kikelj D: Masna spektrometrija, Izročki pri predmetu Instrumentalna farmacevtska analiza, 2011.
49. Hübschmann H: Handbook of GC/MS, Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009: 166.
50. <http://texassodiumazidepoisoning.blogspot.si/2013/01/methods-for-gc-ms.html> (dostopano 5. 4. 2016)
51. Nossack A, Vilegas J, Baer von D, Lancas F: Supercritical Fluid Extraction and Chromatographic Analysis (HRGC-FID and HRGC-MS) of Lupinus spp. Alkaloids, J. Braz. Chem. Soc., 2000; 11: 495-501.
52. Lee S, Cook D, Panter K, Gardner D, Ralphs M, Motteram E, Pfister J, Gay C: Lupine Induced "Crooked Calf Disease" in Washington and Oregon: Identification of the Alkaloid Profiles in Lupinus sulphureus, Lupinus leucophyllus, and Lupinus sericeus, J. Agric. Food Chem., 2007; 55, 10649–10655.
53. Wink M, Meißner C, Witte L: Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus Lupinus, Phytochemistry 1995; 38: 139-153.
54. Belsito E, Di Gioia G, Leggio M, Liguori L, Perri A, Siciliano F: Extraction of Quinolizidine Alkaloids in Non Aqueous Basic Conditions: The Case of Spartium junceum Flowers, Chromatographia, 2008; 68, 345-349.
55. http://everything.explained.today/Kovats_retention_index (dostopano 27. 2. 2016)
56. http://www.shimadzu.com/an/linear_retention_index.html (dostopano 27. 2. 2016)
57. Zellner B, Bicchi C, Dugo P, Rubiolo P, Dugo G, Mondello L: Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review, Flavour and fragrance journal, 2008; 23: 297-314.
58. McNaught A, Wilkinson A, Nic J: IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, (the "Gold Book"), Blackwell Scientific Publications, <http://goldbook.iupac.org> (dostopano 27. 2. 2016)
59. http://cires1.colorado.edu/jimenez/CHEM-5181/Lect/GC_Jessica.pdf (dostopano 27. 2. 2016)
60. <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C90391&Mask=2000> (dostopano 13. 4. 2016)
61. <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-detail-ammodendrine.php> (dostopano 13. 4. 2016)
62. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.204591.html> (dostopano 13. 4. 2016)
63. <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-detail-cytisine.php> (dostopano 13. 4. 2016)
64. <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-detail-angustifoline.php> (dostopano 13. 4. 2016)
65. <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-detail-lupanine.php> (dostopano 13. 4. 2016)
66. <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-detail-thermopsine.php> (dostopano 13. 4. 2016)
67. <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-detail-13-hydroxylupanine.php> (dostopano 13. 4. 2016)

68. https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/public/5990-9867EN_GC_CSG.pdf (dostopano 27. 2. 2016)
69. http://www.us.edu.pl/uniwersytet/jednostki/wydzialy/chemia/acta/ac13/zrodla/05_A_C13.pdf (dostopano 13. 4. 2016)
70. <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:9524> (dostopano 27. 2. 2016)
71. Tero-Vescan: Alkaloid content of some potential isoflavonoids sources (native genista species). long-term safety implications, *Farmacia*, 2014; 62: 1109-1117.
72. Blaschek W: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Drogen A-K, Springer Verlag, 1998; 2: 793-798, 1065-1071.
73. Wink M: Stoffwechsel und Funktion von Chinolizidin Alkaloiden in Pflanzen und pflanzlichen Zellkulturen, Habilitation Thesis, Braunschweig: Technical University of Braunschweig, 1984.
74. Greinwald R, Bachmann P, Witte L, Czygan F: Cytisine-12-carboxy-ethylester, a quinolizidine alkaloid from *Laburnum watereri* and its occurrence in the leguminosae, *Phytochemistry*, 1990; 29: 3553-3554.
75. Vladimirova I, Georgiyants V: Lipophilic substances from *Genista tinctoria*, *Chemistry of Natural Compounds*, 2013; 49: 91-92.
76. Christov L, Evstatieva V: Alkaloid profile of Bulgarian species of Genus *Genista*, *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 2000; 53: 27.
77. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2663.pdf (dostopano 13. 4. 2016)
78. Wink M, Wyk van B: *Mind-Altering and Poisonous Plants of the World*, Timberpress, Portland, 2008: 127, 132, 207, 386, 417.
79. Blaschek W, Hager H, *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Drogen L-Z*, Springer, Berlin, 1997; 3: 104-118.
80. Frohne D, Pfänder H, *Poisonous plants : a handbook for doctors, pharmacists, toxicologists, biologists and veterinarians*, Timber Press, Portland., 2005: 210, 211, 212.
81. Boschin G, Annicchiarico P, Resta D, D'Agostina A, Arnoldi A: Quinolizidine alkaloids in seeds of lupin genotypes of different origins, *J Agric Food Chem.*, 2008; 56: 3657-63.
82. Chludil D, Vilariño P, Franco L, Leicach R: Changes in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* alkaloid profiles in response to mechanical damage, " *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009; 57, 6107-6113.
83. Vilariño M: Post-damage alkaloid concentration in sweet and bitter lupin varieties and its effect on subsequent herbivory, *Journal of Applied Entomology*, 2005; 129: 233-238.
84. Greinwald R, Van Rensen I, Veit M, Canto P, Witte L: A chemical dichotomy in quinolizidine alkaloid accumulation within the section of *Spartioides* of Genus *Genista* (Fabaceae: Genisteae), *Biochemical systematics and ecology*, 1995; 23: 89-97.
85. Wink M, Witte L, Schiebel H, Hartmann T: Alkaloid pattern of cell suspension cultures and differentiated plants of *Lupinus polyphyllus*, *Planta med.*, 1980; 38: 238-245.
86. Pilegaard K: Alkaloids in edible lupin seeds, [http://orbit.dtu.dk/en/publications/alkaloids-in-edible-lupin-seeds\(69c0b86b-3151-4937-9235-ff97b4b8a767\).html](http://orbit.dtu.dk/en/publications/alkaloids-in-edible-lupin-seeds(69c0b86b-3151-4937-9235-ff97b4b8a767).html) (dostopano 30. 3. 2015)

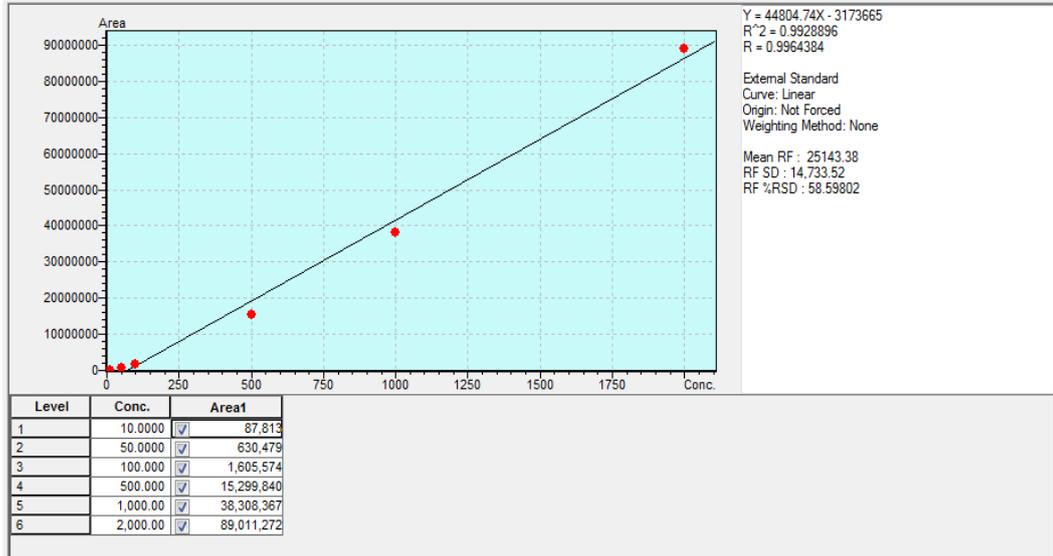
87. Wink M, Hartmann T: Sites of enzymatic synthesis of quinolizidine alkaloids and their accumulation in *Lupinus polyphyllus*, *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1981; 102: 337-344.
88. Wink M, Witte L, Hartmann T, Theuring C, Volz V: Accumulation of Quinolizidine Alkaloids in Plants and Cell Suspension Cultures: Genera *Lupinus*, *Cytisus*, *Baptisia*, *Genista*, *Laburnum*, and *Sophora*, *Planta Medica*, 1983; 48: 253-257.
89. Karlsson M, Peter W: Determination of alkaloids from *Lupinus polyphyllus* by quantitative thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1978; 155: 218-222.
90. Daily A, Kotsev N, Ilieva L, Dutschewska H, Mollov N: Gaschromatographische Identifizierung der Alkaloide aus *Chamaecytisus Link.*, *Archiv der Pharmazie*, 1978; 311: 889-891.
91. Händel R: *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis 5. Folgeband Drogen A-D, XXVIII*, Springer Verlag, 1992; 4.: 800-807.
92. Brossi A: *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, Academic Press, 1987; 31: 125,159.
93. <http://de.wikipedia.org/wiki/Kopf-Zwergginster> (dostopano 27. 2. 2016)
94. <http://image.24ur.com/media/document//60773936.pdf> (dostopano 28. 7. 2016)
95. Hegnauer R, Hegnauer M: *Chemotaxonomie der pflanzen XIb-2 Leguminosae Teil 3: Papilionoideae*, Springer Basel AG, Basel, 2001, 676-696, 691-760, 710-713, 1118-1120.
96. Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G: *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis 5. Auflage, Band 5, Drogen E-O*, Springer-Verlag Berlin, 1993; 5: 219-220.
97. Käss E, Wink, M: Molecular phylogeny of the Papilionoideae (Family Leguminosae): rbcL gene sequences versus chemical taxonomy, *Botanica Acta*, 1995;108: 149-162, 1995.
98. Muzashvili T, Moniuszko-Szajwaj B, Pecio L, Oleszek W, Stochmal A: Ultraperformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Determination of Cyanogenic Glucosides in *Trifolium* Species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014; 62: 1779.
99. Kamo T: Limited distribution of natural cyanamide in higher plants: Occurrence in *Vicia villosa* subsp. *varia*, *V. cracca*, and *Robinia pseudo-acacia*, *Phytochemistry*, 2008; 69, 1166-1172.
100. Enneking D: *The toxicity of Vicia species and their utilisation as grain legumes*, Waite agricultural research institute, Adelaide, 1994: 26-50.
101. Grubhoffer L: Isolation and properties of a lectin from the seeds of hairy vetch, *Biochemical Journal*, 1981; 195: 623-626.
102. Petauer T: *Leksikon rastlinskih bogastev*, Tehniška založba Slovenije Ljubljana, 1993; 1: 152, 205.
103. Anderson C, Majak W, Rassmussen A, Callaway R, Beier C, Nisbet J, Allison J: Toxicity and metabolism of the conjugates of 3-nitropropanol and 3-nitropropionic acid in forages poisonous to livestock, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005; 53: 2344-2350.
104. Noori M, Chehregany A, Hatami A: Nitrotoxins in three genera of Papilionoideae (Leguminosae) found in the Central of Iran and potential health implications, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2007; 89: 479-485.

105. Hembree J, Chang C, McLaughlin L, Peck G, Cassady J: Potential Antitumor Agents: A Cytotoxic Cardenolide From *Coronilla varia*, *J. Nat. Prod.*, 1979; 42: 293–298.
106. ROMÂNĂ A: Ultra-performance liquid chromatography method for the quantification of some phytoestrogens in plant material, *Rev. Roum. Chim*, 2010; 55: 459-465.
107. Joo K, McKee W, MacDonald A, Langille A: Isolation and identification of phytotoxic substances from seeds of *Coronilla varia* L., *Proceedings of the Association of Official Seed Analysts*, 1975; 65: 38-51.
108. Fleischman D, Meyer J, Fowler C: Keratouveitis from *Euphorbia cyparissias* exposure is a temporal phenomenon, *Clinical ophthalmology*, 2012; 6: 851-853.
109. Romeo C, Faltinski F: Chromatographic study of *Euphorbia cyparissias*, *Medicamentul Veterinar*, 2009; 3: 80-96.
110. Jankowska B, Wilk A: Effect of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) and cypress spurge (*Euphorbia cyparissias* L.) plant water extracts on the occurrence of pest insects on white cabbage, *Folia Horticulturae*, 2011; 23: 21-28.
111. Sidjimov K, Tawara N, Stermitz R, Rithner D: An isopavine alkaloid from *Thalictrum minus*, *Phytochemistry*, 1998; 48: 403-405.
112. Taherpour A, Maroofi A: Chemical composition of the essential oil of *Thalictrum minus* L. of Iran, *Natural product research*, 2008; 22: 97-100.
113. Gromova S, Lutsky I, Li D, Wood G, Owen L, Semenov A, Grant D: M.Thalicosides A1-A3, minor cycloartane bisdesmosides from *Thalictrum minus*, *Journal of natural products*, 2000; 63: 911-914.
114. Pelletier S: *Alkaloids: chemical and biological perspectives*, Pergamon, New York, 1992; 8: 108.
115. Buckingham J, Keith H, Baggaley, Roberts A, Laszlo S: *Dictionary of Alkaloids*, CRC Press, Southon, 1989; 2: 1067.
116. Krane B, Shamma M: The Isoquinolone Alkaloids, *J. Nat. Prod.*, 1982; 45: 377–384.
117. Baxter H, Harborne J, Moss G: *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, CRC Press, 1998; 2.: 220.
118. Schiff P: Bisbenzylisoquinoline Alkaloids, *J. Nat. Prod.*, 1997; 60: 934–953, 1997.
119. Kuzmanov B, Dutschewska H: Evolutionary pattern and alkaloid biosynthesis in *Thalictrum.*, *Journal of Natural Products*, 1982; 45: 766-771.
120. Wu C, Tang Y P, Ding W, You Q, Zhang L, Duan A: ¹³C-NMR data of three important diterpenes isolated from *Euphorbia* species., *Molecules*, 2009; *Izv.* 14: 4454-4475.
121. Polat M: Contact dermatitis due to *Allivum sativum* and *Ranunculus illyricus*: Two cases, *Contact Dermatitis*, 2007; 57: 279-280.
122. Oztas P, Gur G, Senlik B, Yalcin B, Polat M, Tamer E, Alli N: Phytocontact dermatitis due to *Ranunculus illyricus*: two cases, *Journal Of The European Academy Of Dermatology And Venereology*, *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2006; 20: 1372-3.
123. Iavarone C, Sen A, Trogolo C, Villa S: Mollugoside, an iridoid glucoside from *Galium mollugo.*, *Phytochemistry*, 1983; 22: 175-178.
124. Petterson D: The use of lupins in feeding systems – review, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2000; 13: 861-882.
125. Bell A: Non-protein aminoacids of *Lathyrus latifolius* as feeding deterrents and phagostimulants in *Spodoptera littoralis*, *Phytochemistry*, 1996; 43: 1003-1007.

126. <https://sl.wikipedia.org/wiki/Latirizem> (dostopano 29. 7. 2016)
127. Cui B, Kinjo J, Nohara T: Triterpene Glycosides from the Bark of *Robinia pseudo-acacia* L., *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 1992; 40: 2995-2995.
128. Welch K, Panter K, Gardner D, Stegelmeier B: The Good and the Bad of Poisonous Plants, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3550245/> (dostopano 18. 4. 2016)
129. Hänsel R, Keller K, Rimpler H: *Hagers Handbuch Der Pharmazeutischen Praxis Drogen A-D*, Springer Verlag, Berlin, 1992; 4: 805-807.
130. Wink M, Witte L, Hartmann T: Quinolizidine alkaloid composition of plants and of photomixotrophic cell suspension cultures of *Sarothamnus scoparius* and *Orobanche rapum-genistae*, *Planta Med*, 1981; 43: 342-352.
131. Annicchiarico P, Manunza P, Arnoldi A, Boschin G: Quality of *Lupinus albus* L.(white lupin) seed: extent of genotypic and environmental effects, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2014; 62: 6539-6545.
132. Carey D, Wink M, Elevational variation of quinolizidine alkaloid contents in a lupine (*Lupinus argenteus*) of the Rocky Mountains, *Journal of Chemical Ecology*, 1994; 20: 849-857.
133. Gremigni P, Hamblin J, Harris D, Cowling A: The interaction of phosphorus and potassium with seed alkaloid concentrations, yield and mineral content in narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*L.), *Plant and Soil*, 2003; 253: 413-427.
134. Vilariño P, Ravetta D: Tolerance to herbivory in lupin genotypes with different alkaloid concentration: Interspecific differences between *Lupinus albus* L. and *L. angustifolius* L., *Environmental and experimental botany*, 2008; 63: 130-136.
135. Adler S, Kittelson M: Variation in *Lupinus arboreus* alkaloid profiles and relationships with multiple herbivores, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2004; 32: 371-390.
136. Wink M: Quinolizidine Alkaloids, *Methods in Plant Biochemistry: Alkaloids and sulphur compounds*, 1993; 8: 197-239.
137. Maknickienė Z, Asakavičiūtė R: Alkaloid content variations in lupin (*Lupinus* L.) genotypes and vegetation periods, *Biologija*, 2008; 54: 112-115, 2008.
138. Cook D, Lee S, Gardner R, Pfister A, Welch D, Green T, Panter K: The alkaloid profiles of *Lupinus sulphureus*, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009; 57: 1646-1653.
139. Cook D, Lee S, Pfister A, Stonecipher A, Welch D, Green T, Panter K: Alkaloid Profiling as an Approach to Differentiate *Lupinus garfieldensis*, *Lupinus sabinianus* and *Lupinus sericeus*, *Phytochemical analysis*, 2012; 23: 278-284, 2012.
140. El-Shazly A, Ateya M, Wink M: Quinolizidine alkaloid profiles of *Lupinus varius orientalis*, *L. albus albus*, *L. hartwegii*, and *L. densiflorus*, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2001; 56: 21-30.

8 PRILOGE

Priloga 1: Umeritvena premica za spartein (metoda Lupanoidi 2).



Priloga 2: Tabela s podatki, nujnimi za izračun vsebnosti alkaloidov.

Vzorec	Metoda	Koncentracija primerljive konc. referenčne spojine sparteina [ppm]	AUC SS	AUC alkaloidov in referenčne spojine sparteina	Vsebnost
<i>C. sagittale</i>	M ₂	50,0	3383118	kaulofilin=1251135	185
				citizin=1101465	163
<i>G. tinctoria 1</i>	M ₂	-za kaulofilin: 500	14112261	kaulofilin: 10655695	3775
		-za citizin, termopsin: 50,0	571200	citizin: 419132 termopsin: 122167	367 107
<i>L. albus</i>	M ₂	-za lupanin: 100	1539449	865601	236
		-za spartein, amodendrin, hidroksilupanin*: 10,0	260587	spartein: 270741	104
				amodendrin: 300111	115
hidroksilupanin: 284171	109				
<i>G. sericea 2</i>	M ₁	10,0	260587	lupanin: 181240	69,6
				hidroksilupanin: 380769	146
<i>G. sericea 4</i>	M ₃	5,00	934148	lupanin: 1935559	104
				hidroksilupanin: 1723685	92,3
<i>L. polyphyllus A</i>	M ₂	-za lupanin: 1000	36640439	lupanin: 78744689	21491
		-za hidroksilupanin in angustifolin: 100	1539449	hidroksilupanin: 3431080	2228
<i>L. polyphyllus B</i>	M ₂	-za lupanin: 2000	52165188	36752215	14091
		-za hidroksilupanin in angustifolin: 100 ppm	1539449	hidroksilupanin: 3642871 angustifolin: 2039739	2366 1325
		-za spartein: 50,0	110183		96,5
<i>C. supinus 2, R</i>	M ₁	10,0	260587	lupanin: 427131	164
<i>C. supinus 2, A</i>	M ₁	50,0	3383118	lupanin: 931144	138
				spartein: 1289893	191
<i>C. supinus 2, B</i>	M ₁	50,0	3383118	lupanin: 5570812	823
<i>C. supinus 2, C</i>	M ₁	50,0	3383118	lupanin: 1630663	241
<i>C. supinus 2, D</i>	M ₁	-za lupanin: 50,0	3383118	lupanin: 7504065	1109
		-za amodendrin: 5,0	103780	amodendrin: 64256	31,0

*Pod imenom hidroksisparteina je mišljen 13- α -hidroksilupanin